



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**Programa Institucional de
Maestría en Ciencias Biológicas
PIMCB**

**Aislamiento, selección y caracterización de
bacterias con actividad celulolítica**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

Ingeniero Agrónomo

ESTEBAN ANGUIANO AGUILAR.

Directora de Tesis:

Doctora en Biotecnología de plantas

ANA TZTZQUI CHÁVEZ BÁRCENAS.

Co- tutor de tesis

Doctor

GUSTAVO JAVIER ACEVEDO HERNÁNDEZ

Uruapan, Michoacán, Marzo del 2019



Aislamiento, selección y caracterización de bacterias con actividad celulolítica

TESIS

Que se somete al jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ING. ESTEBAN ANGUIANO AGUILAR

Esta tesis fue desarrollada bajo la dirección de la Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas

APROBADA

Dr. Juan José Valdez Alarcón
Presidente del jurado

Dr. Gustavo Javier Acevedo Hernández
Sinodal

Dra. Martha Elena Pedraza Santos
Sinodal

Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas
Sinodal

Dra. María del Carmen Rocha Granados
Sinodal

DEDICATORIA

A Dios, por proteger mi caminar durante mi vida académica y personal. A mis padres les agradezco su esfuerzo, dedicación y trabajo; sé que su trabajo es duro y arduo; además sin importar si llegan cansados siempre tienen una sonrisa que ofrecerme, y motivarme para lograr culminar cada etapa de mi vida. A mis hermanas, por todos los bonitos momentos que hemos pasado juntos, por ser mi motivación, felicidad y alegría. A mi esposa por ser la persona que llego en el momento exacto de mi vida, sabes que ere sumamente importante y que juntos lograremos grandes metas.

A ustedes les dedico este proceso de formación como Maestro en Ciencias, el cual será base primordial de lo que constituirá mi vida profesional y laboral en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la persona maravillosa, tierna, dedicada, responsable, hermosa y amorosa, a la cual me honra en llamarle esposa. Amor gracias por ser parte fundamental de esta etapa, pero sobre todo por ser la persona que me acompañará durante el resto de mi vida, sabes que siempre estás en mi mente y corazón, te agradezco por compartir mis desvelos y brindarme la paciencia que me has tenido en todo momento. Sabes, me alegra que hallas sido el público que escuchaba una y otra vez mis ensayos a deshoras de la noche, todo porque me fuese bien en los exámenes. Sabes amor eres la persona que me complementa y que día a día amo más y más. No dudes que estaremos juntos para compartir triunfos y derrotas, que jamás te dejare sola en ningún momento. Gracias a mi criminóloga Favorita, TE AMO FUTURA MASTER.

A mis padres, les agradezco el apoyo infinito que me han brindado. Así mismo por ser los pilares más fuertes de nuestra casa, enseñándome a valorar la familia, el trabajo y la vida, por su valioso tiempo dedicado a mis hermanas y a mí. Del cual nos han enseñado a saber conllevar responsabilidades y afrontar adversidades que nos da la vida. Es por ello que agradezco infinitamente su paciencia y motivación para poder culminar este proyecto de vida. A mis hermanas, por ser las personas que han dado alegría a mi vida. Hermana mayor, (Chayito) gracias por tu valiosos tiempo y apoyo para todo este trámite del cual te tocó ser parte, corriendo de una oficina a otra en C.U, para que pudiese seguir la maestría. Aidee, mi hermana pequeña y flaca, la niña sonriente y carismática que le da alegría a la casa. Sabes cada ocurrencia que tienes hacia nosotros es increíble. Recuerden que siempre estaré para ustedes en lo que necesiten y pueda apoyarles. Las quiero hermanillas. A mi nueva familia Ventura Espinoza, por darme la oportunidad de ser parte de ustedes, y por el apoyo que me han brindado durante este tiempo.

Gracias infinitas a mis abuelos, sé que en presencia ya no está con nosotros mamá "Chayito", pero tu esencia y enseñanzas son las que recuerdo de ti y las tengo sumamente presente. Papá "Nelos", mamá Mari y papá Chuchín, gracias por su apoyo y sus valiosos consejos que han tenido a bien brindarme. Y como uno de ustedes me dijo: más vale un

buen consejo que un montón de dinero. Al resto de mi familia muchas gracias, por sus comentarios de aliento y apoyo.

GRACIAS a usted madrina TZTZQUI, por tener siempre de su apoyo desde que por primera vez fui a su laboratorio a pedir la oportunidad de trabajar un tiempo para poder realizar el verano, pero sobre todo por ser mi asesora, instructora, mentora y amiga, siendo todo un ejemplo a seguir, observando como usted ha sabido salir adelante enfrentando los grandes retos que nos depara la vida y de los que le he aprendido demasiado. A mis asesores de tesis los Drs. Gustavo Javier Acevedo Hernández, Ma. del Carmen Rocha Granados, Juan José Valdez Alarcón y Martha Elena Pedraza Santos, por ser partícipes en cada etapa, en la cual tuvieron a bien compartir su conocimiento, experiencias, palabras, pero sobre todo por su paciencia y comprensión en el transcurso de este proceso.

A mis compañeros y mentores que a lo largo de mis dos años de trabajo tuve la oportunidad de conocer; entre ellos los Drs, Araceli y Osvaldo, Tony, Chave, Renuqui, Victor, Lalo flash en si a toda la chaviza jalisciense. A mis compañeros del gran laboratorio IPA, (Abraham, Engy, Itzia, Lau, César, Nacho, Mayra y Jhony) que dejaron de ser mis amigos para convertirse en mi familia. Y claro también a los más peques del lab (Ale, Froy y Alan) A mi gran mentor el M.C Isaac que sin todo su apoyo no hubiese podido lograr cada experimento en este proyecto, por su buena vibra y compañerismo. A mis amigos entrañables Flor y Ángel, que no fue posible que compartiésemos el mismo lugar de estancia, pero si compartimos el mismo objetivo que fue realizar una maestría. Saben su apoyo fue de suma ayuda para este trayecto. No se me ha olvidado lo que les mencione hace dos años. 2016 “Recuerden par de tortolos, espero que aparte de ser mis amigos y familia del lab, algún día sean parte de mi familia, ustedes saben por qué lo digo. Eso ya huele a boda, pero que creen cuando menos se lo esperaban, les gane.

Los eurodramas, ustedes con los que he compartido grandes momentos de mi vida a lo largo del tiempo que los conozco. Gracias por su valiosa amistad y su apoyo, saben que son mis hermanos mayores. Jejeje. Rodearte de amistades entre los cuales están la Dra Claus, la Dentis Angy, la Teacher Lía, el Lic Ruiz, y la contadora de billetes, no de chistes Mia, es tener un gran tesoro que sabré cuidar y valorar.

A DIOS por darme la oportunidad de culminar esta etapa académica y favorecerme con el apoyo de mi familia, esposa y amigos. Para culminar mis agradecimientos les digo: El éxito no llega por suerte, son horas, días, semanas, meses y años de trabajo, pero sobre todo el secreto de mi gran éxito fue y ha sido el rodearme de personas como ustedes.
GRACIAS!!!!!!!!!!!!!!

ÍNDICE

ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT	XV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Compostaje	3
2.1.1 Fase Mesófila	4
2.1.2 Fase Termófila o Higienización	4
2.1.3 Mesófila II o enfriamiento	5
2.1.4 Maduración.....	5
2.2 Celulosa	5
2.3 Estructura de la celulosa	7
2.4 Biosíntesis de la celulosa	8
2.5 Catabolismo enzimático de celulosa	10
2.5.1 Estructuras implicadas en el catabolismo de la celulosa	10
2.5.1.1 Adherencia mediante complejos de celulosoma.....	10
2.5.1.2 Endoglucanasas	12
2.5.1.3 Exoglucanasas.....	12
2.5.1.4 β -glucosidasas	13
2.5.1.5 Adherencia por fimbrias	14
2.5.1.6 Adherencia de carbohidratos a la capa de glicocálix bacteriano	14
2.5.1.7 Adherencia mediante unión enzimática	14
2.5.2 Hemicelulasas	15
2.6 Aplicaciones industriales de enzimas celulolíticas	16
2.7 Microorganismos lignocelulolíticos y celulolíticos	18
2.7.1 Bacterias lignocelulolíticas	20
2.7.2 Bacterias celulolíticas	20
2.8 Mecanismos microbianos de bioconversión de la biomasa	22
2.9 Caracterización taxonómica de microorganismos	23
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVOS	27
Objetivo General:	27
Objetivos Específicos:	27
HIPÓTESIS	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Colecta de material	28
3.2 Aislamiento de bacterias edáficas.....	29
3.3 Actividad hemolítica	29
3.4 Determinación cualitativa de la capacidad celulolítica	30
3.5 Caracterización morfológica.....	30
3.6 Tinción de Gram.....	31
3.7 Dinámica de crecimiento bacteriano	32
3.8 Sincronización de las curvas de crecimiento	33

3.9	Determinación de la temperatura óptima para el crecimiento de aislados celulolíticos	34
3.10	Determinación de pH del medio de cultivo en relación con la temperatura para la actividad celulolítica	34
3.11	Determinación bioquímica.....	34
3.11.1	Azúcares reductores.....	35
3.12	Pruebas de antagonismo	36
3.13	Cromatografía de capa fina.....	36
3.14	Caracterización molecular.....	37
3.14.1	Extracción de DNA genómico.....	37
3.14.2	Amplificación por PCR del gen 16S rDNA.....	38
3.14.3	Secuenciación y análisis de secuencias	39
3.14.4	Construcción de árboles filogenéticos.....	39
3.15	Análisis estadístico.....	40
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1	Aislamiento y caracterización de bacterias con capacidad de degradar celulosa.....	41
4.2	Aislados con capacidad de degradar celulosa, difieren en su potencial para catabolizar CMC en condiciones <i>in vitro</i>	49
4.3	Caracterización molecular de los aislados con capacidad celulolítica.....	59
4.3.1	Análisis de las secuencias.....	60
4.4	Actividad antagónica de bacterias con actividad celulolítica.....	65
V.	CONCLUSIONES.....	68
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Pagina
1. Cuadro 1. Propiedades de enzimas extraídas de bacterias celulolíticas aerobias y anaerobias. (Frank <i>et al.</i> , 1992 modificada por Sadhu y Kanti, 2013).....	21
2. Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen rDNA 16S.....	39
3. Cuadro 3. Características fenotípicas de aislados con capacidad celulolítica de los cinco sitios de muestreo.....	43
4. Cuadro 4. Aislados con capacidad celulolítica. Microorganismos celulolíticos obtenidos de las cinco zonas de muestreo, ubicados en Nuevo Parangaricutiro y Angahuan.....	44
5. Cuadro 5. Características físico químicas y catalíticas de aislados con capacidad celulolítica de los cinco sitios de muestreo.....	50
6. Cuadro 6. Porcentaje de homología en muestras de las secuencias 16S. 18 aislados obtenidos de los cinco sitios de colecta en la base de datos del NCBI mediante el análisis BLAST.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pagina
1. Figura 1. Estructura general de las fibras de celulosa biosintetizadas por plantas....	6
2. Figura 2. Estructura de la celulosa; a la izquierda β - glucosa; a la derecha la unión de moléculas de β -glucosa por enlaces tipo β 1- 4.....	7
3. Figura 3. Representación de las estructuras I α y I β ilustradas por Sturcova <i>et al.</i> , 2004 y Credou <i>et al.</i> , 2014.....	8
4. Figura 4. Esquema de la obtención de estructuras cristalinas de la celulosa mediante transformaciones químicas descrita por Klemm <i>et al.</i> , 2005.....	8
5. Figura 5. Diagrama desglosado de la síntesis de la celulosa con la interacción de la P-Susy. P-Susy muestra a canalización de UDP-glc en la síntesis (Haigler <i>et al.</i> , 2001).....	9
6. Figura 6. Diagrama de las celulasas endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas sobre la celulosa amorfa y cristalina.....	12
7. Figura 7. Propiedades climáticas y parámetros fisicoquímicas del suelo en los diferentes nichos de las comunidades bacterianas.....	18
8. Figura 8. Representación esquemática de los mecanismos de hidrólisis de celulosa. Los microorganismos aeróbicos secretan las enzimas al medio extracelular (a), mientras que los anaeróbicos forman complejos multienzimáticos llamados celulosomas (b). En los hongos anaeróbicos (c) se postula la formación de complejos enzimáticos que son secretados el medio extracelular (Haitjema <i>et al.</i> , 2014).....	23
9. Figura 9. Localización de los sitios de colecta en Nuevo Parangaricutiro, Mich. Conformados por composta, lombricomposta, zona volcánica y zona boscosa.....	28
10. Figura 10. Protocolo de evaluación de actividad hemolítica en medio agar-sangre con patrones de actividad hemolítica, α (alfa), β (beta), γ (gama).....	30
11. Figura 11. Características de colonias bacterianas de acuerdo a su forma, elevación, borde etc. Descrito por Wolin 1973.....	31
12. Figura 12. (A) Protocolo tinción de Gram, (B) aislado Gram +, (C) aislado Gram -.	32
13. Figura 13. Protocolo para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) (Alexander, 1982). Ejemplo hipotético para la cuantificación de UFC al	

obtener 159 colonias a partir de 100 μL de una dilución de 1×10^{-3} del inoculo original.....	33
14. Figura 14. Morfología colonial de aislados celulolíticos creciendo en medio sólido con CMC como única fuente de carbono. A corresponde al aislado S2Z1A; B, S2Z5B; C, S3Z3C; D, S5Z1D; E, S2Z1B; F, S2Z1F; G, S3Z1D; H, S2Z1E; I, S3Z2A; J, S2Z2B; K, S5Z1A y L, S2Z2E.....	44
15. Figura 15. Media del diámetro de halos de degradación de CMC como lo reporta Viteri <i>et al.</i> (2016). Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$ y $\alpha = 3$).....	45
16. Figura 16. Halos de degradación de colonias bacterianas. A-C colonias S1Z1A, S2Z1E y S2Z1F crecidas en medio CMC; D aislado S3Z1B después de 24 horas de incubación a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ representa la morfología colonial del aislado crecido en medio LB después de 48 horas de incubación a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; E-H, halos de degradación de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.....	45
17. Figura 17. Halos de degradación de colonias bacterianas. I-L colonias S2Z1B, S5Z1B, S3Z3C y S5Z1D crecidas en medio CMC; M-O, halos de degradación de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.....	46
18. Figura 18. Halos de degradación de colonias bacterianas. P, Q y S colonias S2Z2B, S3Z2A y S2Z2E crecidas en medio CMC; R aislado S5Z1A después de 24 horas de incubación a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ representa la morfología colonial del aislado crecido en medio LB después de 48 horas de incubación a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; T-W, halos de degradación de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.....	46
19. Figura 19. Curvas de degradación de azúcares reductores mediante el método de Somogyi y Nelson. El punto de inicio se tomó 4 horas antes de la fase exponencial de cada uno de los aislados celulolíticos. La Figura A muestra los aislados tomados desde las 12 hasta 24 horas de reducción de azúcares, en la Figura B se observan aislados con punto de inicio desde las 16 a 28 horas. La Figura C con fase desde las 24 a las 36 horas de crecimiento. Todos los aislados crecidos en medio CMC a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 130 rpm.....	52
20. Figura 20. Cromatografía de Capa Fina (TLC) en cromatoplasmas de $20 \times 20\text{ cm}$ (Merck) con gel de sílice G 60 F254 de 0.25 mm de espesor, como marcadores de	

corrida se emplearon los azúcares CMC, Celobiosa, Maltosa, Dextrosa y Mix, posterior se muestran los 24 aislados crecidos en medio CMC al 1 % hasta su fase exponencial.....54

21. **Figura 21.** Media del diámetro de halos de crecimiento en CMC a diferentes temperaturas. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$ y $\alpha = 3$).....58

22. **Figura 22.** Media del pH de aislados celulolíticos crecidos a diferentes temperaturas. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$ y $\alpha = 3$)....59

23. **Figura 23.** Amplificación por PCR del Gen 16S de los aislados celulolíticos S1Z1A, S1Z1D, S1Z2C, S2Z1E, S2Z1F, S2Z1G, S2Z2B, S2Z2C, S2Z2D, S2Z2E, S3Z1A, S3Z3D, S3Z3C, S5Z1A, S5Z1B, S5Z1D, S1Z5A, S2Z1B y visualizados en geles de agarosa al 0.8 % mediante electroforesis.....60

24. **Figura 24.** Relación filogenética generada con la secuencia del gen ribosomal 16S de aislados con capacidad celulolítica extraídos en el municipio de Nuevo Parangaricutiro. La topología del árbol fue generada con el método de Neighbor-Joining a partir de un alineamiento múltiple usando el programa CLUSTALW; las distancias genéticas se obtuvieron con el método de Jukes-Cantor y la topología del árbol fue corroborada por un Bootstrap de 1000 repeticiones (valores en las ramas expresadas en porcentaje). Los números de acceso de las secuencias obtenidas de los bancos de datos internacionales se indican antes del nombre del microorganismo al que pertenecen. Para enraizar el árbol se utilizó una secuencia del gen 16S de *Escherichia coli* (J01859.1).64

25. **Figura 25.** Confrontación de los aislados celulolíticos de acuerdo a su capacidad para degradar carboximetilcelulosa (CMC) extraídos de diferentes zonas de colecta. 1-2 son los aislados S1Z1D y S1Z2C; 3, 4, 5 y 7, representan los aislados S2Z1B, S2Z1E, S2Z2B y S2Z2E. 8 y 9, son aislados extraídos del sitio 3 que representan a S3Z1B y S3Z3E. El aislado S5Z1D es representado por la numeración 6. Todos fueron crecidos en medio CMC, durante 48 horas a 35 °C.....66

26. **Figura 26.** Confrontación de los aislados celulolíticos con mayor capacidad celulolítica de acuerdo a su capacidad de degradar carboximetilcelulosa (CMC)

extraídos de diferentes zonas de colecta. En la imagen **A** la cepa que resulto ser antagónica es la 1 (S1Z1D), **B** la cepa 6 (S5Z1D) por su parte la cepa 2 (S1Z2C) correspondiente a la imagen **C**, de la letra **D-I**, la cepa antagónica fue la 4 (S2Z1E). Los aislados fueron crecidos en medio CMC, durante 48 horas a 35 °C.....67

RESUMEN

La producción de celulasas bacterianas en hongos y bacterias celulolíticas ha generado gran interés por sus propiedades enzimáticas, tales como estabilidad a altas temperaturas, amplios rangos de pH y concentraciones de iones elevados, entre otras. En este trabajo se aislaron microorganismos con potencial celulolítico a partir de muestras de composta, lombricomposta, suelo volcánico y bosque; localizados en Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. Se obtuvieron 25 aislados con actividad celulolítica, y se caracterizaron de acuerdo con los análisis de morfología celular, colonial, tinción de Gram y cinética de crecimiento en medios de cultivo suplementado con carboximetilcelulosa (CMC). Posteriormente se realizaron pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, donde se observó que 8 eran capaces de crecer a temperaturas de hasta 70 °C y 17 hasta temperaturas de 40 °C. Adicionalmente se cuantificó la actividad celulolítica por medio de la determinación de azúcares reductores en extractos de los cultivos líquidos, donde se usó CMC como fuente de carbono. Los aislados S1Z2A, S5Z1A y S3Z3D, mostraron la mayor capacidad celulolítica con 100 µg de glucosa por mL en 22 horas de incubación. La identificación y filogenia de 18 de los 25 aislados se logró a través de la comparación de la secuencia del gen ribosomal 16S, de los cuales, 17 presentaron homología con el género *Bacillus* y uno con el género *Stenotrophomonas*. Por su parte, la inferencia de relaciones filogenéticas con base en la secuencia del gen 16S, indicó que 10 aislados son afines a *B. pumillus*; los aislados S2Z1B, S2Z1E, S2Z2E y S3Z3C se agrupan con *B. subtilis*; S2Z1F, S2Z2B y S2Z2 con *B. altitudinis/tequilensis* y S1Z5A con *Stenotrophomonas spp.* Finalmente, los aislados S2Z1B, S2Z1E, S2Z2E, S3Z1B y S3Z3E fueron capaces de desarrollarse simultáneamente *in vitro* sin generar antagonismos. Se propone su evaluación individual o en consorcios para prácticas biotecnológicas y agrícolas.

Palabras clave: Carboximetilcelulosa, aislados, celulolítico, filogenia y extractos.

ABSTRACT

The production of bacterial cellulases in fungi and bacteria, has generated great interest due to the enzymatic properties of these proteins, such as their stability at high temperatures, wide pH ranges of activity, and elevated ion concentrations tolerance, among others. In this work, microorganisms with cellulolytic potential were isolated from samples of compost, worm compost (manure worms), soil from the Paricutin volcano and two other from distinct forest sites; located in Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. We obtained 25 cellulolytic isolates, that were characterized by analysis of cell, colony morphology, Gram-stain and growth kinetics in culture media supplemented with carboxymethylcellulose (CMC). The isolates underwent growth tests at different temperatures, where it was observed 8 of them were able to grow at temperatures up to 70 °C and 17 were able to grow up at temperatures below 40 °C. The cellulolytic activity of the isolates was quantified indirectly by measuring the reducing sugars in culture extracts growth in liquid medium for each isolate, where CMC was used as a carbon source. The isolates S1Z2A, S5Z1A and S3Z3D, showed the highest cellulolytic capacity with 100 g of glucose per mL in 22 hours of incubation. The identification and phylogeny of 18 of the 25 isolates was achieved through the comparison of the sequence of the rDNA 16S, 17 isolates presented homology with the genus *Bacillus* and one with the genus *Stenotrophomonas spp.* The phylogenetic inference based on the sequence of the gene 16S, indicated that 10 isolates are related to *B. pumillus*; isolates S2Z1B, S2Z1E, S2Z2E and S3Z3C are grouped with *B. subtilis*; S2Z1F, S2Z2B and S2Z2 with *B. altitudinis/tequilensis* and S1Z5A with *Stenotrophomonas*. Finally, S2Z1B, S2Z1E, S2Z2E, S3Z1B and S3Z3E were able to develop simultaneously *in vitro* in co-culture without generating antagonisms among them. We propose individual evaluation or in consortiums for biotechnological purposes.

Key words: carboxymethylcellulose, isolated, cellulolytic, phylogeny and extracts.

I. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen diversas condiciones que interactúan con los procesos vitales de los microorganismos. Los factores geoquímicos (pH y salinidad) y físicos (temperatura, presión y radiación), actúan como agentes estresantes sobre la diversidad de microorganismos (Van den Burg 2003). Existen microorganismos capaces de presentar una respuesta de adaptabilidad en ambientes extremos; estos con características en la diferenciación de expresión de genes, síntesis de tipos particulares de enzimas y resistencia a los valores extremos de parámetros ambientales (pH, temperatura, presión) (Clarke 2003). La presencia de microorganismos con dichas condiciones son importantes para su uso en la biotecnología (Nicolaus *et al.*, 2010 ; Ferrer *et al.*, 2007). Es por ello, que en años recientes la búsqueda de microorganismos con potencial biotecnológico se ha centrado en la microbiota natural (Godoy *et al.*, 2013). Las Bacterias y Archaea a menudo se describen como los organismos más resistentes para sobrevivir en ambientes expuestos a duras condiciones difíciles (Wilson y Brimble, 2009). Durante el proceso de intemperismo, después de las etapas iniciales, favorecidas por factores físicos y químicos, se propicia el establecimiento de microorganismos con ciertas particularidades metabólicas como fotótrofos fijadores de nitrógeno y quimiolitótrofos. Posteriormente, las interacciones de microorganismos con raíces de plantas favorecen el establecimiento de comunidades vegetales (Voroney, 2007). La microbiota natural secreta enzimas hidrolíticas y despolimeriza los componentes orgánicos de diferentes residuos orgánicos (Rodríguez y Llenque, 2016). Poli *et al.* (2010) describen la biosíntesis de polisacáridos como una etapa importante de supervivencia, ya que los polisacáridos cubren y protegen a las células contra el medio ambiente, manteniendo la temperatura y contribuyendo a la adquisición de nutrientes. Desde un punto de vista biotecnológico, podría ser útil estudiar los organismos que se encuentran en ambientes hostiles; estos organismos pueden poseer enzimas que degradan moléculas complejas, como la celulosa, la cual está presente en la mayoría de los desechos vegetales fibrosos (Blumer-Schuett *et al.*, 2008 ; Bisaria y Ghose, 1981). Se sabe que, desde 1930 este tipo de moléculas han sido implementadas en las industrias de alimentos, textiles, biocombustibles, alimento animal y en la agrobiotecnología (Bhat, 2000). Sin embargo, debido a su compleja estructura, la degradación completa de la celulosa requiere la actividad de diversas enzimas, denominadas celulasas (Tengerdy y

Szakacs 2003). La endoglucanasa, exoglucanasa, celobiohidrolasa y glucosidasa, son celulasas que actúan de manera complementaria en la hidrólisis de oligosacáridos y polisacáridos unidos mediante enlaces β 1-4 a monómeros de glucosa (Pachón y Perea, 2010). De manera específica la endo β 1-4 glucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces β 1-4 glucosídicos intramoleculares, para generar oligosacáridos. Por su parte la exo β 1-4 celobiohidrolasa cataboliza los extremos no reductores del sustrato generando unidades de celobiosa o glucosa y por último la β 1-4 glucosidasa, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa (Viteri *et al.*, 2016). Así, el aislamiento de microorganismos capaces de degradar las celulosas, tendrían amplias aplicaciones en la industria, posiblemente apoyando el desarrollo de procesos de fermentación alternativos a temperaturas más altas o más bajas, optimizando la degradación de la celulosa, o inhibiendo la contaminación durante este proceso (Gorlach-Lira y Coutinho 2007). Tales desarrollos podrían mejorar la optimización de la conversión de celulosa, generando otros azúcares y mejorando aún más la generación de biofertilizantes para la agricultura (Wilson 2009; Leschine 1995; Hough y Danson 1999). El suelo y zonas que se encuentran en ambientes extremos puede servir como fuente de bioprospección de organismos celulíticos que producen varias celulasas, entre otras cosas, por que los microorganismos que se desarrollan en condiciones extremófilas son capaces de sintetizar proteínas capaces de resistir condiciones fisico-químicas de medios extremos como pH, temperatura, salinidad, entre otras. Además el compostaje es una alternativa donde se reduce el volumen y el peso en un 50 % de los residuos orgánicos; dando como resultado un producto estable que puede utilizarse para mejorar las propiedades químicas y físicas de los suelos para fines agrícolas (Medina *et al.*, 2015). Es por ello que en el presente trabajo se propuso aislar y caracterizar bacterias edáficas con actividad celulolítica extraídas de cinco zonas de Nuevo Parangaricutiro, Michoacán.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Compostaje

El compostaje es una herramienta biotecnológica importante para el tratamiento de residuos agrícolas que conlleva un proceso de descomposición biológica aerobia. Con la adecuada humedad y temperatura se da una transformación higiénica y segura de los residuos orgánicos. Posterior a la transformación se obtiene un insumo de material homogéneo y asimilable para las plantas, un ejemplo son los ácidos húmicos destinados para la producción agrícola que ayudan para mejorar las propiedades químicas y físicas de suelos (Medina *et al.*, 2015).

Ya que el compostaje es un proceso biológico llevado a cabo por microorganismos, se deben tener en cuenta diversos parámetros que afectan el crecimiento y reproducción de la microbiota. Estos factores incluyen el oxígeno o aireación, la humedad de sustrato, tamaño de partícula, temperatura, pH, pruebas de calidad (la relación C:N, contaminación con metales pesados y microbiológicos) (Castillo *et al.*, 2016). La humedad óptima para el crecimiento microbiano se encuentra entre el 50 y 70 %. La actividad biológica decrece cuando la humedad está por debajo del 30 %. Por encima del 70 % el agua desplaza al aire en los espacios libres existentes entre las partículas, se reduce por lo tanto la transferencia del oxígeno produciendo anaerobiosis (Álvarez, 2003).

Es posible interpretar el compostaje como el sumatorio de procesos metabólicos realizados por parte de diferentes microorganismos, que en presencia de oxígeno, aprovechan el nitrógeno (N) y el carbono (C) presentes para producir su propia biomasa (Camacho *et al.*, 2014). La relación C/N óptima durante el inicio del proceso del compostaje de residuos, es de 25 hasta 35. Si la relación es más alta, la descomposición es más lenta y una baja relación impide la descomposición, por lo que se considera que una relación de 30/1 es favorable para el desarrollo de los microorganismos (Salazar, 2014). Si la relación es < 20 durante el compostaje, se podría producir amoníaco, lo cual no solamente daña al medio ambiente sino también empeora el proceso de composteo (Camacho *et al.*, 2014).

Al descomponerse la materia orgánica inicial, los microorganismos desprenden calor medible a través de las variaciones de temperatura a lo largo del tiempo. Según la

temperatura generada durante el proceso, se reconocen tres etapas o fases principales del compostaje, además de una etapa de maduración (Bonilla y Rivas, 2004). Las fases se definen convencionalmente en términos de los tipos de poblaciones de bacterias y hongos que proliferan en las gamas de diferentes temperaturas; fase mesófila (21 – 48 °C), termófila o higienización (45 – 68 °C) mesófila II o enfriamiento (40 – 45 °C) y maduración (Gaitán y Pérez, 2007).

2.1.1 Fase Mesófila

El proceso de compostaje comienza con material orgánico abundante a temperatura ambiente. En pocos días e incluso en horas, la temperatura aumenta hasta los 45 °C. Este aumento de temperatura es debido a actividad microbiana mesofílica donde predominan las bacterias, levaduras, mohos y actinomicetos. Salazar en 2014 menciona que en esta fase los microorganismos utilizan las fuentes sencillas de C y N generando calor. La descomposición de compuestos solubles, como azúcares, almidón, proteínas y ácidos orgánicos, liberan gran cantidad de energía por tanto el pH puede bajar hasta cerca de 4.0 o 4.5 con una duración de entre dos y ocho días (Paradelo *et al.*, 2013).

2.1.2 Fase Termófila o Higienización

Esta fase comienza cuando el material alcanza temperaturas mayores que los 45 °C, los microorganismos mesófilos son reemplazados por aquellos que crecen a mayores temperaturas, principalmente por bacterias del grupo de actinomicetos (*Micromonospora* y *Streptomyces* y bacterias termofílicas (Álvarez, 2003). A partir de los 60 °C las bacterias que producen esporas y actinobacterias, son las encargadas de descomponer las ceras, hemicelulosas y otros compuestos complejos de celulosa. Esta fase puede durar desde unos días hasta meses según la composición de material orgánico, las condiciones climáticas y otros factores (Olalde y Aguilera, 1998).

Esta fase también recibe el nombre de fase de higienización ya que el calor generado destruye bacterias y contaminantes de origen fecal como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., esta fase es importante ya que las temperaturas por encima de los 55 °C inhiben el crecimiento de quistes, huevos de helminto, esporas de hongos fitopatógenos y semillas

de malezas que pueden encontrarse en el material de partida, dando lugar a un producto higienizado (Gaitán y Pérez, 2007).

2.1.3 Mesófila II o enfriamiento

En la tercera etapa donde ya se agotaron las fuentes de carbono y en especial el nitrógeno de fácil asimilación en el material de composteo, la temperatura desciende nuevamente hasta los 40 – 45 °C. Durante esta fase, continúa la degradación de polímeros como la celulosa y aparecen algunas bacterias de los géneros *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Pseudomonas*; además son comunes hongos de los géneros *Aspergillus* y *Mucor*, que pueden ser visibles a simple vista. Al bajar de 40 °C, los organismos mesófilos reinician su actividad y el pH se mantiene ligeramente alcalino. Esta fase de enfriamiento requiere de varias semanas y puede confundirse con la fase de maduración (Román *et al.*, 2013; Thomas y Schaechter, 2012).

2.1.4 Maduración

Es un período que demora meses a temperatura ambiente, durante los cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización de compuestos carbonados para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos (Camacho *et al.*, 2014).

Una alternativa para mejorar el proceso de composteo es la búsqueda de microorganismos con capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas bajo diferentes condiciones de pH y temperaturas que permitan acelerar el proceso de compostaje. Se asume que este proceso se acelera al incrementar el número de microorganismos nativos o externos, mediante la bioaumentación que es la adición artificial de la microbiota (Peña Acuña. 2009 y Camacho *et al.*, 2014).

2.2 Celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante en el planeta, comparado con los demás biopolímeros juntos (Mathews J. *et al.*, 2006). Fue descubierta en 1838 por el químico francés Anselmo Payen tras tratar diferentes tejidos vegetales. Las fibras tratadas eran de un material con fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$ con un valor mínimo de $n=2000$, igual al azúcar

y almidón (Figura 1) (Wüstenberg, Tanja *et al.*, 2014).

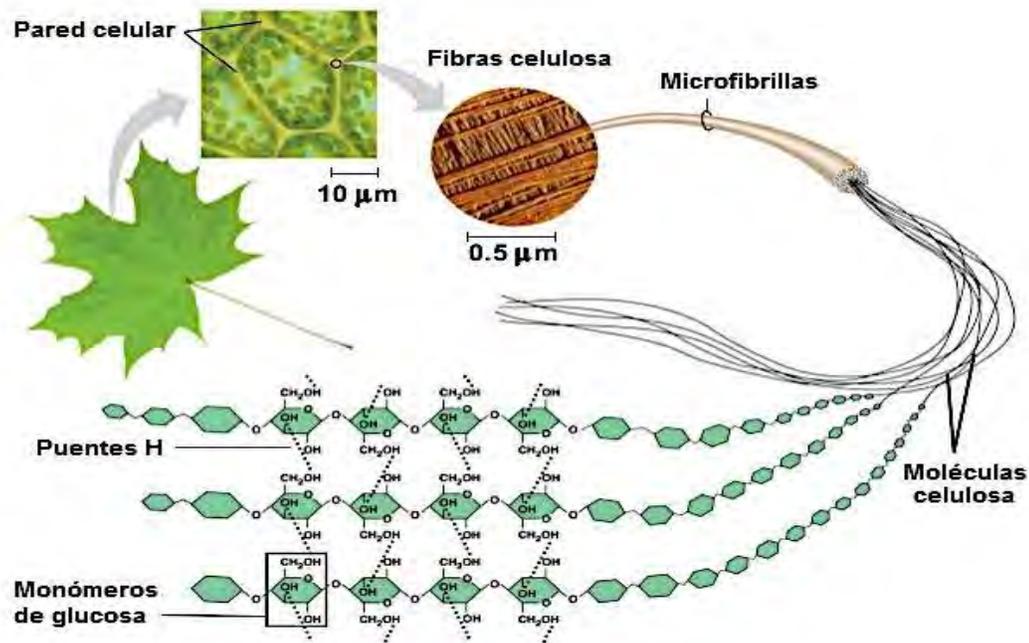


Figura 1. Estructura general de las fibras de celulosa biosintetizadas por plantas.

La biosíntesis de celulosa en la naturaleza ocurre en diferentes microorganismos, principalmente plantas y algunos grupos de hongos (género *Dictyostelium*); sin embargo, también se puede obtener celulosa de manera sintética por síntesis enzimática en condiciones *in vitro* a partir de derivados de glucosa bencilados (Nakatsubo *et al.*, 1996). En la industria, la fuente principal de materia prima para la celulosa es la pasta derivada de la madera (Anon, 2005). Para la producción de papel se utiliza el 97 % de pulpas de celulosa y sólo el 0,24 % para la producción de fibras, biopelículas y la síntesis de ésteres y éteres de celulosa (Wüstenberg, Tanja *et al.*, 2014). En plantas, las paredes celulares se son un importante repositorio natural de celulosa, ésta se deposita en forma de microfibras de celulosa cristalina, que se embeben en una matriz de polisacáridos complejos de los que se distinguen dos clases: pectinas y hemicelulosa. Estos tres elementos principales constituyen la pared primaria de los vegetales, la cual puede sufrir procesos de expansión por elongación celular (Cosgrove, 2005). La pared secundaria se deposita una vez que el proceso de elongación celular cesa, lo que ocurre de manera particular, en elementos traqueales y fibras en plantas vasculares. La composición de la pared celular secundaria

tiene como base microfibras de celulosas, las cuales están ligadas entre sí por polímeros estructuralmente complejos como hemicelulosa y lignina (Zong y Ye, 2015).

2.3 Estructura de la celulosa

La celulosa es un polisacárido compuesto por moléculas de β -D- glucosa unidas por enlaces β 1- 4 (Ramírez, 2014). Su peso molecular es variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ y con un valor mínimo de $n=200$ (Gómez *et al.*, 2013). Cada monómero de glucosa tiene una rotación de 180 grados respecto a su eje, el cual se estabiliza por la formación de enlaces inter e intramoleculares de puentes de hidrógeno. Estas uniones dan origen a cadenas lineales con grupos OH- de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, evitando ser solvatadas por agua (Figura 2) dando lugar a la formación de un polímero no ramificado (Llacza, 2012 y Paradelo *et al.*, 2013).

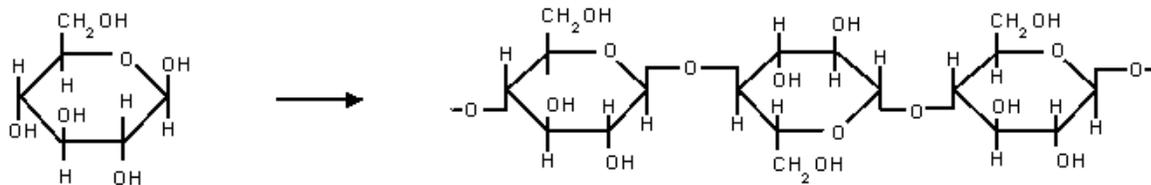


Figura 2. Estructura de la celulosa; a la izquierda β - glucosa; a la derecha la unión de moléculas de β -glucosa por enlaces tipo β 1- 4.

La celulosa puede llegar a formar 6 estructuras cristalinas distintas: celulosa I, II, III, IV, V y VI. La celulosa I y II se encuentran en la naturaleza, las demás son obtenidas por medio de transformaciones químicas o térmicas. La celulosa I se divide en dos formas más $I\alpha$ y $I\beta$ (Figura 3), la forma $I\alpha$ es sintetizada por bacterias y algas, mientras que la celulosa $I\beta$ predomina en las plantas (Sturcova *et al.*, 2004). Esta última presenta mayor grado de cristalinidad y estabilidad termodinámica, ya que se puede obtener de la naturaleza o por un proceso de regeneración de la celulosa I (Credou *et al.*, 2014). A partir de las dos formas antes descritas y mediante las transformaciones químicas esquematizadas en la Figura 4, es posible obtener las demás formas cristalinas que existen (Figura 4).

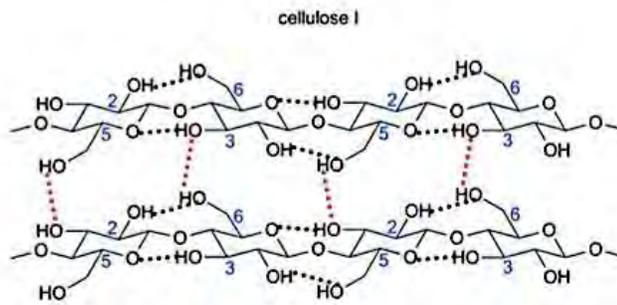


Figura 3. Representación de las estructuras I α y I β ilustradas por Sturcova *et al.*, 2004 y Credou *et al.*, 2014.

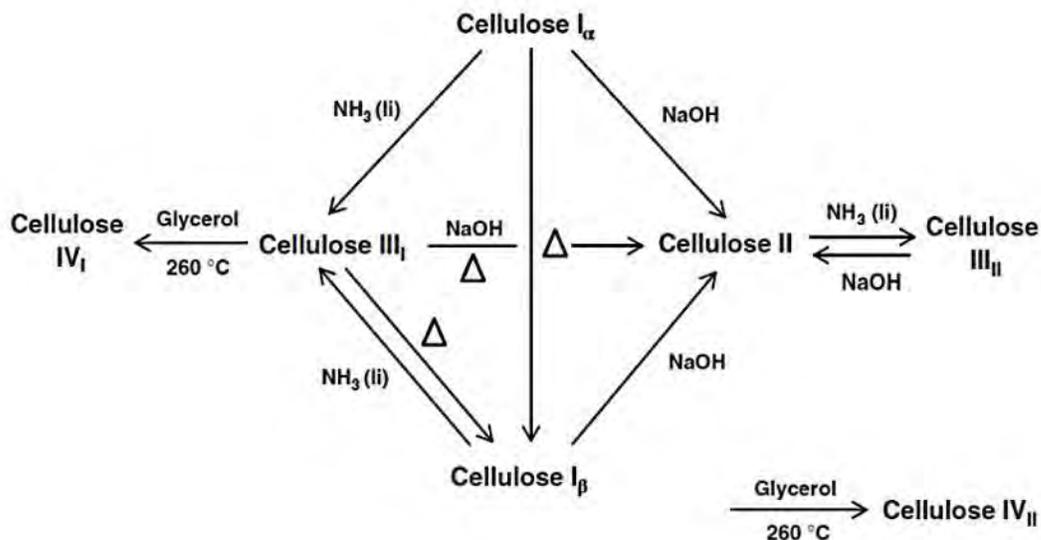


Figura 4. Esquema de la obtención de estructuras cristalinas de la celulosa mediante transformaciones químicas descrita por Klemm *et al.*, 2005.

2.4 Biosíntesis de la celulosa

Un modelo molecular y bioquímico basado en fibras de algodón (*Gossypium hirsutum* L. cv Acala SJ-1) sugieren que la síntesis de celulosa depende de la actividad enzimática de la sacarosa sintasa (SuSy; 2.4.1.13 E.C.) que cataliza la reacción.



En plantas superiores, la molécula precursora de las unidades de glucosa de la celulosa es la sacarosa, la cual es catabolizada por la SuSy para generar como producto fructosa y

UDP-glucosa. En una reacción subsecuente, la UDP-glucosa es usada como sustrato por la celulosa sintasa, enzima que se encuentra localizada en la membrana plasmática y en forma de roseta con varias subunidades de celulosa sintasa unidas (Jarvis *et al.*, 2013). La zona de biosíntesis está asociada con la pared celular secundaria, la cual cuenta con alto contenido de celulosa (Amor *et al.*, 1995; Haigler *et al.*, 2001). Este modelo fue demostrado por microscopía electrónica, entre otras cosas, por la localización subcelular de la SuSy por inmunolocalización, que se encontró asociada a los sitios de formación de paredes secundarias (Salnikov *et al.*, 2001). El modelo de biosíntesis de celulosa en donde está implicada la SuSy, sugiere que la sacarosa es el sustrato preferido para la síntesis de celulosa, por lo menos durante la deposición de la pared secundaria, como se ha demostrado directamente en las fibras de algodón (Acharya *et al.*, 2012). Es por ello que se considera que la disponibilidad de sacarosa en la célula podría afectar a la tasa de síntesis de celulosa (Figura 5). La canalización de UDP-Glucosa a celulosa sintasa mediada por SuSy, da como resultado la liberación de una molécula de Fructosa, la cual puede ser ingresada a la ruta de biosíntesis de celulosa a través de la acción de sacarosa-fosfato sintasa (Delmer, 1999).

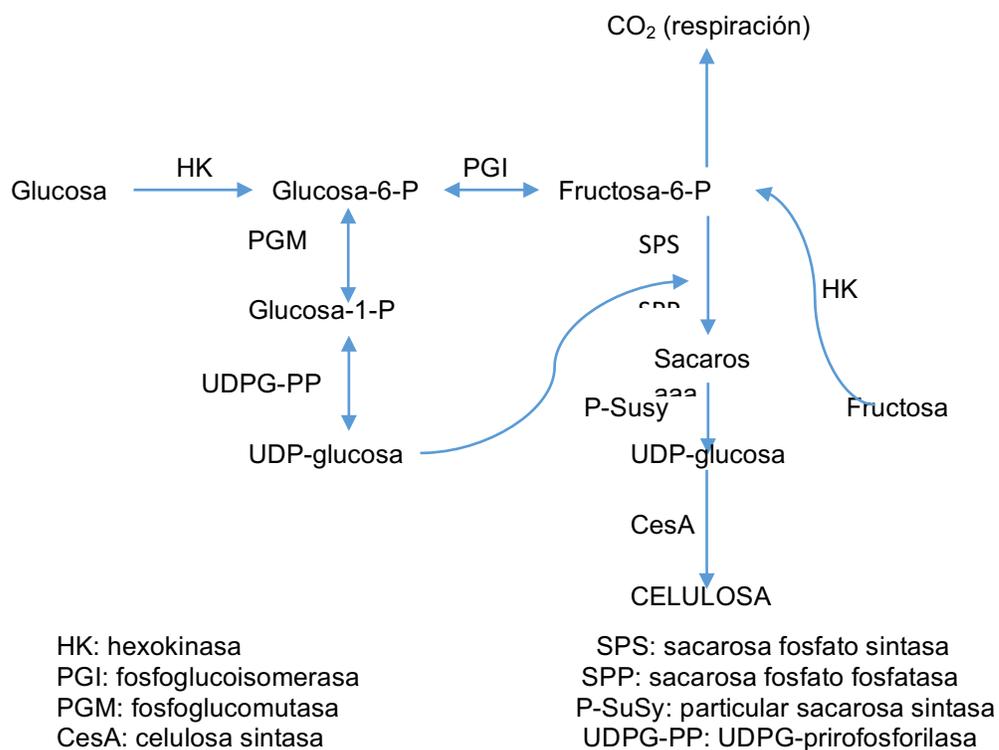


Figura 5. Diagrama desglosado de la síntesis de la celulosa con la interacción de la P-Susy. P-Susy muestra a canalización de UDP-glc en la síntesis (Haigler *et al.*, 2001).

2.5 Catabolismo enzimático de celulosa

Existen diversas enzimas importantes involucradas en distintos procesos que conllevan a la formación de polímeros. Tal es el caso del ciclo del C donde actúan endocelulasas, exocelulasas, y β -glucosidasas. Además, un conjunto diverso de enzimas, tales como endoxylanases, xilosidasas, xiloglucanasas, endomanosas, manosidasas, fucosidasas, arabinosidasas, pectinasas y lignilolíticas, que son necesarias para la hidrólisis de otros polímeros (Rytioja *et al.*, 2014 y Lladó *et al.*, 2017). Sin embargo, las glicosil-hidrolasas (GH) son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos y, para lograr una hidrólisis eficiente de la celulosa y hemicelulosa, se complementan con otras enzimas, como las xilanasas, las esterases que remueven esteres fenólicos, metilo y acetilo o bien polisacárido liasas y monooxigenasas líticas de polisacáridos (Payne *et al.*, 2005).

2.5.1 Estructuras implicadas en el catabolismo de la celulosa

Las investigaciones se han centrado en cuatro estructuras de importancia, debido a su adherencia específica a la celulosa. La primera es mediante complejos llamados celulosomas, la segunda por la adhesión de fimbrias (Morrison y Miron, 2000), la tercera por la unión de carbohidratos en la capa del glicocálix bacteriano (Miron y Forsberg, 1999) y la cuarta por la unión enzimática (Mitsumori y Minato, 1999).

2.5.1.1 Adherencia mediante complejos de celulosoma

Los celulosomas son complejos multienzimáticos especializados en la adherencia y degradación de la celulosa que reside en la superficie celular. El complejo celulosómico se compone de una subunidad no catalítica central llamada scaffoldin (andamiaje) y un dominio de acoplamiento llamado dockering (Shoham y Lamed., 1999). El celulosoma más complejo y mejor investigado es el de la bacteria termófila *Clostridium thermocellum* y más recientemente en otras bacterias y hongos evolutivamente más distantes. Sin embargo, cabe señalar que muchos de los sistemas celulolíticos, particularmente en microorganismos aerobios, están constituidos por enzimas libres (Warren., 1996; Bayer *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998). Los celulosomas son complejos multienzimáticos cuyos

componentes actúan de manera sinérgica para hidrolizar a la celulosa (Bayer *et al.*, 1994). Inicialmente dicho complejo fue descrito como un factor antigénicamente activo que se une a la celulosa y que se localiza en la superficie de la célula. Los celulosomas funcionan como estructuras exocelulares especializadas, que catalizan la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa (Hernández *et al.*, 1999).

El grado de polimerización, la cristalinidad, el área superficial y el tamaño de partícula de la molécula de celulosa influyen en la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática. La actividad enzimática de las celulasas puede ser medida de dos formas básicas mediante la actividad individual de cada celulasa (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas) y por la actividad total de las celulasas sobre la celulosa amorfa y cristalina como se muestra en la Figura 6, donde las celulasas actúan en ambas regiones para culminar con la formación de monómeros (Bonilla y Rivas, 2004).

Se conocen diversos factores asociados con la naturaleza del sistema enzimático de las celulasas, que a su vez influyen en la actividad de las enzimas implicadas y el proceso hidrolítico. Estos incluyen: inhibición del complejo de celulasas por el producto final, inactivación térmica, sinergismo y adsorción irreversible de las enzimas, teniendo estos últimos la mayor influencia en la tasa de degradación del polisacárido (Mansfield *et al.*, 1999). El sinergismo ocurre cuando la acción combinada de dos o más enzimas aumenta la tasa de acción sobre el sustrato respecto a la acción individual (Román *et al.*, 2013). La adsorción de las celulasas es facilitada por la presencia de dominios en el sustrato mediante uniones por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrogeno que ayudan a la estabilidad enzima – sustrato (Paradelo *et al.*, 2013).

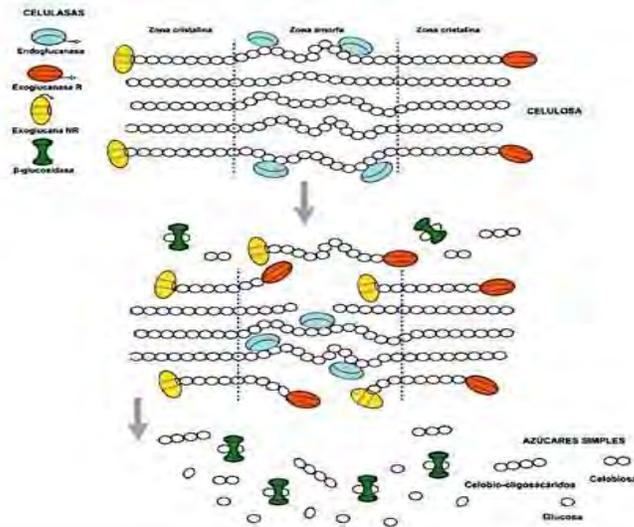


Figura 6. Diagrama de las celulasas endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasas sobre la celulosa amorfa y cristalina.

2.5.1.2 Endoglucanasas

Las endoglucanasas son enzimas que actúan al azar sobre los enlaces β 1– 4 glucosídicos presentes en las regiones amorfas de la celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, lo cual provoca la disminución del grado de polimerización de la celulosa. Esto trae como consecuencia la creación de nuevos extremos no reductores, que sirven de sustrato para la posterior acción de exoglucanasas y el lento incremento de azúcares reductores como; glucosa, celobiosa (disacárido) y celotriosa (trisacáridos) (Llaczka, 2012).

Su actividad es con frecuencia medida sobre celulosa soluble con alto grado de polimerización, como es el caso de la carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa amorfa tratada con H₃PO₄ o álcali mediante la adición de rojo Congo, debido a que el colorante es adsorbido sólo por largas cadenas de polisacáridos (Yang *et al.*, 2014). Pero también, la medición de la actividad de endoglucanasa puede estar basada en la reducción de la viscosidad del sustrato y/o en el incremento de extremos reductores (Badía y Hernández, 2011 y Couturier y Berrin, 2013).

2.5.1.3 Exoglucanasas

Las exoglucanasas (celulosa 1,4-β-celobiosidasas EC 3.2.1.91), también llamadas celobiohidrolasas, hidrolizan los monómeros de glucosa de los extremos accesibles de la

molécula de celulosa y de las celodextrinas en los enlaces β 1– 4 D glucano a partir del extremo no reductor para liberar glucosa y celobiosa (Wilson y Kostylev, 2012). La acción de las exoglucanasas se realiza mediante una adsorción y formación del complejo enzima-sustrato, seguida de la formación del producto. Existen sustratos adecuados que pueden ser implementados para la medición de la actividad exoglucanasa. Tal es el caso de la celulosa cristalina (Avicel) que tienen un bajo grado de polimerización y una baja accesibilidad (Viviano *et al.*, 2011 y Yang *et al.*, 2014).

2.5.1.4 β -glucosidasas

Después de la degradación en zonas amorfas de la celulosa y la hidrólisis de la región cristalina, por la acción de la endoglucanasas y la exoglucanasas. Actúa la β -glucosidasa que hidroliza la celobiosa soluble y otras celodextrinas y que al final producen glucosa (Couturier y Berrin, 2013). La actividad de esta enzima puede ser medida usando celobiosa, la cual no es hidrolizada por las endoglucanasas ni exoglucanasas (Gómez *et al.*, 2013).

La β -glucosidasa es necesaria para hidrolizar la celobiosa y la celotriosa previniendo de esta manera la inhibición de las exoglucanasas por acumulación de producto y por generar un aumento en la tasa hidrolítica. La hidrólisis de la celobiosa difiere de otras reacciones enzimáticas en que el sustrato es soluble y requiere una previa adsorción de la enzima al sustrato (Parillo *et al.*, 2016).

Además del mecanismo clásico de hidrólisis de celulosa, existen otras enzimas descritas recientemente involucradas en la lisis oxidativa de este polímero, las llamadas PMOs (Polysaccharide monooxygenases), previamente clasificadas como GH61 en hongos o CBM33 en bacterias (Beeson *et al.*, 2015).

La utilización de las celulasas a nivel industrial ha alcanzado el 8 % de las demandas enzimáticas. En Estados Unidos el mercado de las celulasas se ha estimado en 400 millones de dólares por año (Zhang *et al.*, 2006). Dichas enzimas son empleadas para la industria textil, producción de alimento animal y detergentes (Hill *et al.*, 2006 y Elba *et al.*, 2007). Además, se están empleando en la bioconversión de biomasa celulósica renovable

a productos químicos de la materia.

2.5.1.5 Adherencia por fimbrias

Las fimbrias son apéndices o pelos cortos superficiales adheridos a las células bacterianas con un grosor de 5 a 7 nm de ancho y de 100 a 200 nm de longitud y que ayudan como forma de anclaje a la superficie. Se han identificado tres tipos de fimbrias en bacterias Gram-positivas como *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguis* (Lindberg *et al.*, 1987 y Pell y Schofield., 1993). El mecanismo de las fimbrias es mediante la invaginación de la membrana citoplasmática a través de los poros de la pared celular y la cápsula. Estas estructuras son implementadas para la colonización durante el proceso de infección. Algunas pueden contener lectinas, las cuales son necesarias para adherirse a las células puesto que pueden reconocer las unidades de oligosacáridos presentes en la superficie de estas células (Suescún *et al.*, 2006).

2.5.1.6 Adherencia de carbohidratos a la capa de glicocálix bacteriano

La evidencia sobre esta adherencia de carbohidratos se ha encontrado de la observación de la microscopía electrónica (Cheng y Costerton, 1980). Diversos estudios demuestran que la capa bacteriana superior está compuesta de glicoproteínas (residuos de hidratos de carbono) que están implicados en la adherencia de las bacterias (Montoya Villafañe., 2008). La adhesión celular se produce tanto por fuerzas electrostáticas además de otras interacciones inespecíficas y por moléculas de adhesión celular como la proteasa y dextranasa. Las cuales en conjunto protegen la bacteria contra los fagocitos. La evidencia más directa del papel de los hidratos de carbono en la adhesión se dio en *Fibrobacter* sp. (Šimić *et al.*, 2015).

2.5.1.7 Adherencia mediante unión enzimática

Para que exista esta unión se requiere del dominio catalítico activo responsable de la ruptura hidrolítica de los enlaces glucosídicos y el dominio de unión que une las enzimas bacterianas a su sustrato. Se ha demostrado que las bacterias que carecen de estos dominios son menos adherentes y en algunos casos, menos capaces de digerir la celulosa cristaloides (Tomme *et al.*, 1995). En *Fibrobacter succinogenes* se han identificado distintos

dominios de unión, incluido el dominio de unión a celulosa de endoglucanasa 2 (EG2) y EGF (Bai *et al.*, 2017).

2.6 Hemicelulasas

Las hemicelulasas pueden agruparse en aquellas que actúan sobre la cadena principal de las hemicelulosas y las enzimas desramificantes que actúan removiendo los residuos sustituyentes de la cadena principal.

El xilano es el tipo de hemicelulosa más abundante en la naturaleza (presente principalmente en paredes celulares de cereales) y entre las enzimas que lo lisan se incluyen las β -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8), generalmente pertenecientes a las familias GH10 y GH11, generando xilooligosacáridos como producto de hidrólisis.

Se han descrito recientemente algunas enzimas con actividad xilanasa clasificadas dentro de las familias GH 5, 7, 8, 26 y 43. Por otro lado, las β -1,4-xilosidasas (EC 3.2.1.37), actúan sobre xilooligómeros de cadena corta y xilobiosa, liberando xilosa, y pertenecen principalmente a las familias GH3, 39, 43, 52 y 54 (Couturier y Berrin, 2013). Un grupo de enzimas muy importantes son las desramificantes, que incluyen α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetil-xilano esterasas (EC 3.1.1.72) y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) ya que permiten un mayor acceso de las endoxilanasas a la cadena principal de xilano (Bajpai, 2014).

Las endoxilanasas actúan al azar sobre los enlaces internos del xilano y difieren en su especificidad hacia el polímero, ya que algunas rompen la cadena en regiones sin sustituciones mientras que otras requieren la presencia de cadenas laterales próximas a los sitios de lisis (Pastor *et al.*, 2007). Las mismas se clasifican de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas en dos tipos: un grupo de xilanasas de bajo peso molecular (< 30 kDa) y punto isoeléctrico (pI) básico, pertenecientes a la familia GH11, y otro grupo con alto peso molecular (> 30 kDa) y pH ácido, de la familia GH10. La familia GH10 incluye enzimas que, además de la actividad endo- β -1,4, pueden presentar actividad sobre arilcelobiósidos y xilanos con enlaces endo- β -1,3. La familia GH11, en cambio, es un grupo monoespecífico, consideradas “xilanasas verdaderas”, ya que sólo actúan sobre xilanos

(Wong *et al.*, 1988; Collin *et al.*, 2005).

Otras enzimas que actúan sobre el principal tipo de hemicelulosa de maderas blandas, los mananos o glucomananos, son las mananasas (endo- β -1,4-mananasas EC 3.2.1.78), pertenecientes a las familias GH5, GH26 y GH113. Las manosidasas (β -manosidasas EC 3.2.1.25) por su parte liberan manosa y manooligosacáridos de los extremos no reductores originados por las mananasas y se incluyen en las familias GH1, GH2 y GH5. Las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) y α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) son enzimas de relevancia en la hidrólisis de gluco y galactomananos, respectivamente (Malgas *et al.*, 2015).

2.7 Aplicaciones industriales de enzimas celulolíticas

Las aplicaciones biotecnológicas de celulasas y hemicelulasas comenzaron a principios de 1980, primero en el ámbito de la alimentación animal y luego humana, mientras que el uso de pectinasas en la industria de alimentos data de 1930. Posteriormente, estas enzimas se comenzaron a utilizar en la industria textil, del lavado y en la del papel. Hoy en día, el uso de celulasas, hemicelulasas y pectinasas representa aproximadamente un 20 % del mercado mundial de enzimas, principalmente obtenidas de los hongos *Trichoderma* y *Apergillus* (Bhat, 2000).

En relación a la industria de alimentos, este tipo de enzimas se utilizan para la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales, en especial pectato liasas y poligalacturonasas en combinación con celulasas, xilanasas y mananasas. Las mismas permiten una licuefacción del macerado de frutas y vegetales y reducen la viscosidad del producto final. Además, algunos tipos de xilanasas son utilizadas para el mejoramiento de la calidad de productos de panadería, al aumentar la concentración de arabino xilooligosacáridos. Una de las aplicaciones más recientes de xilanasas es en la producción de xilooligosacáridos para ser empleados como pre-bióticos en alimentos, al estimular el desarrollo de bacterias pro-bióticas benéficas en el intestino (Aachary *et al.*, 2011). En la industria del vino y cerveza, el uso de glucanasas y pectinasas mejora la maceración de uvas, reduce la viscosidad de la cerveza y modifica algunos residuos aromáticos, mejorando el aroma de vinos. En relación a la alimentación animal, el uso de hidrolasas (glucanasas y xilanasas) en animales monogástricos mejora el valor nutricional, ya que

favorece la digestibilidad del material lignocelulósico de los cereales en el caso de rumiantes que se alimentan de forraje (Payne *et al.*, 2005).

Con respecto a la industria textil y del lavado, las celulasas son de amplia utilidad ya que mejoran la calidad de las telas al modificar las fibras de celulosa de una manera controlada. Es el caso de los procedimientos denominados bio-stoning de telas que reducen el colorante en ciertas zonas de la misma que remueve el exceso de microfibrillas, en especial en telas de algodón (Ballesteros, 2010). En la industria de los detergentes y polvos para el lavado de ropa, el uso de celulasas mejora el brillo de la misma, la suavidad y remueve la suciedad (Bhat, 2000). Las preparaciones de la celulasa de *H. insolens* que son activas bajo condiciones alcalinas suaves (pH 8,5-9) y las temperaturas sobre 50 °C se agregan a los detergentes. Tales celulasas activas bajo condiciones alcalinas aumentan la capacidad de limpieza de los detergentes por fibras de contracción selectiva facilitando así la eliminación de aceite del espacio entre fibras (Karmakar y Ray, 2011).

La industria del papel utiliza combinaciones de celulasas y xilanasas en distintas etapas del proceso como por ejemplo para la generación de la pulpa del papel y modificación de las propiedades de las fibras, así como también en el blanqueo mediante xilanasas y mananasas, reduciendo el uso de cloro generalmente empleado en esta etapa (Kuhad, 2011).

Una de las principales aplicaciones de las enzimas capaces de hidrolizar biomasa lignocelulósica es la producción de combustibles líquidos, en particular bioetanol de segunda generación ya que este tipo de biomasa es la única materia prima sustentable si se desea enfrentar la gran demanda energética actual. Además, la bioconversión a combustibles líquidos y otros químicos tiene varias ventajas en términos de mitigar el efecto invernadero y reducir la dependencia a los combustibles fósiles (Tan *et al.*, 2016). El etanol de segunda generación se denomina de este modo ya que proviene de una fuente no utilizada para la alimentación humana, y se diferencia así de los de primera generación, basados en el uso de maíz y caña de azúcar principalmente. Sin embargo, los costos del procesamiento de biocombustibles de 2-G en la actualidad superan los de 1-G, teniendo en cuenta la recalcitrancia de la biomasa y la falta de enzimas eficientes para sobreponer esta dificultad (Kumar *et al.*, 2016).

2.8 Microorganismos lignocelulolíticos y celulolíticos

En el suelo abundan cinco filos de microorganismos Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, (Lauber *et al.*, 2009). Estos van relacionados con las propiedades físicoquímicas del suelo para determinar la composición y abundancia de la microbiota que se pueda desarrollar (Johnston *et al.*, 2016; Rinta-Kanto *et al.*, 2016). Sin embargo, el pH parece ser el conductor más importante de la composición de la comunidad bacteriana en suelos (Prescott y Grayston, 2013; Urbanová, *et al.*, 2015).

La biomasa forestal (madera muerta y residuos forestales), aumenta los nutrientes existentes y sostiene la acidez que ayudan al establecimiento de nichos microbianos específicos que se albergan en el ambiente que circunda la raíz de la planta (Figura 7) (Hesselink., 2010; Baldrian, 2014 y Kuzyakov y Blagodatskaya, 2015). Cabe señalar que de acuerdo al tipo de bosque se da una gran variación de la microbiota, por ejemplo, en bosques de coníferas existen principalmente Proteobacterias, Acidobacteria y Actinobacteria (Baldrian *et al.*, 2012 y Žifčáková *et al.*, 2016), mientras que en bosques templados caducifolios la interacción es de proteobacterias (Purahong *et al.*, 2014; Urbanová *et al.*, 2015 y López-Mondéjar *et al.*, 2015).

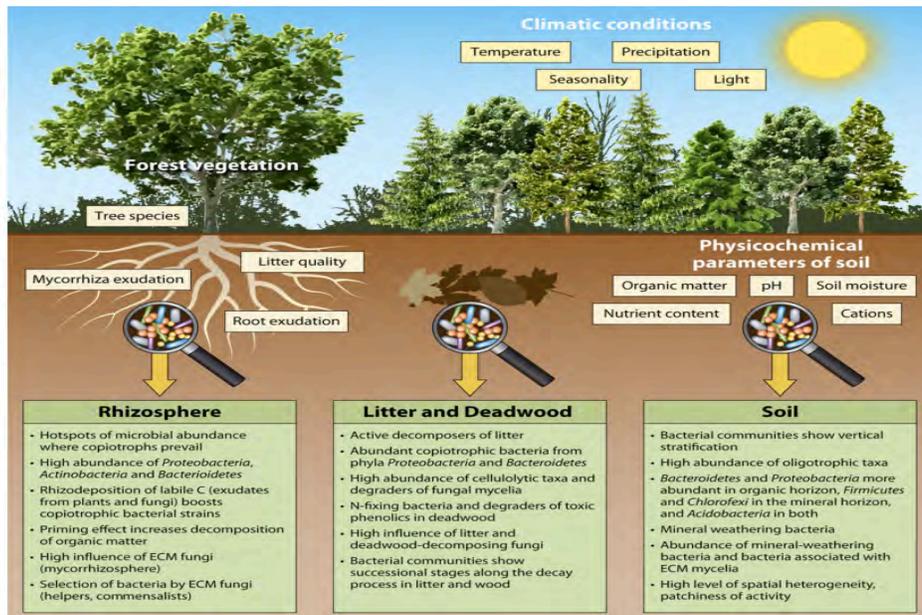


Figura 7. Propiedades climáticas y parámetros físicoquímicos del suelo en los diferentes nichos de las comunidades bacterianas.

La actividad microbiana que existe en los suelos es sumamente competitiva. Debido a dos partes que influyen en su actividad, una son los procesos de degradación de componentes del suelo (materia orgánica, partículas de arcilla) y otra la lixiviación, absorción y mineralización de CO₂ (Fischer *et al.*, 2010).

Oades (1984), menciona que existe una competencia por la obtención de los azúcares existentes en el suelo entre la microbiota y las raíces de plantas. Sin embargo, los microorganismos absorben de manera más fácil los azúcares en forma de hexosas como glucosa, manosa y galactosa, y difieren por las pentosas como arabinosa y xilosa (Jones y Murphy, 2007; Lladó, *et al.*, 2017 y Biernath *et al.*, 2008). Los mono-, di- y oligosacáridos, son el resultado de la hidrólisis enzimática de polisacáridos complejos, y son las formas más fácilmente asimilables en el metabolismo energético de microorganismos (Cheshire *et al.*, 1990; Kuzyakov y Jones, 2006 y Blagodatskaya *et al.*, 2014).

Además, en los suelos existen microorganismos con la capacidad de degradar polisacáridos en partículas más pequeñas. Tal es el caso de microorganismos celulolíticos que intervienen en la remoción de paredes celulares vegetales, producción de glucosa y en la descomposición de residuos vegetales fibrosos entre otros (Sadhu y Kanti, 2013 y Baldrian, 2017b) .

Durante las últimas tres décadas los hongos celulolíticos y lignocelulolíticos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Schizophyllum*, *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Sclerotium* (Goyal *et al.*, 1991) han sido empleados debido a su capacidad para producir enzimas celulolíticas, su fácil clonación y producción. Además, estos producen complejos multienzimáticos con mayor funcionalidad, especificidad y capaz de soportar el estrés ambiental más grande y más diverso (Maki y Leung, 2009).

Sin embargo, el aislamiento y la caracterización de bacterias celulolíticas ha desplazado a los hongos debido a que tienen una mayor tasa de crecimiento en comparación con los hongos. Además, las propiedades morfológicas, genéticas y moleculares de dichos microorganismos las han hecho susceptibles a diferentes tipos de ambientes por lo que pueden clasificarse en termofílicas o psicrófilas, alcalofílicas o acidófilicas entre otras. Procariotas con estas características pueden sobrevivir y producir enzimas celulolíticas en

condiciones extremas, por lo que tienen el potencial de ser utilizados en el proceso de bioconversión (Miranda *et al.*, 2009).

2.8.1 Bacterias lignocelulolíticas

En los suelos es común encontrar bacterias lignocelulolíticas capaces de degradar lignina. Existen Proteobacterias (géneros *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Ochrobacterium*, *Pseudomonas*, *Celulomonas*, *Streptomyces*), Firmicutes (géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*) y Actinobacterias (géneros *Rhodococcus*, *Mycobacteria*, *Microbacterium* y *Streptomyces*) (Masai *et al.*, 2007 y Bandounas *et al.*, 2011). Recientemente, se han descubierto que pueden oxidar los enlaces β -O-4 en Lacasa y oxidar compuestos fenólicos. (Freedman y Zak, 2015 y Guo *et al.*, 2017). Proteobacterias de los géneros *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* son altamente activos en suelos forestales y contienen grandes cantidades de lacasas. Además tienen la capacidad de reducir la toxicidad de los compuestos fenólicos en lugar de degradar la lignina (Nacke *et al.*, 2014 y Woo *et al.*, 2014).

2.8.2 Bacterias celulolíticas

Existen bacterias capaces de catalizar la hidrólisis completa de celulosa y que comúnmente se conocen como celulolíticas verdaderas. Sin embargo, otras bacterias son capaces de producir enzimas como endoglucanasas y β -glucosidasas, que catalizan la degradación de los derivados solubles de celulosa o las regiones amorfas de la celulosa cristalina (Yang *et al.*, 2014 y (Sadhu y Kanti, 2013). Es por ello que bacterias celulolíticas son empleadas en la conversión biológica de la biomasa para biocombustibles renovables (Sadhu y Kanti, 2013), y algunas otras son característica de acuerdo a su componente enzimático de degradación (Cuadro 1).

Dentro del Dominio Bacteria, los principales géneros celulolíticos se distribuyen en los phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. En términos fisiológicos, los sistemas bacterianos celulolíticos más estudiados son los pertenecientes a las bacterias aeróbicas Gram positivas *Cellulomonas* y *Thermobifida* pertenecientes al phylum *Actinobacteria* y las anaerobias fermentativas del phylum Firmicutes, típicamente Gram

positivas, como *Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp. y *Caldicellulosiruptor* spp. y algunas Gram negativas como *Butyrivibrio* spp. y *Acetivibrio* spp. (Ravinovich *et al.*, 2002; Lynd *et al.*, 2002). Además, varias especies de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, fueron reportadas como celulolíticas (Morana *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Propiedades de enzimas extraídas de bacterias celulolíticas aerobias y anaerobias (Frank *et al.*, 1992 modificada por Sadhu y Kanti, 2013).

Nombre de la bacteria	Enzima	Peso molecular (KDa)	Temperatura optima (°C)	pH óptimo
Aerobia				
<i>Bacillus</i> sp (alcalofilica)	Endoglucanasa	54	-	5.0-11.0
Clonada en <i>E. Coli</i>	Endoglucanasa cel	46	-	5.0-11.0
B				
<i>Bacillus</i> sp (neutrofilica)	Endoglucanasa	35	50	7.0-10.0
<i>Bacillus subtilis</i>	Endoglucanasa	33	60	5.5
<i>Cellulomas uda</i>	Exocelobiohidrolasa	81	41-50	5.5-6.5
<i>Microspora</i>	β -glucosidasa	-	-	6.0
Anaerobia				
<i>Acetivibrio</i>	Exoglucanasa C1	38	-	-
Celulolítica ATCC 33288	β - Glucosidasa	8.1	-	-
<i>Clostridium josui</i>	Endoglucanasa	45	60	6.8

El género *Bacillus* naturalmente metaboliza una amplia variedad de azúcares incluyendo xilosa, arabinosa, celulosa, sacarosa, celobiosa y glucosa; sin embargo, a pesar del

extenso conocimiento genético y bioquímico del género, existe poca información de aspectos bioenergéticos, metabólicos, de crecimiento y de formación de productos en condiciones aeróbicas para la utilización de celulosa (Chafla *et al.*, 2016).

La principal vía de la utilización de la glucosa por el microorganismo en el suelo es mediante el ciclo de pentosas fosfato y la glucólisis. El último es parte del ciclo de Krebs. Como resultado de un reciclaje interno, el azúcar puede ser incluido en diversos productos metabólicos como otros azúcares, ácidos carboxílicos y aminoácidos y se puede utilizar para construir los componentes estructurales de la célula como las membranas celulares y las paredes celulares (Gunina *et al.*, 2014; Apostel *et al.*, 2015).

2.9 Mecanismos microbianos de bioconversión de la biomasa

Los microorganismos celulolíticos han desarrollado diversas estrategias de utilización de biomasa, que está reflejada en las enzimas que producen y que actúan en conjunto de manera complementaria y sinérgica. Existe una marcada diferencia en las estrategias celulolíticas entre microorganismos aerobios y anaerobios (Figura 8). Tanto los hongos como las bacterias aeróbicas utilizan la celulosa a través de la producción de celulasas extracelulares. En general, las hifas de hongos filamentosos penetran el sustrato celulósico y es allí donde secretan las enzimas, en proximidad al sustrato. Por otro lado, las bacterias anaeróbicas no poseen la habilidad de penetrar en los sustratos celulósicos, por lo que desarrollaron un mecanismo de degradación de la celulosa mediante la formación de celulosomas. Esto les permite posicionar las células en el sitio de hidrólisis, favorecer el sinergismo enzimático y asegurar una mínima difusión de los productos de hidrólisis para una incorporación eficiente de los mismos (Lynd *et al.*, 2002). El modelo de celulosoma está ampliamente estudiado en bacterias anaeróbicas como *Clostridium thermocellum* y describe a las celulasas organizadas en un complejo celulolítico de alto peso molecular. Además de los dominios enzimáticos catalíticos, las enzimas asociadas al celulosoma contienen dominios cohesina- dockerina que les permiten asociarse en un esqueleto o scaffold que se ancla a la membrana celular y facilita la aproximación del sustrato a la célula para una hidrólisis más eficiente. Otros dominios presentes en este sistema son los CBMs y los dominios de unión a capa S (SLH) (Bayer *et al.*, 1998).

Recientemente se describió un posible modelo de utilización de celulosa en hongos anaeróbicos, frecuentemente aislados del tracto digestivos de herbívoros (*Neocallimastix* spp. y *Orpinomyces* spp.) mediante la formación de complejos similares a los celulosomas, pero que no se anclan a la pared celular fúngica, sino que son secretados (Haitjema *et al.*, 2014).

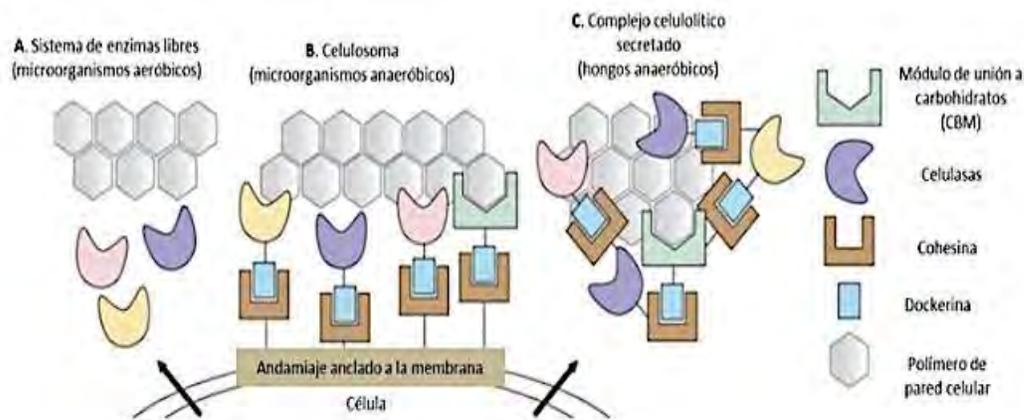


Figura 8. Representación esquemática de los mecanismos de hidrólisis de celulosa. Los microorganismos aeróbicos secretan las enzimas al medio extracelular (a), mientras que los anaeróbicos forman complejos multienzimáticos llamados celulosomas (b). En los hongos anaeróbicos (c) se postula la formación de complejos enzimáticos que son secretados al medio extracelular (Haitjema *et al.*, 2014).

2.10 Caracterización taxonómica de microorganismos

Existe una gran variedad de técnicas para la caracterización de microorganismos clasificadas de manera general en métodos morfológicos o tradicionales y métodos moleculares (Lampe *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, el desarrollo de herramientas de biología molecular ha jugado un papel fundamental en la taxonomía moderna de hongos y bacterias. El empleo de técnicas moleculares ha mejorado el conocimiento sobre la biología de los microorganismos y sus relaciones filogenéticas con otros organismos. Dichas técnicas se fundamentan en el análisis de cromosomas, y/o genes, además de los productos de la transcripción y traducción de éstos. La técnica de PCR es una de las más empleadas en investigación. Se define en la amplificación exponencial de una secuencia específica de ácidos nucleicos que es flanqueada por un par de oligonucleótidos (Secuencia de DNA de 16 a 35 bases), los cuales son usados como cebadores por una ADN polimerasa termoestable (Taq

polimerasa) para la formación de las nuevas cadenas. La técnica consta de múltiples ciclos (usualmente 35 a 40) en los cuales hay desnaturalización de DNA de doble cadena, alineamiento de los oligonucleótidos, extensión (polimerización) y nuevamente desnaturalización. Esto permite la detección precisa de una región del genoma específico y su posterior secuenciación, permite caracterizarla con exactitud (Galvis y Moreno, 2014).

Para identificar bacterias en general se utiliza la amplificación de regiones conservadas, como los genes de ARN ribosomales (rDNA) 16S, 23S y 5S, debido a que contienen regiones altamente variables y secuencias conservadas, que pueden ser empleadas para realizar análisis filogenéticos a todos los niveles taxonómicos. El ribosoma procariótico se divide en dos subunidades ribonucleoprotéicas 50S y 30S, dentro de esta última, está el ADN 16S. Esta subunidad se ha utilizado para la identificación de bacterias, esto debido al tamaño de la subunidad, que es relativamente grande (1500 pb aproximadamente), además de que tiene ciertas regiones variables y regiones conservadas en su secuencia, lo cual hace más amplio el análisis filogenético en comparación con regiones de menor tamaño. La región 5S en los últimos años ha sido poco usada dada su alta conservación y corta longitud (Galvis y Moreno, 2014).

Actualmente se conoce la secuencia del gen 16S de numerosas especies de bacterias, lo que facilita la identificación de estos individuos por técnicas moleculares y el establecimiento de relaciones filogenéticas entre ellas y se ha determinado que la base para la detección, identificación y caracterización de bacterias y hongos en agroecosistemas, consiste en la combinación de metodologías de caracterización morfológica y bioquímica tradicionales, acopladas a técnicas moleculares soportadas en los desarrollos bioinformáticos de los últimos años (Schmitt *et al.*, 2009 y Henrik *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante de la biomasa terrestre; es uno de los componentes más importantes de las paredes celulares de las células de las plantas, que en combinación con la hemicelulosa y la lignina constituye la fracción lignocelulósica de la cual se genera en grandes cantidades durante las actividades agrícolas, madereras y del procesamiento industrial y artesanal de los alimentos (Gómez *et al.*, 2013). Estas actividades arrojan residuos vegetales fibrosos con abundancia de polímeros orgánicos ricos en lignina y celulosa. Los procesos de degradación de desechos vegetales requieren de un largo periodo de tiempo. Durante este periodo generan gases de efecto invernadero y lixiviados que causan contaminación a fuentes hídricas. La biodegradación suele llevarse a cabo por la actividad de biota edáfica donde existen organismos, como hongos, nemátodos y bacterias (Román *et al.* 2013 y Lovaisa y Ulla, 2015). El estudio de microorganismos con capacidad de degradar celulosa de los residuos vegetales fibrosos son un factor importante, ya que en la localidad de Nuevo Parangaricutiro el 90 % de los residuos fibrosos son desaprovechados. Solo en la minoría de los casos se utilizan para la elaboración de compostas, donde las temperaturas oscilan desde los 25 °C hasta los 70 °C. Es por ello que se optó por estudiar microorganismos provenientes de distintos lugares con similitud en la cantidad de materia orgánica y de temperaturas. Además este tipo de microorganismos representa una alternativa que permite en forma particular aminorar esta problemática debido al bajo costo de inversión y a la rentabilidad de los productos obtenidos con alto valor agregado (Varnero *et al.*, 2010 y Chafla *et al.*, 2016). Adicionalmente, el aislamiento de microorganismos que se desarrollan en ambientes extremos para la mayoría de organismos brinda la posibilidad de obtener microorganismos con capacidades catalíticas resistentes a factores físicos y químicos recalcitrantes. Al respecto, durante el proceso de intemperismo, después de las etapas iniciales, favorecidas por factores físicos y químicos, se propicia el establecimiento de microorganismos con ciertas particularidades metabólicas como fotótrofos fijadores de nitrógeno y quimiolitótrofos (Voroney, 2007). Es por ello que en este trabajo se plantea el aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de degradar celulosa que sean extraídos de cinco sitios de colecta. Dos sitios de colecta provenían de materia orgánica en descomposición compuesta principalmente por residuos orgánicos fibrosos, el tercero

perteneciente del volcán Parícutín compuesto principalmente de arena, donde la presencia de materia orgánica era escasa , el cuarto y quinto sitio pertenecientes a zonas boscosas, en los cuales hay diferencia en la concentración de materia orgánica, debido a su tiempo de repoblación, todos ellos con diferencias en la oscilación de temperaturas y altitudes.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Aislar y caracterizar bacterias edáficas con actividad celulolítica extraídas de cinco zonas de Nuevo Parangaricutiro, Michoacán.

Objetivos Específicos:

- i. Aislar bacterias edáficas de la zona de Nuevo Parangaricutiro con actividad celulolítica.
- ii. Caracterizar los aislados con actividad celulolítica de acuerdo a marcadores morfológicos y bioquímicos.
- iii. Seleccionar y caracterizar genéticamente aislados con potencial para degradar celulosa a partir de residuos vegetales.

HIPÓTESIS

Es posible obtener bacterias edáficas cultivables con actividad celulolítica de Nuevo Parangaricutiro, Michoacán.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de material

El material biológico se colectó en cinco sitios de muestreo del estado de Michoacán entre los municipios de Nuevo Parangaricutiro y Angahuan como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Localización de los sitios de colecta en Nuevo Parangaricutiro, Mich. Conformados por composta, lombricomposta, zona volcánica y zona boscosa.

Los primeros dos sitios se localizaron en el rancho “El Durazno”, del municipio de Nuevo Parangaricutiro, donde se elaboró composta a base de estiércol porcícola, vacuno, gallinaza, residuos vegetales de aguacate y leguminosas, aserrín, cachaza y suelo (Álvarez, 2003) y lombricomposta. El tercer sitio fue en el volcán Paricutín perteneciente a los poblados de San Juan Parangaricutiro y Angahuan en las coordenadas $18^{\circ} 28' 8''$ N y $102^{\circ} 14' 25''$ O. El cuarto y quinto sitio se encuentran en dos áreas distintas una boscosa de más de 150 años de edad y otra de alrededor de 40 años (Velázquez *et al.*, 2003) ambos conformados principalmente por especies maderables de pino y encino, donde se ha generado una capa de hojarasca en el suelo que contiene 4.05 % de Materia Organica favorable al nicho ecológico de los microorganismos celulolíticos (Shu-Ying *et al.*, 2011 y Alvarado, 2010). Estos sitios pertenecientes a la extensión denominada el Arenal, municipio de Nuevo Parangaricutiro con las siguientes coordenadas $19^{\circ} 29' 26''$ N y $102^{\circ} 15' 26''$ O. En lo que corresponde a las muestras de composta y lombricomposta, se extrajeron tres porciones del material en degradación de 100 g cada una. Del resto de las zonas, las muestras fueron colectadas del suelo de cada región después de los primeros

10 cm de profundidad del suelo.

3.2 Aislamiento de bacterias edáficas

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio Interacciones Planta-Ambiente de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Para el aislamiento se tomaron 10 g de sustrato, se procesaron para generar diluciones seriadas de acuerdo al protocolo descrito por Stanier e Ingraham (1996). Inicialmente, se realizó un enriquecimiento de las colonias bacterianas en medio PDA (infusión de papa 25 %, sacarosa 0.5 %, y agar 1.6 %, pH 7.0), durante 24 horas a 28 ± 2 °C. Posteriormente se utilizó el medio de Agar nutritivo, modificado por Milian *et al.*, 2009 (peptona 0.6 %, extracto de levadura 0.2 %, cloruro de sodio 0.5 %, CMC 1.5 % y agar 1.5 %, (pH 7.3), específicamente para aislados celulolíticos. Se sembraron las diluciones desde 10^{-4} hasta 10^{-8} y se incubaron por 24 a 72 horas a 37 ± 2 °C. Las colonias con características morfológicas diferentes se seleccionaron y sembraron en agar nutritivo papa dextrosa agar (PDA) para su conservación y posterior uso.

3.3 Actividad hemolítica

Los aislados se incubaron en medio agar-sangre (50 mL de sangre de mamífero, 950 mL de agua destilada y 8 g de agar bacteriológico), para evaluar su posible actividad hemolítica la cual permite discernir su potencial patogénico para humanos.

Cuando el medio agar-sangre se gelificó, se realizaron orificios equidistantes con un sacabocados, en cada orificio se colocaron 100 μ L de cada aislado seleccionado, realizando triplicados en distintas cajas. Las cajas se incubaron a 35 °C durante 72 horas, monitoreando la producción de halos de hemólisis alrededor de los orificios cada 24 horas. Después del periodo de incubación (72 horas) en los casos que hubo actividad hemolítica se evaluó si la hemólisis fue alfa (parcial), beta (total) o gamma (ausencia de hemólisis) de acuerdo al patrón que se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Protocolo de evaluación de actividad hemolítica en medio agar-sangre con patrones de actividad hemolítica, α (alfa; parcial), β (beta; total), γ (gamma; ausencia de hemolisis).

3.4 Determinación cualitativa de la capacidad celulolítica

Para comprobar la existencia de actividad celulolítica de los aislados bacterianos, se llevó a cabo el protocolo de revelado con rojo Congo. Para ello, se inocularon las bacterias en placas con agar nutritivo suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) 1 % (p/v) como única fuente de carbono (CMC, 10 g L⁻¹; NaNO₃, 0.5 g L⁻¹; K₂HPO₄, 1.0 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g L⁻¹; KCl, 0.5 g L⁻¹; FeSO₄·7H₂O 0.001 g L⁻¹). Las cajas Petri se incubaron a 30 °C y después de 72 h, se reveló la degradación de CMC. La superficie de la caja se cubrió con una solución de rojo Congo, al 1.0 %, durante diez minutos; después, se retiró el rojo Congo y se cubrió con solución salina 1M, durante una hora. Al término de la hora, se eliminó la solución salina y se cubrió con ácido acético al 2 %, por diez segundos; finalmente, se descartó el ácido acético y se midió el diámetro de la colonia conjuntamente con la amplitud del halo de hidrólisis de celulosa, observado por la presencia de zonas claras (halos) alrededor de la colonia (Viteri *et al.*, 2016).

3.5 Caracterización morfológica

Después de confirmar la presencia de actividad celulolítica en los aislados no hemolíticos, se procedió a caracterizar morfológicamente los aislados que presentaron colonias con características morfológicas diferentes, fueron re-sembrados por estría cruzada en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) y se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente se caracterizaron de acuerdo a la morfología colonial, tomando los parámetros: tamaño de colonia, color de la colonia, tipo de borde, elevación (Figura 11), textura de la superficie (lisa o rugosa), luz reflejada (brillante o mate), luz transmitida (opaca

o transparente), aspecto (húmedo o seco) y consistencia (blanda, dura o mucosa).



Figura 11. Características de colonias bacterianas de acuerdo a su forma, elevación, borde etc. Descrito por Wolin 1973.

3.6 Tinción de Gram

Como parte de los parámetros de caracterización celular se consideró la tinción de Gram, (1844) modificado. Para ello, se hicieron frotis delgados de cada aislado bacteriano a partir de colonias crecidas en medio de cultivo sólido sobre una gota de agua en un porta objetos con ayuda de un asa bacteriológica, se dejaron secar al aire y se fijaron por flameado en un mechero de gas. Posteriormente se adicionó cristal violeta (cristal violeta 0.5 g disuelto en 100 mL de agua destilada) y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, la muestra se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, se agregó lugol (cristal de yodo re-sublimado 1 g; KI 2 g disueltos en 300 mL de agua destilada), el cual fija la localización del colorante primario, se dejó reposar durante 1 min, se lavó con agua corriente para eliminar el exceso del colorante, se adicionó etanol, para eliminar el excedente de colorante y lugol, el cual se mantiene en bacterias de pared gruesa, posteriormente se le adicionó colorante de contraste safranina (0.1 g L^{-1} safranina en alcohol etílico al 50 %), el cual tiñe de rojo las bacterias decoloradas, se secó durante 1 min a temperatura ambiente y se lavó con agua corriente para eliminar el exceso (Figura

12). Se dejó secar y se observó la tinción en un microscopio óptico (Labtron XS-2100) a aumentos de 40X y 100X.

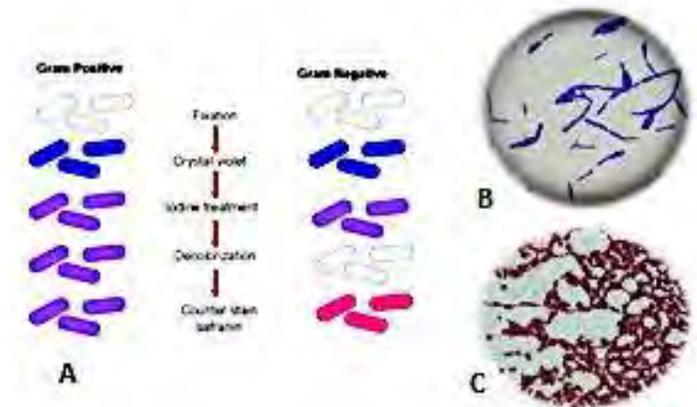


Figura 12. (A) Protocolo tinción de Gram, (B) aislado Gram +, (C) aislado Gram -.

3.7 Dinámica de crecimiento bacteriano

Se analizó la dinámica de crecimiento poblacional de las bacterias determinando la densidad óptica alcanzada en un cultivo líquido cada cuatro horas. Para lo cual se inoculó un cultivo fresco en matraces de 250 mL con 50 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) a base de peptona 1.0 %, extracto de levadura 1.0 %, cloruro de sodio 0.5 %, ajustado el pH a 7.3 (J.H., 1972), se incubó a 35 ± 2 °C, en agitación a 130 rpm. Se determinó la densidad óptica en el cultivo a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305) cada cuatro horas hasta sobrepasar la fase estacionaria. Posteriormente se realizó el conteo de colonias viables en los puntos de la fase exponencial y primeros de la estacionaria del crecimiento, para ello se hicieron diluciones seriadas de los cultivos en solución salina estéril, y se sembraron por triplicado de las diluciones entre 10^{-4} hasta 10^{-8} en placas con agar nutritivo y se incubaron a 35 ± 2 °C por 16 a 24 horas. Posteriormente se contaron las colonias en las placas y se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de cultivo bacteriano (Figura 13) y se determinó el crecimiento sincrónico exponencial de la población bacteriana de acuerdo al método de Jiménez-Delgadillo en 2004.

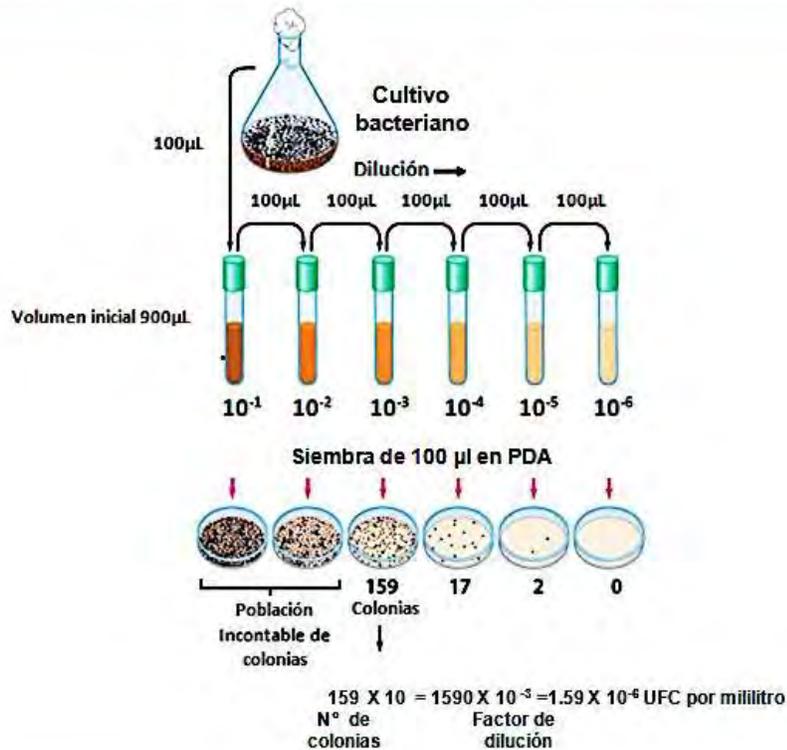


Figura 13. Protocolo para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) (Alexander, 1982). Ejemplo hipotético para la cuantificación de UFC al obtener 159 colonias a partir de 100 µL de una dilución de 1×10^{-3} del inoculo original.

3.8 Sincronización de las curvas de crecimiento

Para determinar el momento de crecimiento sincrónico exponencial de la población bacteriana de cada inoculante, durante la cinética de crecimiento en el cultivo bacteriano, se utilizó el método de Jiménez-Delgadillo (2004), el cual considera que en un cultivo bacteriano los individuos pueden encontrarse en distintas etapas del ciclo celular (crecimiento), sin embargo, durante la fase exponencial, próxima a la fase estacionaria puede encontrarse en un punto en el que la mayor parte de la población se encuentra en crecimiento sincrónico.

Para precisar el tiempo de ocurrencia de la fase exponencial a la fase estacionaria de los aislados que se utilizaron como inóculos en el bioensayo, se realizó un ajuste a la curva de crecimiento a través del programa estadístico Origin 8 y el modelo lineal o logístico de Verhulst-Pearl. La expresión matemática utilizada se muestra a continuación:

$$N = K / (1 + \exp^{a - \mu t})$$

Donde:

N: densidad poblacional (DO)

K: capacidad portadora del medio

μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

t: tiempo (h)

a: constante

3.9 Determinación de la temperatura óptima para el crecimiento de aislados celulolíticos

De los diferentes aislados celulolíticos se tomó una colonia bacteriana previamente crecida durante 24 h en medio LB. Posteriormente en cajas Petri con medio PDA se sembraron las bacterias por el método de punción y se incubaron por 24 h, en aerobiosis, a diferentes temperaturas en un rango de 25 a 70 °C con un intervalo de 5 °C entre temperatura. Para medir su desarrollo se empleó el uso de un vernier (Franca *et al.*, 2011).

3.10 Determinación de pH del medio de cultivo en relación con la temperatura para la actividad celulolítica

Las bacterias seleccionadas se cultivaron en medio LB con pH 7,0 se incubaron a 35 °C por 24 horas y una agitación de 130 rpm. Posteriormente en tubos de centrifugación con 15 mL de medio PD se colocó una colonia de los diferentes aislados celulolíticos por el método de punción. Al tener la muestra conjunta se incubó por 24 h, con agitación, en aerobiosis, a diferentes temperaturas en un rango de 25 a 70 °C con un intervalo de 5 °C entre temperatura. Al finalizar las 24 h de crecimiento de los aislados a su respectiva temperatura se determinó el pH con un potenciómetro.

3.11 Determinación bioquímica

Las pruebas bioquímicas fueron aplicadas a las cepas bacterianas aisladas, lo que permitió analizar los principales sustratos que degradan y la fuente de energía utilizada; a través del empleo de medios de cultivo que contienen CMC y medio mínimo de CMC con indicadores.

3.11.1 Azúcares reductores

Para determinar la actividad celulolítica en forma cuantitativa se obtuvieron sobrenadantes a partir de los cultivos bacterianos de acuerdo al protocolo descrito por Lynch y Raphael (1987). Posteriormente se determinó la actividad celulolítica en los extractos, para lo cual se incubó 1 mL de éste en 50 mL de solución de CMC al 1 % y se incubó a 37 °C hasta la fase exponencial de cada aislado. Posteriormente se determinó la concentración de azúcares reductores por el método de Somogyi y Nelson modificado por Pachón y Perea 2010. El cual consistió en incubar la muestra durante 16 a 24 horas (fase exponencial) durante este tiempo de incubación, cada cuatro horas se tomó una alícuota de 1 mL y se vació en un tubo de centrifugación de 1.5 mL para ser centrifugada a 6,000 rpm durante 30 min. Se recuperaron 250 µL de sobrenadante y se colocaron en un tubo de centrifugación de 15 mL. Al sobrenadante se le añadieron 200 µL de la solución Somogyi I (se disolvieron 3.75 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado (PM 282.23 g/mol), en 100 mL de agua destilada, se adicionaron 7.50 g de carbonato de sodio anhidro (PM 105.99 g/mol), se agitó hasta que los sólidos se disolvieron completamente y luego se adicionó 4.5 g de sulfato de sodio anhidro (PM 142.04 g/mol), se mezcló y se llevó a un volumen de 250 mL, se filtró y almacenó en botellas ámbar a 4 °C). Los tubos se cubrieron ya que las reacciones de Somogyi son fotosensibles.

Posterior se adicionaron 50 µL de solución Somogyi II (se disolvieron 4 g de sulfato de cobre pentahidratado (PM 249.68 g/mol) en agua destilada estéril, por consiguiente, se adicionaron 36 g de sulfato de sodio anhidro (PM 142.04 g/mol), se mezcló fuertemente hasta su disolución total. La mezcla obtenida se llevó a un volumen final de 250 mL. Esta se filtró y almacenó en botellas ámbar a 4 °C.

Posteriormente se tomó una alícuota de 50 mL y se colocó en tubo Falcón de 50 mL, los cuales se sellaron y se llevaron a baño maría durante 30 minutos. Finalmente, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se realizó una mezcla de ambas soluciones adicionando 50 µL de la solución Nelson A y B (Solución A: se disolvieron 25 g de molibdato de amonio tetrahidratado (PM 1235,86 g/mol) en 400 mL de agua destilada, se adicionó gota a gota en agitación constante y sobre cama de hielo 21 mL de ácido sulfúrico concentrado. Solución B: se disolvió 0.60 g de arsenato monoácido de sodio

heptahidratado (PM 311,90 g/mol) en 25 mL de agua destilada, este procedimiento se realizó en cabina de extracción, es importante tomar la precaución de no adicionar ácido por accidente a la solución ya que se formaría un compuesto tóxico y volátil. Posteriormente se mezcló la solución A y B, se llevó a volumen final de 500 mL con agua destilada, se incubó a 37 °C por 36 horas, se filtró la solución, se almacenó en botellas ámbar cubiertas con papel aluminio a 4 °C, para evitar el contacto con la luz. La solución debe presentar un color amarillo pálido para poder ser empleada en la determinación. Las muestras se reposaron durante 24 a temperatura ambiente con las tapas flojas y en oscuridad. Después se adicionaron 750 µL de agua destilada y se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro.

Para determinar la concentración de azúcares se elaboró una curva patrón con glucosa y se utilizó la ecuación para reemplazar las lecturas de absorbancia con la ecuación de la curva. Los resultados fueron reportados en Unidades Celulolíticas, definidas como la cantidad de enzima que libera un µmol de glucosa por minuto por litro, bajo las condiciones de la prueba donde se midió glucosa por mililitro.

3.12 Pruebas de antagonismo

Cada uno de los aislados celulolíticos se crecieron en medio LB con pH 7,0 y se incubaron a 35 °C por 16 horas a 130 rpm. Posteriormente en cajas Petri con medio CMC 1 %, la cual cada una contenía 3 círculos de papel filtro Wathman estériles de 0.5 centímetros de diámetros colocados equidistantemente. A continuación, a cada circunferencia se inoculó una alícuota de 10 µL de los microorganismos a enfrentar en misma fase de crecimiento sincrónico. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril y se llevaron a incubación a 35 °C durante 24 h. El criterio fue seleccionar halos mayores a 5 mm (Gaitán y Pérez, 2007 y Mantilla y Acosta, 2013).

3.13 Cromatografía de capa fina

Se utilizaron placas comerciales de sílica gel 60 GF 254, de 20 x 20 cm x 0.25 mm con un indicador fluorescente Merck No. 5717. Las placas se desarrollaron en el sistema de fase móvil de butanol/acetona/agua (4:5:1). Para separar los productos de la degradación de

CMC por acción de los aislados bacterianos con capacidad celulolítica, los inóculos se crecieron en medio nutritivo LB hasta que alcanzaran la fase exponencial en condiciones de incubación de 35 °C en oscuridad y agitación a 130 rpm, transcurrido el tiempo se tomó 1 mL del inóculo y se reactivó en medio CMC al 1% hasta su fase exponencial en las mismas condiciones de incubación antes señaladas. Posterior a ello se tomó una alícuota de 1.5 mL cada dos horas y se centrifugó a 6,000 rpm durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se tomaron 2 mL de sobrenadante y se almacenaron en tubos Eppendorf de 2.5 mL y se llevaron a congelación (-20 °C), empleando esta muestra como final para la TLC. Paralelamente, se procesó un volumen igual en ambos extractos se aplicaron a secciones de la placa (20 x 20 cm), conjuntamente con patrones al 2 % p/v de carboximetilcelulosa, celobiosa, maltosa, dextrosa y una combinación de los cuatro. En todos los casos se analizaron 50 µL de cada solución, cada placa se dejó en la cámara cromatográfica durante alrededor de 90 minutos. Después de la corrida cromatográfica, la placa se reveló con H₂SO₄ / etanol a una proporción 5:95 y calentada a 40 °C, hasta la aparición de machas con diferentes tonalidades de color marrón/violeta (Ghebregzabeier *et al.*, 1976 y Abad, 2014).

3.14 Caracterización molecular

3.14.1 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA bacteriano se realizó mediante la técnica enzimática modificada de Harwood y Cutting (1990) (VinLaurie y Frost, 2015). A partir de las bacterias cultivadas en medio LB y PDA, se tomó una colonia aislada con un palillo estéril y se inoculó en 5 mL de LB líquido contenido en tubos de ensayo estériles. Se incubaron con agitación a 130 rpm a una temperatura de 35 °C hasta fase exponencial (12-36 h).

Las células se recuperaron por centrifugación, a 14000 rpm durante 7 minutos, en tubos de centrifugación de 1.5 mL. El sobrenadante se desechó y se comenzó con el proceso de extracción, a la pastilla de células bacterianas se le adicionó 600 µL de buffer de lisis (0.1 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8) se resuspendió por 1 minuto, enseguida se agregaron 6 µL de proteinasa K (20 mg/mL) para liberar el DNA nuclear al medio y digerir las proteínas; esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Enseguida se añadieron 30 µL de N-lauril sarcosina al 20 % para completar la lisis celular. Se mezclaron en vórtex y

posteriormente se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente para luego incubar a 65 °C durante 5 minutos. Después se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos para eliminar el lisado celular. Se recuperó el sobrenadante (500 a 600 µL) y se transfirió a un tubo de centrifugación nuevo. Para separar los componentes proteínicos y lipídicos se agregaron 800 µL de cloroformo: alcohol isoamílico frío a una proporción 24:1 respectivamente, se mezcló en vórtex, se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm durante 5 minutos y la fase acuosa (400-500 µL) fue transferida a un tubo de centrifugación nuevo. Nuevamente se agregó al sobrenadante 800 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 frío y se mezcló en vórtex, se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm y la fase acuosa fue transferida a un tubo de centrifugación nuevo. Para precipitar los ácidos nucleicos, primero se adicionaron 20 µL de acetato de sodio 3M pH 4.8 – 5.2 y sin agitar, se añadieron 600 µL de etanol frío al 100 %, la mezcla se incubó durante 20 minutos a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación. Finalmente, se adicionó un volumen de 500 µL de etanol al 70 % (v/v), la pastilla se lavó utilizando el vórtex hasta desprender la pastilla del tubo, se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto; después, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó en termoblock a 65 °C. La pastilla se resuspendió en 20 µL de agua destilada estéril con RNAasa (0.01 mg/mL) y se dejó reposar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para degradar los restos de RNA. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos y recuperó en 15 µL. Los productos de extracción de cada uno de los aislados bacterianos, obtenidos con la metodología antes descrita, se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso (Zapata y Castellanos, 2014 y Lampe *et al.*, 2014).

3.14.2 Amplificación por PCR del gen 16S rDNA

Se amplificó el gen rDNA 16S de cada una de las bacterias mediante la técnica de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos universales fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991 y Zapata y Castellanos, 2014), cuya secuencia en *Escherichia coli* se localiza en las posiciones 8 a 27 y 1524 a 1540, respectivamente (Cuadro 2). Según Weisburg *et al.*, 1991 este par de oligonucleótidos amplifica el mayor número de nucleótidos del gen 16S rDNA de una mayor variedad de taxa bacterianos.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen rDNA 16S.

Oligonucleótidos	Secuencia	Referencia
fD1	5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
rD1	5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'	

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando GoTaq® Green Máster Mix (PROMEGA), bajo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una reacción de 25 µL, mezclando 12.5 µL de GoTaq 2X, 2.5 µL de cada oligonucleótido (fD1 y rD1) diluidos a una concentración de 1 µM, 1.5 µL de extracto de DNA y 6 µL de agua libre de nucleasas. Posteriormente las muestras se colocaron en un termociclador Select Bioproducts® (SelectCycler) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de 3 minutos a una temperatura de 94 °C, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 90 segundos y 94 °C durante 15 segundos y finalmente un ciclo a 72 °C por 5 minutos.

Al finalizar el proceso de amplificación por PCR se confirmó que el producto amplificado fuera de aproximadamente 1500 pb, visualizando el producto de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 0.8 %, usando como referencia el marcador de peso molecular de 1 kb. La concentración del producto de cada reacción se midió por espectrofotometría y al final se almacenaron en refrigeración a 4 °C (Lampe *et al.*, 2014).

3.14.3 Secuenciación y análisis de secuencias

El producto de la PCR se envió para purificación y secuenciación en ambos sentidos al Laboratorio Macrogen, USA.

Los resultados de la secuenciación se editaron en el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) para obtener las secuencias consenso. Estas últimas fueron comparadas utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3.14.4 Construcción de árboles filogenéticos

Para tener mayor confiabilidad en la identificación se estableció un análisis filogenético con

secuencias de referencia que presentan respaldo en la literatura científica. Se utilizaron secuencias del gen rDNA 16S de cepas tipo, de las especies que mostraron un elevado nivel de homología en el análisis de BLAST y de algunas otras con las cuales, de acuerdo con datos publicados, se encontraron relacionadas. Las secuencias se descargaron de la base de datos del GenBank-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para realizar el análisis evolutivo se empleó el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987), replicando un total de 1000 bootstrap (Felsenstein J., 1985). Para la distancia evolutiva se implementó el método del Jukes-cantor (Jukes y Cantor 1969). El análisis evolutivo se realizó en el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016).

3.15 Análisis estadístico

Al recabar los resultados de pH y temperatura, se aplicó un análisis de varianza ANOVA, mediante la comparación de medias por la prueba de Tukey, con un diseño experimental completamente al azar, con el fin de determinar el pH y la temperatura óptima de crecimiento bacteriano en aislados celulolíticos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y caracterización de bacterias con capacidad de degradar celulosa.

De las muestras colectadas de cada uno de los sitios seleccionados se aislaron 44 bacterias a partir de colonias crecidas en medio PDA, para enriquecimiento de los aislados (Cuadro 3). Las 44 colonias purificadas presentaban características morfológicas diferentes entre sí, y fueron sometidas a la prueba de hemólisis. Tres aislados bacterianos presentaron un patrón de degradación de hemoglobina tipo β ; este tipo de degradación causado por la actividad de la enzima hemolisina es característica de ciertos grupos de procariotas patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* o *Vibrio parahemolyticus*, y es un indicador que puede sugerir potencial patogénico en mamíferos (Leonardo y Larrea, 2017), razón por la cual, estos tres aislados fueron descartados (Cuadro 3 y Figura 14). Cada uno de los aislados purificados restantes, fue cultivado en medio con CMC como única fuente de carbono con la finalidad de corroborar su capacidad celulolítica. De esta manera se seleccionaron 25 aislados con actividad celulolítica, de los cuales, cinco provenían de muestras colectadas en composteras (S1) nueve de lombricomposta (S2) seis del interior del cráter del volcán Parícutín (S3) uno de bosque de pino-encino cuya vegetación se estima está presente desde hace 40 años (S4) y cuatro de bosque de pino-encino de una edad aproximada de 150 años (S5) (Cuadro 4).

Los aislados S1Z2A, S2Z2C, S3Z2A y S3Z3D presentaron un halo de degradación de 1.08 cm (excluyendo el diámetro de perforación del sacabocados), en tanto que el aislado S2Z2E presentó el mayor halo de degradación con un diámetro de 1.45 cm. El diámetro del halo en el resto de los aislados varió de 1 cm a 1.41 cm (Figuras 15-18).

El 64 % de los aislados fueron Gram-positivo y el 36 % Gram negativos. En cuanto a la morfología celular, la mayoría de los aislados presentaron una forma bacilar (68 %), mientras que otras formas como cocobacilos (16 %), cocos (8 %) y espiroquetas (4 %). Las variantes de la morfología colonial de una sola especie son indicativo de fenotipos diferentes (Allegrucci y Sauer, 2007); además, las bacterias Gram-positivas forman un clado monofilético consistente dentro del cual se pueden definir dos subgrupos de acuerdo al contenido de GC, en donde se reconocen en un solo grupo a *Mollicutes* y *Firmicutes*

(bajo contenido de GC) y en otro a Actinobacteria (alto contenido de GC) (Amils, 2011). Este resultado sugiere que la mayoría de los aislados pertenece al grupo monofilético de los Gram-positivos.

La microbiota del suelo está influenciada por numerosos factores como la cubierta vegetal y las propiedades físico-químicas del suelo (Philippot *et al.*, 2013). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la dinámica de las poblaciones de bacterias celulolíticas. En una zona de bosque perenifolio, Yang *et al.*, 2013, encontraron abundancia de especies de *B. cereus*, *B. subtilis* y *Pontibacter amylolyticus* con alta capacidad de degradar celulosa. Mientras que en un suelo de bosque caducifolio, se encontró una mayor densidad de bacterias celulolíticas de especies como *M. testaceum*, *C. indolaceticum* y *F. pectinovorum*; estas especies, en general presentaron una menor actividad celulolítica que las encontradas en el bosque perenifolio, pero estaban en un ambiente rico en materia orgánica, por lo que se concluyó, que las propiedades del medio ambiente, particularmente el contenido de nutrientes del suelo determina la distribución y la composición de grupos bioquímicos de bacterias. De suelos de bosques tropicales, se han aislado los géneros *Aquitalea*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Gordonia* y *Paenibacillus*, con una alta representación de taxa pertenecientes al filo proteobacteria (Woo *et al.*, 2014), mientras que en otros estudios también se ha reportado la abundancia de aislados bacterianos pertenecientes a Actinobacterias y a Firmicutes (Singh *et al.*, 2007). Otro factor documentado que moldea a las comunidades microbianas del suelo en distintos ecosistemas es el pH. La alcalinización del suelo por conversión de un ecosistema natural a un agroecosistema ocasionó un aumento en los índices de diversidad de poblaciones bacterianas; sin embargo, en ambientes naturales la biomasa microbiana fue mayor cuando se comparó con la del agrosistema en donde el suelo había sido modificado solamente por las prácticas agrícolas (Lan *et al.*, 2017), se hipotetizó que el aumento de la diversidad de bacterias en el agrosistema estuvo relacionado con la disponibilidad de nutrientes que se favorece por las prácticas agrícolas.

3. Características fenotípicas de aislados con capacidad celulolítica de los cinco sitios de muestreo, ubicados en Nuevo Parangaricuti. Las características corresponden a: C, con capacidad celulolítica; NC, sin capacidad celulolítica; ND, no determinado.

dos riano	Prueba de hemolisis	Potencial celulolítico	Tinción de Gram	Morfología celular	Morfología colonial								
					Forma	Elevación	Textura	Luz reflejada	Luz transmitida	Aspecto	Superficie	Color	Margen
1A	α	C	+	Bacilo	Circular	Plana	Aterciopelada	Opaca	Transparente	Seco	Plana	Blanca	Liso
1B	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1C	β	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1D	α	C	+	Bacilo	Circular	Plana	Aterciopelada	Mate	Transparente	Seco	Plan-convexa	Blanca	Liso
2A	α	C	+	Coco	Circular	Convexa	Creмосa	Mate	Opaca	Húmeda	Convexa	Blanca	Liso
2B	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2C	α	C	+	Cocobacilo	Filamentosa	Elevada	Pulverente	Brillante	Transparente	Húmeda	Plan-convexa	Blanca	Aserrado
3A	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3B	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3C	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3D	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4A	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4B	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5A	α	C	-	Bacilo	Irregular	Plana	Granular	Brillante	Opaca	Seco	Plana	Canela	Encorvado
1A	α	C	-	Bacilo	Irregular	Plana	Creмосa	Brillante	Opaca	Húmeda	Plana	Blanca	Encorvado
1B	α	C	-	Cocobacilo	Circular	Elevada	Algodonosa	Mate	Opaca	Seco	Plan-convexa	Blanca	Liso
1C	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1D	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1E	α	C	-	Bacilo	Puntiforme	Plana	Aterciopelada	Mate	Transparente	Seco	Plana	Blanca	Encorvado
1F	α	C	+	Bacilo	Irregular	Plana	Aterciopelada	Mate	Opaca	Seco	Plana	Blanca	Encorvado
1G	α	C	-	Coco	Circular	Elevada	Creмосa	Brillante	Opaca	Húmeda	Plana	Blanca	Encorvado
2A	β	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2B	α	C	+	Cocobacilo	Filamentosa	Plana	Vellosa	Mate	Transparente	Seco	Plana	Blanca	Aserrado
2C	α	C	-	Bacilo	Circular	Plana	Aterciopelada	Mate	Transparente	Seco	Plana	Blanca	Liso
2D	α	C	+	Bacilo	Puntiforme	Elevada	Creмосa	Brillante	Opaca	Húmeda	Plan-convexa	Canela	Liso
2E	α	C	+	Bacilo	Filamentosa	Plana	Aterciopelada	Brillante	Transparente	húmeda	Plan-convexa	Blanca	Aserrado
1A	α	C	+	Bacilo	Rizoide	Plana	Aterciopelada	Mate	Opaca	seco	Plana	Blanca	Aserrado
1B	α	C	+	Bacilo	Irregular	Plana	Aterciopelada	Mate	Opaca	Seco	Plana	Canela	Ondulado
1C	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2A	γ	C	-	Cocobacilo	Irregular	Convexa	Aterciopelada	Mate	Opaca	Seco	Plana	Blanca	Aserrado
2B	γ	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3A	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3B	β	/	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3C	α	C	+	Diplobacilo	Rizoide	Plana	Aterciopelada	mate	opaca	Seco	Plana	blanca	Ondulado
3D	α	C	+	Bacilo	Irregular	Convexa	Mucosa	mate	opaca	Húmeda	Umbilicada	canela	Aserrado
3E	α	C	+	Bacilo	Rizoide	Convexa	Mucosa	mate	opaca	Seco	Convexa	canela	Aserrado
1A	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1B	α	C	-	Espiroqueta	Irregular	Convexa	Creмосa	brillante	opaca	Húmeda	Plan-convexa	blanca	Liso
1C	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1A	α	C	+	Bacilo	Filamentosa	Elevada	Granular	mate	opaca	Húmeda	Convexa	blanca	Ondulado
1B	α	C	+	Bacilo	Filamentosa	Elevada	Algodonosa	mate	opaca	Húmeda	Convexa	canela	Aserrado
1C	α	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1D	α	C	+	Bacilo	Filamentosa	Plana	Aterciopelada	mate	opaca	Seco	Plana	blanca	Aserrado
2A	α	C	-	Bacilo	Irregular	Plana	Mucosa	brillante	opaca	Húmeda	Plana	canela	Aserrado

Cuadro 4. Aislados con capacidad celulolítica. Microorganismos celulolíticos obtenidos de las cinco zonas de muestreo, ubicados en Nuevo Parangaricutiro y Angahuan.

Sitio	Composta	Lombricomposta	Volcán	Bosque	Bosque
Zona 1	S1Z1A S1Z1D	S2Z1A	S3Z1A S3Z1B	S4Z1B	S5Z1A
		S2Z1B			S5Z1B
		S2Z1E			S5Z1D
		S2Z1F			
		S2Z1G			
Zona 2	S1Z2A S1Z2C	S2Z2B	S3Z2A		S5Z2A
		S2Z2C			
		S2Z2D			
		S2Z2E			
Zona 3	S1Z3A		S3Z3C		
			S3Z3D		
			S3Z3E		

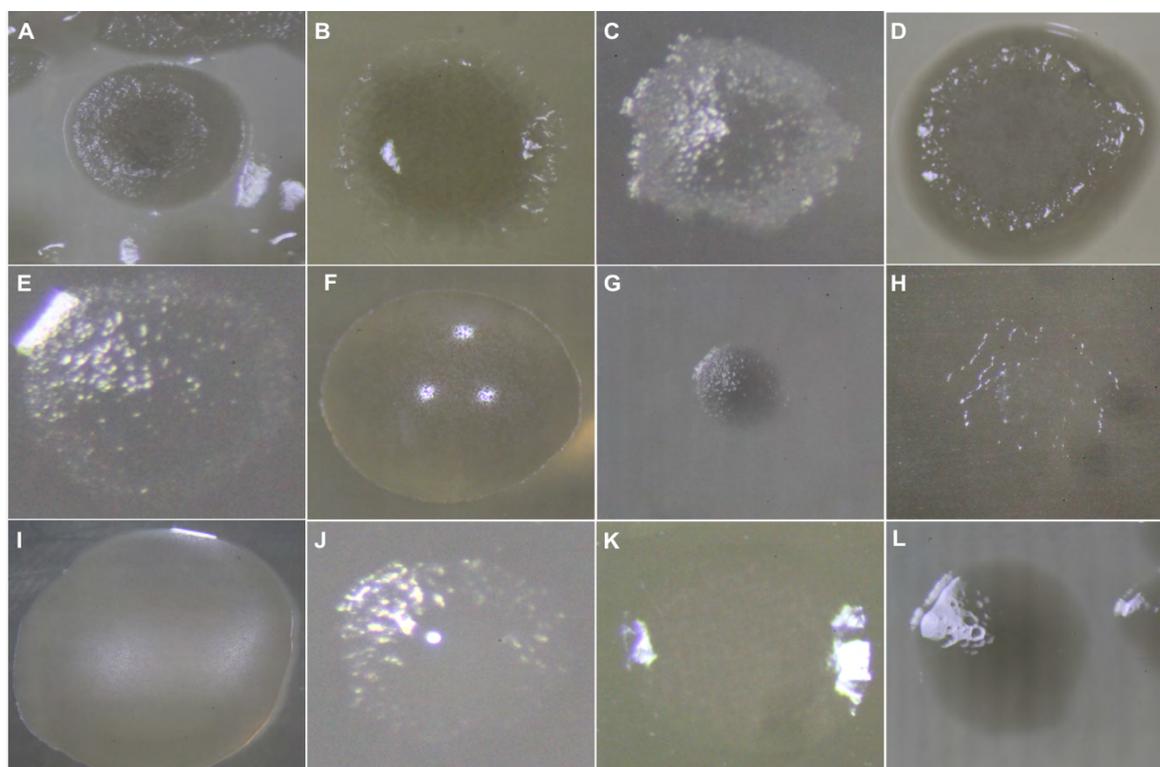


Figura 14. Morfología colonial de aislados celulolíticos creciendo en medio sólido con CMC como única fuente de carbono. A corresponde al aislado S2Z1A; B, S2Z5B; C, S3Z3C; D, S5Z1D; E, S2Z1B; F, S2Z1F; G, S3Z1D; H, S2Z1E; I, S3Z2A; J, S2Z2B; K, S5Z1A y L, S2Z2E.

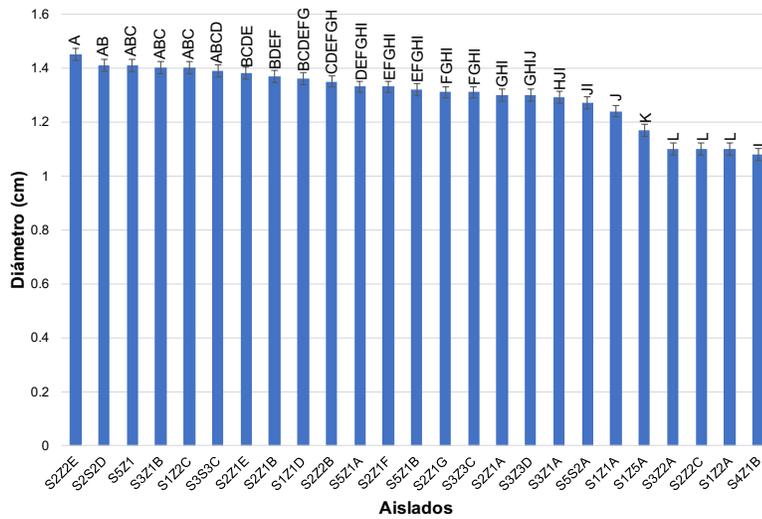


Figura 15. Media del diámetro de halos de degradación de CMC en 25 aislados. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$ y $\alpha = 3$).

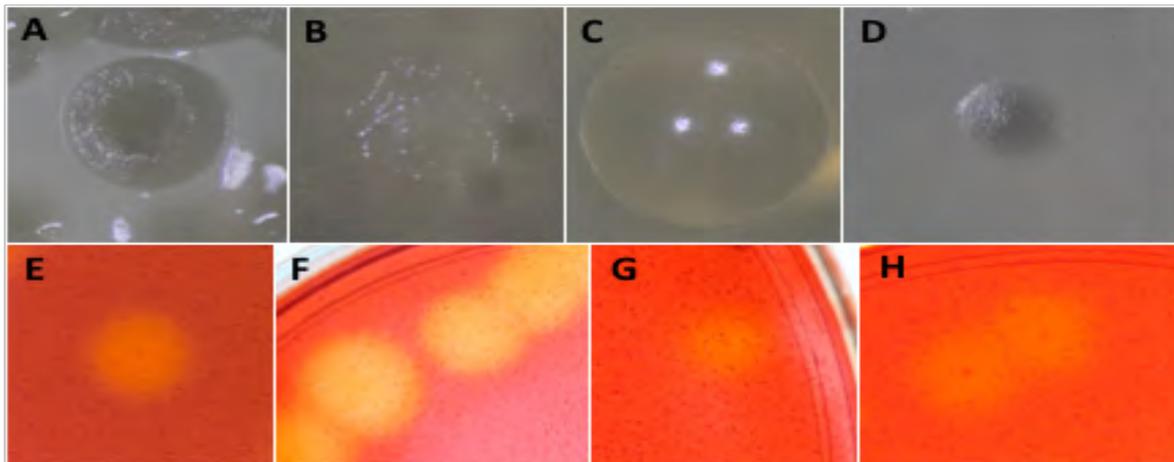


Figura 16. Halos de degradación de colonias bacterianas. A-C colonias S1Z1A, S2Z1E y S2Z1F crecidas en medio CMC; D aislado S3Z1B después de 24 horas de incubación a 35 °C representa la morfología colonial del aislado crecido en medio LB después de 48 horas de incubación a 35 °C; E-H, halos de degradación de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.

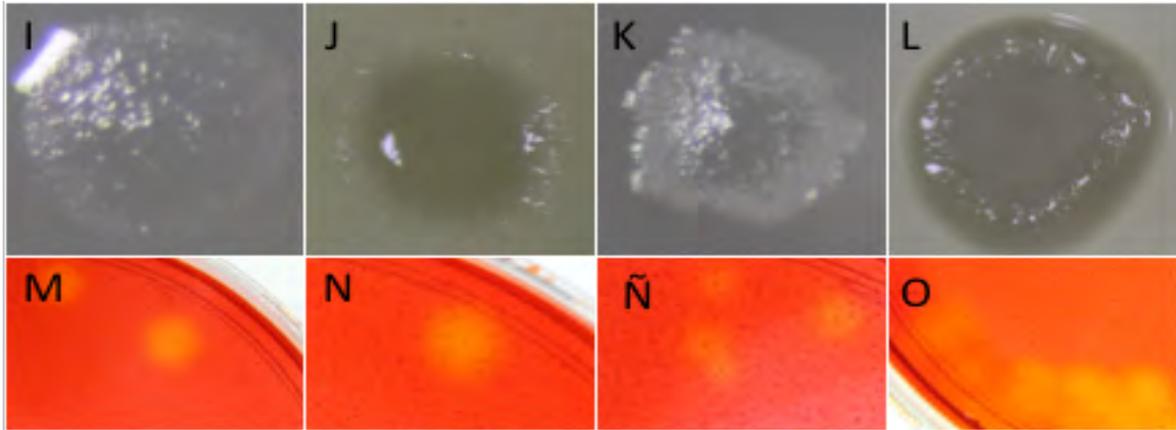


Figura 17. Halos de degradación de colonias bacterianas. I-L colonias S2Z1B, S5Z1B, S3Z3C y S5Z1D crecidas en medio CMC; M-O, halos de degradación de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.

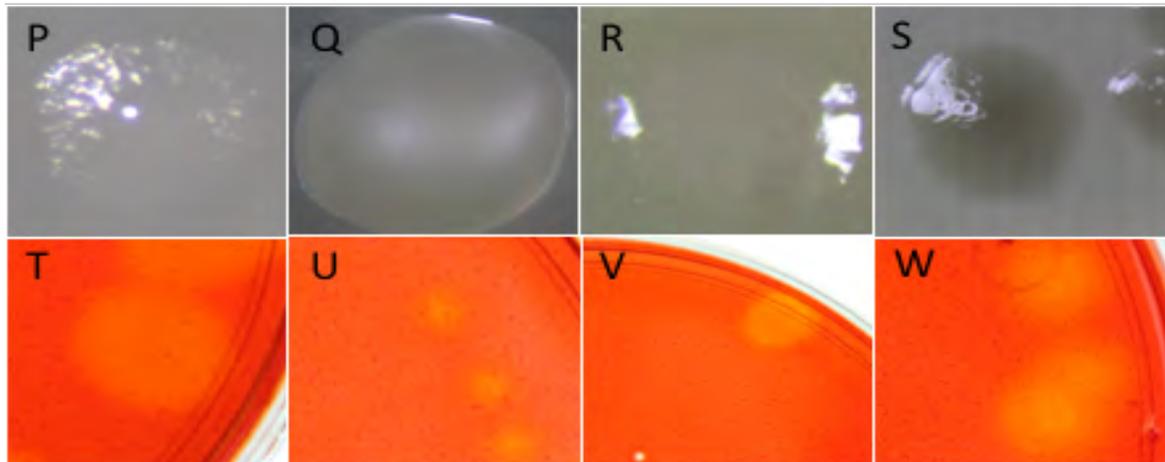


Figura 18. Halos de degradación de colonias bacterianas. P, Q y S colonias S2Z2B, S3Z2A y S2Z2E crecidas en medio CMC; R aislado S5Z1A después de 24 horas de incubación a 35 °C representa la morfología colonial del aislado crecido en medio LB después de 48 horas de incubación a 35 °C; T-W, halos de degradación de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.

En nuestro estudio, el número de aislados obtenidos a partir de las muestras de suelo de bosque fue reducido en comparación con composta. Esto podría deberse a que en esta zona, las características particulares de vegetación, disponibilidad de nutrientes y características físico-químicas del suelo han permitido el establecimiento de pocas poblaciones de bacterias celulolíticas. Sin embargo, es importante resaltar que, el uso de fuentes de carbono recalcitrantes como CMC o lignina para realizar el aislamiento de bacterias celulolíticas, o el empleo de medios de cultivo específicos que favorezcan el crecimiento de ciertos taxa bacterianos podría generar un número mayor de aislados a partir de muestras de suelo con las características de los dos sitios de bosque muestreados en este trabajo. La variación de las poblaciones microbianas también podría ser

influenciada por las condiciones estacionales al momento de la colecta (Hakspiel Segura. 2009; Andy y Edwin 2008)

Las modificaciones del pH ocasionadas por actividades antropogénicas como el cambio de ambientes naturales a agrosistemas. Asimismo, el pH es uno de los factores con mayor variación durante las etapas de composteo, en la etapa mesófila II, disminuye el pH y se mineraliza el nitrógeno orgánico y se libera el H^+ como producto del proceso de nitrificación hasta la etapa de maduración (Zhang *et al.*, 2011).

Esto en conjunto con un ambiente rico en nutrientes y cambios dinámicos de temperatura trae como consecuencia el establecimiento de clases de microorganismos con metabolismos contrastantes en cada una de las etapas de composteo (Ryckeboer *et al.*, 2003), en dónde de manera particular, durante la etapa mesófila II, se favorece la presencia de microorganismos capaces de degradar fuentes de carbono de alto peso molecular como polímeros de glucosa (Insam y Bertoldi, 2007) ya que en esta etapa se agotan las fuentes de carbono de bajo peso molecular y este evento sucede a la degradación de polímeros complejos como la celulosa; la mesófila II, se caracteriza por la presencia de bacterias celulolíticas mesófilas de los géneros *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Pseudomonas*, entre otras (Romane *et al.*, 2013; Thomas y Schaechter, 2012).

Por su parte, a diferencia del composteo tradicional, el lombricomposteo es un proceso mesofílico en el cual participan anélidos, de manera específica de la especie *Eisenia fetida* es la más utilizada en este tipo de prácticas. En el lombricomposteo se genera un producto final con un contenido de nutrientes superior, así como con una actividad microbiana elevada, y se obtiene en menor tiempo que en el composteo (Tognetti *et al.*, 2005). Esto significa que los procesos de degradación de polímeros como la celulosa se realiza en tiempo corto, entre otras cosas, por acción sinérgica entre las comunidades microbianas. La cantidad de celulosa durante el proceso de lombricomposteo ha sido cuantificada (Aira *et al.*, 2006) y se ha observado que su disminución en el sustrato está acompañada de una alta densidad de lombrices y un incremento en la biomasa microbiana. Además, se ha propuesto que las condiciones de lombricomposteo favorecen el establecimiento de relaciones simbióticas y sinérgicas entre bacterias celulolíticas que producen enzimas con una alta capacidad catalítica y lombrices (Hong *et al.*, 2011).

El aislamiento de bacterias celulolíticas a partir de ambientes extremos, particularmente aquellos con altas temperaturas se considera de importancia por las propiedades termoestables de las enzimas que estos organismos producen. Stathopoulou *et al.* (2012) obtuvieron un aislado de *Geobacillus* sp. productor de celulasa, xilanasa, β -glucosidasa y β -xilosidasa a partir de muestras de ambientes volcánicos. En el género *Geobacillus* se ha identificado el gen *celA*, que codifica para una endoglucanasa extracelular que retiene su actividad después de haber sido sometida una temperatura de 65 °C durante 6 horas y con rangos de actividad enzimática óptima desde los 45 hasta los 75 °C (Ng *et al.*, 2009). Otra especie aislada de ambientes volcánicos es el extremófilo *Thermoclostridium stercorarium*, que es un Gram-positivo fermentador con alta actividad celulolítica y hemicelulolítica (Schwarz *et al.*, 1995). Otros celulolíticos han sido obtenidos de ambientes extremófilos como fuentes de geiseres naturales en Candarave-Tacna, Perú y en el Parque Nacional Yellowstone (Lampe *et al.*, 2014; Debord *et al.*, 1995). En el presente trabajo, se obtuvieron seis aislados fenotípicamente distintos a partir de las muestras de suelo del cráter del volcán Parícutín, la mayoría de ellos Gram positivos. En este ambiente, la materia orgánica era escasa a comparación de lo que se observó en otras zonas de colecta y no había cubierta vegetal. Durante el proceso de intemperismo, después de las etapas iniciales, favorecidas por factores físicos y químicos, se propicia el establecimiento de microorganismos con ciertas particularidades metabólicas como fotótrofos fijadores de nitrógeno y quimiolitótrofos. Posteriormente, las interacciones de microorganismos con raíces de plantas favorecen el establecimiento de comunidades vegetales (Voroney, 2007). Fujimura *et al.* (2012) reportan la colonización microbiana de sustratos posterior a la erupción del Monte Oyama (año 2000); en la que describen la abundancia de bacterias pertenecientes a Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria a partir de muestras colectadas en una zona no afectada por la erupción, con una edad geológica aproximada de 800 años. En muestras colectadas de zonas que habían sufrido los efectos de la erupción, el metabolismo heterotrófico no se detectó por análisis del perfil fisiológico y se demostró la presencia de bacterias quimiolitótrofas, con Proteobacteria como el grupo más abundante. La erupción del volcán Parícutín ocurrió en el año de 1943 y se extendió hasta 1952 (Inbar *et al.*, 1994). En este estudio fue posible aislar bacterias capaces de degradar celulosa del interior del cráter del volcán, lo cual sugiere que, desde el inicio del periodo de inactividad del volcán hasta la fecha, se ha propiciado el establecimiento de bacterias

heterotróficas capaces de degradar una fuente recalcitrante de carbono como celulosa como un mecanismo para aprovechar la escasa disponibilidad de carbono.

4.2 Aislados con capacidad de degradar celulosa, difieren en su potencial para catabolizar CMC en condiciones *in vitro*

Se realizó la dinámica de crecimiento *in vitro* de los 25 aislados bacterianos con capacidad celulolítica crecidos en medio de cultivo líquido con CMC como única fuente de carbono. Además, se determinó el momento de crecimiento sincrónico ideal, en el que la tasa de reproducción es proporcional a la población existente y a la cantidad de recursos disponibles, de acuerdo al modelo lineal o logístico de Verlhults-Pearl (Sunday *et al.*, 2012). A las 16 horas de crecimiento en cultivo líquido a una temperatura de 35 °C y en agitación, 17 aislados celulolíticos estuvieron en su punto ideal de crecimiento sincrónico; los aislados S1Z5A, S2Z1B, S3Z3D, S5Z1D y S5Z2A, a las 28 horas; S2Z2E, a las 56 horas; S1Z2A a las 12 horas y S5Z1A a las 4 horas (Cuadro 4). En cultivos bacterianos en medio líquido, se reconoce que existe una etapa de división celular sincrónica durante las primeras horas, en la cual se mantiene una fase logarítmica estable. Posterior a ello, comienza la fase estacionaria o de latencia; donde disminuye la multiplicación; se produce un declive del crecimiento celular y se paraliza el desarrollo; ocasionado por la disminución de nutrientes y el aumento de sustancias tóxicas en el medio (Guzmán y Cedeño, 2015; Panicov, 2011). Sin embargo, el género *Bacillus*, se ha caracterizado por mostrar fases de crecimiento sincrónico que comienzan entre las 2 y las 16 horas en medio CMC en condiciones *in vitro* (Rodríguez y Llenque, 2016). Además, bacterias celulolíticas como *B. cecembensis*, *Paenibacillus papuli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoioides*, presentan crecimiento sincrónico más rápido y eficaz en medio enriquecido con CMC, que con otras formas de carbono como celulosa cristalina (Avicel). La dinámica de crecimiento de los aislados bacterianos que se obtuvieron en este trabajo fue evaluada en presencia de CMC como fuente de carbono.

El punto de crecimiento sincrónico se usó como referencia para realizar el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en medio CMC sólido. La mayor parte de los aislados generaron entre 5.0×10^5 y 7.0×10^{10} UFC \cdot mL⁻¹ en el punto de crecimiento sincrónico ideal, sin embargo el aislado S3Z3D desarrolló 4.0×10^4 UFC \cdot mL⁻¹ y los aislados

S3Z1A, S3Z3C, S2Z2C alcanzaron la mayor densidad colonial con 1.0×10^{11} UFC \cdot mL⁻¹ (Cuadro 5). La formación de colonias de bacterias celulolíticas *in vitro* depende de diversos factores ambientales como el pH, temperatura y sustrato, además de la capacidad de adherencia al medio de cultivo, donde pueden coexistir células no adherentes con celodextrinas en las que se limita la generación de colonias (Khatiwada *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 2009).

Cuadro 5: Características físico químicas y catalíticas de aislados con capacidad celulolítica. Las abreviaturas corresponden a: CMC carboximetilcelulosa; M, degradación enzimática de monómeros; MD, degradación enzimática a monómeros y dímeros; ND, no determinado.

Aislados	Crecimiento sincrónico (Hrs)	CMC (cm)	UFC	µg de glucosa	TLC
S1Z1A	16	1.24	8.0×10^9	35.02	ND
S1Z1D	16	1.36	3.0×10^8	37.09	ND
S1Z2A	12	1.1	4.9×10^8	31.91	ND
S1Z2C	16	1.4	7.0×10^9	46.74	M
S1Z5A	28	1.17	1.0×10^7	ND	ND
S2Z1A	16	1.3	7.0×10^7	47.43	ND
S2Z1B	28	1.37	6.7×10^6	28.72	M
S2Z1E	16	1.38	3.0×10^6	40.53	ND
S2Z1F	16	1.33	1.5×10^7	50.71	M
S2Z1G	16	1.31	1.0×10^8	50.71	ND
S2Z2B	16	1.35	8.0×10^7	23.64	ND
S2Z2C	16	1.1	1.0×10^{11}	31.57	ND
S2Z2D	16	1.41	8.7×10^7	31.57	ND
S2Z2E	56	1.45	2.0×10^5	46.22	ND
S3Z1A	16	1.29	1.0×10^{11}	33.46	MD
S3Z1B	16	1.4	4.0×10^7	ND	ND
S3Z2A	16	1.1	3.4×10^6	25.19	ND
S3Z3C	16	1.31	1.0×10^{11}	36.03	ND
S3Z3D	28	1.3	4.0×10^4	30.12	ND
S3Z3E	16	1.39	7.0×10^7	42.26	ND
S4Z1B	16	1.08	6.0×10^7	28.64	ND
S5Z1A	4	1.33	5.0×10^5	26.57	ND
S5Z1B	16	1.32	6.5×10^6	49.88	M
S5Z1D	28	1.41	7.0×10^{10}	29.88	MD
S5Z2A	28	1.27	7.0×10^9	46.53	ND

Otro factor influyente, es el sitio de procedencia del microorganismo; se ha observado que bacterias con capacidad de degradar carboximetilcelulosa, como única fuente de carbono procedentes de zonas boscosas y composteras, con alto contenido de materia orgánica, presentan un alto número de colonias (1.26×10^{11} hasta 9.4×10^{13} UFC \cdot mL⁻¹); el género *Bacillus*, es el más abundante dentro de microorganismos celulolíticos encontrados en las

zonas mencionadas anteriormente. (Cuevas 2013; Florez *et al.*, 2016 y Morales-barrón *et al.*, 2017). Mientras que microorganismos celulolíticos que fueron extraídos de suelos con poca cantidad de arcilla, limo, materia orgánica y baja conductividad eléctrica; forman desde 3×10^5 a 6.8×10^7 UFC ml^{-1} *in vitro* (Ashwani *et al.*, 2014).

Durante esta etapa, y a medida que se subcultivaban los aislados originalmente seleccionados, se observó que S1Z5A y S3Z1A perdieron la capacidad de desarrollarse en condiciones *in vitro*, por lo que no fueron sujetos a las evaluaciones posteriores.

El crecimiento sincrónico se utilizó como referencia para cuantificar la capacidad celulolítica, de acuerdo a la concentración de azúcares reductores generados por el catabolismo de la CMC en medio líquido. De los 23 aislados evaluados, los pertenecientes al grupo cuyo punto de crecimiento sincrónico se alcanzó a las 12 h de inoculación en medio LB, presentaron una concentración máxima de 30 a 40 μg de glucosa $\cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 19 A), los aislados de crecimiento sincrónico a las 16 h alcanzaron un máximo de 25 a 50 μg de glucosa $\cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 19 B) y los aislados de crecimiento sincrónico a las 22 h mostraron una concentración máxima de 30 a 40 μg de glucosa $\cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 19 C).

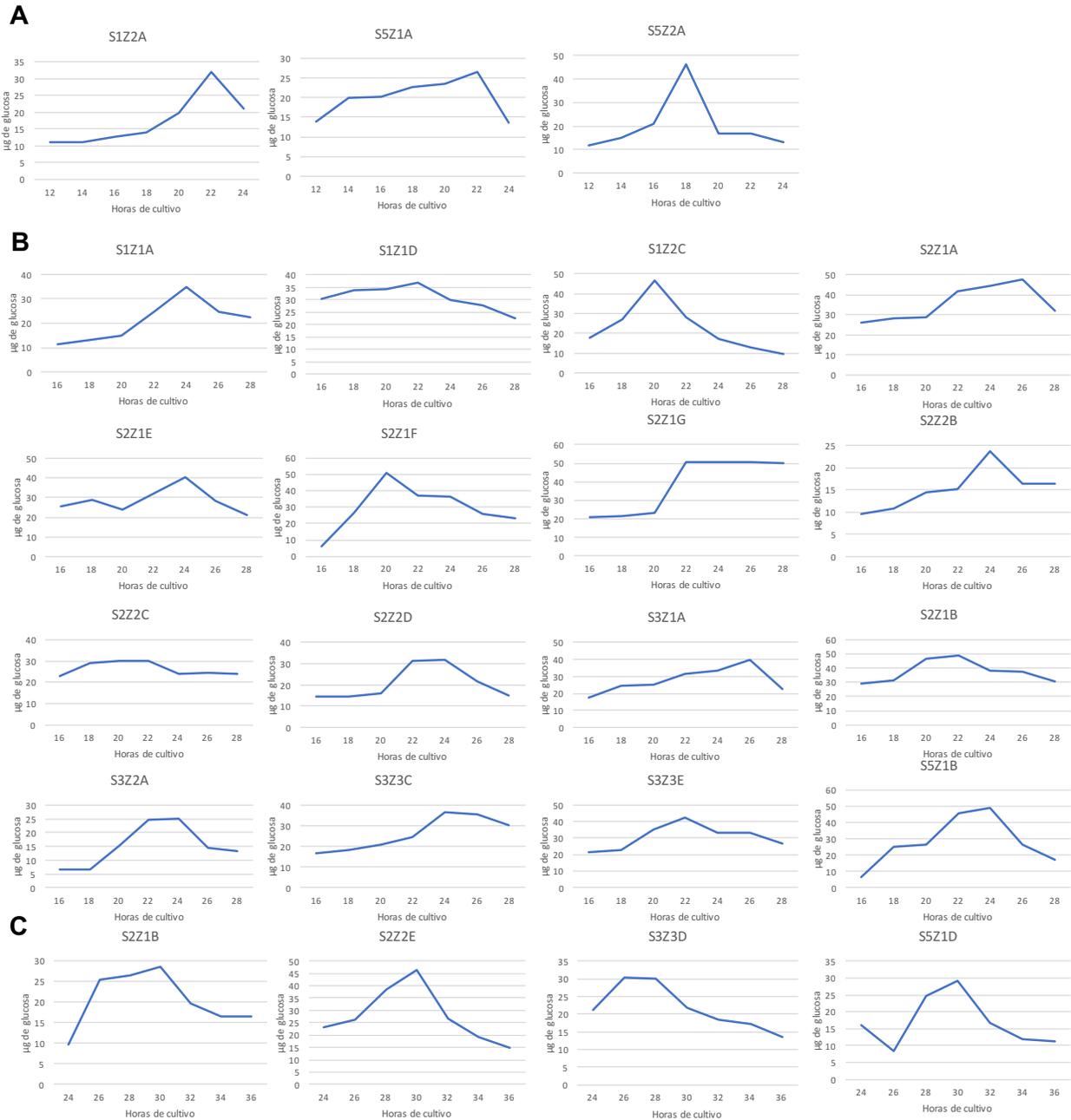


Figura 19. Curvas de degradación de azúcares reductores mediante el método de Somogyi y Nelson. El punto de inicio se tomó 4 horas antes de la fase exponencial de cada uno de los aislados celulolíticos. La Figura A muestra los aislados tomados desde las 12 hasta 24 horas de reducción de azúcares, en la Figura B se observan aislados con punto de inicio desde las 16 a 28 horas. La Figura C con fase desde las 24 a las 36 horas de crecimiento. Todos los aislados crecidos en medio CMC a 35 °C a 130 rpm.

Se sabe que, la degradación de azúcares es un proceso altamente eficiente por microorganismos que utilizan un sistema transportador de celulasas, donde el consumo de azúcares solubles en el interior de las células, es transportado al citosol en donde

comienzan a ser transformados en glucosa-6-fosfato para entrar a la ruta glucolítica. Frecuentemente esto ocurre segundos después de la liberación inicial de las fibras de celulosa (Camacho *et al.*, 2014). Sin embargo, los picos más altos de actividad enzimática se generan al final de la glucólisis, al agotarse los polisacáridos presentes en el medio (CMC) (Khatiwada *et al.*, 2016). De acuerdo a los resultados obtenidos, mediante la implementación de microorganismos celulolíticos se sugiere que exista una correlación entre factores como el pH y temperatura, estos factores externos influyen en los procesos de degradación enzimática (Rastori *et al.*, 2010). 23 aislados fueron sometidos a análisis de los productos de hidrólisis mediante cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography o TLC por sus siglas en inglés). 6 aislados (S5Z1D, S2Z1B, S3Z1A, S1Z2C, S2Z1F y S2Z1B) presentaron la capacidad de degradar CMC a dímeros, ya que se observó la presencia de manchas en las placas de sílice que coincidían con los dímeros de referencia (celobiosa y maltosa) (Cuadro 4). Por su parte, los productos resueltos por TLC de los extractos generados de los aislados S3Z1A y S5Z1D sugieren que ambos son capaces de degradar el polímero en monómeros (Figura 20). En el resto de los aislados no se detectó la presencia de monómeros o dímeros en los extractos resueltos por TLC.

Es bien sabido que la producción de celulasas se optimiza mediante el uso de aislados bacterianos con capacidades enzimáticas específicas. Además, la capacidad de degradación de un polímero como la celulosa, está relacionado con la temperatura, el pH, el sustrato y el tiempo de desarrollo fisiológico de manera *in vitro*. Estudios recientes demuestran que existen bacterias con la capacidad de degradar polímeros a dímeros, cuando se implementa CMC y no papel filtro como única fuente de carbono, haciendo al CMC 4.7 veces más susceptible a la degradación enzimática, la cual permite una mayor asimilación por parte de los microorganismos, para concluir en la formación de diversos azúcares y/o fuentes de carbono (Tollefson *et al.*, 2008).

Es por ello que en la actualidad el contar con aislados celulolíticos que contengan celulasas activas y estables, además de sobrevivir a capacidades termofílicas, son de gran interés debido a sus potenciales aplicaciones industriales, bioenergéticas y agrícolas.

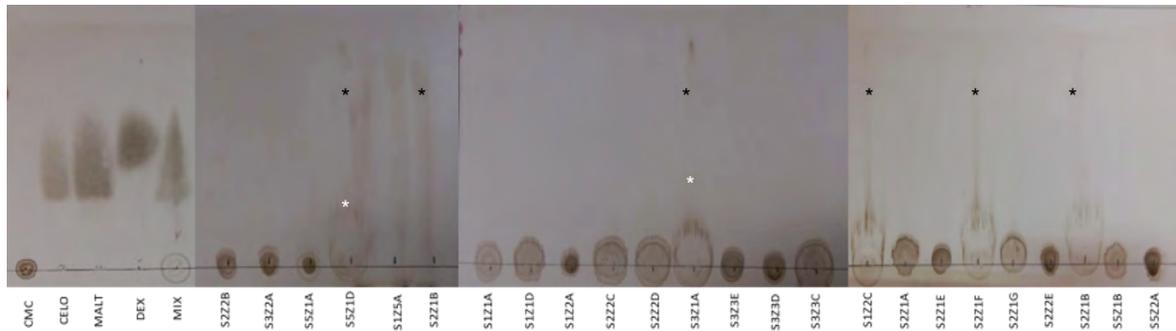


Figura 20. Cromatografía de Capa Fina (TLC) en cromatoplasmas de 20 x 20 cm (Merck) con gel de sílice G 60 F254 de 0.25 mm de espesor, como marcadores de corrida se emplearon los azúcares CMC, Celobiosa, Maltosa, Dextrosa y Mix, posterior se muestran los 24 aislados crecidos en medio CMC al 1 % hasta su fase exponencial. El asterisco (*) indica degradación de CMC a dímeros y el doble asterisco (**), degradación a monómeros.

Por el contrario, existen bacterias que limitan las actividades enzimáticas por parte de las celulasas y disminuyen la formación de glucosa como fase final (Berg *et al.*, 1971). Se sabe que el género *Bacillus* tiene una mayor degradación enzimática con CMC como sustrato, que con celulosa microcristalina (De Marco *et al.*, 2017). Se sabe que especies como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* sp. obtenidas en nuestro proyecto, tienen la capacidad para hidrolizar distintos polímeros a monómeros de manera *in vitro* (Lee *et al.*, 2018; Wu., B. *et al.*, 2018). Además, en la obtención de hexosas y pentosas (glucosa y xilosa) a partir de material vegetal fibroso, se han usado *Scopulibacillus* sp., *Enterobacter* sp y *Cytophaga hutchinsonii* (Yan., Z. F. *et al.*, 2018; Waghmare *et al.*, 2018). Donde actúan en la transformación rápida de celulosa con la utilización de un sistema simple de la celulasas que consiste en endoglucanasas y β -glucosidasas. Además, este género es altamente tolerante a la glucosa ya que conserva el 40 % de su actividad al aumentar 100 veces la concentración de glucosa *in vitro*, mostrando así su potencial de aplicación en la agroindustria (Van Dick *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Sin embargo; también existen enzimas derivadas de microorganismos como *Clostridium cellulolyticum*; el 52 % de los microorganismos celulolíticos demuestran interacciones enzimáticas con otras endoglucanasas, pertenecientes a glicol hidrolasas (Fu *et al.*, 2010).

Al sustituir CMC, por otro sustrato natural, nuestros microorganismos no se desarrollaron de la misma manera. Es por ello que, la afinidad de un microorganismo por un sustrato específico, es de suma importancia; ya que, al contener la adecuada fuente de carbono, el

microorganismo aumenta su capacidad catalítica dada por las enzimas hidrolíticas, siendo la sacarosa el sustrato mayor utilidad seguido del CMC. Por el contrario, de manera *in vitro* al no existir el sustrato adecuado la despolimerización es baja, la fase Lag del desarrollo celular se prolonga y el rendimiento bacteriológico disminuye (Ahuja *et al.*, 2004). Se sabe además que el añadir caseína y tirosina en el medio de cultivo aumenta la producción enzimática; pero estos afectan la permeabilidad celular (Reese E. T 1971 y Bradford M. M.1976). Khatiwada *et al.* en (2016) menciona que, el rendimiento celulolítico de microorganismos del genero *Bacillus* se ve beneficiado cuando se implementa celulosa vegetal, α - celulosa, CMC u otras fuentes de carbohidratos. Al momento de determinar la capacidad catalítica para otros microorganismos celulolíticos como es el caso del hongo *Saccharomyces cerevisiae*, resulta haber una mayor degradación enzimática en CMC que al implementar papel filtro como fuente de carbono. En estos casos las actividades extracelulares de la celulasa varían de 0,012 a 0,196 UI mL para papel filtro y de 0,162 a 0,400 UI mL para el análisis de endoglucanasa en CMC (Gupta *et al.*, 2011). Leschine y Canale, en (1983), sugieren que se deben de implementar condiciones adecuadas para microorganismos celulolíticos específicos y así obtener un rendimiento remunerable y adecuado con la capacidad de degradar CMC en velocidades aceleradas.

Se sabe que, bacterias como *Marinimicrobium* sp. tienen una alta actividad para degradar CMC extracelular. Esta bacteria demostró su actividad máxima degradadora a 55 °C y pH de 7,0 en ausencia de NaCl conservando el 84 % de la enzima, además de resistir diferentes concentraciones de pH (5 – 11) indicando que es halotolerante, termoestable y alcalino-estable (Zhao *et al.*, 2012). Por otra parte, bacterias como *Clostridium cellulolyticum* tienen una actividad enzimática en pH 6,5 a 35 °C, al demostrar actividad alta para en CMC y baja en Avicel insoluble (Fu *et al.*, 2010). Estudios recientes revelan que el nivel máximo de actividad de la celulasa producido por aislados de *Bacillus* sp. y *Serratia* sp. es posterior a las 24 horas de crecimiento celular, sin embargo, existen *Pseudomonas* spp. que demoran hasta 42 horas para su expresión. Señalando que el pH y la temperatura óptima para la expresión es a 37 °C y pH de 7,0 respectivamente. Sin embargo, la celulasa cruda, resulta ser más rápida en la liberación de azúcares, donde los microorganismos producen un nivel de celulasa alto con una capa degradante de celulosa (Khatiwada *et al.*, 2016). Pandey *et al.*, (2013) sugiere que la temperatura óptima para la

actividad celulolítica de la celulasa secretada por los aislados bacterianos extraídos de diversos ambientes extremos es de 40 °C. Por otra parte, la celulasa proveniente de fuentes fúngicas es inestable en condiciones alcalinas y temperaturas mayores de 50 °C (Singh *et al.*, 2011). Por lo antes mencionado; se requiere optimizar las condiciones fisicoquímicas para la máxima actividad de un microorganismo celulolítico antes de su aplicación.

Es por ello que se realizó la determinación de la temperatura óptima para el crecimiento de los 25 aislados celulolíticos crecidos en medio de cultivo CMC como única fuente de carbono. Los aislados S3Z1B y S2Z1B, presentaron los crecimientos bacterianos más altos; desde 4.5 cm (25 °C) hasta 7 cm (50 °C) de diámetro con estas referencias en 7 temperaturas, cabe señalar que el diámetro de los aislados a los 60 °C decreció. Sin embargo obtuvimos 19 aislados donde sus diámetros bacterianos tuvieron una variación muy amplia de temperatura óptima. Como referencia los aislados S1Z1D, S2Z1E y S5Z1D, con un diámetro de crecimiento de 3.8 cm a los 45 °C y 2.5 cm a los 55 °C; y un tercer grupo donde sus diámetros oscilaron entre 1cm y 0.5 cm (S5Z2A y S4Z1B) (Figura 22). Cabe señalar que dos aislados (S5Z2A y S3Z3C) no crecieron a temperaturas mayores a los 50 °C (Figura 21); aunado a ello 22 aislados podrían caracterizarse dentro del rango de los termófilos, ya que crecen a temperaturas mayores de los 45 °C. De acuerdo a los resultados obtenidos las temperaturas óptimas para el desarrollo de aislados celulolíticos provenientes de 5 zonas de Nuevo Parangaricutiro; son entre los 35 a 45 °C, ya que fue donde se observó mayor desarrollo.

Se conoce que existen microorganismos susceptibles a las variaciones de temperaturas, (Mantilla y Acosta, 2013). Sin embargo, se sabe que para las funciones catalíticas de los microorganismos celulolíticos es más eficiente su desarrollo a temperaturas de 50 °C. Esto se concreta con los trabajos de Guzmán *et al.* (2015) y Amraini *et al.* (2017), quienes mencionan que *Bacillus* sp, *B. subtilis* y *Bacillus circulans* aislados de composta y geiseres, tienen mayor crecimiento entre los 50 y 60 °C, además de que la actividad catalítica aumenta drásticamente al sobrepasar los 45 °C, debido a un aumento en la energía cinética de los microorganismos (Acharya y Chaudhary, 2012 y Ladeira *et al.*, 2015). Se sabe también que al aumentar la temperatura se produce una mayor cantidad de ácidos

orgánicos, por lo que conlleva a la disminución del pH (Heck *et al.*, 2002 y Shabeb *et al.*, 2010).

Los resultados arrojaron que en temperaturas mínimas el pH más alto osciló entre 8 y 7 (S1Z2C y S3Z3C) y de 4.8 (S1Z1A) el mínimo, referente a los 25 a 35 °C, entre los 40 y 50 °C el pH más alto se encontró en 6.7 (S2Z2A, S1Z5A y S3Z1D) y de 3.2 en el aislado S3Z1A (Figura 23). En inóculos con temperaturas posteriores a los 50 °C el pH del medio se acidificó ya que el 84 % de los aislados se encontró en los rangos de 7 a 3.89 en comparación con los de la temperatura de 70 °C donde un 52 % se encontró en un pH de 7.01 (S1Z2A) el 40 % a pH inferior de 6 (S2Z1A) (Figura 22). Cabe mencionar que el pH se ve influenciado por la temperatura, ya que entre más aumentó la temperatura el pH se volvió más ácido y si la temperatura es baja el pH es alcalino, es por ello que los datos obtenidos en nuestro experimento demuestran que las temperaturas óptimas para que el crecimiento bacteriano esté en un pH cercano a la neutralidad debe de encontrarse entre los 35 y 45 °C, y así no se disminuya el crecimiento celular. Se sabe que los valores óptimos de pH para bacterias celulolíticas oscila entre 6.0 y 7.5, mientras que en el caso de hongos celulolíticos este rango se amplía entre valores de pH 5.5 a 8.0 (Salazar, 2014). Además; en numerosas reacciones enzimáticas los iones H⁺ pueden actuar como inhibidores, causando la disminución del crecimiento celular por el bajo pH (Ramírez, 2014). En organismo celulolíticos estrictamente aeróbios es necesario un pH entre 7-8 para que su crecimiento celular sea eficiente, ya que en pH ácidos el crecimiento decrece (Berg *et al.*, 1971). Específicamente, *Bacillus* sp. y *B. subtilis* requieren un medio de crecimiento neutro (8-6.5 y 7.5) y una temperatura de 40 °C para su desarrollo fisiológico (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016 y Amraini *et al.*, 2017). Sin embargo, para que la actividad enzimática de endoglucanasas sea mayor se requiere de temperaturas más elevadas (59.5 °C hasta 67.5 °C), donde los pH deben de oscilar entre 5.9 y 6.4 (Lampe *et al.*, 2014). Prasad *et al.* (2015), reafirma este resultado, al obtener *Bacillus* sp. con una actividad de celulasa estable en pH 6 – 8 a 50 °C, donde la enzima mostró un 19 % de aumento en su actividad enzimática relativa. Por parte de hongos celulolíticos como *Trichoderma* y *Aspergillus*, donde se empleó medio con CMC, los factores físico- químicos influyen en la capacidad degradadora del material celulolítico de manera *in vitro*. Se sabe que para estos géneros la gama de pH debe de ser alcalino (7 a 9) y así rendir un buen funcionamiento en la degradación (Laachari

et al., 2013 y Guzmán et al., 2015). Por lo antes mencionado los microorganismos celulolíticos con características específicas han atraído considerable atención debido a sus potenciales aplicaciones industriales, estas pueden llegar a ser halotolerante, termotable y alcalino-estable (Zhao et al., 2012).

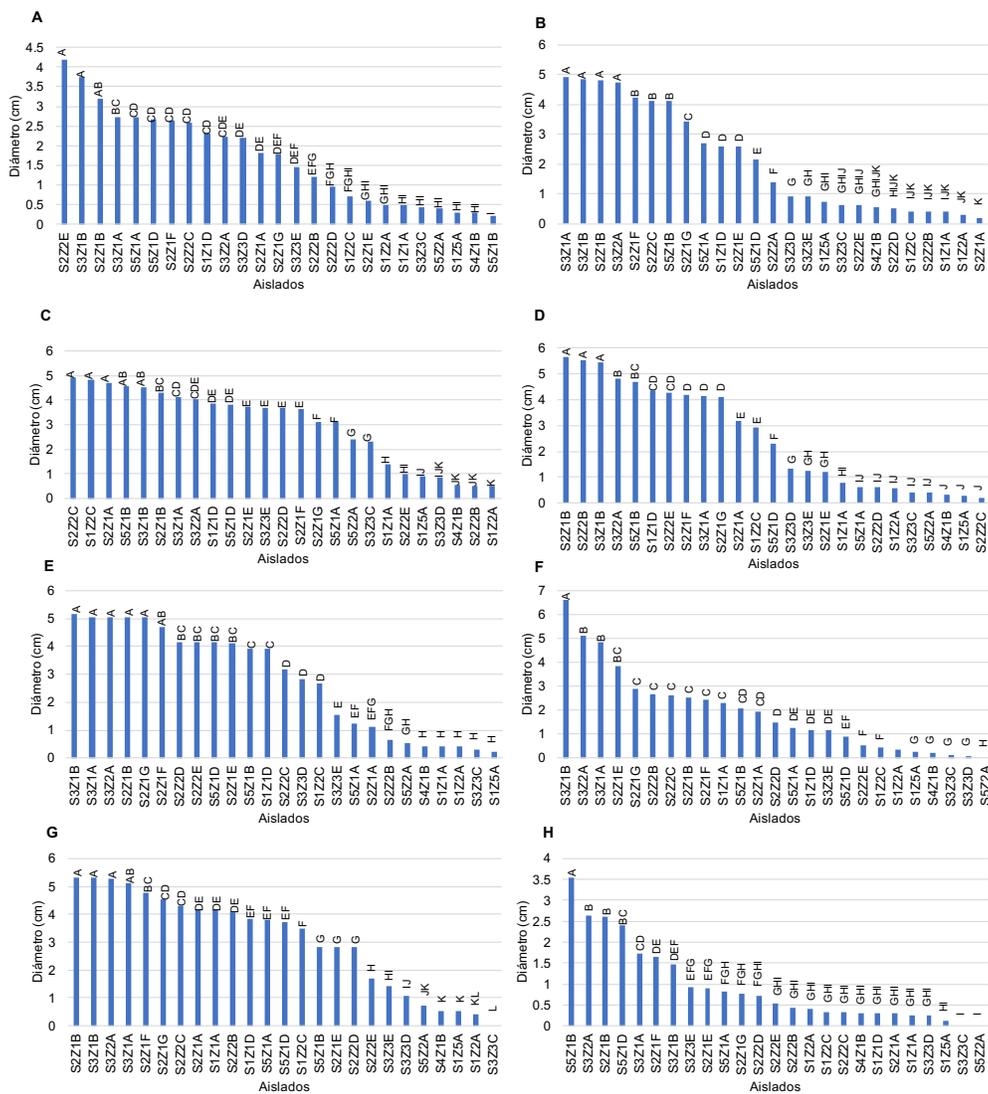


Figura 21. Media del diámetro de halos de crecimiento en CMC a diferentes temperaturas. La letra A representa 25 °C, B) 30 °C, C) 35 °C, D) 40 °C, E) 45 °C, F) 50 °C, G) 55 °C y H) 60 °C. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$ y $\alpha = 3$).

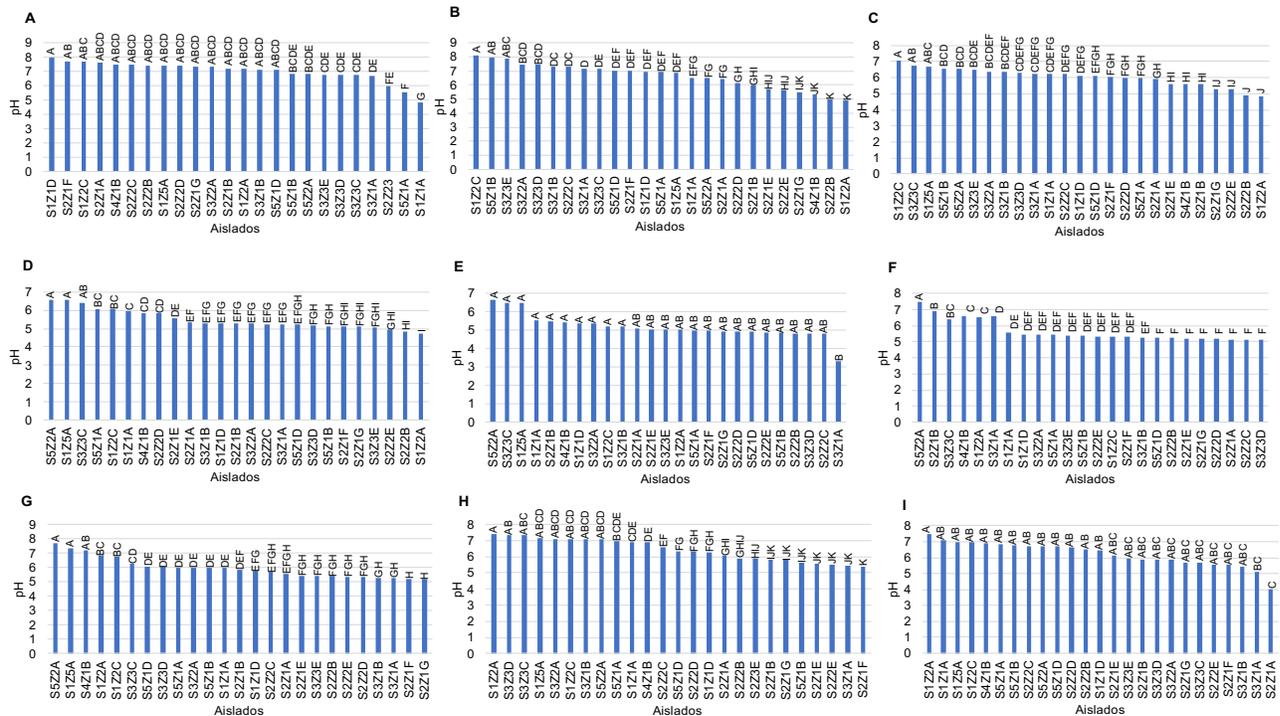


Figura 22. Media del pH de aislados celulolíticos crecidos a diferentes temperaturas. La letra A representa 25 °C, B) 30 °C, C) 35 °C, D) 40 °C, E) 45 °C, F) 50 °C, G) 55 °C, H) 60 °C e I) 70 °C. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$ y $\alpha = 3$).

Además, de tener determinada la temperatura y pH óptimos para la actividad de la celulasa producida por los aislados bacterianos, se procedió a determinar la filogenia de los aislados obtenidos.

4.3 Caracterización molecular de los aislados con capacidad celulolítica

Con la finalidad de definir la identidad a nivel de género o especie de los aislados bacterianos obtenidos en este trabajo, se amplificó por PCR la región del gen 16S del rDNA delimitada por los oligonucleótidos fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991 y Zapata y Castellanos, 2014). Para todos los aislados se logró amplificar un producto de PCR de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) (Figura 23). Todos los productos de amplificaciones se secuenciaron por ambos extremos y posteriormente, las secuencias fueron usadas para comparar en las bases de datos internacionales y generar inferencias filogenéticas.

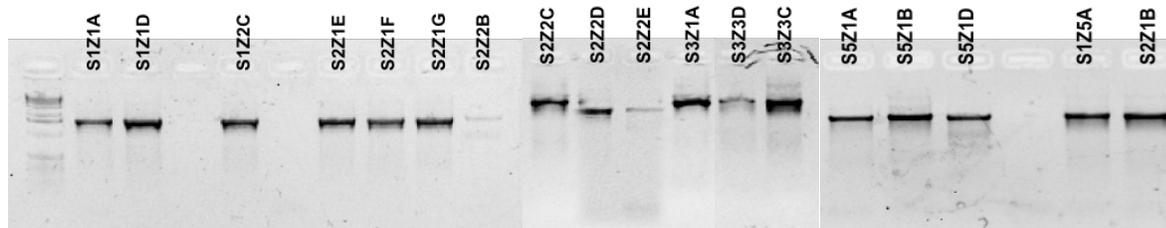


Figura 23. Amplificación por PCR del Gen 16S de los aislados celulolíticos S1Z1A, S1Z1D, S1Z2C, S2Z1E, S2Z1F, S2Z1G, S2Z2B, S2Z2C, S2Z2D, S2Z2E, S3Z1A, S3Z3D, S3Z3C, S5Z1A, S5Z1B, S5Z1D, S1Z5A, S2Z1B y visualizados en geles de agarosa al 0.8 % mediante electroforesis.

4.3.1 Análisis de las secuencias

Todas las secuencias generadas en este estudio, mostraron del 100 al 99 % de similitud cuando se compararon con secuencias que están contenidas en las bases de datos internacionales (Cuadro 6). La comparación de las secuencias en el GenBank, dio como resultado que 17 de los aislados analizados pertenecen al género *Bacillus*, mientras que el S1Z5A aislado pertenece al género *Stenotrophomonas*. De las 17 especies de *Bacillus*, 10 aislados presentaron 100 % de similitud con *B. pumilus* y se agruparon filogenéticamente con esta especie; S2Z1B, S2Z1E, S2Z2E y S3Z3C con *B. subtilis*; S2Z1F, S2Z2B, S2Z2C con las especies *B. altitudinis*, *B. tequilensis* y *B. stratosfericus* (Figura 24).

La taxonomía del género *Bacillus* ha generado gran controversia, entre otras cosas, por la poca resolución que otorga la secuencia del gen 16S al momento de definir a las especies estrechamente relacionadas en este género (Maughan y Van der Auwera, 2004). Dentro del género, se ha identificado de manera convencional un grupo que se designa como “complejo de especies de *Bacillus subtilis*”, el cual incluye a las especies *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. axaraquensis*, *B. malacitensis*, *B. mojavenensis*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis* y *B. velezensis*. Todas estas especies tienen un nivel elevado de conservación en la secuencia del gen 16S, y adicionalmente algunas de ellas son difíciles diferenciar entre sí por estados de carácter bioquímicos o fisiológicos. Es por ello que se ha propuesto el uso de otros marcadores moleculares con tasas de mutación más elevadas como el gen de la subunidad pequeña de la girasa A (*gyrA*) la subunidad B de la RNA polimerasa y la subunidad alfa de la polimerasa III, entre otras (Rooney *et al.*, 2009). Adicionalmente a esto, los perfiles de ácidos grasos también han ayudado a definir la existencia de grupos taxonómicos a nivel de especie o subespecie

dentro del género (Rooney *et al.*, 2009). Los perfiles lipídicos también han ayudado a soportar la separación de especies *Bacillus* para ser subordinadas en otras categorías taxonómicas (Krishnamurthi *et al.*, 2009; Kämpfer *et al.*, 2006) sin embargo, esto trae consigo el riesgo de surgir grupos con clasificaciones artificiales.

De manera similar, otro grupo de *Bacillus*, cuyo nombre, no tiene validez taxonómica pero que se reconoce por agrupar a especies estrechamente emparentadas es el “grupo de *Bacillus cereus*”, el cual, como su nombre lo indica, contiene a especies fenotípica y genotípicamente relacionadas con *B. cereus*, dentro de las que destacan *B. anthracis* y *B. thuringensis*, también se consideran dentro de este grupo a *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis*. En este grupo, las particularidades patogénicas de las especies se han referido como elementos para su separación en especies diferentes, (Vilas-Bôas *et al.*, 2007; Rasko *et al.*, 2005). Sin embargo, se han caracterizado cepas de *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringensis* con similitudes genómicas entre sí elevadas, que sugiere que estas especies deben considerarse como la misma (Helgason *et al.*, 2000).

Por otro lado, la caracterización de especies dentro del género es consistente por el análisis de características fisiológicas, bioquímicas y genéticas, sin embargo se resalta el potencial de variación intraespecífico e interespecífico dentro de los miembros de *Bacillus* (Parvathi *et al.*, 2009; Maughan y Van der Auwera, 2004), lo que denota la complejidad para definir la diversidad de especies que comprende el género.

En *Bacillus*, especies como *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, entre otras han sido reconocidas como microorganismos con potencial biotecnológico por su capacidad de biosintetizar enzimas capaces de degradar celulosa (Tuan Lah *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Aulitto *et al.*, 2017). Durante los procesos de degradación de materia por métodos como la composta y la lombricomposta se han obtenido resultados contrastantes de la abundancia de microorganismos del género *Bacillus*, por ejemplo, Fracchia *et al.* (2006), compararon los grupos microbianos representativos en productos finales de composta y lombricomposta, y reportaron que en el primero, había una mayor abundancia de bacterias pertenecientes a *Firmicutes* y *Actinobacteria*, mientras que en lombricomposta, otros phyla bacterianos fueron más representativos no incluyéndose dentro de ellos bacterias Gram-positivas; la lombricomposta, estaba compuesta por abono

de cerdo, vaca y gallina, así como de residuos y agrícolas. Adicionalmente, indican que la mayoría de los microorganismos del phylum *Firmicutes* reportados en su estudio fueron miembros estrechamente emparentados con el género *Bacillus*. Por su parte, Jayakumar y Natzrajan (2012), reportan que en lombricomposta cuyo principal sustrato fue el abono de cabra, la mayor abundancia de microorganismos fue de especies del género *Bacillus*. En ambos casos, la designación taxonómica de los grupos identificados estuvo basada en la secuencia del gen 16S. Estos resultados ponen en perspectiva la capacidad de distintos manejos en los procesos de manejo de residuos y su impacto en las comunidades microbianas que se establecen en diferentes procesos. En nuestro trabajo, tanto de ambientes naturales como de los procesos de composteo el género *Bacillus* predominó en los aislados fenotípicamente distintos identificados molecularmente, por lo que se sugiere que las condiciones naturales y las de composteo particulares de la región estudiada favorecen el establecimiento de bacterias de este género.

La secuencia del aislado S1Z5A tuvo homología con especies reconocidas dentro del género *Stenotrophomonas* están subordinadas a *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. En 1993, Palleroni y Bradbury proponen el nuevo género *Stenotrophomonas* por la transferencia de la especie *Xanthomona maltophilia* al nuevo género *Stenotrophomonas*. El género *Stenotrophomonas* comprende especies cuya morfología celular es bacilar, Gram negativas no esporuladas, pequeño, fino, móvil mediante un flagelo polar multitrico, no fermentadoras, oxidasa negativas, generalmente no hemolíticas, olor característico a amoníaco, aerobias estrictas, poco exigente que se desarrolla en forma rápida en los medios de cultivo utilizados de rutina siendo las colonias rugosas de 3-5 mm de diámetro, brillantes y de color blanco a amarillento que se tornan color amarillo en MacConkey y café verdoso en agar sangre, y con una temperatura óptima de crecimiento es 35 °C (López *et al.*, 2003 y Mayer *et al.*, 2004).

Especies con actividad celulolítica de *Stenotrophomonas* han sido aisladas de intestinos de larvas de *Diatraea saccharalis*, cuya fuente de alimentación principal es la caña de azúcar, de *Holotrachia parallela* y de intestinos de caracoles de la especie *Achatina fulica* (Dantur *et al.*, 2015 Huang *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2015). La especie *S. rhizophila* con capacidad celulolítica fue aislada de muestras de material composteado (Saffari *et al.*,

2016). El aislado S1Z5A se obtuvo a partir del material de composteo que se estimó estaba en la etapa mesófila II. Se sabe que especies de *Stenotrophomonas* (Vazquez *et al.*, 2005) se desarrollan en ambientes mesofílicos, durante el composteo en esta etapa también predominan especies del género *Bacillus* (Romane *et al.*, 2013; Thomas y Schaechter, 2012).

Cuadro 6. Porcentaje de homología que muestran las secuencias 16S rDNA de nuestros 18 aislados obtenidos de los cinco sitios de colecta en la base de datos del NCBI mediante el análisis BLAST.

Aislado	Relación con especie	Similitud
S1Z1A	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S1Z1D	<i>Bacillus pumilus</i>	99 %
S1Z2C	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S1Z5A	<i>Stenotrophomonas</i>	100 %
S2Z1A	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S2Z1B	<i>Bacillus subtilis</i>	99 %
S2Z1E	<i>Bacillus subtilis</i>	100 %
S2Z1F	<i>Bacillus altitudinis/tequilensis</i>	99 %
S2Z1G	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S2Z2B	<i>Bacillus stratosphericus/tequilensis</i>	100 %
S2Z2C	<i>Bacillus altitudinis/tequilensis</i>	100 %
S2Z2D	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S2Z2E	<i>Bacillus subtilis</i>	100 %
S3Z1B	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S3Z3C	<i>Bacillus subtilis</i>	100 %
S3Z3D	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S5Z1B	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %
S5Z1D	<i>Bacillus pumilus</i>	100 %

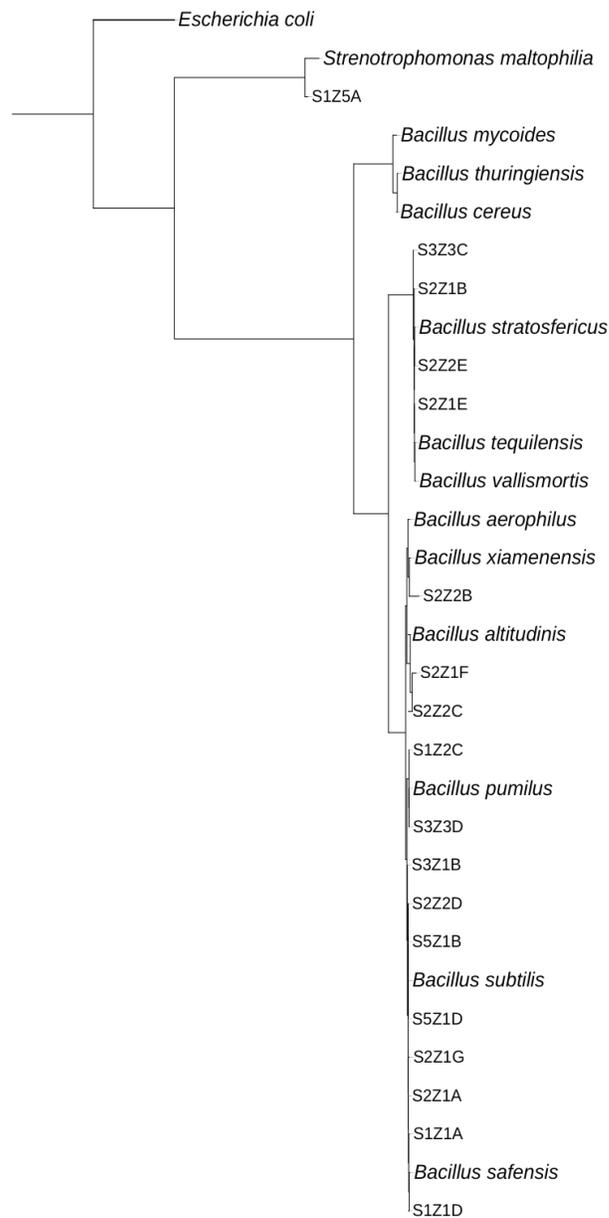


Figura 24. Relación filogenética generada con la secuencia del gen ribosomal 16S de aislados con capacidad celulolítica extraídos en el municipio de Nuevo Parangaricutiro. La topología del árbol fue generada con el método de Neighbor-Joining a partir de un alineamiento múltiple usando el programa CLUSTALW; las distancias genéticas se obtuvieron con el método de Jukes-Cantor y la topología del árbol fue corroborada por un Bootstrap de 1000 repeticiones (valores en las ramas expresadas en porcentaje). Los números de acceso de las secuencias obtenidas de los bancos de datos internacionales se indican antes del nombre del microorganismo al que pertenecen. Para enraizar el árbol se utilizó una secuencia del gen 16S de *Escherichia coli* (J01859.1).

4.4 Actividad antagónica de bacterias con actividad celulolítica.

Para el uso posterior de los aislados en consorcios celulolíticos *in vitro*, se realizaron pruebas de antagonismo. Se observó que el aislado S2Z1E tuvo la mayor actividad antagónica frente a las demás cepas evaluadas generando el máximo halo de inhibición frente a las cepas S1Z2, S2Z1B, S5Z1D, S2Z2E y S2Z2B como se observa en la Figura 25, por lo que en un principio fue descartada como parte del consorcio microbiano, debido a su antagonismo frente a las siete cepas restantes. La mayor susceptibilidad se observó en las cepas S1Z2C, S2Z2B y S5Z1D cuyo crecimiento se inhibió por los demás aislados. Así mismo, existieron 3 asociaciones que resultaron antagónicas entre al menos uno de los microorganismos incluidos que están indicados en la Figura 26 como 1, 2, 3 (S1Z1D, S1Z2C, S2Z1B) combinación que resultó en la inhibición del crecimiento de S1Z1D; 6, 1, 7 (S5Z1D, S1Z1D, S2Z2E) en donde se inhibió el crecimiento de S5Z1D; y la combinación 2, 5, 6 (S1Z2C, S2Z2B, S5Z1D) en la que se inhibió el crecimiento de S2Z2B y S5Z1D respectivamente. La actividad antagónica evidenció que a pesar de que algunos microorganismos fueron obtenidos de la misma muestra, existe antagonismo entre ellos, una posible explicación a este hecho es que existen diferencias en la complejidad del sistema enzimático que les permite degradar el sustrato, generando diferentes tasas de crecimiento y dando lugar a una competencia por sustrato, espacio, inhibición por antibióticos o bacteriocinas e inhibición heteróloga por quorum sensing. Todos estos fenómenos se han implicado en antagonismo (Barrera y Charry. 2008).

Además, cabe señalar que el medio CMC tiene componentes nutricionales adicionales a la fuente de carbono como las fuentes de nitrógeno (peptona especial y extracto de levadura) a partir de las cuales el microorganismo puede crecer sin la necesidad de iniciar su metabolismo enzimático para catabolizar al polímero y generar glucosa, procesos que para los microorganismos implican gasto de energía. La degradación y catabolismo de celulosa representan un costo energético mayor si se compara con el catabolismo de glucosa (Lara *et al.*, 2012). En otros trabajos como el publicado por Barrera y Charry (2008), se reportó la obtención de cepas celulolíticas aisladas de residuos de lechuga que no presentaron efectos antagónicos. Pero también se sabe que bacterias celulolíticas como *B. subtilis*, *B. velezensis*, y *B. altitudinis*, extraídos de la corteza de *Eucommia ulmoides* y

de composteras, son antagónicas a un amplio espectro de microorganismos como hongos patógenos, celulolíticos, lignocelulolíticas y xilosos (Chen *et al.*, 2018).

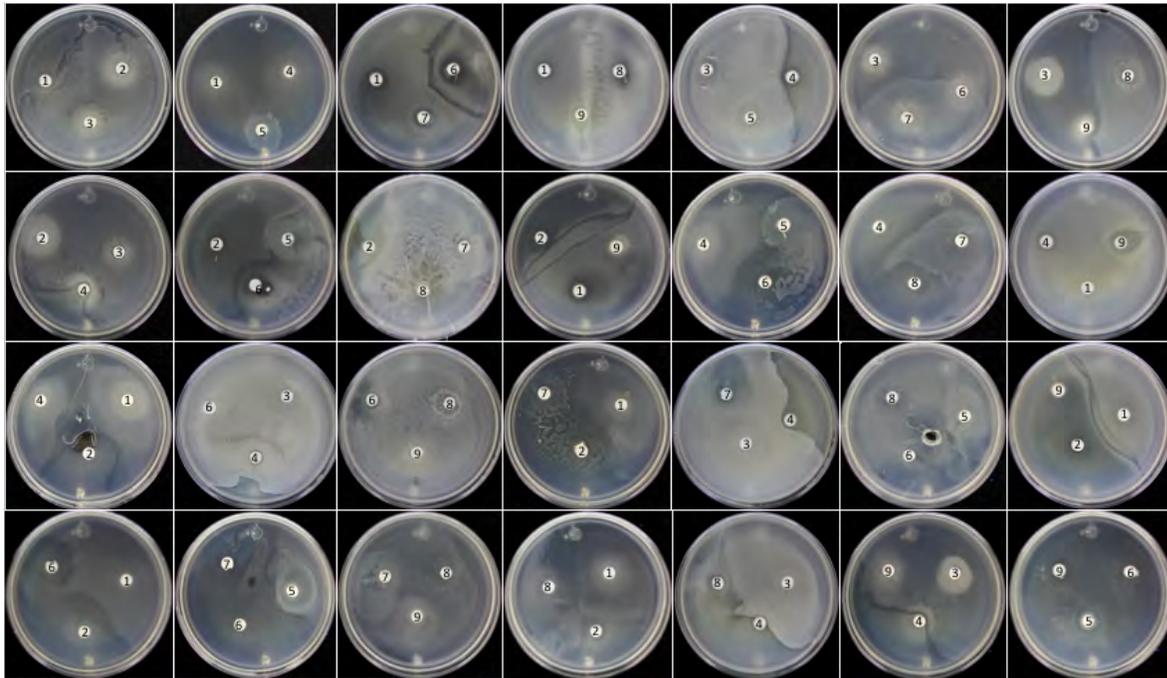


Figura 25. Confrontación de los aislados celulolíticos de acuerdo a su capacidad para degradar carboximetilcelulosa (CMC) extraídos de diferentes zonas de colecta. 1-2 son los aislados S1Z1D y S1Z2C; 3, 4, 5 y 7, representan los aislados S2Z1B, S2Z1E, S2Z2B y S2Z2E. 8 y 9, son aislados extraídos del sitio 3 que representan a S3Z1B y S3Z3E. El aislado S5Z1D es representado por la numeración 6. Todos fueron crecidos en medio CMC, durante 48 horas a 35 °C.

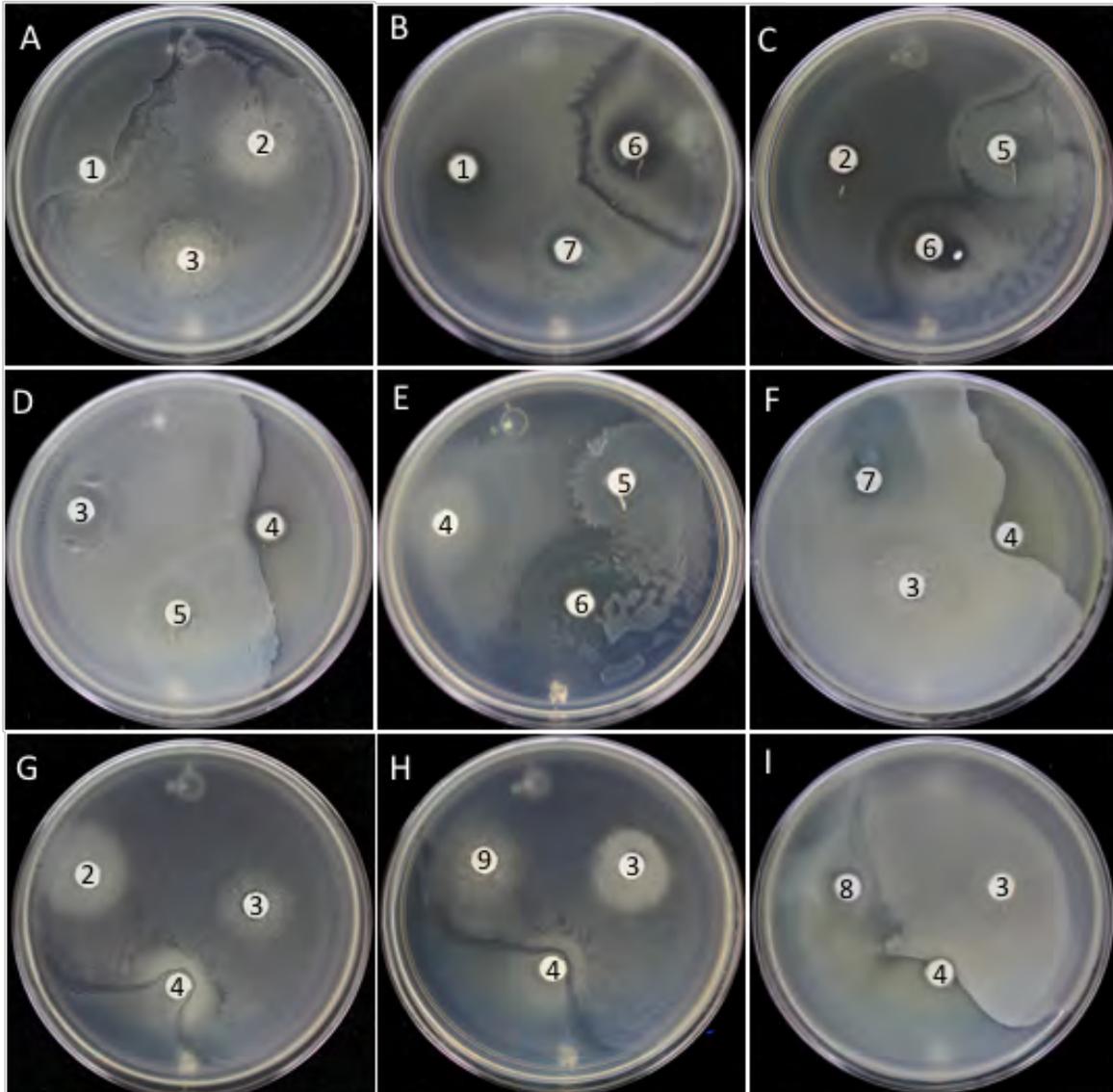


Figura 26. Confrontación de los aislados celulolíticos con mayor capacidad celulolítica de acuerdo a su capacidad de degradar carboximetilcelulosa (CMC) extraídos de diferentes zonas de colecta. En la imagen **A** la cepa que resulto ser antagonica es la 1 (S1Z1D), **B** la cepa 6 (S5Z1D) por su parte la cepa 2 (S1Z2C) correspondiente a la imagen **C**, de la letra **D-I**, la cepa antagonica fue la 4 (S2Z1E). Los aislados fueron crecidos en medio CMC, durante 48 horas a 35 °C.

V. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados y los resultados obtenidos se concluyó lo siguiente:

- En el municipio de Nuevo Parangaricutiro se encontraron aislados bacterianos con la capacidad de degradar carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.
- El sustrato con mayor cantidad de materia orgánica en degradación que correspondió a composta y lombricomposta favorecen el establecimiento de microorganismos fenotípicamente distintos capaces de degradar celulosa.
- Los aislados S2Z1F y S2Z1G pertenecientes a lombricomposta, tuvieron la mayor actividad catalítica de CMC. En condiciones de lombricomposta existen microorganismos con alta capacidad de degradar celulosa.
- La actividad catalítica de los aislados bacterianos celulolítica se ve influenciada por la presencia de las temperaturas y el pH en el que se desarrollan los aislados. La actividad catalítica no tiene correlación con la degradación de carboximetilcelulosa en medio sólido debido a la acción de las enzimas junto con el microorganismo.
- Microorganismos aislados de lombricomposta tienen la capacidad de degradar CMC hasta dímeros y monómeros por detección mediante cromatografía de capa fina, seguidos de aislados pertenecientes al sitio volcánico.
- Las condiciones naturales y el manejo de residuos favorecen el establecimiento de microorganismos del género *Bacillus*, capaces de degradar celulosa.
- Las bacterias celulolíticas S2Z1B, S2Z2B, S2Z2E, S3Z1B y S3Z3E, pueden ser utilizadas para formar un consorcio con potencial para la degradación de residuos orgánicos fibrosos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aachary A, A. y Prapulla S, G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10: 2-16.
- Abad, F. J. S. (2014). Evaluación cualitativa mediante cromatografía de la fertilidad de cinco suelos con diferentes manejos orgánicos y convencionales. Universidad de Cuenca. 56-63.
- Acharya, S., Chaudhary, A. (2012). Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot springs. *Brazilian Biological Technology*. 55: 497-503.
- Adhyaru, D. N., Bhatt, N. S., Modi, H. A., y Divecha, J. (2017). Cellulase-free-thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8: Over-production through statistical approach, purification and bio-deinking/bio-bleaching potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12: 220-227.
- Ahuja, L. R., Ma, L., y Howell, T. A., (2003). Agricultural system models in field research and technology transfer. *Cultural and Biotechnology*. 34-35.
- Ahuja, S. K., Ferreira, G. M., y Moreira, A. R. (2004). Utilization of enzymes for environmental applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 24: 125-154.
- Aira, M., Monroy, F., y Domínguez, J. (2006). Microbial biomass governs enzyme activity decay during aging of worm-worked substrates through vermicomposting. *Journal of Environmental Quality*. 36: 448-452.
- Alexander, M. (1982). Most Probable Number Method for Microbial Populations 1. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Soil Biotechnology*. 815-820.
- Ali, A. (2017). Isolation and identification of effective cellulolytic bacteria in composting process from different sources. *Archiv für Acker-und Pflanzenbau und Bodenkunde*. 45-47.
- Allegrucci, M., y Sauer, K. (2007). Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology*. 189(5): 2030-2038.
- Alvarado, S. (2010). Dinámica de la materia orgánica en suelos agrícolas. Ponencia XI. Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. 16(2): 13-14.
- Álvarez, J. M. de la P. (2003). Manual de compostaje para Agricultura Ecológica. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. 2: 11-16.

- Amils, R., Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., y Sanz, J. L. (2011). Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Environmental Microbiology*. 77(17):6085-6093.
- Amor, Y., y Delmer, D., P. (1995). Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*. 7(7): 987-1000.
- Amraini, S. Z., Ariyani, L. P., Hermansyah, H., Setyahadi, S., Rahman, S. F., Park, D. H., y Gozan, M. (2017). Production and characterization of cellulase from *E. coli* EgRK2 recombinant based oil palm empty fruit bunch. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 22(3), 287-295.
- Andy, C., y Edwin, F. (2008). Aislamiento e identificación de géneros microbianos a partir de muestras de suelo, agua, sedimento en la laguna, y zonas adyacentes en la Reserva Biológica Limoncocha (Doctoral dissertation, Universidad Internacional SEK).
- Anon, (2005). Soil Microbiology. *European Coatings Journal*.12: 36–41.
- Anwar, S., F. Liaquat, Q., M. Khan, Z., Khalid, M. y Iqbal. S. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*. 168: 400–405.
- Apostel, C., Dippold, M., y Kuzyakov, Y. (2015). Biochemistry of hexose and pentose transformations in soil analyzed by position-specific labeling and ¹³C-PLFA. *Soil Biology and Biochemistry*. 80: 199-208.
- Ashwani, K., Sunity, S., y Dinesh K., (2014). Evaluation of antimicrobial potential of cadmium sulphide nanoparticles against bacterial pathogens *International Journal Pharmaceutic Science Review*. 24 (2): 202-207.
- Asoodeh, A., Lagzian, M. (2012). Purification and characterization of a new glucoamylopullulanase from thermotolerant alkaliphilic *Bacillus subtilis* DR8806 of a hot mineral spring. *Process Biochemistry*. 47: 806–815.
- Aulitto, M., Fusco, S., Bartolucci, S., Franzén, C. J., y Contursi, P. (2017). *Bacillus coagulans* MA-13: a promising thermophilic and cellulolytic strain for the production of lactic acid from lignocellulosic hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*.10(1): 210.
- Ayyachamy, M., y Vatsala, T., M. (2007). Production and partial characterization of cellulase free xylanase by *Bacillus subtilis* C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 467–472.
- Babb, M., V. y Haigler, C., H. (2001). Sucrose Phosphate Synthase Activity Rises in Correlation with High Rate Cellulose Synthesis in Three Heterotrophic Systems. *Plant Physiology*. 127(3): 1234–1242. <http://doi.org/10.1104/pp.010424>.
- Badía, M. M. R., Hernández, B. T., Murrel, J. L., Mahillon, J., y Pérez, M. H. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus sp.* asociadas al cultivo del arroz

- (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de microbiologia*. 6(1): 90–99.
<http://orgprints.org/23097/>
- Bai, H., Zi, H., Huang, Y., Han, M., Irfan, M., Liu, N., y Han, X. (2017). Catalytic Properties of Carboxymethyl Cellulase Produced from Newly Isolated Novel Fungus *Penicillium ochrochloron* ZH1 in Submerged Fermentation. *Catalysis Letters*. 147(8): 2013–2022.
<http://doi.org/10.1007/s10562-017-2119-0>
- Bais, H. P., Fall, R. y Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*. 134: 307–319.
- Bajpai, P. K., Singh, I., y Madaan, J. (2014). Development and characterization of PLA-based green composites: A review. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*. 27(1): 52-81.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., y Voříšková, J. (2012). Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME Journal*. 6(2): 248-258.
- Baldrian, P. (2017b). Microbial activity and the dynamics of ecosystem processes in forest soils. *Current Opinion in Microbiology*. 37(1). 128–134.
<http://doi.org/10.1016/j.mib.2017.06.008>
- Baldrian, P. (2014). Distribution of extracellular enzymes in soils: spatial heterogeneity and determining factors at various scales. *Soil Science Society American Journal*. 78: 11.
<https://doi.org/10.2136/sssaj2013.04.0155dgs>.
- Ballesteros, M. (2010). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, pp 159- 177, En: *Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass*. Waldron Woodhead Publishing Series in Energy. 24-27.
- Bandounas. L., Wierckx, N. J., de Winde, J. H., y Ruijssenaars, H. J. (2011). Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *Bromathology and Biotechnology*. 11: 94. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-94>.
- Barrera, L., y Charry, N. (2008). Producción y evaluación de un inoculante microbiano con capacidad amilolítica a partir de un proceso de compostaje de residuos de lechuga. Pontificia Universidad Javeriana, tesis de posgrado. 43-44.
- Basta, A. H., y El-Saied, H. (2017). Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. *Journal of Applied Microbiology*. 107(6): 2098.
- Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R., y Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*. 8(5): 548-557.
- Bayer, E.A., Morag, E., Lamed, R. (1994). *Trends Biotechnology*. 12: 378-386.

- Baysal, Z., Uyar, F., y Aytekin, Ç. (2003). Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*. 38(12): 1665-1668.
- Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H., y Marletta, M. A. (2015). Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *Journal American Chemistry Society*. 134(2): 890-2.
- Berg, C. M., Nishimura, Y., Caro, L., y Hirota, Y. (1971). Chromosome replication in *Escherichia coli*: IV. control of chromosome replication and cell division by an integrated episome. *Journal of Molecular Biology*. 55(3): 441-456.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18(5): 355-383.
- Biernath, C., Fischer, H., y Kuzyakov, Y. (2008). Root uptake of N-containing and N-free low molecular weight organic substances by maize: a $^{14}\text{C}/^{15}\text{N}$ tracer study. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(9): 2237-2245.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., y Kalinowska, H. (2005). Bacterial cellulose. *Biopolymers Online: Biology Chemistry Biotechnology Applications*. 55-59.
- Binod, P., Kuttiraja, M., Archana, M., Janu, K. U., Sindhu, R., Sukumaran, R. K., y Pandey, A. (2012). High temperature pretreatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production. *Biology Chemistry Biotechnology Applications*. 92(1): 340-345.
- Bisaria, V. S., y Ghose, T. K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*. 3(2): 90-104.
- Blagodatskaya, E., y Kuzyakov, Y. (2014). Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*. 67: 192-211.
- Blumer-Schuetz, S. E., Kateava, I., Westpheling, J., Adams, M. W. W., y Kelly R, M. (2008). Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. *Curr Opin Biotechnol*. 19: 210–217.
- Bonilla, J. P., y Rivas, N. (2004). Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 14(5): 412–418.
- Borriss, R. X. H., Chen, C., Rueckert, J., Blom, A., Becker, B., Baumgarth, B., Ventilador, R. M., Pukall, P., Schumann, C., Junge, J., Vater, K. A., y Klenk, H. P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and

- FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61: 1786–1801.
- Bradford, M. M., McRorie, R. A., Turner, R. B., y Williams, W. L. (1976). Acrolysin, the aminoproteinase catalyzing the initial conversion of proacrosin to acrosin in mammalian fertilization. Biochemical and Biophysical Research Communications. 71(2): 492-498.
- Camacho, A. D., Martínez, L., Ramírez, S. H., Valenzuela, R., y Valdéz, M. (2014). Potential of Different Microorganisms for Solid Waste Composting. Terra Latinoamericana. 32(4): 291–300.
- Castillo, C., Cabello, F. M., Salazar, A. M., Sánchez-Baracaldo, G. P., Lima-Mendez, G., Hingamp, P., y Raes, J. (2016). Cyanobacterial symbionts diverged in the late Cretaceous towards lineage-specific nitrogen fixation factories in single-celled phytoplankton. Nature Communications. 7: 11071.
- Cavaglieri, L. J., Orlando, M. I., Rodríguez, S., Chulze, S., y M. Etcheverry. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. Research Microbiology. 156: 748–754.
- Chafra, A. L., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Espín, J., y Silva, L. (2016). Isolation, selection and characterization of cellulolytic fungi from cocoa (*Theobroma cacao* L) hull. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 50-53.
- Chao, H. P., y Lee, W. C. (2000). A bioelectrode for penicillin detection based on gluten-membrane-entrapped microbial cells. Biotechnology and Applied Biochemistry. 32(1): 9-14.
- Chávez-Pacheco, J. L., Martínez Yee, S., Contreras Zentella, M., y Escamilla Marván, E. (2004). Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 7(1): 11-14.
- Cedeño, M. G., Pazmiño, D. E. Z., Rondón, A. J., Laurencio, M. S., Perez, M. Q., Leon, R. A., y Rivera, R. F. (2014). Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias. 46(2): 177–189.
- Chao, Yaping. (2009). Bacterial cellulose production by *acetobacter xylinum*. Biotechnology Sistem Internal. 3(1): 12.
- Chen, H.; Li, X.; Blum, D.; Ljungdahl, L. (1998) FEMS Microbiology Letters. 159: 63-68.
- Chen, H. J., Chang, H. J., Fan, C., Chen, W. H., y Lee, M. S. (2011). Screening, isolation and characterization of biotransformation bacteria from specific soils. International Conference on Environment and Industrial Innovation. 12: 134-136.

- Chen, L., Gu, W., Xu, H. yan, Yang, G. L., Shan, X. F., Chen, G., y Qian, A. D. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF. *Biotechnology*. 8(2):14-16. <http://doi.org/10.1007/s13205-018-1125-2>.
- Cheng, K., J, y Costerton, J., W. (1980). Adhesive bacteria, their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. in *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Ruckebusch Thivend Lancaster, England. 225-250.
- Cheng, Y. J., Yang, S. H., y Hsu, C. S. (2009). Synthesis of conjugated polymers for organic solar cell applications. *Chemical Reviews*. 109(11): 5868-5923.
- Cheshire, M. V. (1979). *Nature and Origin of Carbohydrates in Soil*. Academic Press International. 35-36.
- Chithrashree, U. C. (2011). Plant growthpromoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*. 59: 114-122.
- Ciechanska, D. (2004). Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. *Fibres Text East European*. 12(4): 69-72.
- Collins, T., Gerday, C., y Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *Microbiology Reviews*. 29(1): 3-23.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*. 6(11): 850.
- Cotler, H., Cram, S., Martínez Trinidad, S., y Bunge, V. (2015). Evaluación de prácticas de conservación de suelos forestales en México: Caso de las zanjas trinchera. *Investigaciones Geograficas*. (88): 6–18. <http://doi.org/10.14350/rig.47378>.
- Couturier, M., y Berrin, J. G. (2013). The saccharification step: the main enzymatic components. En *Lignocellulose conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*. Springer. 5: 93-110.
- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D., Distel, D. L., Dupree, P, Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., McQueen-Mason S. J., Schnorr, K., Walton, P. H., Watts, J. E., y Zimmer, M. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Current Chemistry Biological*. 29: 108-19.
- Credou, J., y Berthelot, T. (2014). Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry*. 2(30): 4767-4788.
- Cuevas, E. G. (2013). Producción de auxinas por bacterias solubilizadoras de fósforo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Tesis de grado. 76-79.

- DeBord, J., Bonavia, G., Haushalter, R. C., Rose, D., y Zubieta, J. (1995). Hydrothermal Synthesis and Characterization of Two-and Three-Dimensional Solids of the Oxovanadium (IV)-Phosphite System. The Structures of $[\text{HN}(\text{Me})(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})\text{H}]\text{-(VO)}_4(\text{OH})_2(\text{HPO}_3)_4$, $[\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]\text{-(VO)}_3(\text{HPO}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2$, and $[\text{VO}(\text{HPO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$. *Chemistry of Materials*. 7(11):1995-1998.
- Delmer, D. P. (1999). Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Biology*. 50(1): 245-276.
- Derekova, A., Mandeva, R., y Kambourova, M. (2008). Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading *Bacillus* from Bulgarian hot springs. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 24: 1697-1702.
- Entenani, S., Asoodeha, A., y Entenani, S. (2013). Molecular cloning of a thermo-alkaliphilic lipase from *Bacillus subtilis* DR8806: Expression and biochemical Characterization Process *Biochemistry*. 48: 1679–1685.
- Enebak, S. A y A. Carey, W. (2000). Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Physiology*. 84: 306–308.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., y Golyshin, P. N. (2007). Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*. 10(3): 207-214.
- Fischer, M., Van, Kleunen, M., y Weber, E. (2010). A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. *Ecology Letters*. 13(2): 235-245.
- Flórez, P. A. V., Guerra, D. A. C., y Rosero, S. E. V. (2016). Development and evaluation of an inoculum of celulolytic bacteria. *Revista de Divulgación Científica*. 18(1): 207-215.
- Fracchia, L., Dohrmann, A. B., Martinotti, M. G., y Tebbe, C. C. (2006). Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(6): 942.
- Franca. S., Medina, L. V, Ramos, N., Amaíz, L., y Valbuena, O. (2011) Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de las Trincheras, Venezuela. *Revista Científica Venezolana*. 36-40.
- Freedman, Z. B., y Zak, D. R. (2015). Atmospheric and deposition alters connectance, but not functional potential among saprotrophic bacterial communities. *Molecular Ecology*. 24: 3170–3180. <https://doi.org/10.1111/mec.13224>.
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*. 94: 1245–1248.

- Fu, J., Wang, Q., Yin, J., Liu, M., Li, N., Yao, W., y Li, D. (2010). Expression and characterization of soluble recombinant Ulp1p with glutathione S-transferase tag in *Escherichia coli*. *Sheng wu gong cheng xue bao. Chinese Journal of Biotechnology*. 26(6): 837-842.
- Fujimura, R., Sato, Y., Nishizawa, T., Nanba, K., Oshima, K., Hattori, M., y Ohta, H. (2009). Analysis of early bacterial communities on volcanic deposits on the island of Miyake (Miyake-jima), Japan: a 6-year study at a fixed site. *Microbes and Environments*. 1326-1328.
- Fukumoto, J. (1943). Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. *Journal Agricultural Chemistry Society Japan*. 19: 487–503.
- Gaitán, D. M. Bohorquez, y Pérez, L. I. P. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dentranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana. 145-56. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis274.pdf>
- Galvis, F., y Moreno, L. Y. (2014). Caracterización molecular mediante rep-PCR de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, obtenidos de muestras de suelo. *Agronomía Costarricense*, 38(1):223–229. www.mag.go.cr/rev%5Cnwww.cia.ucr.ac.cr%5Cnhttp://www.mag.go.cr/rev_ag
- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C. M., Satomi, K. Venkateswaran y M. E. Hart. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal System Evolution Microbiology*. 56: 1475–1484.
- Ghebregzabher, M., Rufini, S., Monaldi, B., y Lato, M. (1976). Thin-layer chromatography of carbohydrates. *Journal of Chromatography*. 127(2): 133-162.
- Godoy, E. Á., Díaz, S. A., y Díaz, M. A. (2013). Utilización racional de los residuos forestales. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53(9): 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gómez, S. F. A., Sarmiento, G., Leonardo, F., y Diana, C. (2013). Caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta Ecosangil del municipio de San Gil , Santander. *Revista Matices Tecnológicos*. 5(5): 29–36. <http://doi.org/ISSN 2027-4408>. Caracterización.
- Gorlach-Lira, K., y Coutinho, H. D. (2007). Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(1): 135-141.
- Goyal, A., Ghosh, B., y Eveleigh, D. (1991). Characteristics of fungal cellulases. *Bioresour*

Technology. 36: 37–50.

- Gunina, A., y Kuzyakov, Y. (2015). Sugars in soil and sweets for microorganisms: Review of origin, content, composition and fate. *Soil Biology and Biochemistry*. 87–100. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.021>
- Guo, P., Han, T., Zhang, L., Li, S., Ma, D., y Du, Y. (2017). Changes of soil bacterial activities and functions after different N additions in a temperate forest. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(4): 3853–3860. <http://doi.org/10.1007/s11356-016-8141-8>.
- Gupta, V. K., Gupta, B., Rastogi, A., Agarwal, S., y Nayak, A. (2011). Pesticides removal from waste water by activated carbon prepared from waste rubber tire. *Water Research*. 45(13): 4047-4055.
- Gutiérrez, V. R., Pinzón, Á. E., Casas, J., y Martínez, M. M. (2008). Determination of cellulolytic activity of soil from *Stevia rebaudiana* Bertoni crops. *Agronomía Colombiana*. 26(3): 497–504.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., y Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124(1): 91-97.
- Gutiérrez-Manero, F., Ramos, A., Probanza, J., Mehouchi J., y Talan, M. (2001). The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberelins. *Physiology Plant*. 111: 206–211.
- Gutiérrez-Manero, F., Acero, J. Lucas. A., y Probanza, A. (1996). The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) growth and characterization and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil*. 182: 67–74.
- Guzmán, Á. M. C., Zambrano, D. E. P., Rivera, R. D. F., Rondón, A. J., Silva, M. L., y Pérez, M. Q. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de manabí-ecuador con actividad celulolítica. *Cultivos Tropicales*. 36(1): 7–16. Retrieved from <http://ediciones.inca.edu.cu>
- Haigler, C. H. y Babb, V. M., (2001). Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high-rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems. *Plant Physiology*. 127(3): 1234-1242.
- Haitjema, C. H., Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K. y O'Malley, M. A. (2014). Anaerobic gut fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnology and Bioengineering*. 111: 1471– 1482.
- Handtke, S., Albrecht, D., Otto, A., Becher, D., Hecker, M., y Voigt, B. (2018). The Proteomic Response of *Bacillus pumilus* Cells to Glucose Starvation. *Proteomics*. 18(1):1700109.

- Harwood, C. R., y Cutting, S. M. (1990). Molecular biological methods for *Bacillus*. *Microbiology*. 36-41.
- Hakspiel Segura, C. (2009). Variación estacional de la trama trófica microbiana en la laguna de Macapule, Sinaloa (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas). 34-38.
- Heck, J. X., Hertz, P. F., y Ayub, Maz. (2002). Cellulase and xylanase productions by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal Microbiology*. 33: 213-218.
- Hernández, J. P., de-Bashana, L. E., Rodriguez, D. J., Rodriguez, Y., y Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology*. 45: 88-93.
- Hernández Santoyo, A., García Hernández, E., y Rodríguez Romero, A. (1999). Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Journal of the Mexican chemical society*, 43: 3-4.
- Hesselink, T. P. (2010). Increasing pressures to use forest biomass: a conservation viewpoint. *For Chronogram*. 86: 28–35.
- Henrik, N., U. Martin y M. Wolfgang. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applications Microbiology and Biotechnology*. 87: 99-108.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., y Kolstø, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Journal of Environmental and Microbiology*. 66(6): 2627-2630.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., y Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Procces National Academy Science USA*. 314: 1598-1600.
- Hough, D. W., y Danson, M. J. (1999). Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3(1): 39-46.
- Högberg, M. N., Briones, M. J., Keel, S. G., Metcalfe, D. B., Campbell, C., Midwood, A. J., Thornton, B., Hurry, V., Linder, S., Nasholm, T., y Högberg, P. (2010). Quantification of effects of season and nitrogen supply on tree below ground carbon transfer to ectomycorrhizal fungi and other soil organ- isms in a boreal pine forest. *New Phytology*. 187: 485–493. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03274.x>.
- Ibrahim, H., Ilinca, A., y Perron, J. (2008). Energy storage systems—Characteristics and comparisons. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 12(5): 1221-1250.

- Inbar, J., y Chet, I. (1995). The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*. 141(11): 2823-2829.
- Insam, H., y De Bertoldi, M. (2007). Microbiology of the composting process. In *Waste management series*. 8: 25-48.
- J.H., M. (1972). *Caldo Luria Bertani*. México.
- Jarvis, M. C. (2013). Cellulose biosynthesis: counting the chains. *Plant Physiology*. 163(4): 1485-1486.
- Jiménez-Delgadillo, M. R. (2004). Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Doctorado, CINVESTAV-IPN, Irapuato, Guanajuato, México.
- Johnston, S. R., Boddy, L., y Weightman, A. J. (2016). Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology and Ecology*. 92: 179. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw179>.
- Jonas, R., y Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*. 59(1-3): 101-106.
- Jones, S. S., Murphy, K. M., Campbell, K. G., y Lyon, S. R. (2007). Evidence of varietal adaptation to organic farming systems. *Field Crops Research*. 102(3): 172-177.
- Jukes T. H. y Cantor C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*. 21-32.
- Kamble, R. D., y Jadhav, A. R. (2011). Xylanase Production by an Alkalo- thermophilic *Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 in Submerged Fermentation. *International Journal Biotechnology and Biochemistry*. 1(1): 132-134.
- Karmakar, M., y Ray, R. R. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Reserach Journal Microbiology*. 6(1): 41-53.
- Kämpfer, P., Rossello-Mora, R., Falsen, E., Busse, H. J., y Tindall, B. J. (2006). *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of 'Paenibacillus hongkongensis' as *Cohnella hongkongensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(4): 781-786.
- Kellner, H., Luis, P., Zimdars, B., Kiesel, B., y Buscot, F. (2008). Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biol Biochemistry*. 40:638–648. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.09.013>.
- Khatiwada, C. P., Sivakumar, S., Venkatesan, A., y Soundhirarajan, P., (2015). Synthesis, characterizations and anti-bacterial activities of pure and Ag doped CdO nanoparticles by chemical precipitation method. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 136:

1751-1759.

- Kim, Y. K., Lee, S. C., Cho, Y. Y., Oh, H. J., y Ko, Y. H. (2012). Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *International Sistem Reseacrhc and microbiology*. 212.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., y Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*. 44(22): 3358-3393.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., y Singh. A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Reserach*. 280696.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). Mega 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874.
- Kuzyakov, Y., y Blagodatskaya, E. (2015). Microbial hotspots and hot moments in soil: concept y review. *Soil Biology and Biochemistry*. 83: 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>.
- Kuzyakov, Y. (2006). Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(3): 425-448.
- Krishnamurthi, S., Chakrabarti, T., y Stackebrandt, E. (2009). Re-examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris* Rheims et al. 1999 and proposal to transfer it to *Solibacillus* gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(5): 1054-1058.
- Laachari, F., Elabed, S., Sayari, A., Mohammed, I., Harchali, E. H., Boubendir, A., y Ibensouda, S. K. (2013). Biochemical characterization of a thermoactive and thermostable lipase from a newly isolated *Trichosporon coremiiforme* strain. *African Journal of Biotechnology*. 12-28.
- Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa J. B., y Martins, M. LI. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *EleCtron Journal Biotechnology*. 18: 110-115.
- Lah, T. N. T., Rahman, N. N. N., y Nama, M. B. (2012). Cellulase activity and glucose production by *Bacillus Cereus* monoculture and co-culture utilizing palm kernel cake (PKC) under solid state fermentation. In *International Conference on Environment, Energy and Biotechnology*, Singapore. 33: 172-177).
- Lampe, M., Santiago, C., González, J., Velasco, C., Lampe, M., Santiago, C., y Santiago, C. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas termófilos de géiseres naturales de candarave - tacna. *Biotechnology*. 18: 34-42.

- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., y Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environmental and Microbiology*. 75: 5111–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>.
- Lee, B. H., Kima, B. K., Lee, Y. J., Chung, Ch, H., y Lee, J. W. (2010). Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 38–42.
- Lee, C. C., Kibblewhite, Accinelli. R. E., Smith, M. R., Wagschal. K., Orts, W. J., y Wong, D. W. S. (2008). Cloning of *Bacillus licheniformis* xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Current Microbiology*. 57: 301–305.
- Lee, C. R., Chi, W. J., Lim, J. H., Dhakshnamoorthy, V., y Hong, S. K. (2018). Expression and characterization of the processive exo- β -1, 4-cellobiohydrolase SCO6546 from *Streptomyces coelicolor* A (3). *Journal of Basic Microbiology*. 58(4): 310-321.
- Lemessa, F., y Zeller, W., (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biology Control*. 42: 336–344.
- Leonardo, G., y Larrea, B. (2017). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. *Microbiology and Biochemistry*. 67-87.
- Leschine, S. B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Reviews in Microbiology*. 49(1): 399-426.
- Lim, J. H., Lee, C. R., Dhakshnamoorthy, V., Park, J. S., y Hong, S. K. (2016). Molecular characterization of *Streptomyces coelicolor* A (3) SCO6548 as a cellulose 1, 4- β -cellobiosidase. *FEMS Microbiology letters*. 3: 363.
- Lindberg, F., Lund, B., Johansson, L., y Normark, S. (1987). Localization of the receptor-binding protein adhensin at the tip of the bacterial pilus. *Nature*. 328: 84-87.
- Llacza, H. F. L. (2012). Evaluación de la actividad celulolítica del complejo enzimático celulasa en cepas fúngicas de los departamentos de Cajamarca , Lima , Junín , Huánuco. Universidad Nacional de San Marcos. 89-96.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., y Baldrian, P. (2017). Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 81(2):1–27. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00063-16>
- Lorenzo, M., Frías, A., Villa, P., y Valle, M. (2006). Detección por cromatografía de capa fina (CCF) de metabolitos antifúngicos producidos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, XL(1),27–

30.Retrievedfrom. 123. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223121549004>.

- López, R., Lado, F. L., Rodríguez, I., Gamallo, R., Lorenzo, V., y Rodríguez-Otero, L. (2003). Endocarditis por 8: presentación de un caso y revisión de la literatura. *Review of Medical Internal*. 20: 312-6.
- López-Mondéjar, R., Voršíšková, J., Veřtrovský, T., y Baldrian, P. (2015). The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biology Biochemistry*. 87: 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.008>.
- Lovaisa, N. C., y Ulla, E. L. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*. 35(1): 13-28.
- Lu, X., Zhou, D., Chen, X., Zhang, J., Huang, H., y Wei, L. (2017). Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean *Glycine max* (L.) Merr. *Plant and Soil*. 416(1-2): 53-66.
- Lynch, M. J., y Raphael, S. S. (1987). *Métodos de laboratorio*, Vol. 2, 2ª edición. Ed. Nueva Editorial Interamericana, México, D. F.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., y Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology, Molecular and Biological Reviews*. 66(3): 506-77.
- Maki, M., Leung, K. T., y Qin, W. (2009). The prospects of cellulase producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal Biology Science*. 5: 500–516.
- Malgas, S., van Dyk, J. S., y Pletschke, B. I. (2015). A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(8): 1167-1175.
- Maughan, H., y Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11(5): 789-797.
- Mansfield, S. D., Mooney, C., y Saddler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*. 15(5): 804–816. <http://doi.org/10.1021/bp9900864>
- Mantilla, C. L., y Acosta, R. C. P. (2013). Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1): 8–16.

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=91508170&lang=es&site=ehost-live>.

- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., y Smid, E. J. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*. 44: 94-102.
- Masai, E., Katayama, Y., y Fukuda, M. (2007). Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. 214-217.
- Mathews, R. M., Silveira, É. L. D., Scaquitto, D. C., Pedrinho, E. A. N., Val-Moraes, S. P., Wickert, E., y Lemos, E. G. D. M. (2006). Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(4): 439-447.
- Mayer-Hamblett, N., Aitken, M., Rubinfeld, G., y Ramsey, B. (2004). Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Biological Reviews*. 59: 955-9.
- Medina, J., Monreal, C., Barea, J. M., Arriagada, C., Borie, F., y Cornejo, P. (2015). Crop residue stabilization and application to agricultural and degraded soils: A Review *Waste Management*. 42: 41–54. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.04.002>
- Mehta, D., y Satyanarayana, T. (2013). Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. In: *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. Biotechnology of Thermophiles*. 3-60.
- Miranda, M., Kam, T, L., y Wensheng, Q. (2009). The prospects of cellulase- producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biology Science*. 5: 500-516.
- Miron, J., y Forsberg, C. I. (1999). Characterization of cellulose binding proteins which are involved in adhesion mechanism of *Fibrobacter intestinalis* DR7. *Application Microbiology and Biotechnology*. 51: 491-497.
- Mitsumori, M., y Minato, H. (1997). Cellulose-binding proteins from rumen microorganisms in Rumen Microbes and digestive Physiology in Ruminants. *Japan Scientific Societies Press*. 47-57.
- Mohammadipour, M. M., Mousivand, G., Salehi, J., y Abbasalizadeh, S. (2009). Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Microbiology*. 55: 395–404.
- Montoya Villafañe Hugo Humberto. (2008). *Microbiología Básica para el Área de la Salud y Afines.*, segunda edición, Colombia. y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-biológicas*. 7(1). 55-57.

- Molina, C., y Espín, N. (2014). Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Ligninolítica y Celulolítica a partir del Crecimiento del Hongo *Lentinus edodes* en Aserrín. *Tropical Reviews*. 33(2): 1–7. http://www.revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista_politecnica2/article/view/120
- Morales-Barrón, B. M., Vázquez-González, F. J., González-Fernández, R., Mora-Covarrubias, A. D., Quiñonez-Martínez, M., Díaz-Sánchez, Á. G., y Valero-Galván, J. (2017). Evaluación de la capacidad antagónica de cepas del orden bacillales aisladas de lixiviados de lombricomposta sobre hongos fitopatógenos. *Acta Multidisciplinary Scientific Journal*. 27(5): 44–54. <http://doi.org/10.15174/au.2017.1313>
- Morales, S. M. B., Castelblanco, E. M. S., y Suárez, H. J. G. (2014). Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. *Revista Del Sistema de Ciencia Tecnología E Innovación (SENNOVA)*. 1(1): 148–155. <http://www.metarevistas.org/index.php/sennova/article/view/89>.
- Morana, A., Maurelli, L., Lonata, E., La Cara, F., y Rossi, M. (2011). Cellulases from Fungi and Bacteria and their Biotechnological Applications. En: *Cellulase: types and action, mechanism and uses*. Nova Science Publishers Inc. 1-80.
- Moreno, M. L. O., y Vélez, D. U. (2011). A new method for quantifying endoglucanase activity based on Congo red-carboxymethyl cellulose complex depolymerisation. *Orinoquia*. *Biotechnology Reviews*. 15(1): 7–15.
- Morrison, M., y Miron, J. (2000). Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pilproteins. *Microbiology Letters*. 185: 109-115
- Nacke, H., Fischer, C., Thurmer, A., Meinicke, P., y Daniel, R. (2014). Land use type significantly affects microbial gene transcription in soil. *Microbiology and Ecology*. 67: 919–930. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0377-6>.
- Nakamura, L. K. (1989). Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *International Journal System Bacteriology*. 39: 295–300.
- Nakatsubo, F., Kamitakahara, H., y Hori, M. (1996). Cationic ring opening polymerization of 3,6 D O-benzyl-D-Glucose 1,2,4-orthopivalate and the first chemical synthesis of cellulose. *Journal American Chemistry Society*. 118: 1677-1678.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal Biology Chemistry*. 153(2): 375-380.
- Nicolaus, B. Poli, A. y Anzelmo, G. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs Journal*. 8(6): 1779-1802.

- Oades, J. M. (1984). Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil*. 76: 319-337.
- OHair, J. A., Li, H., Thapa, S., Scholz, M., y Zhou, S. (2017). Draft Genome Sequence of *Bacillus altitudinis* YNP4-TSU, Isolated from Yellowstone National Park. *Genome Announcements*. 5(28): 617- 631.
- Olalde, V. P., y Aguilera, L. I. G. (1998). Microorganisms and Biodiversity. *Terra Larinoamericana*. 16(3): 289–292.
- Pachón, H. A., y Perea, C. D. A. (2010). Determinación cuantitativa de la actividad enzimática celulolítica de microorganismos aislados de suelos de cultivos de arroz. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de doctorado.
- Pakpitcharoen, A., Potivejkul, K., Kanjanavas, P., Areekit, S., y Chansiri, K. (2008). Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. *Science Asia*. 34: 424–431.
- Palleroni, N. J., y Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 43(3): 606-609.
- Palmisano, M. M., K. Nakamura, L., E. Duncan, K., A. Istock, C. y M. Cohan, F. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *International Journal System Evolution Microbiology*. 51: 1671–1679.
- Pandey, A. K. y Kumar, S. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 13-17.
- Paradelo, R., Moldes, A. B., y Barral, M. T. (2013). Evolution of organic matter during the mesophilic composting of lignocellulosic winery wastes. *Journal of Environmental Management*. 116: 18–26. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.12.001>
- Parillo, R., Ventrino, V., Pepe, O., Rivas, P. C., y Testa, A. (2016). Use of Compost from Chestnut Lignocellulosic Residues as Substrate for Tomato Growth. *Waste and Biomass Valorization*. 1, 1–15. <http://doi.org/10.1007/s12649-016-9761-4>.
- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N., y Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(2): 269-275.
- Pastor, F. I. J., Gallardo, Ó, Sanz-Aparicio, J., y Díaz, P. (2007). Xylanases: molecular properties and applications. *Enzymatic Structure Function and Application Springer Netherlands*. 65–82.
- Payne, G. W., Ramette, A., Rose, H. L., Weightman, A. J., Jones, T. H., Tiedje, J. M., y

- Mahenthiralingam, E. (2006). Application of a recA gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in Burkholderia species. *Microbiology Letters*. 259(1): 126-132.
- Pell, A. N., y Schofield, P. (1993). Microbial adhesion and degradation of plant cell walls Forage Cell Wall Structure and Digestibility. *Madison Journal*. 397-423.
- Peña, E. F., y Acuña, E. C. (2009). Residuos de la cosecha forestal: aprovechamiento. In *Industria Forestal*. 156–168).
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., y Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11(11): 789.
- Pillai, P., y Archana, G. (2012). A novel process for biodegradation and effective utilization of chrome shavings, a solid waste generated in tanneries, using chromium resistant *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry*. 47(12): 2116-2122.
- Poli, A., Anzelmo, G., y Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs Journal*. 8(6): 1779-1802.
- Potshangbam, M., Sahoo, D., Verma, P., Verma, S., Kalita, M. C., y Devi, S. I. (2018). Draft Genome Sequence of *Bacillus altitudinis* Lc5, a Biocontrol and Plant Growth-Promoting Endophyte Strain Isolated from Indigenous Black Rice of Manipur. *Genome Announcements*. 6(26): 601-618.
- Prasad, R., Bhuyan, T., Mishra, K., Khanuja, M., y Varma, A. (2015). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from *Azadirachta indica* for antibacterial and photocatalytic applications. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 32: 55-61.
- Purahong, W., Schloter, M., Pecyna, M. J., Kapturska, D., Daumlich, V., Mital, S., Buscot, F., Hofrichter, M., Gutknecht, J. L., y Kruger, D. (2014). Uncoupling of microbial community structure and function in decomposing litter across beech forest ecosystems in Central Europe. *Science Journal*. 4: 7014. <https://doi.org/10.1038/srep07014>.
- Prescott, C. E., y Grayston, S., J. (2013). Tree species influence on microbial communities in litter and soil: current knowledge and research needs. *Ecology Manage*. 309: 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.02.034>.
- Priest, F. G. (2009). Genus *Paenibacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3. The Firmicutes, 2nd edition. ed. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W. Springer. 269-95.
- Ramírez, J. H. R. (2014). Efecto de diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa sobre la cinética de crecimiento de *Bacillus sp.* Universidad Nacional de Trujillo,

Facultad de Ciencias Biológicas. Académico Profesional de Microbiología.

- Ramírez, P., y Cocha, J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. 10(1): 67-77.
- Rastori, R. P., Kumar, A., Tyagi, M. B., y Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*. 123-132.
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., y Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(2): 303-329.
- Rabinovich, M. L., Melnick, M. S., y Bolobova, A. V. (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry Journal*. 67(8): 850-71.
- Rawat, R., y Tewari, L. (2012). Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Biology Journal*. 16:637–644.
- Reese, E. T., Parrish, F. W., y Ettliger, M. (1971). Nojirimycin and d-glucono-1, 5-lactone as inhibitors of carbohydrases. *Carbohydrate Research*. 18(3): 381-388.
- Reva, O. N., Dixelius. C., Meijer, J., y Priest, F. G. (2004). Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Microbiology Ecology*. 48: 249-259.
- Rinta-Kanto, J. M., Sinkko, H., Rajala, T., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Tamminen, M. V., y Timonen, S. (2016). Natural decay process affects the abundance and community structure of Bacteria and Archaea in *Picea abies* logs. *FEMS Microbiology and Ecology*. 92: 87. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw087>.
- Roberts, M. S., Nakamura, L., y Cohan, F. M. (1994). *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal System Bacteriology*. 44: 256–264.
- Roberts, M. S., K. Nakamura., L. y M. Cohan, F. (1996). *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal System Bacteriology*. 46: 470–475.
- Rodríguez, L. A. S., y Llenque, L. D. (2016). Isolation and selection of cellulolytic bacteria from compost organic waste. *REBIOL*. 36(1): 19–28. <http://doi.org/ISSN: 2313-3171>
- Román, P., Martínez, M., y Pantoja, A. (2013). Manual de compostaje del agricultor, Experiencias en América Latina. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. FAO. (1):34-45. <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>

- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., y Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. inaquosorum subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(10): 2429-2436.
- Russell, L. M., Bahadur, R., Hawkins, L. N., Allan, J., Baumgardner, D., Quinn, P. K., y Bates, T. S. (2009). Organic aerosol characterization by complementary measurements of chemical bonds and molecular fragments. *Atmospheric Environment*. 43(38): 6100-6105.
- Ryckeboer, J., Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., y Coosemans, J. (2003). Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*. 125(3): 361-368.
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R., y Mäkelä, M. R. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology Biology Molecular Biological Reviews*. 78: 614–649. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>.
- Sadhu, S., y Kanti, T. M. (2013). Cellulase Production by Bacteria : A Review. *British Microbiology Research Journal*. 3(3): 235–258. <http://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/2367>.
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Salazar, T. A. (2014). Actividad microbiana en el proceso de compostaje aerobio de residuos sólidos orgánicos. *Revista de Investigación Universitaria*. 3(2): 74–84.
- Salnikov, V. V., Grimson, M. J., Delmer, D. P., y Haigler, C. H. (2001). Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. *Phytochemistry*. 57: 823–833.
- Saleem, M., Aslam, F., Saleem, A. M., Tariq, M., y Ibrahim, R. M. (2012). Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus* sp. and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 28: 513–522.
- Sánchez-Santillán, P., Cobos-Peralta, M. A., Hernández-Sánchez, D., Alvarado-Iglesias, A., Espinosa-Victoria, D., y Herrera-Haro, J. G. (2016). Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia*. 50(5): 575–582.
- Sa-Pereira, P, A. Mesquita, J. C. Duarte, M. R. Barros, A. y M. Costa-Ferreira. (2002). Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme Microbial Technology*. 30: 924-933.
- Schmitt, I. A., Crespo, P. K., Divakar, J. D., Fankhauser, E., Herman-Sackett, K., Kalb, M. P., Nelsen, N. A., Nelson, E., Rivas-Plata, A. D., Shimp, T. Widhelm., y Lumbsch, H. T. (2009). New Primers for Promising Single-copy Genes in Fungal Phylogenetics and

- Systematics. *Persoonia*. 23: 35–40.
- Schwarz, J. A., Contescu, C., y Contescu, A. (1995). Methods for preparation of catalytic materials. *Chemical Reviews*. 95(3): 477-510.
- Shabeb, M. S. A., Younis, M. A. M., Hezayen, F. F. y Nour-eldein M. A. (2010). Production of cellulose in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. *World Application Science Journal*. 8: 35-42.
- Shoham, Y., Lamed, R., y Bayer, E. A. (1999). The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiology*. 7: 275-281.
- Shu-Ying, Z., Qing-Feng, W., Rui, W., y Shu-Guang, X. (2011). Changes in bacterial community of Anthracene bioremediation in municipal solid waste composting soil. *Journal of Zhejiang University-Science*. 12(9): 760-768.
- Simic, M., Al-Khayri, J. M., y Johnson, D. V. (2015). *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits*. Springer. 56-62.
- Singh, G., Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Ramachandrarao, P., y Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology. Biotechnology Journal*. 18(22): 225103.
- Stanier, R., y Ingraham, J. (1996). *Microbiología*. Reverté S. A. 195.
- Stathopoulou, G., Dutra, L., Basden, S. L., Leyro, T. M., Powers, M. B., y Otto, M. W. (2012). A meta-analytic review of psychosocial interventions for substance use disorders. *American Journal of Psychiatry*. 165(2): 179-187.
- Sturcova, A., Apperley, D. C., Sugiyama, J., y Jarvis, M. C. (2004). Structural details of crystalline cellulose from higher plants. *Biomacromolecules*. 5: 1333-1339.
- Suescún, A. V., Cubillos, J. R., y Zambrano, M. M. (2006). Genes involucrados en la biogénesis de fimbrias afectan la formación de biopelículas por parte de *Klebsiella pneumoniae*. *Biomédica*. 26(4): 528-37.
- Seo, J. K., Park, T. S., Kwon, I. H., Piao, M. Y., Lee, C. H., y Ha, J. K. (2013). Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 isolated from the rumen of a native Korean goat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 26(1): 50.
- Sunday, J., James, A. A., Ibijola, E. A., Ogunrinde, R. B., Ogunyebi, S. N. (2012). A computational approach to Verhulst-Pearl Model. *Journal of Applied Chemistry*. 2(6): 45-52.
- Sunar, K., Dey, P., Chakraborty, U., y Chakraborty, B. (2015). Biocontrol efficacy and plant

- growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills. *Journal of Basic Microbiology*. 55(1): 91-104.
- Suthar, H., Krushi, H., Anjana, D., y Anuradha, N. (2009). Selective plugging strategy based microbial enhanced oil recovery using *Bacillus licheniformis* TT33J. *Microbiology and Biotechnology*. 19(10). 1230–1237.
- Šimić, K., Soljačić, I., y Pušić, T. (2015). Application of Cellulases in the Process of Finishing Uporaba celulaz v procesu plemenitenja. *Scientific Review*. 58(1): 47–56. <http://doi.org/10.14502/Tekstilec2015.58.47>
- Tamariz, C. del R. A. (2014). Diversidad de bacterias termotolerantes celulíticas y xilanolíticas de fuentes termales del Callejón de Huaylas. The Americas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis de Grado. <http://www.jstor.org/stable/978380?origin=crossref>.
- Tan, H. T., Corbin, K. R., y Fincher, G. B. (2016). Emerging Technologies for the production of renewable liquid transport fuels from biomass sources enriched in plant cell walls. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1854.
- Tengerdy, R. P., y Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2-3): 169-179.
- Thomas, S. M., y Schaechter, M. (2012). Topics in ecological and environmental microbiology. Academic Press. 123-127.
- Tognetti, C., Mazzarino, M. J., y Laos, F. (2007). Improving the quality of municipal organic waste compost. *Bioresource Technology*. 98(5): 1067-1076.
- Tomme, P., Warren, R. A. J., y Gilkes, N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*. 37:1-81.
- Thorpe, M. R., y Minchin, P. E. H. (1996). Mechanisms of long- and short-distance transport from sources to sinks. *Biological Journal*. 261–282.
- Urbanová, M., Šnajdr, J., y Baldrian, P. (2015). Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology Biochemistry*. 84: 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.011>.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. 6(3): 213-218.
- Varnero, M. T., Quiroz, M. S., y Álvarez, C. H. (2010). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Informacion Tecnologica*. 21(2): 13–20. <http://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4154it.09>
- Varnero, M., Galleguillos, K., y Rojas, R. (2011). Sistemas de compostaje para el

tratamiento de Alperujo. Información Tecnológica. 22: 49-56. ISSN 0718-0764.

- Velázquez, A., Torres, A., y Bocco, G. (2003). Las enseñanzas de San Juan. Las enseñanzas de San Juan: Investigación participativa para el manejo integral de recursos naturales. México.
- Viteri, P. A. F., Catillo, D. A. G., y Viteri, S. E. R. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronomica*. 65(4): 362–367. <http://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>.
- Viteri, P. A. F., Guerra, D. A. C., y Rosero, S. E. V. (2015). Desarrollo y evaluación de un inóculo de bacterias celulolíticas. *Revista U.D.C.A , Acta y División Científica*. 18(1): 207–215.
- Viviano, F., Medina, L. V., Ramos, N., Amaíz, L., y Valbuena, O. (2011). Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de Las Trincheras, Venezuela. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental*. 2(1): 18–29.
- Waghmare, P. R., Patil, S. M., Jadhav, S. L., Jeon, B. H., y Govindwar, S. P. (2018). Utilization of agricultural waste biomass by cellulolytic isolate *Enterobacter sp.* *Biology Agriculture and Natural Resources*. 52(5): 399-406.
- Warren, R.A.J. *Annu. (1996). Review Microbiology*. 50: 183-212.
- Westover, K. M., Kennedy, A. C., y Kelley, S. E. (1997). Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *Journal of Ecology*. 863-873.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., y Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*. 173: 697-703.
- Wei, G, J. W., Kloepper, Y, S. y Tuzun. (1996). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*. 86: 221–224.
- Wilson, D. B. y Kostylev, M. (2012). Cellulase Processivity. *Methods in Molecular Biology Clifton Natural Journal*. 908: 93–99.
- Woo, H. L., Hazen, T. C., Simmons, B. A., y DeAngelis, K. M. (2014). Enzyme activities of aerobic lignocellulolytic bacteria isolated from wet tropical forest soils. *Systematic and Applied Microbiology*. 37(1): 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.10.001>.
- Wong, K. K., Tan, L, U., y Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiology Reviews*. 52(3): 305-17.
- Wu, B., Zheng, S., Pedroso, M. M., Guddat, L. W., Chang, S., He, B., y Schenk, G. (2018). Processivity and enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase

- from *Bacillus subtilis* BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 11(1): 20.
- Wüstenberg, Tanja. (2014). Cellulose and cellulose derivatives in the food industry: fundamentals and applications. *Biotechnology Journal*. 123-134.
- Yang, J. K., Zhang, J. J., Yu, H. Y., Cheng, J. W., y Miao, L. H. (2014). Community composition and cellulase activity of cellulolytic bacteria from forest soils planted with broad-leaved deciduous and evergreen trees. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(3): 1449–1458. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-5130-4>.
- Yan, Z. F., Lin, P., Li, C. T., Kook, M., y Yi, T. H. (2018). *Scopulibacillus cellulosityticus* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium isolated from tea. *Biology Journal*. 1-8.
- Zapata, H. B. M., y Castellanos, R. C. (2014). Isolation and identification of thermophilic cellulolytic bacteria from natural geysers candarave - tacna. *Revista de Ciencia y Desarrollo*. 18: 29–36. <http://doi.org/1SSN 2304-8891>
- Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., y Mielenz, J. R. (2006). Outlook of cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 24: 452-481.
- Zhang, C., Wang, X., Zhang, W., Zhao, Y., y Lu, X. (2017). Expression and characterization of a glucose-tolerant β -1, 4-glucosidase with wide substrate specificity from *Cytophaga hutchinsonii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(5): 1919-1926.
- Zhao, J., Nagashima, K., Bogart, R. S., Kosovichev, A. G., y Duvall Jr, T. L. (2012). Systematic center-to-limb variation in measured helioseismic travel times and its effect on inferences of solar interior meridional flows. *The Astrophysical Journal Letters*. 749(1), 5-8.
- Zhu, H., Luo, W., Ciesielski, P. N., Fang, Z., Zhu, J. Y., Henriksson, G., y Hu, L. (2016). Wood-derived materials for green electronics, biological devices, and energy applications. *Chemical Reviews*. 116(16): 9305-9374.
- Žifčáková, L., Veřtrovský, T., Howe, A., Baldrian, P. (2016). Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental Microbiology*. 18: 288–301. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13026>.
- Žifčáková, L., Veřtrovský, T., Lombard, V., Henrissat, B., Howe, A., y Baldrian, P. (2017). Feed in summer, rest in winter: microbial carbon utilization in forest top soil. *Microbiome*. 5(1): 122. <http://doi.org/10.1186/s40168-017-0340-0>.