

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



TEMA:

EVALUACIÓN DE BACTERIAS TRANSFORMADORAS DE CARBONO OBTENIDAS DE SUELO DE PÁRAMO PRISTINO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Línea de investigación: Biotecnología, energía y recursos naturales renovables

AUTORA:

Liliana Vanessa Chulde Román

DIRECTOR:

Ing. Santiago Zárate Baca. MSc.

Ibarra – Ecuador

Julio 2024



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECA

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401869920		
APELLIDOS Y NOMBRES:	CHULDE ROMÁN LILIANA VANESSA		
DIRECCIÓN:	Calle Rio Guayas y Babahoyo		
EMAIL:	lvchulder@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-	TELÉFONO MÓVIL:	0987567898

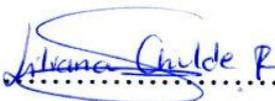
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Evaluación de bacterias transformadoras de carbono obtenidas de suelo de páramo prístino del Parque Nacional Cayambe Coca.
AUTORA:	Chulde Román Liliana Vanessa
FECHA: DD/MM/AA	18/07/2024
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Santiago Zarate MSc. MSc. Pedro Barba

2. CONSTANCIAS

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 18 días del mes de Julio de 2024

LA AUTORA:

(Firma)..........

Nombre: LILIANA VANESSA CHULDE ROMÁN

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR**

Ibarra, 18 de Julio del 2024

Ing. Santiago Zárate. MSc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



Ing. SANTIAGO ZARATE. MSc.

C.I: 1718974841

AGRADECIMIENTO

Agradezco primero a Dios por bendecirme en cada paso y poner a personas maravillosas en mi vida, agradezco mucho a cada miembro de mi familia ya que este logro lleva el nombre de cada uno de ellos, gracias por el amor incondicional, gracias a mi mami y papi por darme el mejor regalo, la educación, quizá ellos no tuvieron la oportunidad de sacar una profesión pero se sacrificaron mucho para que yo si lo haga, a mis hermanas por ser un soporte emocional y apoyo constante, a mi tutor Ing. Santiago Zárate MSc por su orientación y paciencia durante el desarrollo de mi investigación, a mi asesor MSc Pedro Barba y docentes porque he sido testigo de la dedicación y buena predisposición de enseñar, ellos han dirigido con su ejemplo este camino de principio a fin.

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a Dios por bendecirme cada día por darme salud, los recursos necesarios para poder desarrollar este proyecto y en especial por encargarse de poner a cada una de las personas que estuvieron presentes quienes con su apoyo esto fue posible.

A mis amados padres Yolanda y Miguel que con su amor, paciencia y esfuerzo me han concedido la alegría de poder cumplir este sueño, a mis hermanas Mónica y Janeth por su ejemplo y palabras de aliento en todos los momentos, a mis sobrinos Estefy, Fer, Emy y Edu por llenarme de alegría, a mi Perlita por acompañarme en mis desveladas y darme mucho amor. Gracias familia por sostenerme y levantarme cuando sentía que ya no podía más, por ser el motivo de salir adelante.

A mis amigas y amigos que fueron parte de mi desarrollo personal, cada uno sabe el lugar que tiene en mi corazón ya que en alguna etapa de mi vida me apoyaron y me animaron.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE ANEXOS	12
CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Planteamiento del problema	16
1.2 Justificación.....	17
1.3 Pregunta directriz.....	18
1.4 Objetivos.....	19
1.4.1 Objetivo general.	19
1.4.2 Objetivos específicos.....	19
1.5 Hipótesis	19
CAPÍTULO II.....	20
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1.1 Parque Nacional Cayambe Coca	20
2.1.2 Suelo de Páramo	20
2.1.3 Microorganismos del suelo.....	20
2.1.4 Microorganismos asociados a la descomposición de materia orgánica	21
2.1.5 Relación entre suelo, bacterias y carbono orgánico:	22
2.2 Celulosa	22
2.2.1 Hidrolisis de celulosa.....	22
2.2.2 Pruebas de detección de hidrólisis de celulosa	24
2.2.3 Importancia biotecnológica	25
2.3 Almidón.....	25
2.3.1 Hidrólisis del almidón	26
2.3.2 Pruebas de detección de hidrólisis de almidón	26
2.3.3 Importancia biotecnológica	27
2.4 Quitina	27
2.4.1 Hidrolisis de quitina.....	27
2.4.2 Importancia biotecnológica	28

2.5	Impacto del cambio climático y disturbios en los páramos andinos	29
CAPÍTULO III		30
3.	METODOLOGÍA	30
3.1	Descripción del área de estudio	30
3.2	Ejecución del primer objetivo específico	30
3.2.1	Activación de inóculos bacterianos	30
3.2.2	Formulación de medios de cultivo.....	31
3.2.3	Identificación de la actividad hidrolítica	32
3.2.4	Cálculo del índice hidrolítico	33
3.2.5	Análisis estadísticos.....	33
3.3	Ejecución del Segundo objetivo específico.....	33
3.3.1	Fermentación en caldo Carboximetilcelulosa (CMC).....	33
3.3.2	Fermentación en caldo Almidón.....	37
3.4	Ejecución del tercer objetivo específico.....	39
3.4.1	Revisión bibliográfica.....	39
3.4.2	Selección de protocolos experimentales.....	40
3.4.3	Adaptación de optimización de protocolos	40
3.4.4	Preparación de medios de cultivo.....	40
3.4.5	Elaboración de Procedimientos de Inoculación y Cultivo.....	40
3.4.6	Desarrollo de Métodos Analíticos	40
3.4.7	Creación de Curvas de Calibración	41
3.4.8	Implementación de Análisis Estadístico.....	41
CAPÍTULO IV		42
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1	Identificación de las bacterias transformadoras de carbono	42
4.1.1	Activación y crecimiento bacteriano	42
4.1.2	Cálculo del índice celulolítico	43
4.1.3	Cálculo del índice amilolítico.....	46
4.2	Seleccionar bacterias promisorias en la transformación de fuentes de carbono 47	
4.2.1	Actividad celulolítica en medio líquido.....	48
4.2.2	Actividad amilolítica en medio líquido	50
4.3	Elaborar un manual para la identificación de bacterias transformadoras de carbono.....	51
4.3.1	Discusión	54
CAPÍTULO V.....		56

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
5.1	Conclusiones.....	56
5.2	Recomendaciones	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	23
Figura 2. Hidrólisis enzimática del almidón.....	26
Figura 3. Hidrólisis de quitina.....	28
Figura 4. Soluciones de glucosa a concentraciones conocidas.....	35
Figura 5. Crecimiento y actividad de las bacterias en el medio de celulosa, almidón y quitina.....	43
Figura 6 Cepas con índice celulolítico con respecto al control positivo.....	45
Figura 7 Cepas con índice amilolítico con respecto al control positivo.....	47
Figura 8 Porcentajes de consumo de cepas celulolíticas.....	49
Figura 9. Cinética el consumo de sustrato a base de celulosa.....	50
Figura 10 Porcentajes de consumo de cepas amilolíticas seleccionadas.....	51
Figura 11. Cinética de consumo de almidón.....	51
Figura 12. Diseño de tablas de protocolos.....	53
Figura 13. Contenido del manual.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo	31
Tabla 2. Pruebas colorimétricas.....	32
Tabla 3. Medio de carboximetilcelulosa.....	34
Tabla 4. Concentraciones de glucosa	35
Tabla 5. Medio de almidón.....	37
Tabla 6 Concentraciones de yoduro de potasio	38
Tabla 7. Selección de microorganismos según índice hidrolítico y actividad.....	48
Tabla 8. Análisis de varianza reactores de celulosa con actinomicetos	76
Tabla 9. Análisis de varianza reactores de celulosa con pseudomonas	76
Tabla 10. Análisis de varianza de reactores de almidón en actinomicetos.....	77
Tabla 11. Análisis de varianza de reactores de almidón en pseudomonas	77
Tabla 12. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks.....	77
Tabla 13. Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas.	78
Tabla 14. Prueba de Chi cuadrado de Pearson evaluación de actividad celulólfica.	78

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de celulosa	57
Anexo 2. Curva de calibración de yoduro de potasio.....	58
Anexo 3. Crecimiento y actividad de las cepas en los 3 medios formulados.....	58
Anexo 4. Crecimiento y actividad en medio de carboximetilcelulosa	61
Anexo 5. Crecimiento y actividad en medio de agar almidón.....	67
Anexo 6 Crecimiento de actividad quitinolítica	72
Anexo 7. Calculo del índice celulolítico de bacterias con actividad positiva	75
Anexo 8. Calculo del índice amilolítico de bacterias con actividad positiva	76

RESUMEN

Los páramos se encuentran distribuidos al largo de los Andes, desempeñan un papel ecosistémico fundamental, sus suelos albergan gran diversidad de microorganismos nativos con diferentes capacidades siendo un punto de partida para aprovechar la biodiversidad microbiana con características específicas que permitan obtener nuevos productos u optimizar procesos industriales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad que tienen las bacterias aisladas previamente en el proyecto BIOGGEC para degradar fuentes de carbono. Específicamente, se evaluó la degradación de los sustratos celulosa, almidón y quitina. Para ello, se realizó un primer tamizaje por siembra de punción en agar carboximetilcelulosa, agar almidón y agar quitina. La actividad celulolítica se reveló con una solución de rojo congo al 1%. Un total de 49 cepas evidenciaron halo de hidrólisis alrededor de las colonias. Por otro lado, la actividad amilolítica se evaluó mediante la prueba de revelado con bolas de yoduro. Bajo este método, 39 cepas generaron un halo de hidrólisis. Finalmente, la actividad quitinolítica evidenció únicamente crecimiento en 41 cepas, mas no de la formación de un halo de hidrolisis, razón por la cual no se consideró este sustrato en futuros análisis. Posteriormente, se realizó un segundo cribado bajo las mismas condiciones para cada sustrato, priorizando el índice hidrolítico calculado, criterio que se tomó en cuenta para el segundo objetivo conjuntamente con el criterio con respecto a la cepa que tengan más de una actividad enzimática de los sustratos mencionados. Bajo estos criterios se seleccionaron las cepas QA20, QP8, MA49, MP24 y MA37, MP49 para ser sometidas a ensayos enzimáticos en sustratos líquidos de celulosa y almidón. Pruebas posteriores de azúcares reductores se realizaron para valorar el consumo de sustrato generado por cada cepa. Los resultados revelaron que la cepa QP8 obtuvo un mayor porcentaje de consumo de celulosa con el 62% y un 80% de almidón respecto al control a las 30 horas de cultivo. Estos resultados demuestran que dentro de la biodiversidad de los suelos del páramo prístino existen bacterias capaces de degradar eficientemente los polímeros más abundantes en la naturaleza como celulosa. El descubrimiento de estas bacterias favorece la comprensión de la diversidad microbiana y proporciona información valiosa que incluye un potencial biotecnológico en la parte energética, medioambiental y alimenticia

Palabras Clave: Actividad enzimática, bacteria, almidón, celulosa, biotecnología.

ABSTRACT

The paramos are distributed along the Andes and play a fundamental ecosystemic role. Their soils harbor a great diversity of native microorganisms with different capabilities, serving as a starting point to harness microbial biodiversity with specific characteristics to obtain new products or optimize industrial processes. The objective of this study was to evaluate the capacity of bacteria previously isolated in the BIOGGEC project to degrade carbon sources. Specifically, the degradation of cellulose, starch, and chitin substrates was evaluated. For this purpose, an initial screening was performed by puncture inoculation on carboxymethylcellulose agar, starch agar, and chitin agar. Cellulolytic activity was revealed with a 1% Congo red solution. A total of 49 strains showed a hydrolysis halo around the colonies. On the other hand, amylolytic activity was evaluated using the iodine ball test. Under this method, 39 strains generated a hydrolysis halo. Finally, chitinolytic activity only showed growth in 41 strains, but no hydrolysis halo formation was observed, which is why this substrate was not considered in future analyses. Subsequently, a second screening was conducted under the same conditions for each substrate, prioritizing the calculated hydrolytic index, a criterion considered for the second objective along with the criterion regarding strains with more than one enzymatic activity for the mentioned substrates. Under these criteria, strains QA20, QP8, MA49, MP24, MA37, and MP49 were selected to undergo enzymatic assays in liquid cellulose and starch substrates. Subsequent reducing sugar tests were performed to assess the substrate consumption generated by each strain. The results revealed that strain QP8 achieved the highest cellulose consumption percentage with 62% and 80% starch compared to the control at 30 hours of culture. These results demonstrate that within the biodiversity of pristine paramo soils, there are bacteria capable of efficiently degrading the most abundant polymers in nature, such as cellulose. The discovery of these bacteria enhances the understanding of microbial diversity and provides valuable information, including biotechnological potential in the energy, environmental, and food sectors.

Keywords: Enzymatic activity, bacteria, starch, cellulose, biotechnology.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Los ecosistemas de páramo brindan varios servicios ecosistémicos como la belleza escénica, protección hidrológica, fijación y almacenamiento de carbono, debido a sus características únicas (Llambí et al., 2012). Los páramos ecuatorianos han sido ampliamente estudiados respecto a fauna y flora, sin embargo, el suelo y su microbiota en general ha sido poco investigados (Granados et al., 2005), pese a ser un ecosistema único y frágil que alberga una biodiversidad excepcional (Pinos et al., 2021).

Según López, Farinango (2022), en su estudio “*Evaluación de una estrategia de biorremediación de suelos de páramo afectados por incendio mediante consorcios de microorganismos nativos del Parque Nacional Cayambe Coca*” aislaron un total de 80 cepas bacterianas con el propósito de utilizar estos microorganismos para biorremediación de suelos afectados por incendios. Las bacterias obtenidas de este ecosistema desempeñan un papel crucial en los procesos biogeoquímicos y su capacidad para degradar carbono y el desconocimiento de las capacidades bacterianas presenta un vacío en el entendimiento de procesos microbiológicos presentes en los páramos.

A pesar de la importancia crítica de las bacterias del suelo que respecta al funcionamiento saludable de los páramos, existe la falta de investigación e información que limita la capacidad para desarrollar estrategias de remediación, conservación y manejo sostenible del páramo, volviéndose un obstáculo para aprovechar su potencial en aplicaciones biotecnológicas y agrícolas (Lizarazo & Gómez, 2014). La comprensión de las capacidades que tienen las bacterias aisladas en entornos extremos como los páramos puede ayudar a desarrollar enfoques más efectivos y sostenibles como el tratamiento de desechos orgánicos y agrícolas, en regiones donde los recursos son limitados (Castro et al., 2011).

La disponibilidad de residuos sólidos urbanos, vegetales con gran contenido de celulosa, lignina y almidón, así como la gran cantidad de desechos diarios generados por los sistemas agrícolas, se vuelve una problemática sino tienen un posterior uso, su acumulación en el suelo da origen a la proliferación de plagas y hospederos fitopatógenos

ambientales. (Lira et al., 2019). Es así que, la disposición final de los residuos orgánicos producidos representa un problema y la falta de desarrollo e investigación de microorganismos con capacidad de producir metabolitos biológicamente activos no se desarrollan pese a ser procesos que sean económicamente rentables (Viteri et al., 2015).

Las bacterias del suelo son fundamentales en los ciclos biogeoquímicos y aunque las cepas se aislaron para la biorremediación de suelos afectados por incendios, la información sobre la capacidad de transformar carbono ofrece una oportunidad única para desarrollar tecnologías de restauración sostenible y conservación de ecosistemas en particular dentro del contexto de la mitigación al cambio climático con un enfoque a la resiliencia de los ecosistemas de páramo.

1.2 Justificación

En Ecuador, dos tercios de la extensión total de páramos se encuentran fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Pinos et al., 2021). Lamentablemente no se le ha dado la debida importancia a la investigación del suelo del páramo, lo que ha generado una escasez de información científica al respecto ignorando los principios básicos relacionados con el tema (Llambí et al., 2012). La investigación propuesta busca llenar esta brecha en el conocimiento al evaluar la capacidad de bacterias aisladas del páramo para degradar carbono.

Los microorganismos, en especial las bacterias juegan un rol importante en el proceso de transformación o en el llamado ciclo de carbono, entender cómo estas bacterias interactúan con estos compuestos es fundamental para implementar estrategias de conservación efectivas dentro de ecosistemas, estudiar estas capacidades bacterianas pueden proporcionar información importante de como influyen en los procesos biogeoquímicos y equilibrio ecológico de estos ecosistemas vulnerables, afectados por actividades antrópicas como agricultura, pastoreo o quema.

Las bacterias del suelo son conocidas por su diversidad metabólica y su capacidad para producir una amplia gama de compuestos bioactivos y enzimas con diversas funciones (Sastoque et al., 2007). Al descomponer estructuras como celulosa, almidón y quitina las bacterias producen una variedad de metabolitos secundarios que pueden tener

propiedades bioactivas interesantes, como actividad antimicrobiana, antioxidante o antifúngica. Identificar y caracterizar estos metabolitos secundarios podría llevar al descubrimiento de compuestos con aplicaciones en medicina, agricultura o industria.

Muchas bacterias del suelo, incluidas las aisladas de páramos, no solo tienen implicaciones ambientales muchas de las bacterias producen enzimas que les permiten descomponer y metabolizar diferentes sustratos orgánicos, algunas de estas enzimas, como las celulasas o las amilasas son particularmente útiles, como en la producción de biocombustibles, alimentos o productos farmacéuticos (Richard y col., 2006). Es así como desde hace varias décadas se han venido utilizando estos biocatalizadores en procesos de la industria textil, alimentos, papel, detergentes y recientemente la industria de bioetanol (Cabra et al., 2014).

En general los páramos son ecosistemas importantes para la captura de carbono a nivel regional y global, sin embargo, la falta de conocimiento de estos ambientes limita la comprensión para conservar y gestionar adecuadamente estos ecosistemas únicos. El estudio sobre el potencial que tienen las bacterias en la transformación de carbono presentes en el PNCC representaría una fuente de información de alto valor ecológico, al ampliar nuestra comprensión sobre las capacidades de las bacterias para descomponer carbono, no solo contribuirá al desarrollo científico, sino que también tendrá un impacto significativo en la conservación ambiental y la preservación de estos ecosistemas.

1.3 Pregunta directriz

¿Las bacterias del proyecto BIOGEEC tienen la capacidad de degradar fuentes de carbono?

1.4 Objetivos

1.4.1 *Objetivo general.*

Evaluar las bacterias transformadoras de carbono procedentes de suelo de páramo prístino del Parque Nacional Cayambe-Coca

1.4.2 *Objetivos específicos*

- Identificar las bacterias transformadoras de carbono del banco de cepas del proyecto BIOGEEC.
- Seleccionar bacterias promisorias en la transformación de fuentes de carbono.
- Elaborar un manual para la identificación de bacterias transformadoras de carbono.

1.5 Hipótesis

En el parque nacional Cayambe coca existen microorganismos transformadores de carbono, los cuales poseen diferentes actividades para degradar fuentes de carbono.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1.1 *Parque Nacional Cayambe Coca*

El Parque Nacional Cayambe Coca (PNCC) pertenece a una áreas protegidas del Ecuador, se distribuye en cuatro provincias: Imbabura, Pichincha, Napo y Sucumbíos y posee un tipo de vegetación de páramo de pajonal y pantanoso (Ministerio del Ambiente, 2020). Los páramos son ecosistemas frágiles neotropicales de alta montaña, en Ecuador tienen una altura promedio de 3300msnm, cubren el 7 % de su territorio, el mismo que no se encuentra protegido en su totalidad, y proveen de servicios ambientales a la población como recursos hídricos y sumideros de carbono principalmente que ayudan en el control del calentamiento global (Hofstede et al., 2014).

2.1.2 *Suelo de Páramo*

El suelo de los páramos ecuatorianos al tener densidad aparente baja, estructura abierta y porosa permite el desarrollo de plantas endémicas y diversidad faunística (Valle et al., 2009) El clima frío, húmedo, y la baja presión atmosférica son factores que favorecen la acumulación de la materia orgánica (Zambrano et al., 2011). Los microorganismos como bacterias y hongos comprenden más del 90% de la biomasa microbiana, actúa en procesos de transformación y dinamización de nutrientes para la fijación del nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Hernández & Lizarazo, 2015) descomposición de materia orgánica y desarrollo del suelo (Rinnan & Baath, 2009).

2.1.3 *Microorganismos del suelo*

La diversa cantidad de microorganismos como hongos, bacterias, actinomicetos que se encuentran en una fracción del suelo cumple funciones precisas en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos, permiten la descomposición de la materia orgánica hasta los compuestos más simples que le permiten absorber a las plantas (Zambrano et al., 2011). La vida que se desarrolla en este tipo de entornos pertenecientes al páramo depende su riqueza en el microbiota del suelo, se encarga de procesos de mineralización, descomposición y almacenamiento de carbono, que permiten

mantener un control positivo frente al cambio climático (Chuncho-Morocho & Chuncho, 2019).

La producción y degradación por bacterias son procesos de importancia en el reciclamiento de la materia orgánica y en el comienzo de las tramas tróficas microbianas (Cuevas, 2004). La riqueza de microorganismos provenientes del suelo es muy útil en el ciclo de transformación de carbono, en especial las bacterias parte de la metanogénesis, del ciclo de degradación del carbono (Orejuela et al., 2012).

2.1.4 Microorganismos asociados a la descomposición de materia orgánica

Los microorganismos asociados a la descomposición de materia orgánica incluyen bacterias, hongos y otros organismos especializados en descomponer residuos orgánicos, n. En el suelo, la mayoría de compuestos orgánicos se procesan por microorganismos heterótrofos que utilizan carbono orgánico como fuente de nutrientes y de energía (Rincon, 2013). Las bacterias y plantas desempeñan un papel fundamental en la transformación del carbono, a través de procesos como la descomposición y fotosíntesis.

Los hongos, bacterias y actinobacterias por medio de secreciones de enzimas hidrolíticas tienen un papel fundamental en la depolimerización de componentes orgánicos, entre los más importantes son las celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas fosfatasas y arilsulfatasas que hidrolizan moléculas grandes como almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que son asimilados por los microorganismos como fuente de carbono y energía (Rodríguez & Llenque, 2016).

Algunas de las especies conocidas por degradar componentes orgánicos que se hallan con más frecuencia son *Actinobifida chromogena*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micromonospora carbonacea*, *Streptomyces* spp., entre otras (Toloza, 2023). Según Sánchez et al., (2020), *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* son algunas de las bacterias reconocidas en la industria por su capacidad para degradar almidón, debido a su producción de amilasas termoestables. Aunque las enzimas de origen fúngico son generalmente más efectivas, las bacterias han ganado atención en los últimos años por sus enzimas, que presentan tasas de crecimiento más rápidas en comparación con los hongos (Vásquez & Millones, 2023).

2.1.5 Relación entre suelo, bacterias y carbono orgánico:

Las bacterias del suelo desempeñan un papel crucial en la transformación del carbono orgánico, descomponiendo residuos orgánicos como las exudaciones de raíces y restos frescos de plantas. Los productos de desecho de estas bacterias se convierten en materia orgánica (Ireland & Trivandrum, 2009). El carbono orgánico es vital para la actividad biológica del suelo, ya que proporciona recursos energéticos en forma de carbono lábil a los organismos del suelo (Martínez & Fuentes, Juan Pablo Acevedo, 2008). Por lo tanto, las bacterias del suelo son un componente importante del ciclo del carbono en el suelo y juegan un papel clave en la formación y mantenimiento del carbono orgánico del suelo.

2.2 Celulosa

La celulosa es la biomasa más abundante en la tierra, especialmente en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Govindrao & Bassappa, 2018) se considera como el producto primario de la fotosíntesis en ambientes terrestres y el bio recurso renovable más abundante producido en la biosfera. Este polisacárido es comúnmente degradado por una enzima llamada celulasa, la cual es producida por varios microorganismos, comúnmente por bacterias y hongos (Sethi et al., 2013).

La celulosa constituye el componente esencial de las paredes celulares en la mayoría de las plantas terrestres, se encuentra casi pura en fibra de algodón y junto a otros compuestos como la lignina y las hemicelulosas en la madera y los tallos de las hojas (Lynd et al., 2002). Las zonas amorfas de la estructura cristalina de la celulosa presentan una composición heterogénea con diversos tipos de enlaces, lo que es fundamental para su biodegradación (Malherble & Cloete, 2002).

2.2.1 Hidrolisis de celulosa

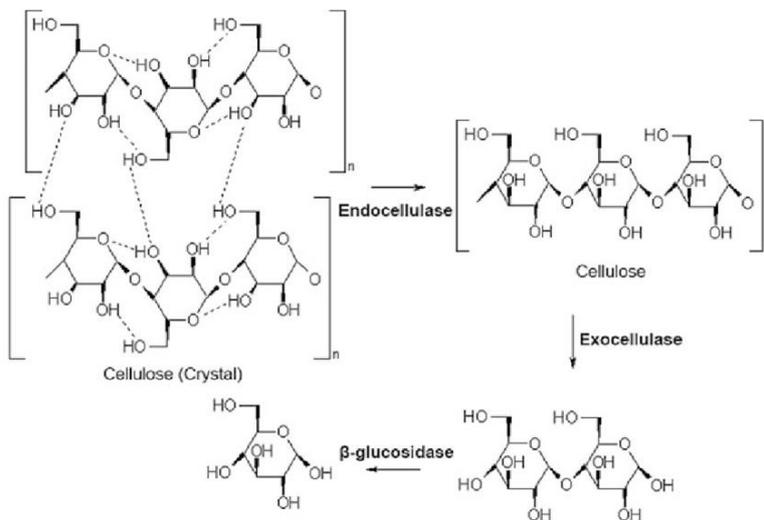
La hidrólisis de la celulosa presenta mecanismos diferentes entre bacterias y hongos aerobios y anaerobios. Los hongos y bacterias aerobios suelen tener un sistema de celulasas no complejo, lo que resulta en la secreción de enzimas hidrolíticas de celulosa en el entorno de cultivo. Por otro lado, las bacterias anaerobias, especialmente *Clostridium spp.*, y los hongos de los géneros *Neocallimastix*, *Piromonas* y

Sphaeromonas, poseen un sistema de celulasas que forman un complejo, donde las enzimas celulolíticas están contenidas en una estructura llamada celulosoma.

Esta diferencia fundamental tiene implicaciones significativas en el uso biotecnológico de estos microorganismos, ya que los sistemas basados en bacterias y hongos anaerobios pueden ofrecer ventajas sobre los sistemas aeróbicos en términos de eficiencia hidrolítica. El complejo de celulasas permite una alta coordinación entre las enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa, evitando la pérdida de intermediarios durante la degradación debido a cambios en las condiciones ambientales (Malherble & Cloete, 2002).

Algunos géneros bacterianos como *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* y *Micrococcus* son conocidos por su capacidad celulolítica, mejorando la degradación de la celulosa y promoviendo la formación de sustancias húmicas que resultan en compost de alta calidad (Vásquez & Millones, 2023). La aplicación de hongos y bacterias anaerobios en proyectos de biorremediación puede ser más atractiva debido a su bajo costo y alta eficiencia en la maquinaria hidrolítica de la celulosa (Malherble & Cloete, 2002).

Figura 1. Hidrólisis enzimática de la celulosa.



(Kumar, 2019).

2.2.2 Pruebas de detección de hidrólisis de celulosa

2.2.2.1 Prueba colorimétrica de Rojo Congo

El Rojo Congo se emplea frecuentemente en microbiología para identificar la presencia de celulosa y almidón. Su uso en medios de cultivo permite detectar la hidrólisis de la celulosa por parte de bacterias u otros microorganismos, lo cual facilita la distinción entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos mediante la formación de zonas claras alrededor de las colonias (Viteri et al., 2015).

Este reactivo se une a las fibras de celulosa, lo que provoca un cambio de color característico. Las fibras de celulosa se descomponen cuando la celulosa presente en el medio de cultivo la hidrolizan enzimas producidas por los microorganismos, y el Rojo Congo ya no puede unirse a ellas, perdiendo el color característico. Este cambio de color puede ser indicador de la actividad enzimática de las bacterias en la hidrólisis de la celulosa.

Es importante destacar que el Rojo Congo es solo una herramienta de detección y no proporciona información específica sobre los microorganismos responsables de la hidrólisis de la celulosa. Por ello, se suele utilizar junto con otras técnicas de identificación microbiana para caracterizar a los microorganismos presentes en un medio de cultivo y determinar su capacidad para degradar la celulosa.

El rojo Congo se utiliza en ensayos para detectar la hidrólisis de polisacáridos, ya que forma complejos con moléculas no hidrolizadas. Esto facilita distinguir entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos mediante la formación de zonas claras alrededor de las colonias (Sánchez et al., 2020).

2.2.2.2 Técnica del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)

La actividad del sistema enzimático dentro del complejo celulolítico se puede evaluar midiendo la cantidad de glucosa liberada mediante el método del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los métodos del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y Somogyi-Nelson son los más comúnmente usados para la determinación espectrofotométrica de azúcares reductores, donde la principal ventaja que poseen radica en la alta sensibilidad (Canseco et al., 2015). En este proceso, el Ácido 3,5-dinitrosalicílico se convierte en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos se oxidan a grupos

carboxilos. Esta técnica espectrofotométrica se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otros azúcares reductores hasta el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), cuya presencia se detecta mediante la lectura de absorbancia a 540 nm.

La intensidad del color amarillo generado por la reducción del ácido es proporcional a la concentración de azúcar reductor presente, y se cuantifica mediante la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro, aplicando la ley de Beer Lambert (Viteri et al., 2015). Las condiciones de la prueba, como la temperatura del agua de calentamiento, la transferencia de calor, el tiempo de reacción, y la proporción de glucosa, celobiosa y ciclodextrinas presentes, así como el tiempo de preparación del reactivo, influyen significativamente en la lectura del DNS, aspectos que a menudo se pasan por alto (Zhang et al., 2006).

2.2.3 Importancia biotecnológica

Esta enzima que degrada la celulosa tiene potencial económico, por ejemplo, en la formación de detergentes en polvo, la extracción de jugos de frutas y verduras y el procesamiento de almidón, también son ampliamente conocidas en la industria textil para el suavizado del algodón y el acabado de la mezclilla, para el cuidado del color, limpieza; en la industria alimentaria para hacer puré, en las industrias de la pulpa y el papel para mejorar el drenaje y modificar la fibra, e incluso se utilizan para aplicaciones farmacéuticas (Sethi et al., 2013)

2.3 Almidón

El almidón se encuentra usualmente en plantas y semillas de leguminosas y cereales en donde opera como reserva de energía, y se obtiene a partir de la sacarosa producida durante el proceso de fotosíntesis. El almidón es un polisacárido compuesto por largas cadenas de glucosa. Estas cadenas están formadas por amilosa (cadena lineal) y amilopectina (cadena ramificada). La degradación del almidón es un proceso natural que implica la ruptura de las moléculas de almidón en componentes más simples.

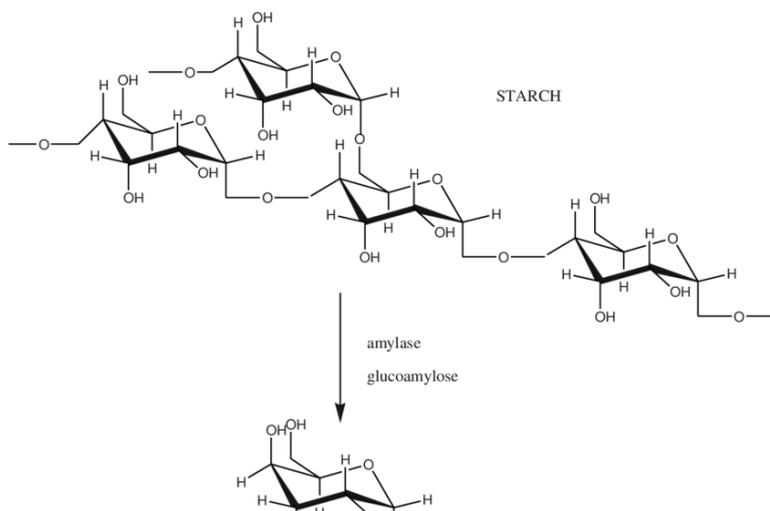
Este proceso es llevado a cabo por diversas enzimas que actúan sobre las cadenas de almidón, descomponiéndolas en unidades más pequeñas, al modificar el almidón se mejoran las propiedades para determinadas aplicaciones, lo cual hace que sea más

resistente a la humedad del medio ambiente y al crear nuevos enlaces promueve una mayor resistencia mecánica y mejora las propiedades de barrera a los gases; de esta manera, se forman películas con mejores propiedades que las obtenidas con el almidón nativo, prolongando la vida útil y retardando los procesos de senescencia en frutas y hortalizas de una manera más eficiente.

2.3.1 Hidrólisis del almidón

La hidrólisis del almidón implica la ruptura de los enlaces glucosídicos del polisacárido, lo que permite obtener moléculas más simples como glucosa, maltosa y otros oligosacáridos. Los microorganismos como *Streptomyces Nocardiosis*, *Thermomonospora* han sido identificados como productores de enzimas clave en la degradación del almidón, actúan rompiendo los enlaces glucosídicos entre las moléculas de glucosa, tanto en la amilosa como en la amilopectina. Las amilasas pueden ser alfa-amilasas, que cortan los enlaces interiores, o beta-amilasas, que actúan en los extremos de la cadena, las glucosidasas, trabajan para romper los enlaces glucosídicos.

Figura 2. Hidrólisis enzimática del almidón



(Żymańczyk et al., 2016).

2.3.2 Pruebas de detección de hidrólisis de almidón

2.3.2.1 Prueba de Lugol

Una vez que la bacteria haya crecido, se inunda la placa con lugol, que forma un complejo púrpura al reaccionar con el almidón intacto, la ausencia de color púrpura indica

que el almidón ha sido hidrolizado por enzimas amilolíticas producidas por los microorganismos, en medios de cultivo sólidos que contienen almidón, las bacterias y hongos productores de amilasas formarán halos transparentes alrededor de las colonias, evidenciando la hidrólisis del almidón

2.3.2.2 Técnica de yoduro de potasio

La técnica de yoduro de potasio es un método colorimétrico ampliamente utilizado para cuantificar el almidón en muestras biológicas. Este método se basa en la formación de un complejo de color azul oscuro cuando el almidón reacciona con yodo (I₂) en presencia de yoduro de potasio.

2.3.3 *Importancia biotecnológica*

La industria del almidón constituye uno de los mayores usuarios de amilasas para la hidrólisis y modificación de esta materia prima, con el objetivo de obtener glucosa, maltosa y oligosacáridos, que luego pueden convertirse en jarabes de fructosa y dextrosa (Quintero et al., 2009). En su gran mayoría se han aislado actinobacterias de suelos terrestres y marinos, con el fin de ser utilizados en la industria farmacéutica y de detergentes.

2.4 **Quitina**

Después de la celulosa, la quitina es el polímero más abundante en la naturaleza, compuesto por N-acetil glucosamina unidas por enlaces β 1-4. Se encuentra ampliamente distribuida en la pared celular de hongos, así como en el integumento de insectos y el exoesqueleto de crustáceos (Sastoque et al., 2007) Debido a su insolubilidad en agua, tamaño, complejidad molecular y composición heterogénea, la quitina no se degrada directamente dentro de las células, por lo que los microorganismos utilizan enzimas quitinolíticas para su descomposición.

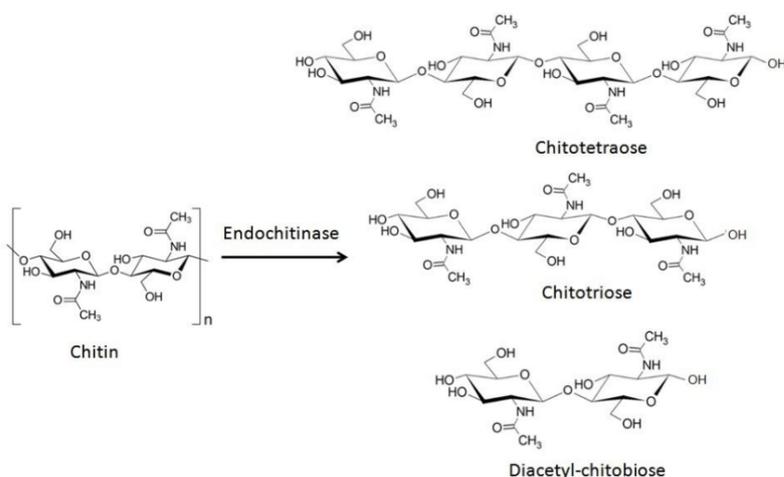
2.4.1 *Hidrolisis de quitina*

Diversos estudios señalan que microorganismos quitinolíticos producen enzimas hidrolíticas como proteasas y quinasas lo cual ha permitido su aplicación en la industria y en control biológico respectivamente. El sistema de quitinasas desempeña un papel crucial en la degradación de la quitina, siendo fundamental para la hidrólisis de la pared celular de hongos (Rodas et al., 2009). Los microorganismos quitinolíticos presentan un

importante interés en la industria, debido a sus múltiples aplicaciones al emplearse dentro del área de la agricultura, como biopesticidas para el control de fitopatógenos (Castro et al., 2011).

También en el manejo de desechos, para su biodegradación y en la medicina, como indicadores de infección por hongos (Sastoque et al., 2007). Debido a la abundancia de quitina en ecosistemas marinos, se presume que la mayoría de los microorganismos presentes tienen capacidad de degradar este polisacárido (Rodas et al., 2009). Al contrario, en el caso de entornos terrestres, investigaciones de las secuencias del gen de la quitinasa en ambientes que difieren en sus características, evidencian como las condiciones ambientales otorgan nuevas propiedades a las enzimas

Figura 3. Hidrólisis de quitina



(Singh et al., 2020).

2.4.2 Importancia biotecnológica

Los materiales a base de quitina y su principal derivado, quitosano, tienen importantes propiedades antimicrobianas, emulsionantes, etc. Se utilizan con éxito en campos tan diversos como farmacia, medicina, industria alimentaria, tratamiento de aguas residuales y agricultura, entre otros (Pacheco, 2013). En agricultura, la quitina y el quitosano pueden funcionar como inductores de mecanismos de defensa en plantas, recubrimiento de frutos, agentes floculantes en tratamiento de aguas y aditivos alimenticios. En biomedicina, la quitina y el quitosano se utilizan para preparar columnas de cromatografía, inmovilizar enzimas, absorber contaminantes y en formulaciones

farmacéuticas. La producción biotecnológica de quitinasas, enzimas que degradan la quitina, es de gran interés para obtener derivados como el quitosano y la N-acetil glucosamina (Pacheco, 2013).

2.5 Impacto del cambio climático y disturbios en los páramos andinos

Los páramos andinos son altamente vulnerables a los escenarios de cambio climático, lo que puede provocar el ascenso de la zona de páramo, la pérdida de extensión y la migración de especies a áreas más altas y frías andinos (Vargas Ríos, 2013). Los páramos andinos son fundamentales para el suministro de agua, ya que retienen grandes cantidades de agua y actúan como sumideros de carbono, lo que los hace vitales para la regulación del clima y la provisión de servicios ecosistémicos. Los disturbios pueden afectar la actividad de las bacterias del suelo y, por lo tanto, el almacenamiento de carbono en los páramos.

La importancia de la biotecnología en la investigación de bacterias de páramo que transforman diferentes fuentes de carbono, como la celulosa y el almidón, radica en su potencial para el desarrollo de aplicaciones en diversos campos. La biotecnología puede aplicar el potencial de bacterias para mejorar su capacidad de descomponer compuestos de carbono, lo que podría tener aplicaciones en la producción de biocombustibles, la degradación de desechos orgánicos y la agricultura sostenible (Sethi et al., 2013).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

La presente investigación es una continuidad del estudio realizado por López y Farinango titulado “Evaluación de una estrategia de biorremediación de suelos de páramo afectados por incendio mediante consorcios de microorganismos nativos del parque nacional Cayambe Coca” proyecto realizado dentro de El Consorcio Alemán-Ecuatoriano de Codificación de Barras (BIO-GEEC) llamado Proyecto BIOGEEC.

3.1 Descripción del área de estudio

El área de estudio está situada en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca, ubicado al nororiente ecuatoriano abarcando cuatro provincias entre Sierra y Amazonía. Estas provincias son Imbabura y Pichincha en la Sierra, y en la Amazonía, Sucumbíos y Napo. La altitud del área de estudio se encuentre entre 3000 y 3500 m.s.n.m., que abarca la altitud perteneciente a páramos, el tipo de páramo que se encuentra en el Parque es pajonal y pantanoso (Ministerio del Ambiente, 2020).

Las muestras con las que se trabajó en esta investigación fueron tomadas del páramo correspondiente al sector de Papallacta en tres puntos estratégicos que fueron: Punto 1 Bosque de Polylepis; UTM 17 M820350, Punto 2 cerna a la Laguna; UTM 17 M818733 9968756 y Punto 3 Pajonal; UTM17 M 819056 9966764. Se utilizaron 76 cepas de pertenecientes al proyecto BIOGEEC, y se procedió a elegir medios que ayuden a seleccionar las cepas degradadoras de carbono.

3.2 Ejecución del primer objetivo específico

3.2.1 Activación de inóculos bacterianos

Para la activación de los inóculos bacterianos, se utilizó agar nutritivo (Difco TM Nutrient Agar) como medio de cultivo. El agar se calentó con agitación suave hasta la completa disolución, luego se dejó hervir un minuto y se esterilizó en la autoclave a 121°C durante 15 min. El medio se dispensó en pacas petri estériles, una vez que el agar se solidificara se procedió a transferir 20uL de la muestra a la caja petri, con una pipeta estéril, se extendió uniformemente el inoculante sobre la superficie del medio de cultivo utilizando un asa de inoculación estéril, las cajas petri se colocaron en una incubadora a 37°C.

Después de la incubación, se observaron las placas para verificar el crecimiento, se realizó una resiembra de cada placa para obtener colonias mediante la técnica de sembrado por estría, Este procedimiento permitió reactivar y mantener las bacterias en estado viable y puro para su posterior uso en experimentos o procesos de fermentación, se almacenaron adecuadamente en el refrigerador a 4°C temperatura recomendada para su conservación a corto plazo.

3.2.2 *Formulación de medios de cultivo*

Se prepararon tres medios de cultivo distintos para el crecimiento de bacterias del suelo de páramo prístino, la composición de cada medio se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo

Medio	Compuesto	Cantidad
Celulosa	Carboximetilcelulosa (CMC)	10g/mL
	Extracto de levadura	0,1g/mL
	Peptona	0,5g/mL
	Nitrato de potasio	1 g/mL
	Sulfato de magnesio	0,5g/mL
	Fosfato monobásico de potasio	1g/mL
	Agar, pH7	15g/mL
Almidón	Almidón soluble	10g/mL
	Extracto de levadura	2,5g/mL
	Peptona	2,5g/mL
	Agar, pH7	15g/mL
Quitina	Quitina	5 g/L
	Sulfato de amonio	1 g/L
	Fosfato mono potásico	2 g/L
	Fosfato de sodio	3g/L
	Sulfato de hierro	0.10 g/L
	cloruro de calcio	1 mg/L

Sulfato de manganeso	0.010 mg/L
Sulfato de zinc	0.040 mg/L
Sulfato de cobre	0.030 mg/L
Agar	20.0 g/L
pH 7	

Las 78 bacterias se sembraron en cada medio selectivo por el método de punción y se incubaron a 37°C, durante 24h, en medio selectivo para microorganismos quitinolíticos la incubación se realizó durante 4-5 días, una vez transcurrido el tiempo se observó el crecimiento bacteriano.

3.2.3 Identificación de la actividad hidrolítica

Se realizó un enfoque diferente para la identificación de la actividad enzimática en cada medio de cultivo como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas colorimétricas

Medio	Prueba	Procedimiento
Celulosa	Rojo Congo	Después de las 24h los crecimientos bacterianos se sometieron a la prueba del Rojo Congo al 1% (p/v), la prueba consistió en agregar aproximadamente 3mL de Rojo Congo sobre la caja petri, se dejó actuar por 60 minutos y descartar el exceso, posteriormente se agregó 2mL NaCl 0.1M por 15 minutos, se descartó nuevamente el exceso.
Almidón	Lugol	Después de 24h, las cepas fueron sometidas a una prueba colorimétrica con lugol. Los halos de hidrolisis se evidencian de 1 a 3min después de haber inundado la caja Petri. El principio de esta prueba se basa en la incapacidad que presenta el lugol para pigmentar las zonas en las que el almidón ha sido hidrolizado por acción enzimática. (Sanchez et al., 2005).

Quitina	Visual	Después de 5 días se verificó la formación de un halo de hidrólisis transparente alrededor de la colonia indica la degradación de la quitina (Korany et al., 2019)
---------	--------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.2.4 Cálculo del índice hidrolítico

Se realizó siembras por triplicado de cada bacteria con actividad celulolítica y amilolítica al encontrar tamaños de halo grandes con relación al tamaño de la colonia se calculó el índice hidrolítico, midiendo el diámetro (mm) de cada halo y colonia con el calibre deslizante. El cálculo de la capacidad hidrolítica se expresó usando la formula

$$\text{Índice hidrolítico} = \frac{\text{Tamaño del halo} - \text{Tamaño de la colonia}}{\text{Tamaño de la colonia}} \text{ (Vásquez \& Millones, 2023).}$$

3.2.5 Análisis estadísticos

Se midieron y se compararon los diámetros de los halos resultantes de la hidrolisis de celulosa y almidón, posteriormente se realizaron los cálculos respectivos para hallar el promedio de cada cepa evaluada. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA con un nivel de significancia de 0,05, en los casos de que los análisis de varianza no cumplieran con los supuestos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

3.3 Ejecución del Segundo objetivo específico

Para la selección de las bacterias promisorias en la transformación de carbono en medio líquido se tomó en cuenta dos criterios de selección. Primero que la cepa tenga el mayor índice hidrolítico (A) con respecto al control positivo en cada medio de cultivo. Segundo que la cepa comparta, tanto actividad celulolítica como, amilolítica.

3.3.1 Fermentación en caldo Carboximetilcelulosa (CMC)

3.3.1.1 Preparación del caldo carboximetilcelulosa al 10%

Para los ensayos se trabajó en erlenmeyers de 100ml, se añadió 45ml del medio de cultivo formulado con carboximetilcelulosa al 10% Tabla 3. Se preparó un inóculo

bacteriano a partir de cultivos puros de las cepas QA20, MA49, MP24 y QP8. Se sembró en caldo nutritivo y se ajustó la concentración bacteriana a 0,5 acorde a la escala de McFarland empleando un turbidímetro y se incubó a con agitación orbital a 37°C, 150 rpm por 20 horas. Cada inóculo se escaló de tubo de ensayo a matraz para obtener una concentración deseada de 5 acorde a la escala de McFarland.

Tabla 3. Medio de carboximetilcelulosa

Compuesto	Cantidad
Carboximetilcelulosa (CMC)	10g/mL
Extracto de levadura	2,5g/mL
Peptona	2,5g/mL
Sulfato de amonio	0,5g/mL
Cloruro de calcio	0,5g/mL
Fosfato monobásico de potasio	0,1g/mL
pH7	

3.3.1.2 Inoculación de bacterias celulolíticas

A partir de estos cultivos se realizaron inóculos por triplicado en 5mL ajustando la concentración bacteriana al tubo de 1 de la escala de McFarland. Para las cepas celulolíticas el inóculo inicial de 5 mL se sembró en 45 mL de caldo CMC. Figura 4. Los cultivos se incubaron en agitador orbital a 35°C a 150 rpm durante 30 horas. Se realizó muestreos cada 2 horas para determinar la actividad celulolítica.

3.3.1.3 Muestreo para análisis de azúcares y enzimas

Las muestras se tomaron a intervalos regulares de 2 horas durante 16 horas y la última muestra a las 30 horas. Se extrajo una muestra de 2ml por cada Erlenmeyer utilizando una pipeta estéril, las muestras se transfirieron a tubos eppendorf de 2ml, los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm utilizando una centrífuga MPW-251 (Warszawa, Polonia) durante 20 minutos. El sobrenadante se reservó para evaluar el consumo de sustrato y la presencia de enzimas.

3.3.1.4 Curva de calibración de celulosa

Se prepararon una serie de soluciones estándar de glucosa en las concentraciones conocidas como se detalla en la tabla 4. Se tomó 1mL de cada concentración y se añadió 1mL de solución de DNS, se mezcló con vórtex durante 10 segundos, se colocó a baño maría a una temperatura de 100°C por 5 minutos, se dejó reposar por 10 minutos y finalmente se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm usando como blanco agua destilada. Se registraron los valores de la absorbancia para cada solución estándar de glucosa, la ecuación de la regresión lineal fue ($y = 3,0214x - 0,0198$) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9979$, indicando una alta correlación entre la absorbancia y la concentración de glucosa.

Tabla 4. Concentraciones de glucosa

Absorbancia	nm	Concentración (g/L)
3	540	1
1,481	540	0,5
0,7981	540	0,25
0,326	540	0,125
0,079	540	0,0625
0,067	540	0,0312
0,06	540	0,0156
0,05	540	0,00078

Figura 4. Soluciones de glucosa a concentraciones conocidas



Se verificó la precisión y la linealidad de la curva de calibración utilizando puntos de control adicionales y comparando los valores predichos con los valores reales conocidos, como se evidencia en el anexo 1

3.3.1.5 Medición de absorbancia de las muestras

El consumo de celulosa se evaluó por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), esta técnica es comúnmente utilizada para cuantificar carbohidratos reductores, como la glucosa, esta técnica permite cuantificar la celulosa, que es un polímero de glucosa. Se realizó mezclando 1 mL del sobrenadante con 1 mL de DNS, se colocó a baño maría a una temperatura de 100°C por 5 minutos, se dejó reposar por 10 minutos y finalmente se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm. Debido a que las muestras estaban altamente concentradas, se prepararon diluciones de 1:5 y se empleó como blanco agua destilada más reactivo DNS (Sánchez et al., 2020).

3.3.1.6 Cálculo del consumo de celulosa

La concentración de celulosa en las muestras se determinó utilizando la curva de calibración previamente establecida, los valores de las muestras fueron introducidas en la ecuación de la curva de calibración la cual relaciona la absorbancia con la concentración de azúcares reductores, considerando que toda la glucosa medida procede de la degradación de la celulosa, permitiendo calcular la celulosa consumida por las bacterias celulolíticas en el medio de carboximetilcelulosa CMC.

3.3.1.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software Infostat. Se realizaron pruebas estadísticas apropiadas para comparar las concentraciones de celulosa consumida por las bacterias QA20, MA49, MP24 y QP8. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Tukey, para determinar si existían diferencias significativas entre las cepas evaluadas. Se estableció un nivel de significancia estadística de $\alpha=0.05$. Los resultados se expresan como medias \pm desviación estándar y se consideraron significativos cuando el valor de p era menor que 0.05.

3.3.2 *Fermentación en caldo Almidón*

3.5.2.1 Preparación de caldo almidón al 10%

Para los ensayos se trabajó en erlenmeyers de 100ml, se añadió 45ml del medio de cultivo formulado con almidón al 10% tabla 5. Se preparó un inoculo bacteriano a partir de cultivos puros de las cepas QA20, MA37, MP49 y QP8. Se sembró en caldo nutritivo. Empleando un turbidímetro se ajustó la concentración bacteriana a 0,5 acorde a la escala de McFarland y se incubó a con agitación orbital a 37°C, 150 rpm por 20 horas. Cada inoculo se escaló de tubo de ensayo a matraz con la finalidad de obtener una concentración deseada de 5×10^8 cell/mL acorde a la escala de McFarland

Tabla 5. Medio de almidón

Compuesto	Cantidad
Almidón soluble	10g/mL
Extracto de levadura	2,5g/mL
Peptona	2,5g/mL
Sulfato de amonio	0,5g/mL
Cloruro de calcio	0,5g/mL
Fosfato monobásico de potasio	0,1g/mL
pH7	

3.3.2.1 Inoculación de bacterias amilolíticas

A partir de los cultivos iniciales, se prepararon inóculos por triplicado con volúmenes de 5 mL, ajustando la concentración bacteriana al estándar del tubo a la escala de McFarland. Para las cepas amilolíticas, el inóculo inicial de 5 mL se sembró en 45 mL de caldo de almidón (Figura 4). Los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 35°C y 150 rpm durante 30 horas. Se realizaron muestreos cada 2 horas para determinar la actividad amilolítica

3.3.2.2 Muestreo para análisis de enzimas

Las muestras fueron tomadas en intervalos de tiempo específicos, a las 0,2,6,8,20 horas después del inicio de la fermentación. Se extrajeron muestras de 2ml por cada Erlenmeyer utilizando una pipeta estéril, las muestras se transfirieron a tubos eppendorf de 2ml, los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm utilizando una centrífuga MPW-251 (Warszawa, Polonia) durante 20 minutos. El sobrenadante se reservó para evaluar el consumo de sustrato y la presencia de enzimas.

3.3.2.3 Curva de calibración con yoduro de potasio

La curva de calibración se construyó utilizando una solución de yoduro de potasio diluida 1:4 en agua destilada como blanco de reactivos (0,5g de almidón en 50mL de agua destilada) Se prepararon una serie de soluciones estándar de almidón con concentraciones conocidas, y se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 640 nm como se indica en la tabla 6. A partir de estas mediciones, se estableció la relación entre la absorbancia y la concentración de almidón, lo que permitió la posterior cuantificación de almidón en las muestras de fermentación.

Tabla 6 Concentraciones de yoduro de potasio

Absorbancia	nm	Concentración (g/L)
2,43	640	1
1,27	640	0,5
0,69	640	0,25
0,45	640	0,125
0,19	640	0,0625
0,14	640	0,0312
0,11	640	0,0156
0,08	640	0,00078

La ecuación de la regresión lineal fue ($y = 1,1272x - 0,0445$) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9981$, indicando una alta correlación entre la absorbancia y la concentración de almidón. Se verificó la precisión y la linealidad de la curva de calibración utilizando puntos de control adicionales y comparando los valores predichos con los valores reales conocidos, como se evidencia en el anexo 2.

3.3.2.4 Medición de absorbancia de las muestras

El consumo de almidón se evaluó por la técnica de yoduro de potasio. Se realizó añadiendo 800uL del sobrenadante con 200uL solución de yoduro de potasio en una proporción de 1:4, la mezcla resultante se analizó utilizando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640nm. Como las muestras estaban altamente concentradas, se prepararon diluciones de 1:50 donde se mezclaron 980uL de agua destilada con 20uL de la muestra.

3.3.2.5 Cálculo de la concentración de consumo de almidón

La concentración de almidón en las muestras se determinó usando la curva de calibración establecida, los valores de las muestras se introdujeron en la ecuación de la curva de calibración que relaciona la absorbancia con la concentración de almidón.

3.3.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software Infostat. Se realizaron pruebas estadísticas apropiadas para comparar las concentraciones de almidón consumido por las bacterias QA20, MA37, MP49 y QP8. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Tukey, para determinar si existían diferencias significativas entre las cepas evaluadas. Se estableció un nivel de significancia estadística de $\alpha=0.05$. Los resultados se expresan como medias \pm desviación estándar y se consideraron significativos cuando el valor de p era menor que 0.05.

3.4 Ejecución del tercer objetivo específico

3.4.1 *Revisión bibliográfica*

Se llevó a cabo una revisión de la literatura científica para identificar los protocolos y metodologías utilizadas en la evaluación de actividad degradativa que tienen las bacterias en diferentes fuentes de carbono como celulosa, almidón y quitina. Entre los buscadores se incluyeron PubMed, ScienceDirect y Google Scholar. Se recopilaron artículos relevantes que describen procedimientos, técnicas experimentales.

3.4.2 Selección de protocolos experimentales

A partir de la revisión se seleccionaron los protocolos experimentales más adecuados y reproducibles para la evaluación de bacterias degradadoras de almidón, celulosa y quitina. Los criterios de selección incluyeron la robustez del método, la facilidad de implementación en laboratorio y la disponibilidad de reactivos y equipos necesarios.

3.4.3 Adaptación de optimización de protocolos

Los protocolos seleccionados se adaptaron y optimizaron para su uso específico en la evaluación de bacterias transformadoras de carbono. Esto incluyó la modificación de volúmenes de reactivos, tiempos de incubación y reproducibilidad de los ensayos

3.4.4 Preparación de medios de cultivo

Se describieron en detalle las recetas y procedimientos para la preparación de agar celulosa, agar almidón y agar quitina. Esto incluyó la composición exacta de los medios, las condiciones de esterilización y las instrucciones para el almacenamiento y uso. Incluye la preparación de caldo carboximetilcelulosa y caldo almidón.

3.4.5 Elaboración de Procedimientos de Inoculación y Cultivo

Se establecieron procedimientos detallados para la descongelación, reactivación e inoculación de bacterias a partir de cultivos congelados. Se incluyeron métodos para la preparación de inóculos y las condiciones óptimas de incubación para promover el crecimiento bacteriano y la degradación de los sustratos.

3.4.6 Desarrollo de Métodos Analíticos

Se desarrollaron y estandarizaron métodos analíticos para cuantificar la degradación de almidón, celulosa y quitina. Esto incluyó: Celulosa Residual: Ensayo DNS, con medición de absorbancia a 540 nm. Almidón Residual: Técnica del yoduro de potasio, con medición de absorbancia a 640 nm.

3.4.7 Creación de Curvas de Calibración

Se realizaron curvas de calibración utilizando soluciones estándar de almidón, celulosa y quitina en diversas concentraciones. Las absorbancias se midieron y se plotearon contra las concentraciones conocidas para obtener ecuaciones de calibración.

3.4.8 Implementación de Análisis Estadístico

Se describieron los métodos de análisis estadístico a utilizar, incluyendo análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Además, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Se detallaron las instrucciones para el uso del software Infostat versión [indicar versión] para la realización de estos análisis.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de las bacterias transformadoras de carbono

4.1.1 Activación y crecimiento bacteriano

Se activó 78 cepas bacterianas aisladas previamente en el proyecto BIOGEEC. Estas cepas no están caracterizadas molecularmente y los resultados de esta investigación se rigen al código de cada cepa. Se realizó 2 análisis, uno cualitativo y uno cuantitativo para evaluar actividad celulolítica, amilolítica y quitinolítica. En el anexo 3 se detalla el crecimiento y la actividad de las cepas en cada medio de cultivo, se adoptó la convención de utilizar la palabra “SI” para denotar el crecimiento y actividad positiva. Por el contrario, la palabra “NO” fue asignado a las cepas sin crecimiento y sin actividad.

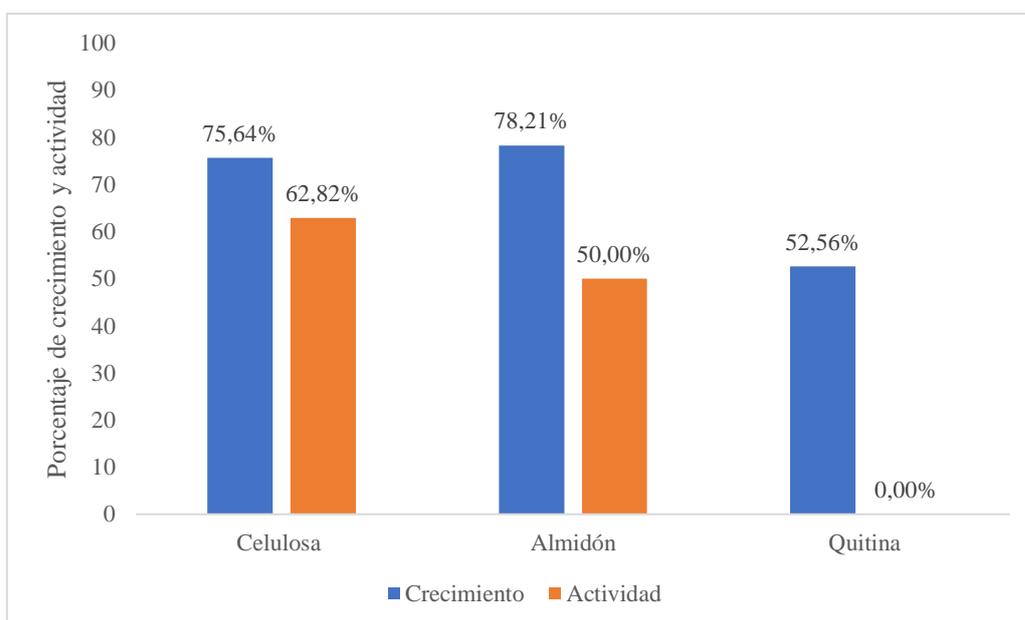
De las 78 cepas analizadas Anexo 4, el 75,64% (n=59) mostraron crecimiento en el medio de cultivo celulosa, de estas cepas que crecieron, el 62,82% (n=49) exhibieron actividad celulolítica como se observa en la figura 6, se realizó una prueba X^2 , el valor calculado del estadístico fue ($\chi^2 = 78$; gl= 77; p= 0,446) dado que el valor de p es mayor al nivel de significancia preestablecido 0,05; no se encontraron diferencias significativas entre las cepas, por lo tanto la actividad no depende de la bacteria.

El 78,21 % (n=61) de las 78 cepas analizadas en medio de almidón manifestaron crecimiento de estas, el 50 % (n=39) mostraron actividad amilolítica, figura 6, en algunos casos las actividades se evidenciaron por la formación de un halo alrededor de las colonias. Se realizó una prueba X^2 , el valor calculado del estadístico fue ($\chi^2 = 78$; gl= 77; p= 0,446) dado que el valor de p es mayor al nivel de significancia preestablecido 0,05, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas, por lo tanto, depende del tipo de bacteria para cada actividad.

Se evaluó la capacidad de 78 cepas bacterianas para degradar quitina, a pesar del crecimiento observado en 41 cepas correspondiente al 52,56% como se evidencia en la figura 6, en estas cepas no se detectaron halos de aclaramiento alrededor de las colonias, lo que indica la ausencia de actividad quitinolítica, se puede aludir que las bacterias se mantuvieron vivas utilizando otros componentes del medio de cultivo como El sulfato de

amonio proporciona una fuente rica de nitrógeno, esencial para el crecimiento bacteriano. Otros minerales como los fosfatos (fosfato mono potásico y fosfato de sodio) también son importantes para diversas funciones celulares, incluyendo la síntesis de ATP y la regulación de la actividad enzimática, La quitina es un polímero complejo y su forma física en el medio puede afectar su disponibilidad. Si la quitina no estaba en una forma fácilmente degradable, las bacterias podrían no haber podido utilizarla eficientemente. La ausencia de halos de aclaramiento alrededor de las colonias en tu medio de quitina puede atribuirse a las condiciones del medio, como el pH, la temperatura, la presencia de nutrientes y la disponibilidad de oxígeno, si estas condiciones no son óptimas para la actividad enzimática específica no podría observarse a pesar del crecimiento de las cepas y aunque las cepas pudieran tener capacidad hidrolítica para ciertos tipos de quitina, no se puede concluir definitivamente debido a la falta de especificidad en la composición del sustrato

Figura 5. Crecimiento y actividad de las bacterias en el medio de celulosa, almidón y quitina



4.1.2 Cálculo del índice celulolítico

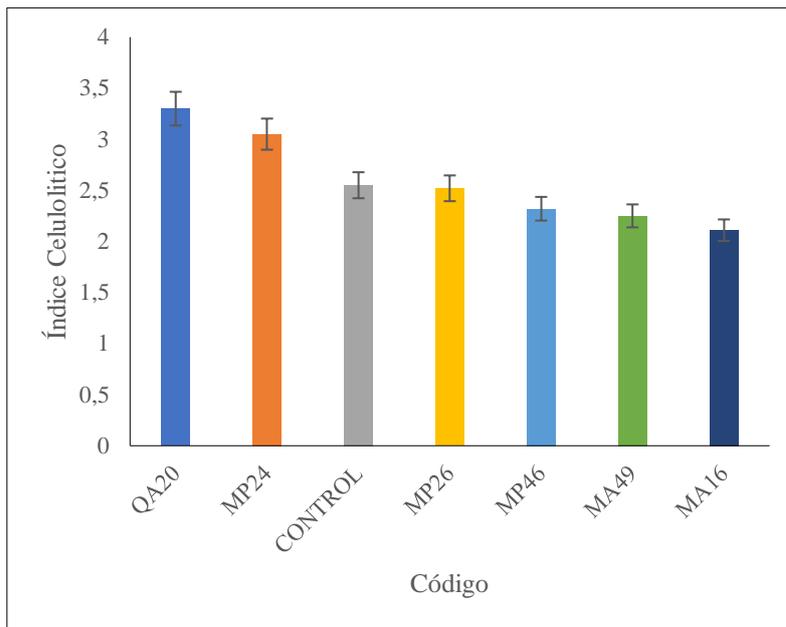
El índice hidrolítico se define como la relación entre el diámetro total del halo y el diámetro de la colonia, de las 49 cepas con actividad celulolítica, 43 cepas tuvieron un

índice celulolítico menor al control anexo 7. Un índice similar al de 4 cepas (MA16, MA49, MP26 y MP46) y 2 cepas (MP24, QA20) tuvieron un índice de 3, mayor con respecto al control formaron un halo de hidrólisis de 30mm.

Viteri et al., 2015 menciona que bacterias provenientes de suelos en los bosques de páramo de los cuales son capaces de generar halos de hidrólisis de celulosa desde 2,5 mm hasta 6,5 mm de diámetro, mientras que las cepas analizadas del proyecto BIOGEEC reportaron halos de hidrólisis de mayor diámetro oscilando desde los 9 a 32 mm como se observa en la figura 7. En el análisis estadístico, se compararon 49 muestras bacterianas en cuanto a su índice celulolítico. Estas muestras no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica, específicamente la normalidad de residuos y la homocedasticidad. Debido a esta falta de cumplimiento, se optó por utilizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados de esta prueba indicaron diferencias significativas entre las cepas evaluadas ($p < 0.05$). Específicamente, las cepas QA20 y MP24 mostraron los mayores índices celulolíticos, destacándose sobre las demás cepas analizadas. Estas cepas, por su alta capacidad para degradar celulosa, fueron seleccionadas para futuros ensayos en cultivos en medio líquido.

El uso de la prueba de Kruskal-Wallis fue crucial debido al incumplimiento de los supuestos paramétricos. La significancia estadística ($p < 0.05$) observada en este análisis confirmó que las diferencias entre las cepas no eran aleatorias, sino que reflejaban variaciones reales en sus capacidades celulolíticas. Las cepas QA20 y MP24 no solo destacaron por sus altos índices, sino también por su baja variabilidad, lo que las hace candidatas ideales para ensayos posteriores en medios líquidos. Este hallazgo es particularmente relevante para aplicaciones industriales, donde la consistencia y el rendimiento son esenciales. Las barras de error en el gráfico de barras reflejan la variabilidad y precisión de los índices celulolíticos medidos como se evidencia en la figura 6.

Figura 6 Cepas con índice celulolítico con respecto al control positivo



En el estudio de Viteri et al., (2015) se encontraron aislamientos con alta capacidad celulolítica pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. Los diámetros de los halos de degradación de celulosa más sobresalientes reportados fueron de 6.5 mm y 5.4 mm. Estos resultados difieren significativamente de los obtenidos en el proyecto BIOGGEC, donde los diámetros de los halos de degradación de celulosa de las cepas aisladas oscilaron entre 9 y 32 mm. Esta variación sugiere una mayor capacidad celulolítica en las cepas aisladas en nuestro estudio, pese a ser aislados en ecosistema de páramo.

Los hallazgos de nuestro estudio, comparados con los de Viteri et al. (2015), muestran una mayor capacidad celulolítica en las cepas aisladas del proyecto BIOGGEC. Específicamente, las cepas aisladas en nuestro estudio presentaron diámetros de halo significativamente mayores, lo que indica una mayor eficiencia en la degradación de celulosa. Esta diferencia puede deberse a la variabilidad en las condiciones ambientales de los sitios de aislamiento o a las diferencias genéticas intrínsecas entre las cepas.

En este estudio, se utilizó *Bacillus cereus* ATCC como referencia debido a su conocida capacidad celulolítica. Los resultados mostraron que el desempeño de las bacterias aisladas del suelo de páramo fue similar al de este control positivo. Esto sugiere que las cepas de bacterias del páramo poseen enzimas altamente eficaces para la degradación de celulosa. Esta capacidad es crucial en el ecosistema de páramo, ya que

contribuye al reciclaje y la disponibilidad de nutrientes, manteniendo así la salud y la sostenibilidad del ecosistema

4.1.3 Cálculo del índice amilolítico

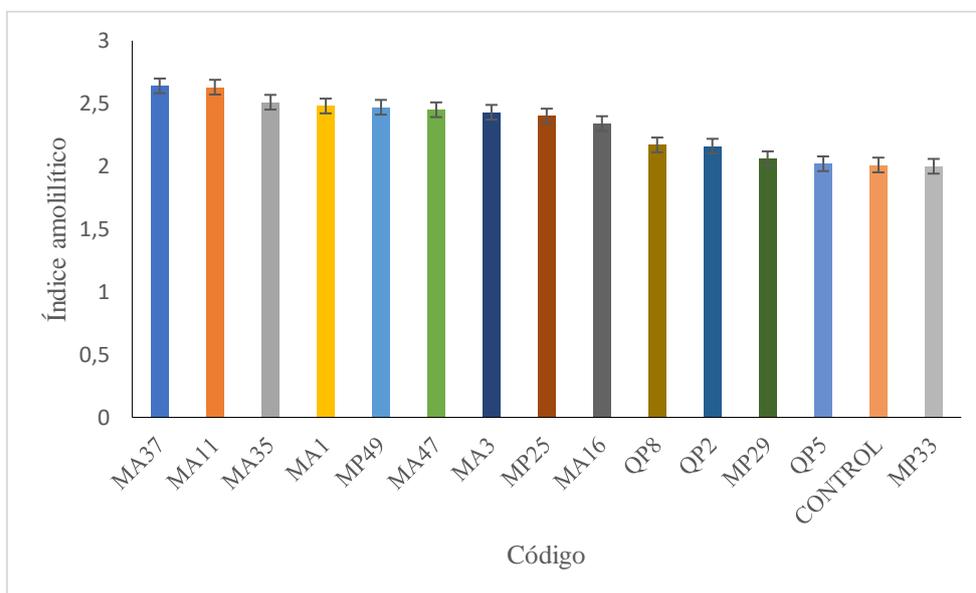
De las 39 cepas evaluadas, se observó la formación de halos alrededor de las colonias, como se muestra en el Anexo 8. Estas cepas fueron sometidas a una prueba de revelado con bolas de yoduro por triplicado para calcular el índice amilolítico. Las cepas MA37, MA11, MA35, MA1, MP25, MA16, QP8, QP2, MP29 y QP5 presentaron un índice superior al control positivo *Bacillus cereus* ATCC, como se observa en la Figura 8. Los diámetros de los halos fueron de 20 mm para MA37 y 18 mm para MA11. En el análisis estadístico de las 39 muestras, no se cumplieron los supuestos de la estadística paramétrica, específicamente la normalidad de residuos y la homocedasticidad.

Por esta razón, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que mostró diferencias significativas entre las cepas ($p < 0.05$). Las cepas MA37, MA11, MA35, MA1, MP49, MA47, MA3, MP25 y QP8 presentaron índices significativamente mayores que el control, lo que justifica su selección para ensayos en cultivos en medio líquido. En comparación con estudios previos, como el de (Viteri et al., 2015), nuestros resultados muestran una capacidad amilolítica significativamente mayor en las cepas aisladas en el proyecto BIOGGEC. Los diámetros de halo observados en nuestro estudio (9 a 32 mm) superan considerablemente los reportados por Viteri et al. (6.5 mm y 5.4 mm), lo que sugiere una mayor eficiencia en la degradación de almidón.

La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas en los índices amilolíticos entre las cepas evaluadas, lo que justifica la selección de las cepas MA37, MA11, MA35, MA1, MP49, MA47, MA3, MP25 y QP8 para estudios adicionales. Estas cepas no solo mostraron índices superiores al control positivo, sino también baja variabilidad, lo que las hace candidatas prometedoras para aplicaciones biotecnológicas en la bioconversión de almidón. Las barras de error en el gráfico de barras proporcionan información crítica sobre la variabilidad y precisión de los índices amilolíticos medidos. Barras de error pequeñas, como las observadas en las cepas MA37 y MA11, indican alta consistencia en la capacidad de estas cepas para degradar almidón, sugiriendo que estos resultados son confiables y reproducibles.

La alta capacidad amilolítica de las cepas seleccionadas tiene importantes implicaciones ecológicas y prácticas. En el ecosistema de páramo, la degradación eficiente del almidón es crucial para el reciclaje de nutrientes y la sostenibilidad del medio ambiente. Además, estas cepas podrían tener aplicaciones en la industria biotecnológica, especialmente en la producción de biocombustibles y en procesos de biorremediación. Se ha demostrado que géneros como *streptomyces*, *actinomices bacillus* son reconocidos por producir amilasas como el control positivo *Bacillus cereus* ATCC, esta bacteria se ha utilizado en varios estudios de bacterias celulolíticas y amilolíticas como en el estudio sobre aislamiento y selección de bacterias celulolíticas autóctonas de Manabí, Ecuador (Zambrano et al., 2011; Alves et al., 2021), estudios realizados por Zambrano et al., (2011) demostraron que el halo puede variar en diferentes cepas ya que los resultados están por debajo de los obtenidos en esta investigación.

Figura 7 Cepas con índice amilolítico con respecto al control positivo



4.2 Seleccionar bacterias promisorias en la transformación de fuentes de carbono

Para la selección de las bacterias promisorias en la transformación de carbono en medio líquido se tomó en cuenta dos criterios de selección. Primero que la cepa tenga el mayor índice hidrolítico (A) con respecto al control positivo. Segundo que la cepa

comparta, tanto actividad celulolítica como, amilolítica. Las cepas se seleccionadas bajo estos criterios fueron QA20, QP8, MA49, MP24 y MA37, MP49, como se evidencia en la tabla 8, el doble signo “++” significa que el resultado fue igual o mayor al control. El signo” +” significa que tiene un resultado positivo inferior al control, y el signo “-” significa que no posee la actividad.

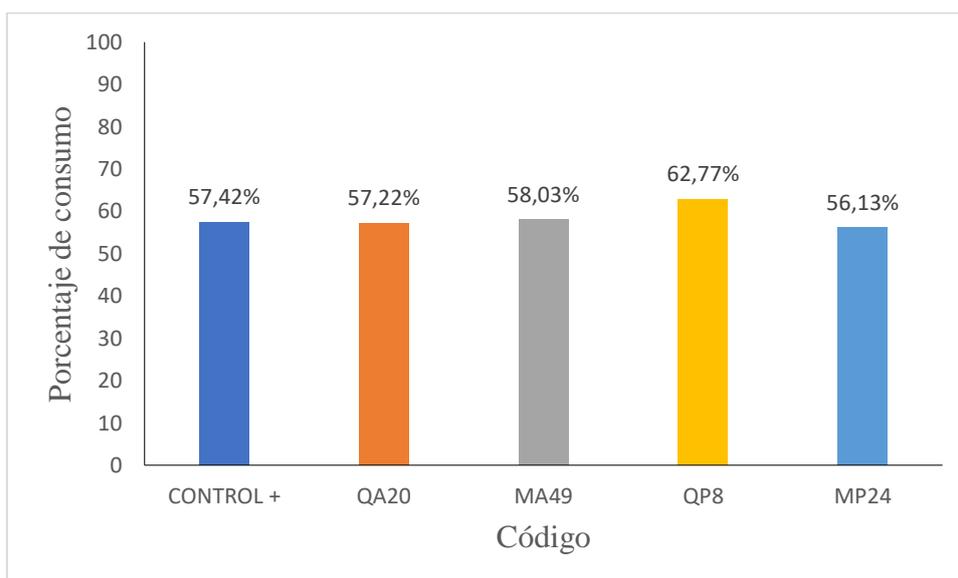
Tabla 7. Selección de microorganismos según índice hidrolítico y actividad

Criterio de selección	QA20	MA49	MA37	QP8	MP24	MP49
A. Índice hidrolítico						
mayor o igual que el control positivo	++	++	++	++	++	++
B. Actividad						
Celulolítica y amilolítica	++	++	++	++	+ -	++

4.2.1 Actividad celulolítica en medio líquido

La Figura 9 muestra el porcentaje de carboximetilcelulosa (CMC) al 10% consumida por las bacterias después de 30 horas, en comparación con el control positivo *Bacillus Cereus* ATCC, utilizando la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La cepa QP8 demostró un consumo de celulosa superior al 62%. En contraste, las cepas QA20 y MA49 mostraron un consumo de celulosa del 57%, muy similar al observado en el control positivo *Bacillus Cereus* ATCC. La cepa MP49 alcanzó un consumo del 56%, también cercano, pero ligeramente inferior al control positivo.

Figura 8 Porcentajes de consumo de cepas celulolíticas

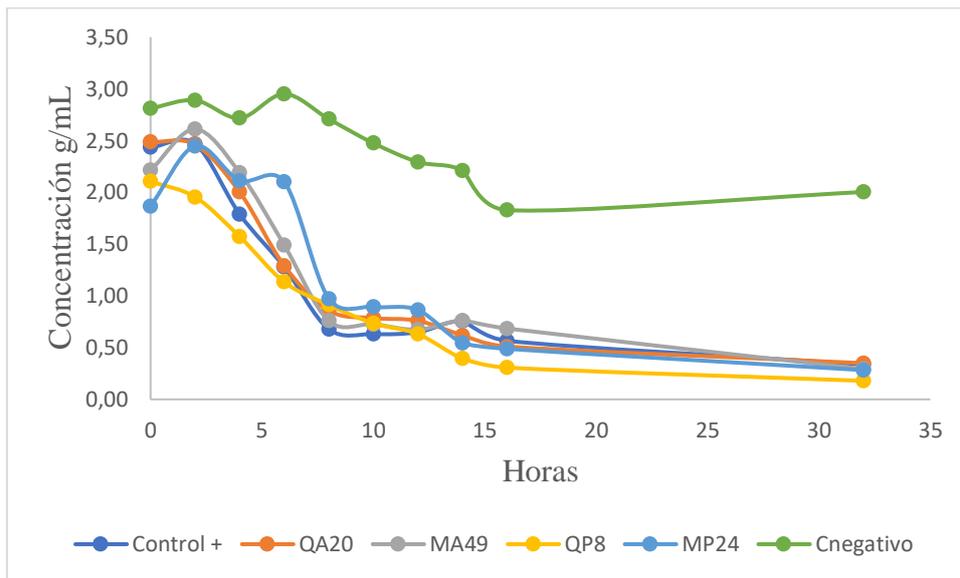


Los resultados revelaron que las cepas evaluadas son capaces de degradar celulosa en medio líquido a las 30 horas. La Figura 10 muestra la cinética de consumo de sustrato de las cuatro cepas celulolíticas en comparación con el control, registrada por horas desde el momento de la inoculación. El consumo de celulosa está directamente relacionado con la actividad enzimática, como demostrado en el estudio de Sanchez et al., (2005) donde las cepas celulolíticas mostraron mayor actividad enzimática a las 48 horas.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre las cepas, cumpliendo adecuadamente con los supuestos del ANOVA. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que los datos no se desviaban significativamente de una distribución normal ($W=0.88$, $p=0.1067$). La prueba de homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) utilizando la prueba de Levene no mostró diferencias significativas en el consumo de sustrato entre las cepas ($F=0.81$, $p=0.5460$), confirmando que también se cumplía el supuesto de homocedasticidad.

El ANOVA reveló diferencias significativas entre los grupos ($F=27.57$, $gl=4$, $p<0.05$), indicando que al menos una cepa difiere significativamente de las otras en cuanto al consumo de sustrato de celulosa, destacando la cepa QP8 por mostrar el mayor consumo.

Figura 9. Cinética el consumo de sustrato a base de celulosa

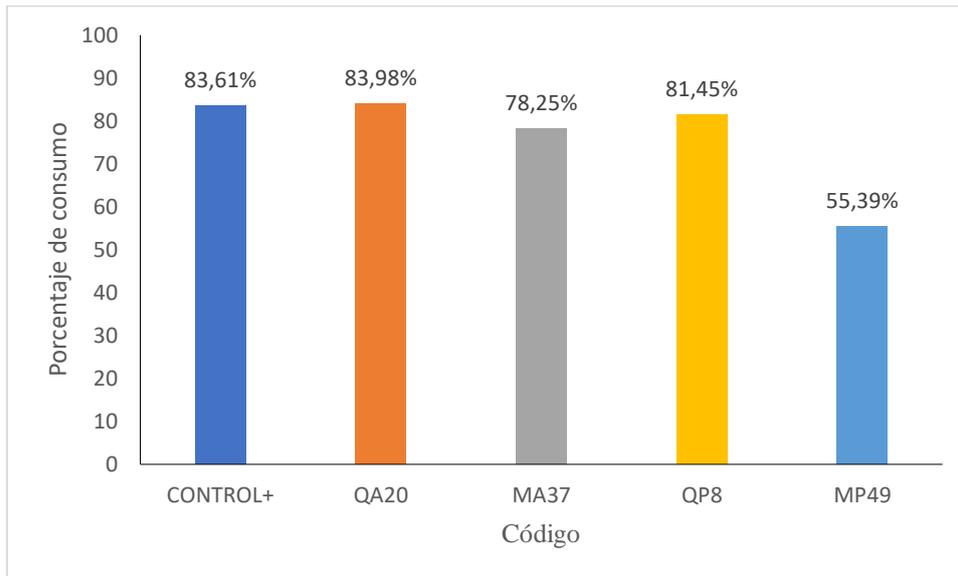


4.2.2 Actividad amilolítica en medio líquido

La Figura 10 presenta el porcentaje de almidón consumido por las bacterias después de 30 horas en comparación con el control positivo *Bacillus Cereus* ATCC, utilizando la técnica de yoduro de potasio para medir el consumo de sustrato. Cada barra representa el porcentaje de almidón consumido por las cepas seleccionadas en medio líquido con un 10% de almidón. Las cepas amilolíticas QA20, MA37 y QP8 mostraron un consumo de almidón superior al 78%, mientras que la cepa MP49 tuvo un consumo del 55%, considerablemente menor que las otras cepas.

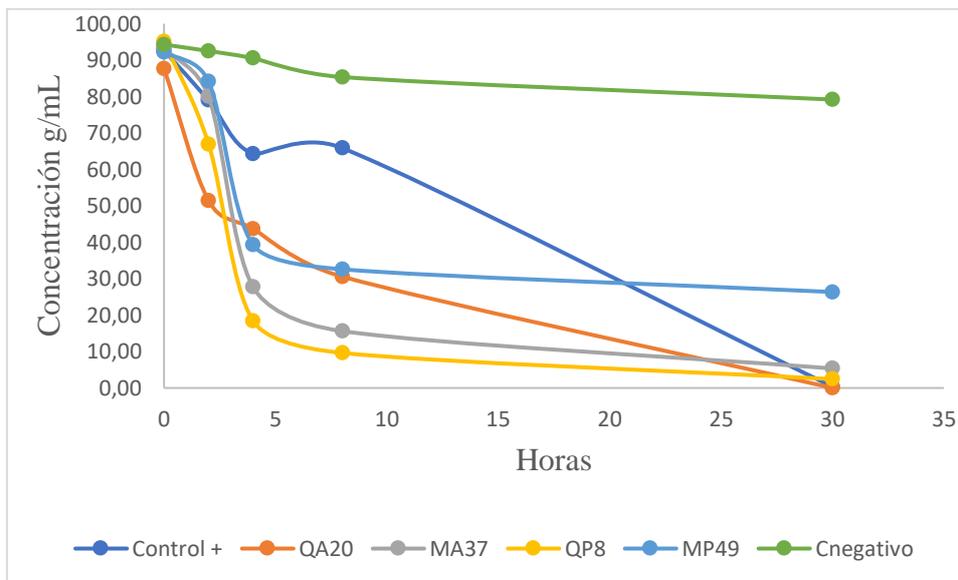
Se compararon cuatro cepas, las cuales no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica debido a la falta de normalidad en los residuos y de homocedasticidad. Por lo tanto, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias significativas en el porcentaje de consumo de almidón entre las cepas QA20, MA37, QP8 y MP24. Este análisis mostró una diferencia significativa en el porcentaje de consumo de almidón entre las cepas bacterianas ($H=13.50$; $p=0.009$), con un valor de $p<0.05$. Este resultado indica que al menos una cepa difiere significativamente de las otras en términos de consumo de almidón.

Figura 10 Porcentajes de consumo de cepas amilolíticas seleccionadas

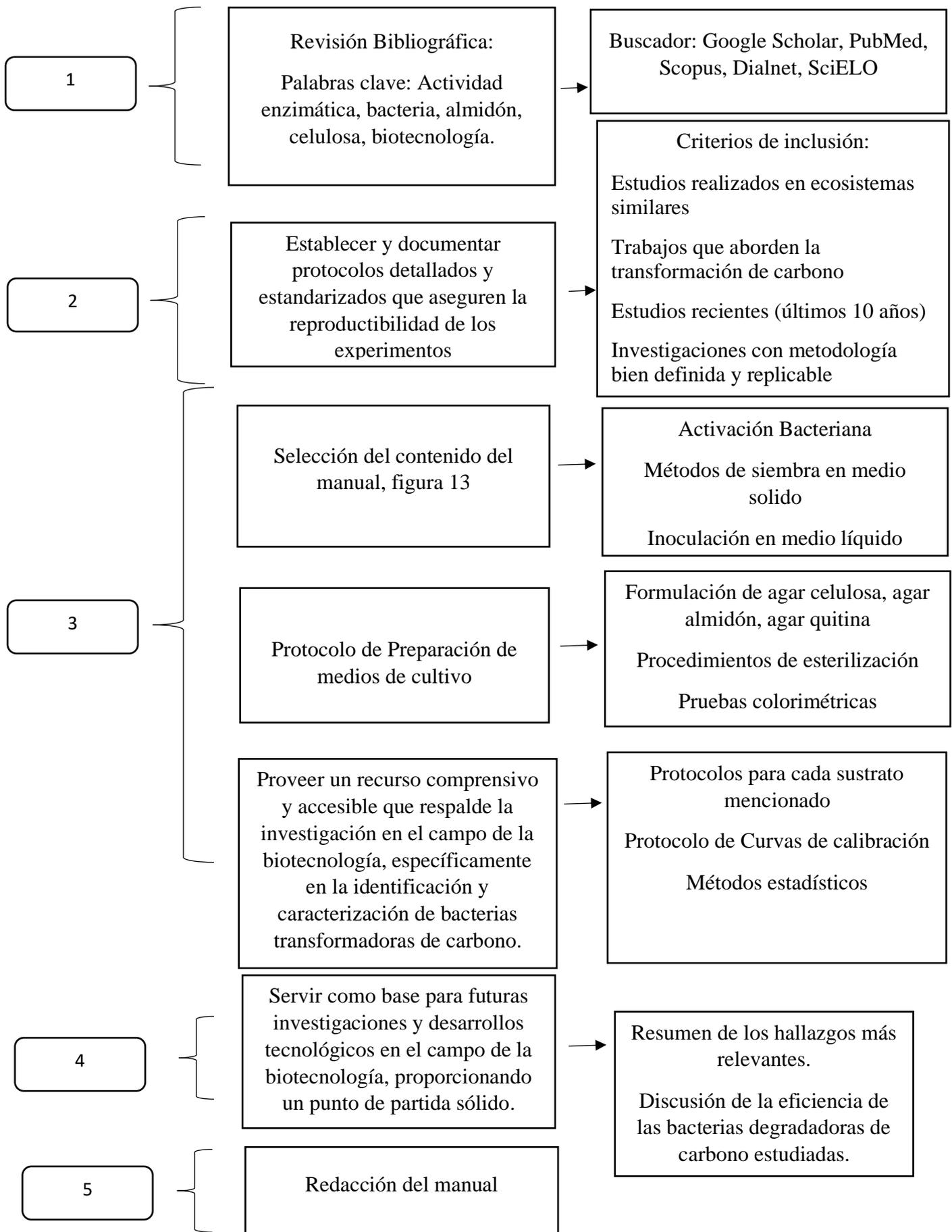


Los resultados mostraron que todas las cepas evaluadas tienen la capacidad de degradar almidón en medio líquido. En el Anexo 10 se presenta la cinética de consumo de sustrato de las cuatro cepas amilolíticas en comparación con el control, registrada por horas desde el momento de la inoculación.

Figura 11. Cinética de consumo de almidón



4.3 Elaborar un manual para la identificación de bacterias transformadoras de carbono



El manual proporciona una guía completa sobre el estudio de bacterias celulolíticas, amilolíticas y quitinolíticas. Contiene detalles sobre los métodos de aislamiento y cultivo bacteriano, los procedimientos para evaluar la actividad enzimática, y la comparación de estas actividades con *Bacillus cereus* ATCC como control positivo, cada protocolo consta de apartados como se indica en la figura 12.

Figura 12. Diseño de tablas de protocolos

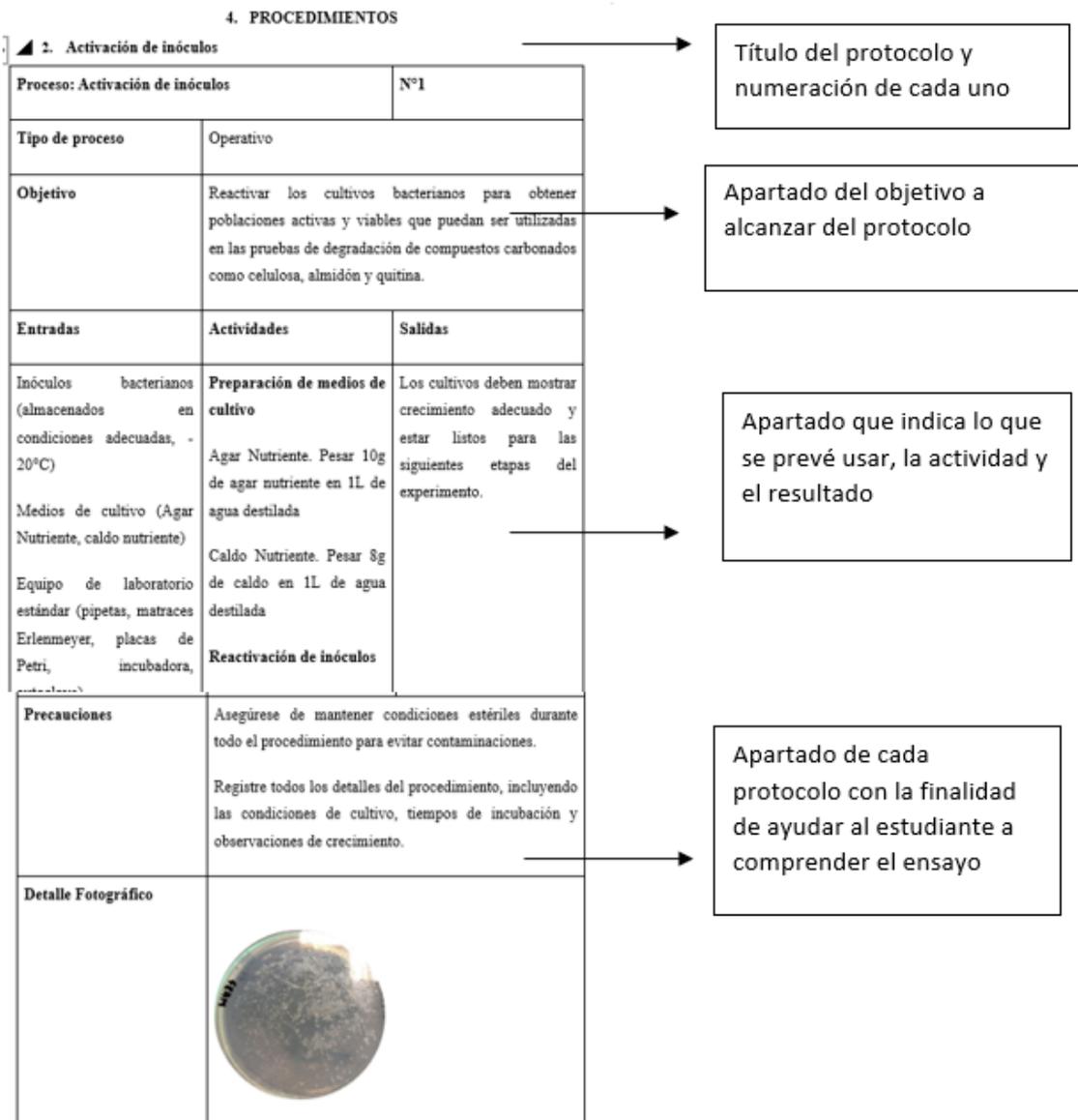


Figura 13. Contenido del manual

Contenido	
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	5
3. MARCO NORMATIVO	5
1. Seguridad en el laboratorio.....	5
4. PROCEDIMIENTOS	7
2. Activación de inóculos	7
3. Técnicas de siembra.....	9
4. Preparación de medios de cultivo	12
5. Evaluación de la degradación de celulosa en medio sólido.....	16
6. Evaluación de la degradación de celulosa en medio líquido	18
7. Evaluación de la degradación de almidón en medio sólido.....	22
8. Evaluación de la degradación de almidón en medio líquido	24
9. Evaluación de la degradación de quitina en medio sólido.....	27
10. Análisis estadístico	28
5. RECOMENDACIONES	31
6. GLOSARIO DE TÉRMINOS	31
7. REFERENCIAS	33

4.3.1 Discusión

La elaboración del manual sobre bacterias transformadoras de carbono ofrece varias ventajas significativas. En primer lugar, proporciona una guía estructurada y detallada para la identificación y utilización de cepas bacterianas eficientes en la transformación de compuestos orgánicos complejos. Esta iniciativa puede facilitar la estandarización de procedimientos experimentales y fomentar la reproducibilidad de resultados en el laboratorio de biotecnología aplicada. Además, un manual bien documentado sirve como referencia invaluable para investigadores y profesionales de la biotecnología, acelerando el desarrollo de nuevas aplicaciones industriales y ambientales. La recopilación de datos sobre las capacidades de transformación de diferentes cepas permite una comparación directa y la selección informada de los microorganismos más prometedores para estudios y futuras aplicaciones.

Limitaciones del Manual

A pesar de sus numerosos beneficios, la creación y el uso de un manual también presentan algunas desventajas y limitaciones. Una posible desventaja es la rigidez inherente para seguir un conjunto de procedimientos estandarizados, lo que podría limitar la creatividad en otra investigación. Los métodos y protocolos incluidos en el manual pueden no ser aplicables en todas las situaciones experimentales, ya que depende de los objetivos de cada investigación, especialmente en condiciones ambientales variables o en estudios de campo, donde los factores no controlados pueden influir significativamente en los resultados. Además, la información contenida en el manual puede quedar obsoleta rápidamente debido al avance continuo en la investigación científica y tecnológica. Es esencial actualizar regularmente el manual para incluir nuevos hallazgos y metodologías emergentes, lo cual puede requerir recursos y tiempo adicionales.

Link del manual.

<https://utneduec.sharepoint.com/:w:/s/TUTORIASTESISBIO-SZB-CHULDELILIANA/ES2tPWcvSv5DtHIaek7W52UBrQDqCkWvVI81mpn4dWEMEA?e=yYnKnB>

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Las bacterias evaluadas en este estudio demostraron una capacidad significativa para degradar compuestos carbonados, con más del 50% de las cepas mostrando actividad celulolítica y amilolítica, aunque no se observó actividad quitinolítica, los resultados destacan el potencial de estas bacterias para la degradación de materia orgánica específica y la producción de enzimas como celulasas y amilasas, este estudio revela su potencial para aplicaciones biotecnológicas.

Las cepas evaluadas no solo mostraron capacidades superiores a las del control positivo *Bacillus Cereus* ATCC en amilolíticas y celulolíticas, sino que también destacaron por su relevancia en la degradación de materia orgánica en ecosistemas de páramo. Estos hallazgos subrayan su prometedor potencial para aplicaciones biotecnológicas, destacando cepas como QP8 como candidatas clave para futuras investigaciones.

El manual desarrollado en este estudio no solo garantiza la calidad y coherencia de la investigación actual, sino que también establece una referencia crucial para futuros estudios en biotecnología. Su implementación promete avanzar en el conocimiento y mejorar la eficiencia operativa en estudios de bacterias transformadoras de carbono.

5.2 Recomendaciones

Los microorganismos celulolíticos y amilolíticos pueden ser evaluados bajo diversas condiciones experimentales, incluyendo variaciones de temperatura, pH y concentración de sustratos. En la literatura, se ha observado que muchos de estos microorganismos pueden mejorar su actividad enzimática ajustando estas variables. Por ejemplo, estudios previos han demostrado que ciertas cepas muestran un aumento significativo en la actividad enzimática a un pH específico, como pH 5.5, lo cual podría ser relevante para investigaciones futuras.

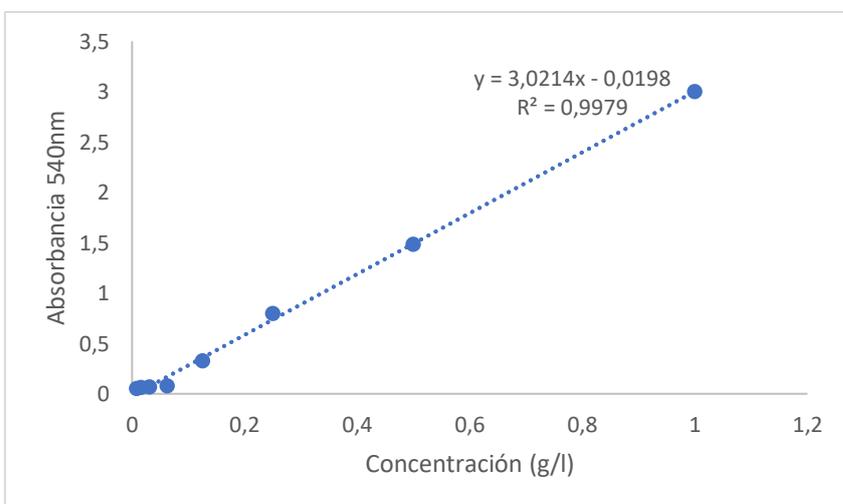
Para estudios futuros, se recomienda considerar variables adicionales como la tolerancia a temperaturas inferiores a 20 °C, especialmente para microorganismos que podrían ser utilizados como inoculantes en el compostaje de residuos orgánicos.

Estos microorganismos ofrecen perspectivas prometedoras para aplicaciones en el tratamiento de residuos orgánicos urbanos o agrícolas en proyectos futuros. Se sugiere también evaluar la actividad enzimática de las cepas que mostraron actividad, pero que no fueron evaluadas en reactores debido al número significativo de cepas con resultados positivos para estos sustratos.

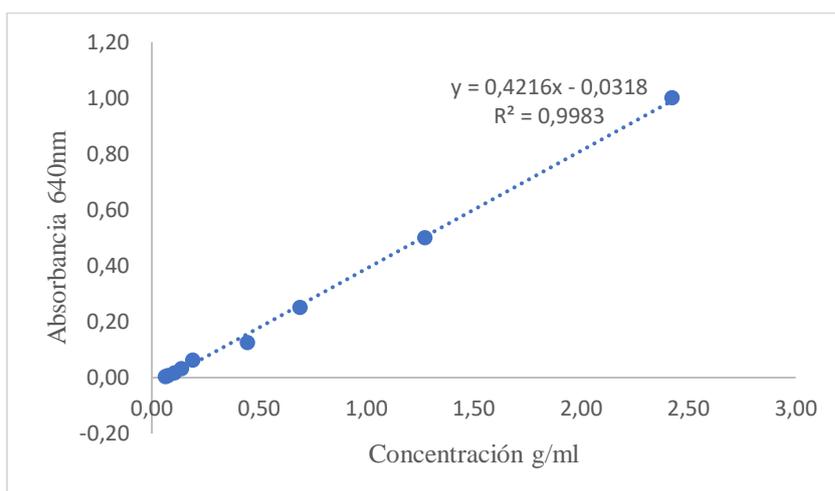
Esta investigación abre nuevas líneas de exploración en biotecnología, como la ingeniería metabólica para identificar las moléculas involucradas en la degradación de celulosa, almidón y quitina, y enzimología para optimizar la actividad enzimática con posibles aplicaciones en sectores industriales como la alimentación, agricultura y textil, entre otros.

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de celulosa



Anexo 2. Curva de calibración de yoduro de potasio



Anexo 3. Crecimiento y actividad de las cepas en los 3 medios formulados

CÓDIGO	CELULOSA		ALMIDÓN		QUITINA	
	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)
MA1	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA3	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA7	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MA11	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA16	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA21	SI	SI	SI	NO	SI	NO
MA32	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MA33	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA34	NO	NO	SI	NO	NO	NO
MA35	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA37	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA44	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA46	NO	NO	SI	NO	SI	NO
MA47	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA48	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA49	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MA50	NO	NO	SI	NO	NO	NO
MA51	SI	SI	SI	SI	SI	NO

CÓDIGO	CELULOSA		ALMIDÓN		QUITINA	
	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)
MA52	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MA53	SI	SI	NO	NO	NO	NO
MA54	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MA55	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MA57	SI	NO	SI	SI	SI	NO
MA60	SI	NO	SI	NO	NO	NO
QA1	NO	NO	NO	NO	NO	NO
QA2	SI	SI	SI	SI	SI	NO
QA4	SI	NO	NO	NO	NO	NO
QA9	SI	NO	SI	NO	NO	NO
QA10	SI	SI	NO	NO	NO	NO
QA11	NO	NO	SI	NO	NO	NO
QA12	NO	NO	SI	NO	NO	NO
QA13	SI	SI	SI	SI	SI	NO
QA20	SI	SI	SI	SI	SI	NO
QA21	NO	NO	NO	NO	NO	NO
QA22	SI	SI	SI	SI	SI	NO
QA23	SI	SI	SI	NO	NO	NO
QP2	SI	SI	SI	SI	SI	NO
QP4	NO	NO	NO	NO	NO	NO
QP5	SI	SI	SI	SI	SI	NO
QP8	SI	SI	SI	SI	SI	NO
QP10	NO	NO	NO	NO	NO	NO
QP20	NO	NO	SI	NO	NO	NO
MP5	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MP7	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MP12	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP13	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MP14	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP15	NO	NO	SI	SI	SI	NO

CÓDIGO	CELULOSA		ALMIDÓN		QUITINA	
	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)
MP16	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP19	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP20	NO	NO	SI	NO	NO	NO
MP22	NO	NO	SI	NO	NO	NO
MP23	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP24	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MP25	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP26	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MP28	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP29	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP30	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP31	SI	NO	SI	NO	NO	NO
MP32	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP33	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP34	SI	SI	SI	NO	NO	NO
MP36	SI	NO	NO	NO	NO	NO
MP37	SI	NO	NO	NO	NO	NO
MP38	SI	NO	NO	NO	NO	NO
MP39	SI	SI	NO	NO	NO	NO
MP42	SI	NO	SI	SI	SI	NO
MP44	SI	NO	SI	NO	NO	NO
MP46	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP47	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MP48	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MP49	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP50	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP52	SI	SI	SI	SI	SI	NO
MP60	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MP61	SI	SI	SI	SI	SI	NO
PseudoP13	SI	SI	SI	SI	SI	NO

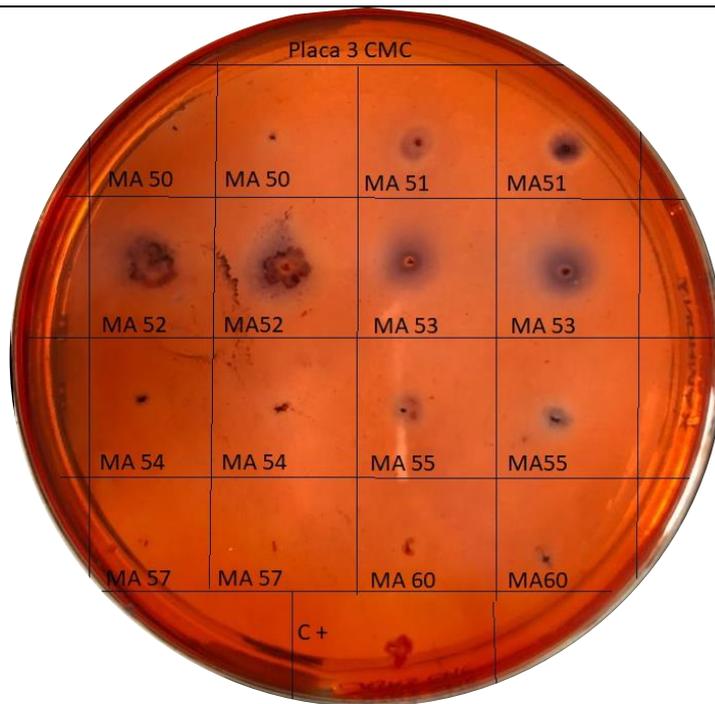
CÓDIGO	CELULOSA		ALMIDÓN		QUITINA	
	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)	CRECE (SI/NO)	ACTIV (SI/NO)
TOTAL	59	49	61	39	41	0

Anexo 4. Crecimiento y actividad en medio de carboximetilcelulosa

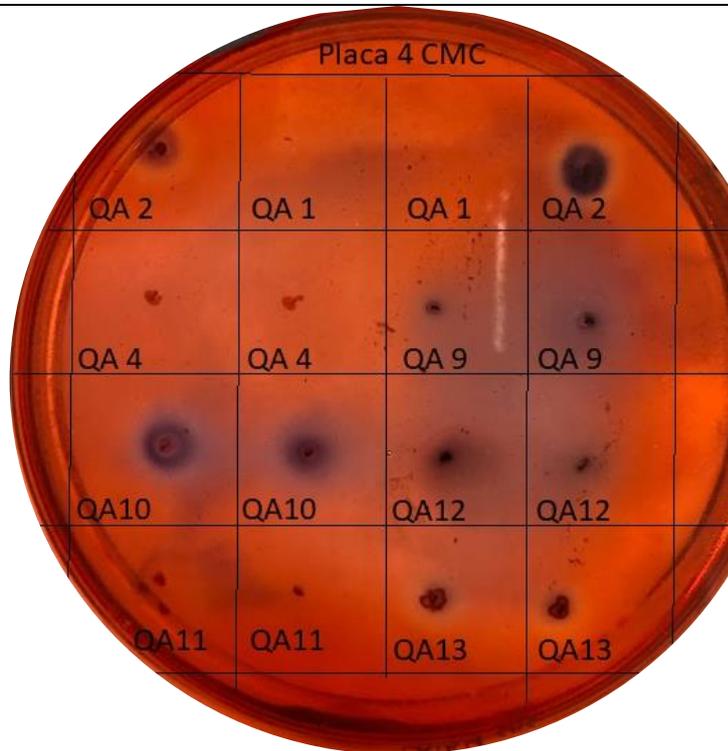
SCREENING 1 CELULOSA		
Código		
MA1		
MA3		
MA7		
MA11		
MA16		
MA21		
MA32		
MA33		
MA34		
MA35		
MA37		
MA44		
MA46		
MA47		
MA48		
MA49		

SCREENING 1 CELULOSA

MA50
MA51
MA52
MA53
MA54
MA55
MA57
MA60

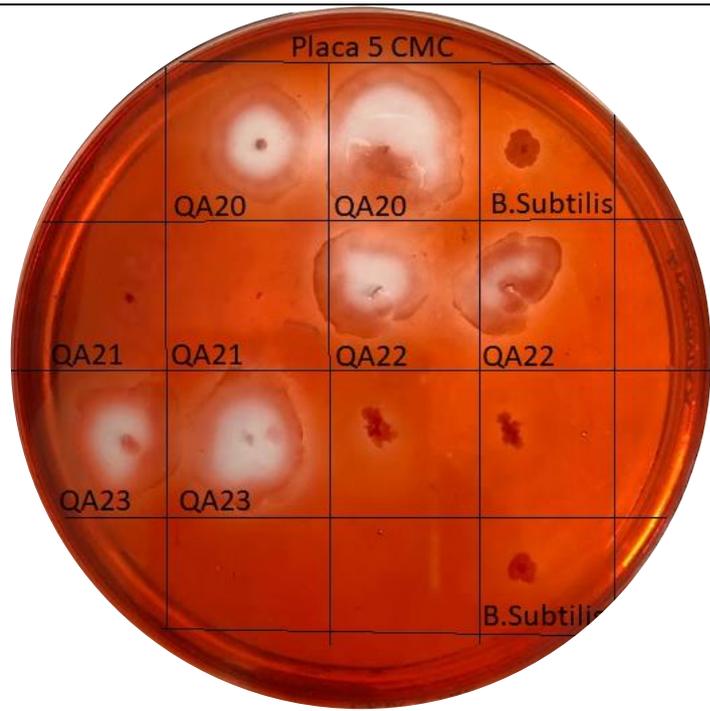


QA1
QA2
QA4
QA9
QA10
QA12
QA11
QA13

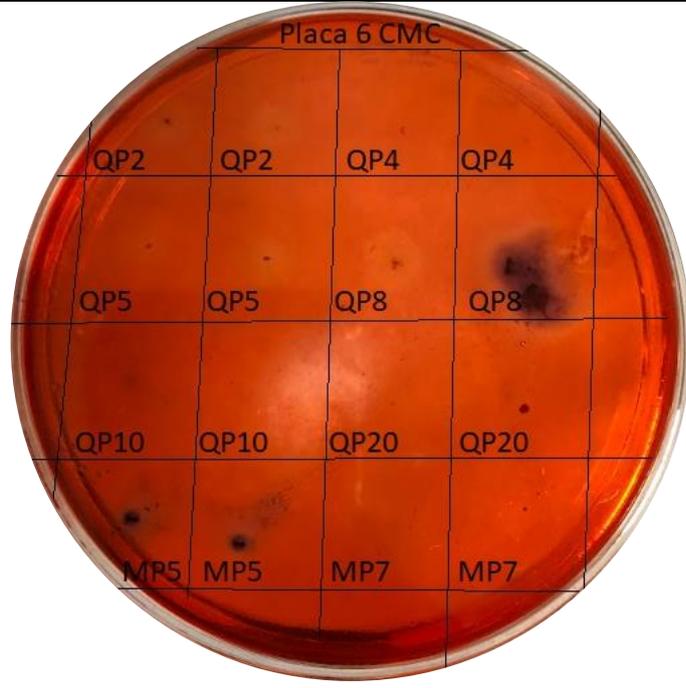


SCREENING 1 CELULOSA

QA20
QA21
QA22
QA23

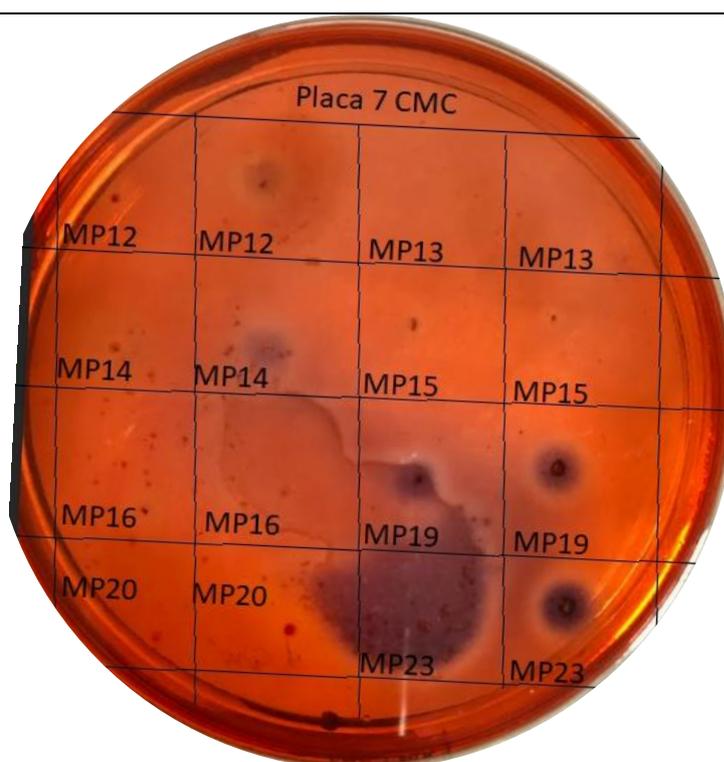


QP2
PQ4
QP5
QP8
QP10
QP20
MP5
MP7

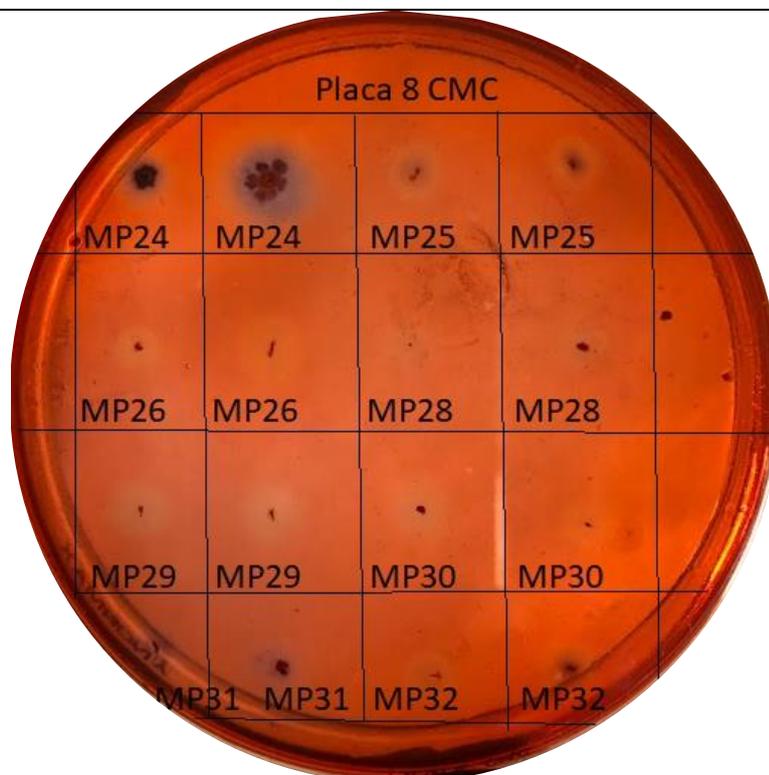


SCREENING 1 CELULOSA

MP12
MP13
MP14
MP15
MP16
MP19
MP20
MP23

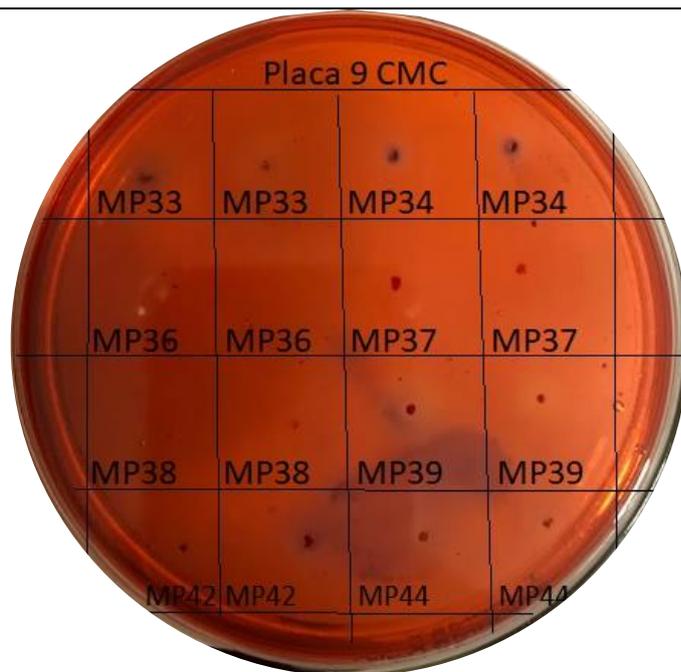


MP24
MP25
MP26
MP28
MP29
MP30
MP31
MP32

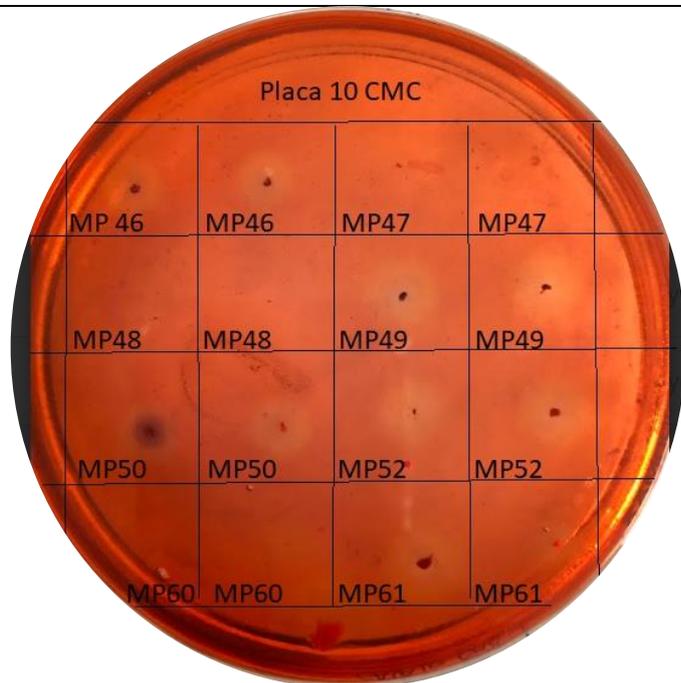


SCREENING 1 CELULOSA

MP33
MP34
MP36
MP37
MP38
MP39
MP42
MP44

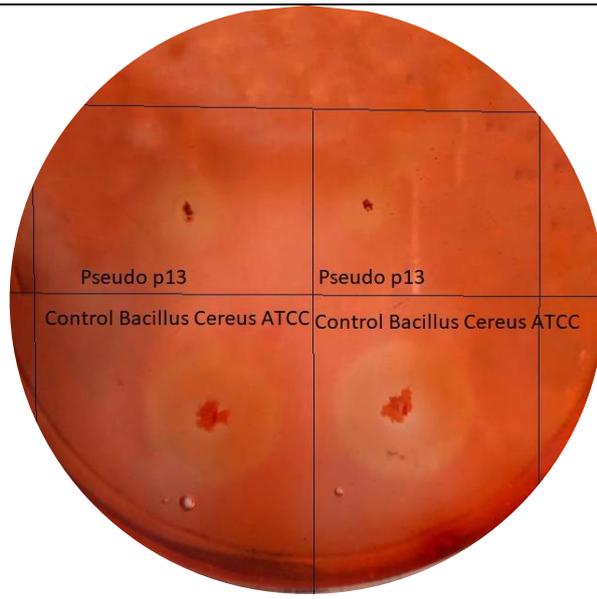


MP46
MP47
MP48
MP49
MP50
MP52
MP60
MP61



SCREENING 1 CELULOSA

Pseudo
P13
Control
Positivo

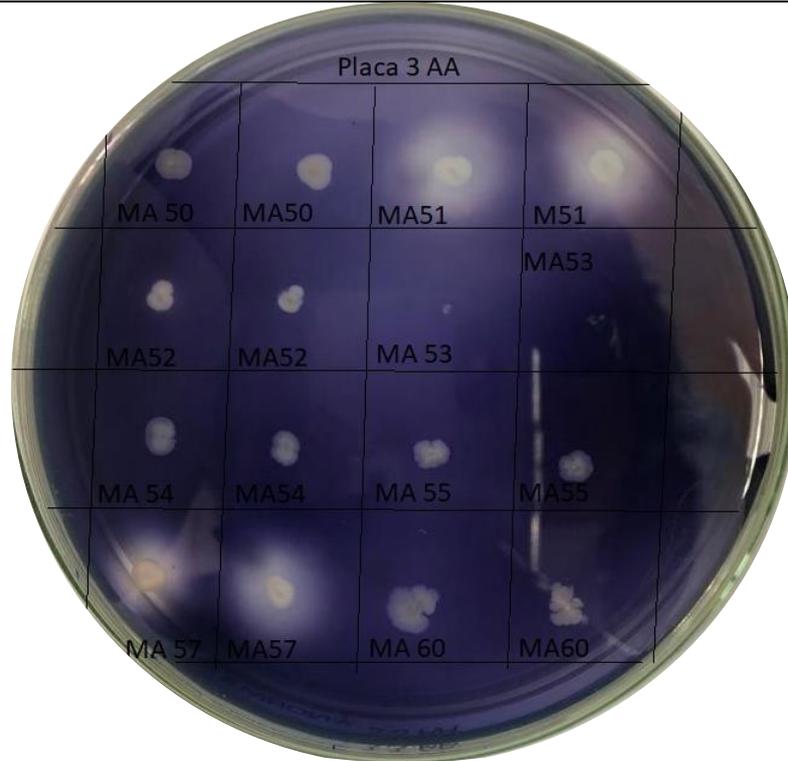


Anexo 5. Crecimiento y actividad en medio de agar almidón

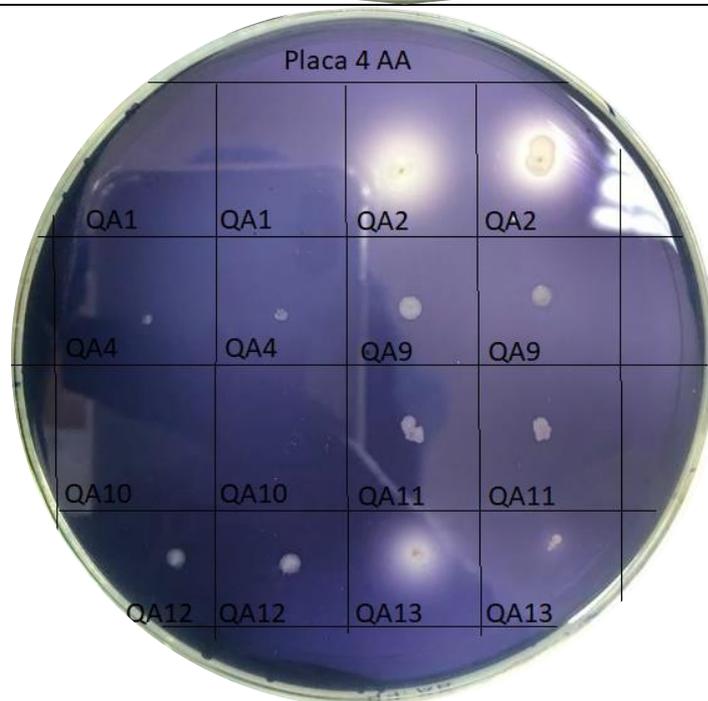
SCREENING 1 ALMIDÓN	
Código	<p>Placa 1 AA</p>
MA1	
MA3	
MA7	
MA11	
MA16	
MA21	
MA32	
MA33	
MA34	
MA35	
MA37	
MA44	
MA46	
MA47	
MA48	
MA49	

SCREENING 1 ALMIDÓN

MA50
 MA51
 MA52
 MA53
 MA54
 MA55
 MA57
 MA60



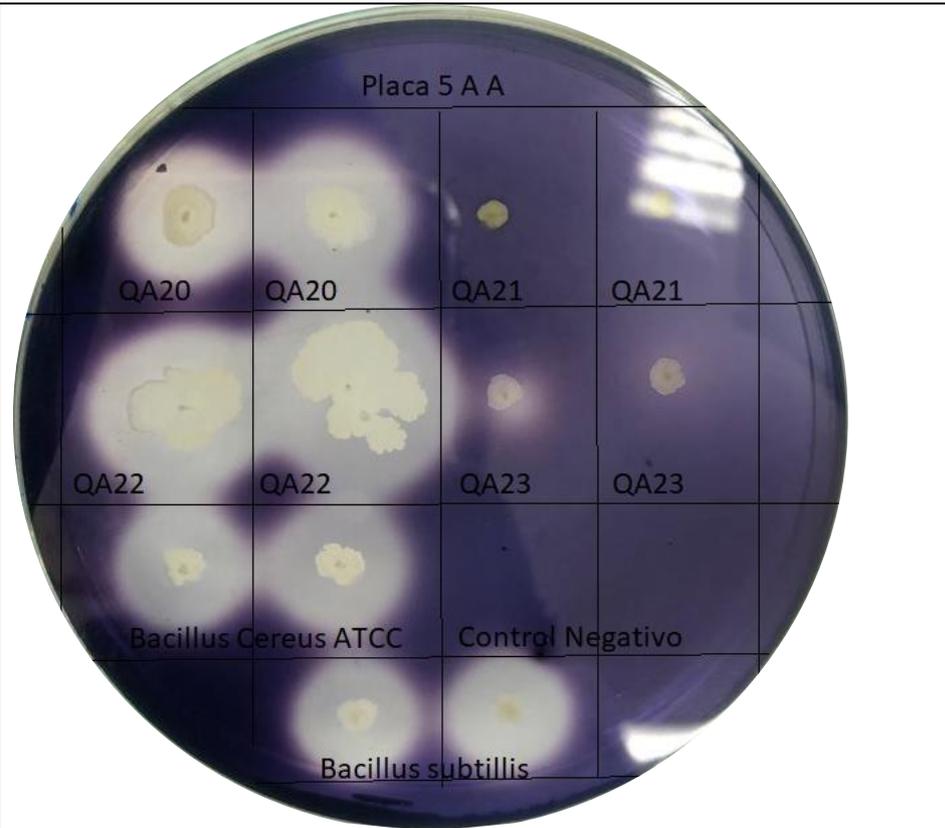
QA1
 QA2
 QA4
 QA9
 QA10
 QA12
 QA11
 QA13



SCREENING 1 ALMIDÓN

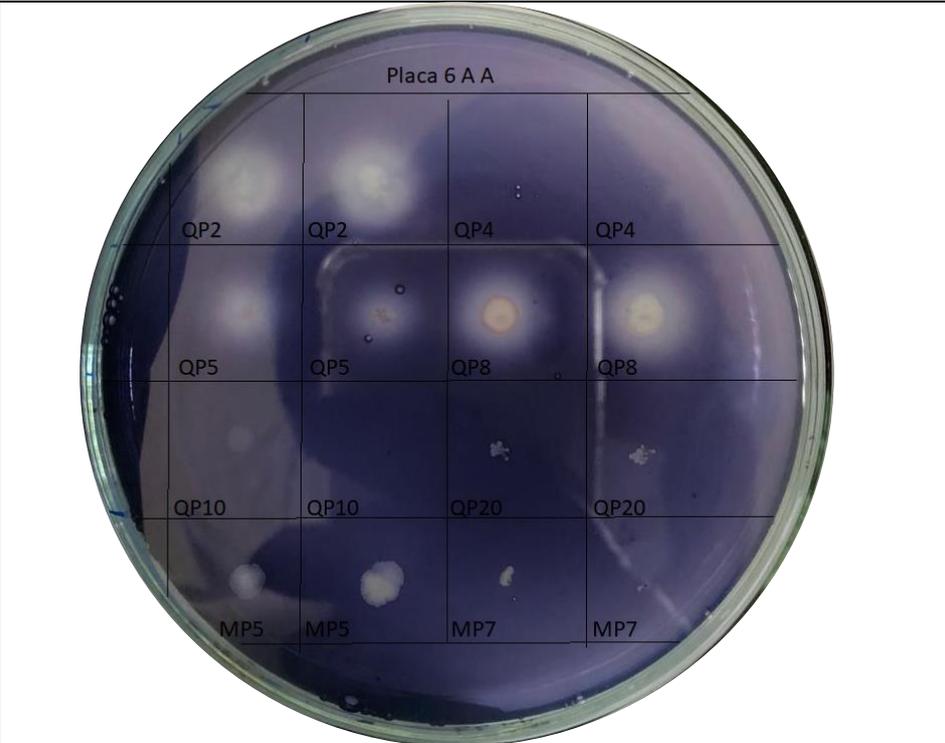
QA20
QA21
QA22
QA23
Bacillus cereus como control positivo

Bacillus subtilis control positivo



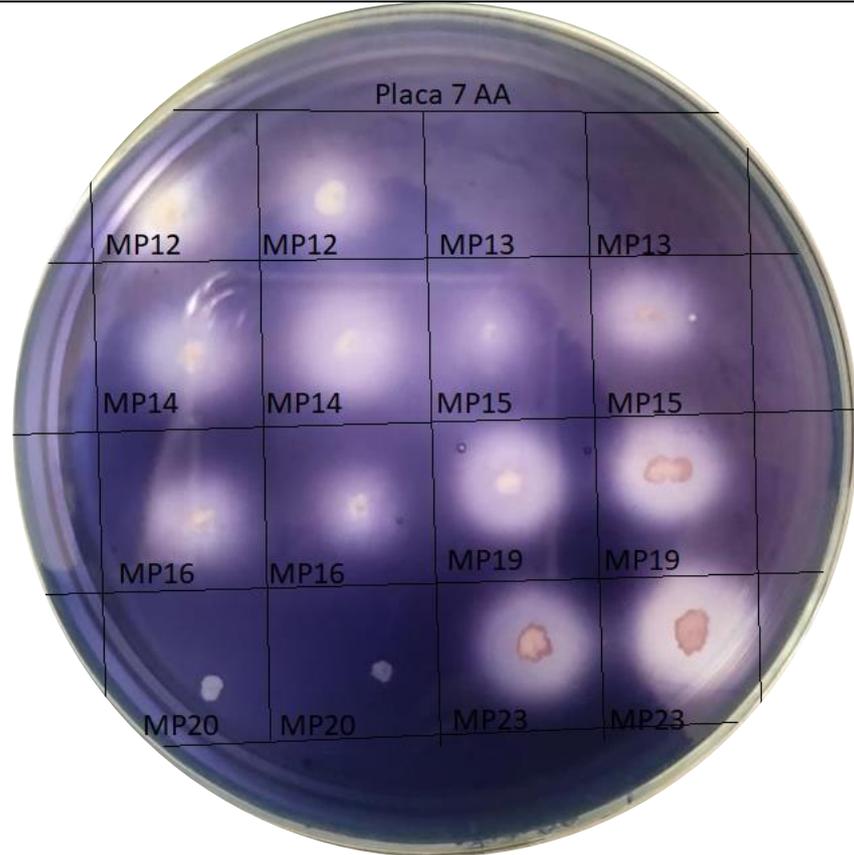
SCREENING 1/ PSEUDOMONAS

QP2
PQ4
QP5
QP8
QP10
QP20
MP5
MP7

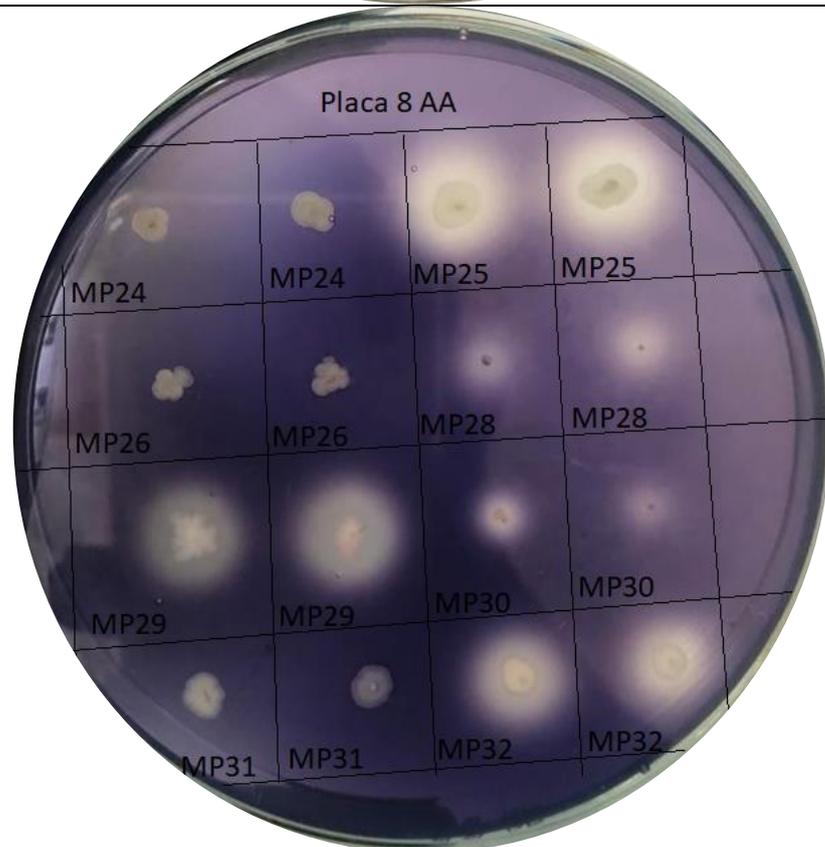


SCREENING 1 ALMIDÓN

MP12
 MP13
 MP14
 MP15
 MP16
 MP19
 MP20
 MP23

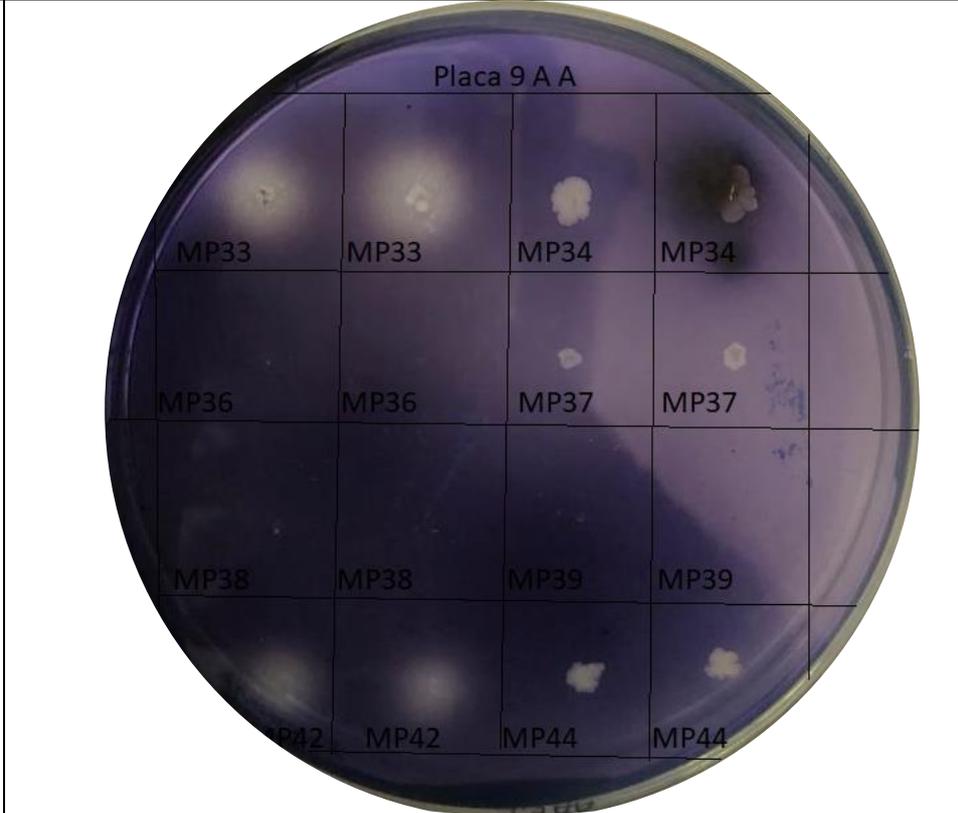


MP24
 MP25
 MP26
 MP28
 MP29
 MP30
 MP31
 MP32

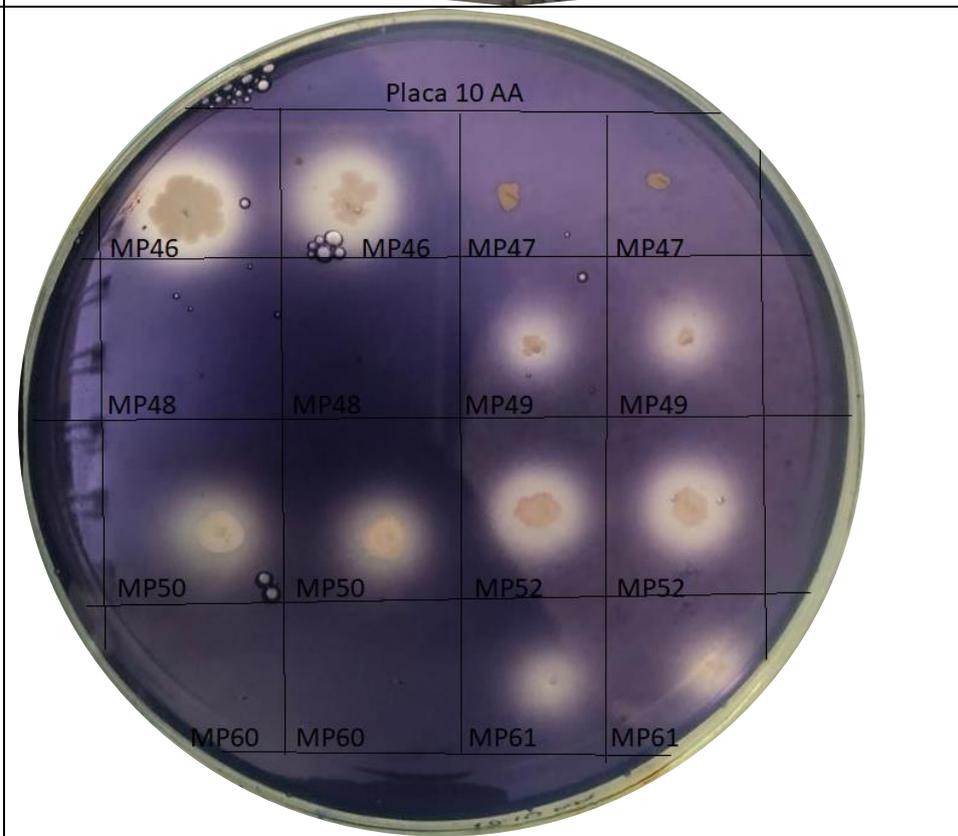


SCREENING 1 ALMIDÓN

MP33
 MP34
 MP36
 MP37
 MP38
 MP39
 MP42
 MP44



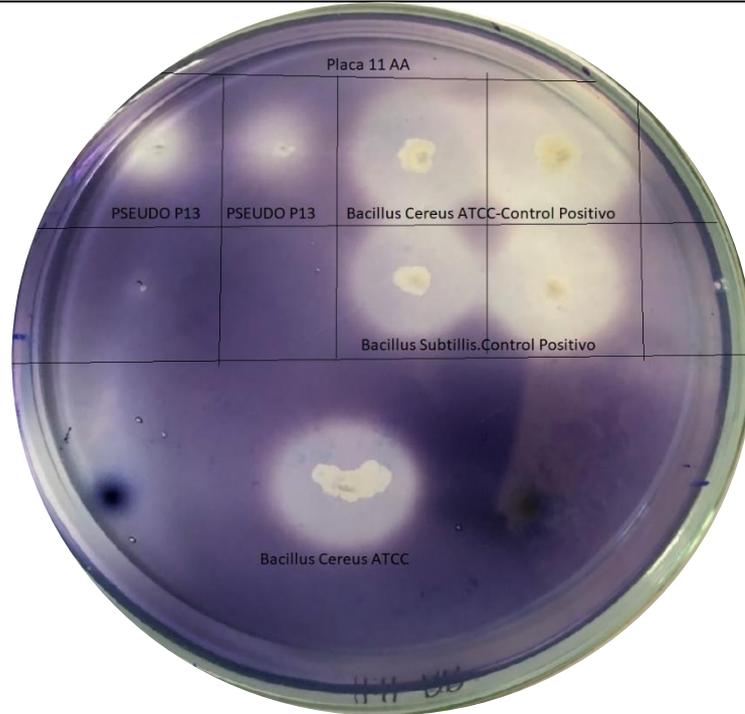
MP46
 MP47
 MP48
 MP49
 MP50
 MP52
 MP60
 MP61



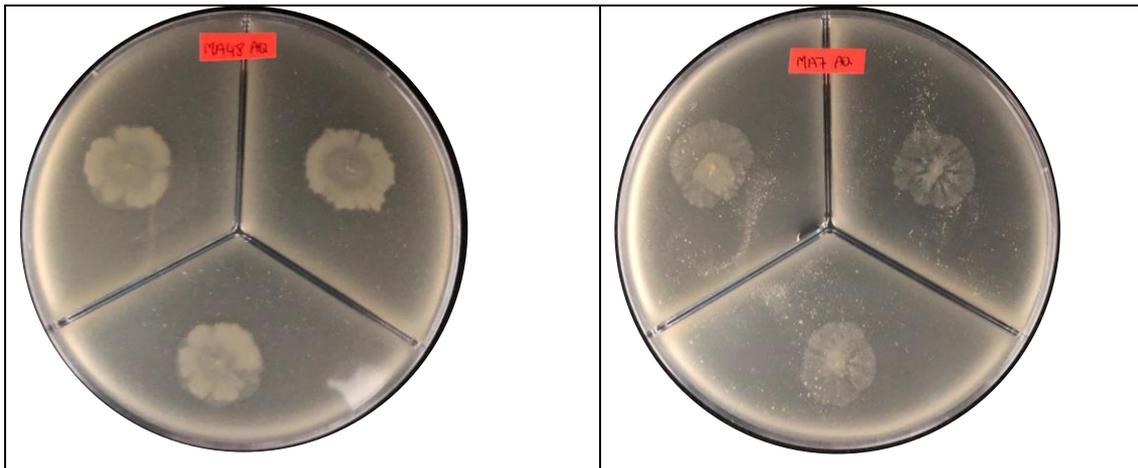
SCREENING 1 ALMIDÓN

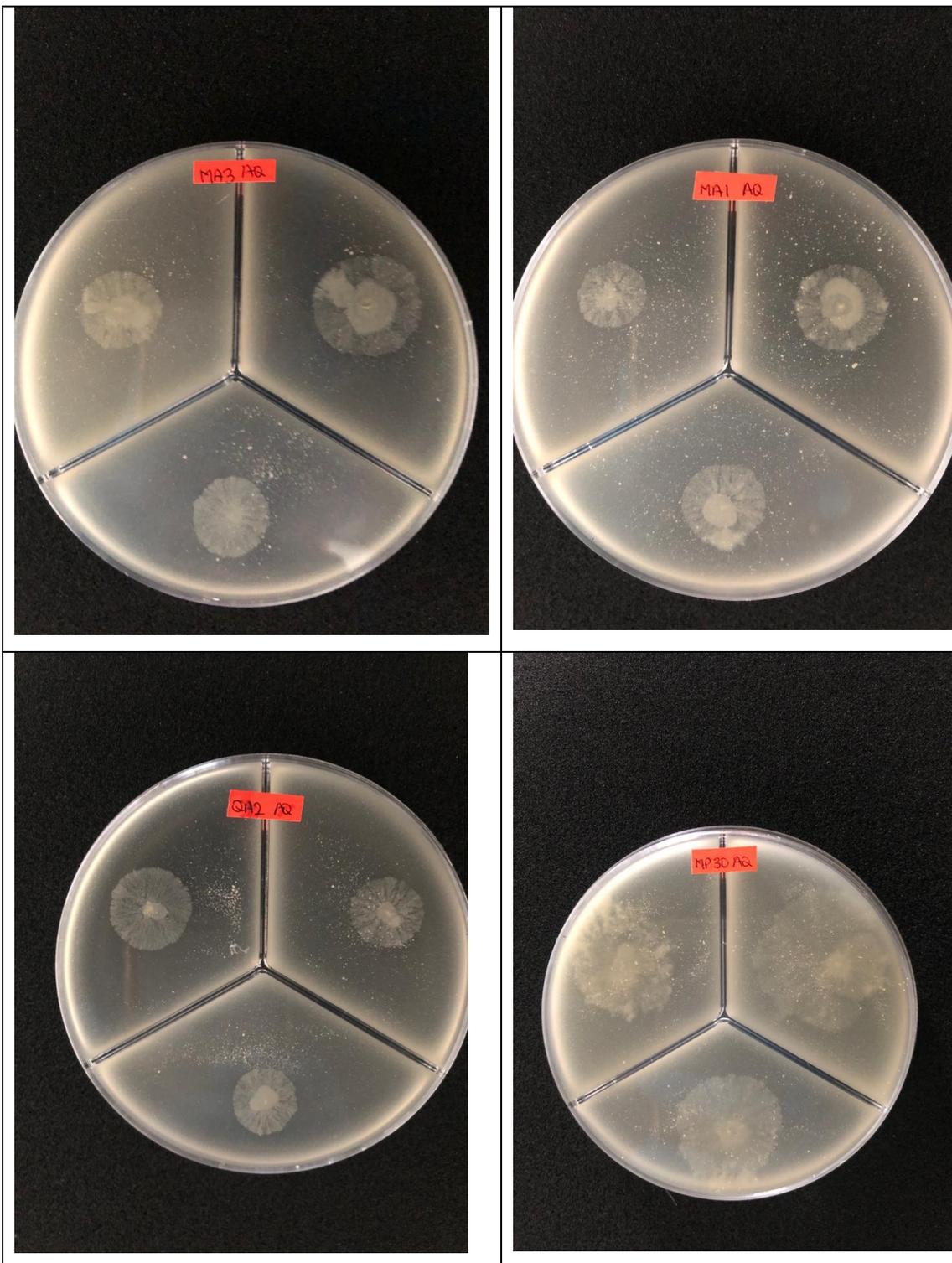
Pseudo P13

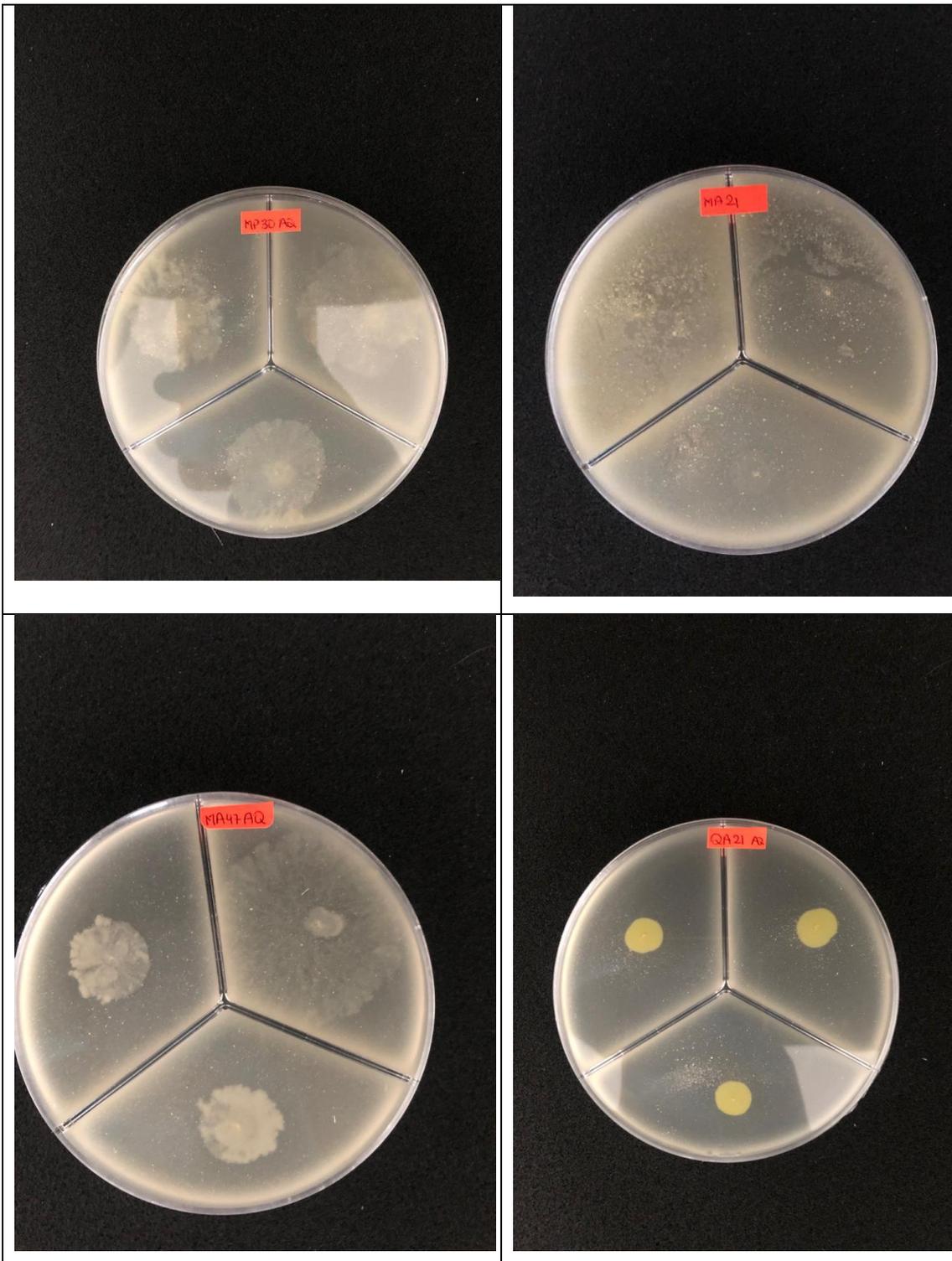
CONTROL

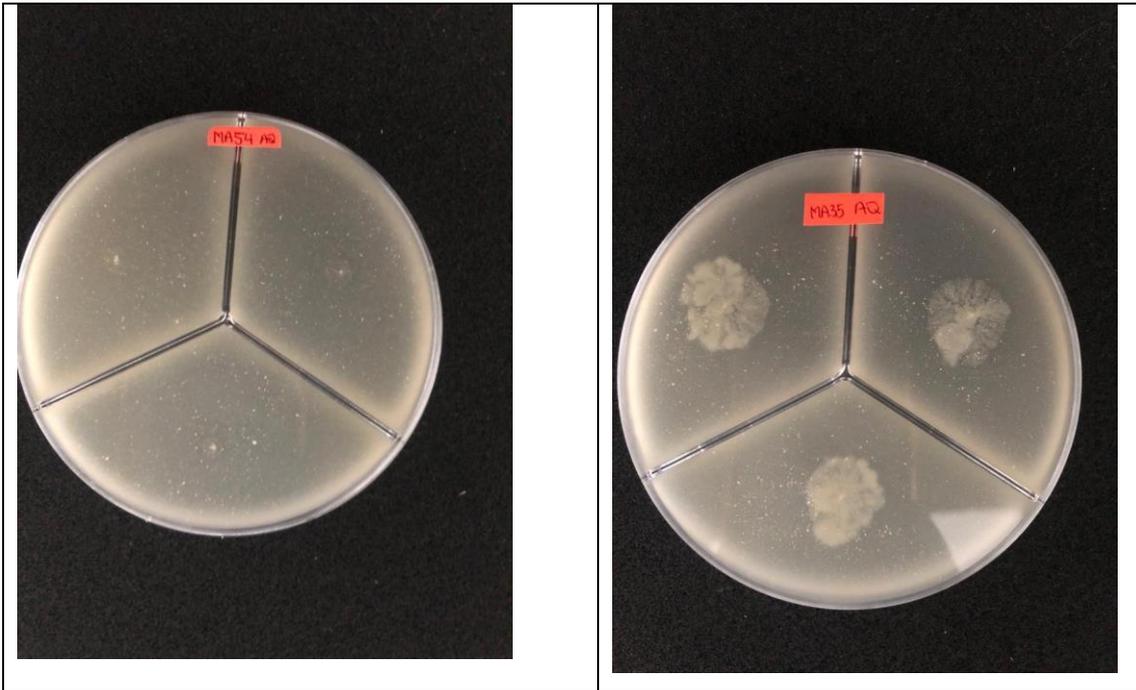


Anexo 6 Crecimiento de actividad quitinolítica

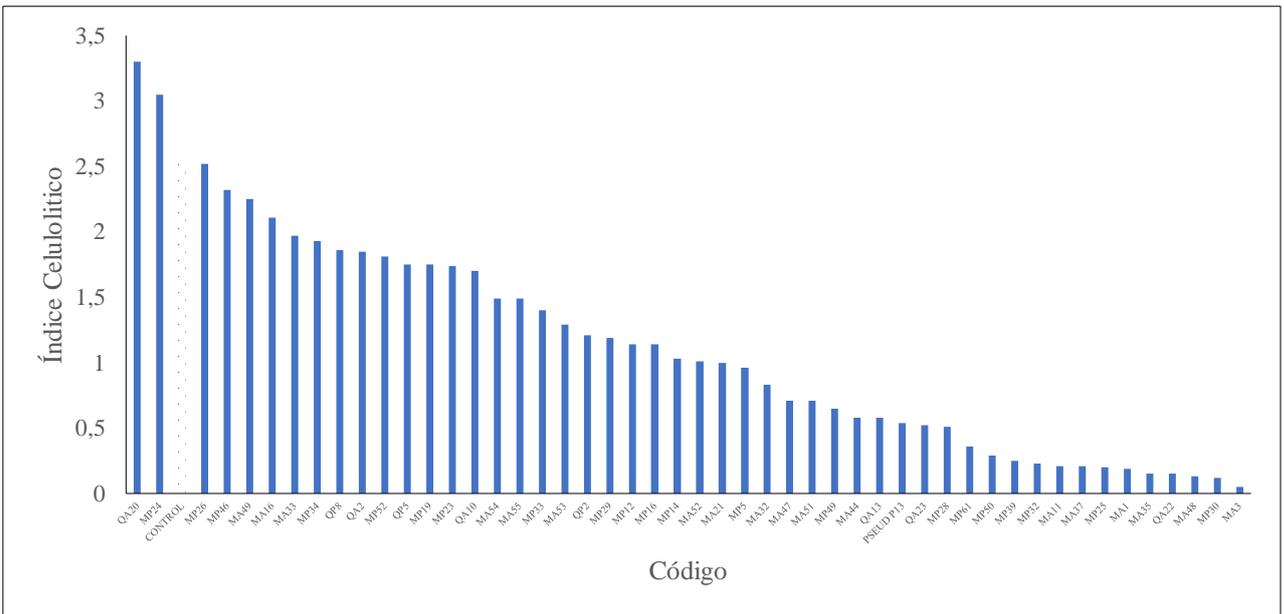








Anexo 7. Calculo del índice celulolítico de bacterias con actividad positiva



Anexo 8. Calculo del índice amilolítico de bacterias con actividad positiva

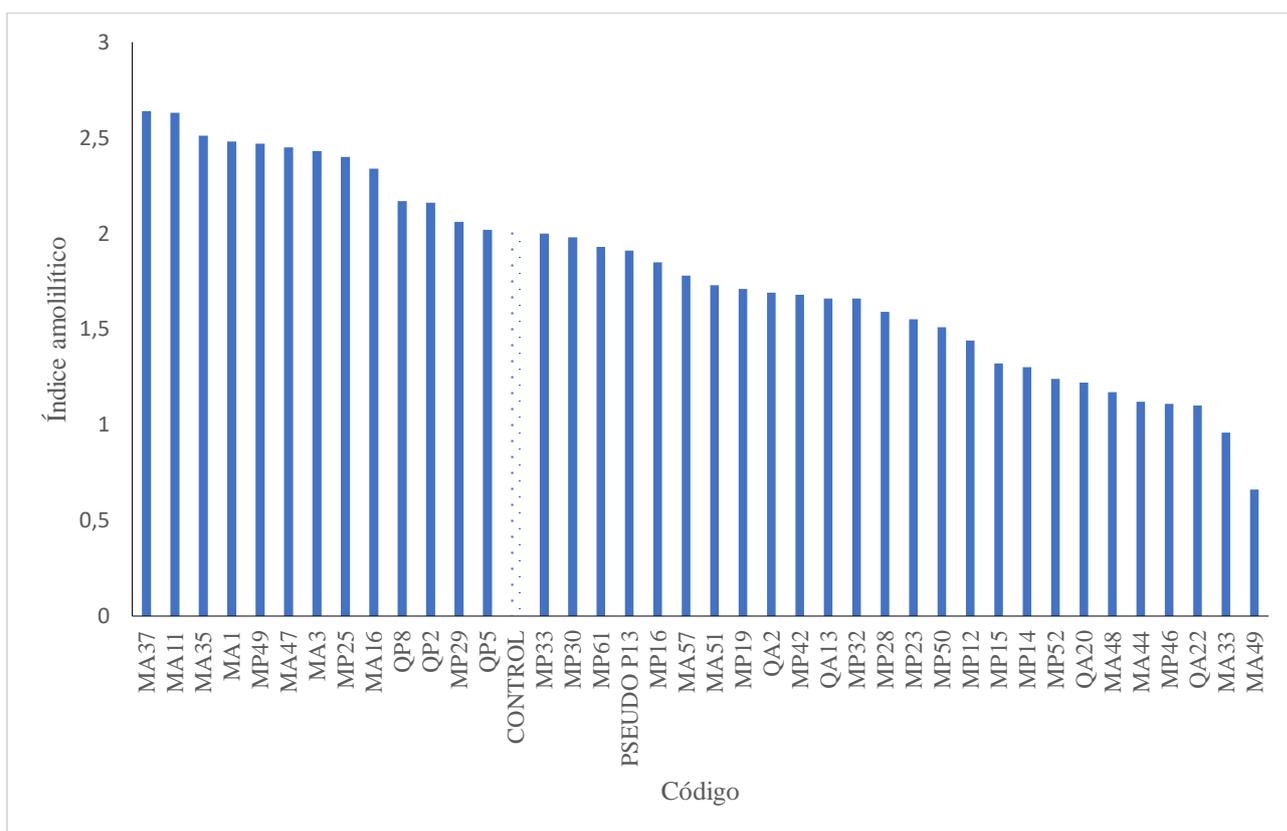


Tabla 8. Análisis de varianza reactores de celulosa con actinomicetos

F.V	SC	gl	CM	F	p
Total	6,74	8			
Cepa	1,07	2	0,53	10,56	0,0254
Repetición	5,46	2	2,73	54,02	0,0013
Error	0,20	4	0,05		

Tabla 9. Análisis de varianza reactores de celulosa con pseudomonas

F.V	SC	gl	CM	F	p
Total	77,66	8			
Cepa	74,40	2	37,20	118,16	0,0001
Repetición	2,47	2	1,23	6,24	0,0589

Error	0,79	4	0,20
-------	------	---	------

Tabla 10. Análisis de varianza de reactores de almidón en actinomicetos

F.V	SC	gl	CM	F	p
Total	61,65	8			
Cepa	61,62	2	30,81	4907,64	0,0001
Repetición	0,01	2	4,0E-03	0,64	0,5721
Error	0,03	4	0,01		

Tabla 11. Análisis de varianza de reactores de almidón en pseudomonas

F.V	SC	gl	CM	F	p
Total	1742,07	8			
Cepa	1480,88	2	740,44	17,15	0,0109
Repetición	88,45	2	44,23	1,02	0,4374
Error	172,74	4	43,18		

Tabla 12. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks

Objetivo	Variable	n	w	p
1 Screening2 Celulosa-Actinos	RDUO Raíz índice Cel	75	0,97	0,3854
1 Screening2 Celulosa- Pseudo	RDUO Raíz índice Cel	78	0,95	0,0448
1Screening2Almidón-Actino	RDUO Índice amilolítico	57	0,94	0,0487
1 Screening2 Almidón-Pseudo	RDUO Índice amilolítico	66	0,91	0,0002
2 Reactores Celulosa Actinos	RDUO consumo %-C	9	0,92	0,5071

2 Reactores Celulosa-Pseudo	RDUO Consumo %-C	9	0,94	0,6844
2 Reactores Almidón-Actino	RDUO Consumo %-C	9	0,89	0,3160
2 Reactores Almidón-Pseudo	RDUO Consumo %-C	9	0,94	0,7190

Tabla 13. Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas.

Objetivo	F.V	SC	gl	CM	F	p
2 Reactores Celulosa Actinos	cepa	3,3E-03	2	1,6E-03	0,21	0,8201
2 Reactores Celulosa-Pseudo	cepa	0,09	2	0,05	1,36	0,3256
2 Reactores Almidón-Actino	cepa	2,5E-03	2	1,2E-03	2,26	0,1860
2 Reactores Almidón-Pseudo	Cepa	15,81	2	7,90	1,55	0,2863

Tabla 14. Prueba de Chi cuadrado de Pearson evaluación de actividad celulolítica.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi cuadrado Pearson	86,00	42	<0,0001
Chi cuadrado MV-G2	116,93	42	<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,71		
Coef.Conting.Pearson	0,71		

- Alves, J., Mario Da Rosa, G., Corteze, A., Wastowski, D., Hildebrand, H., & Wever da Silva, D. (2021). Biotecnología: identification and evaluation of the *Bacillus cereus* amyolytic activity. *Research, Society and Development*.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21301>
- Cabra, T., Rodríguez, A., & Villota, C. (2014). CAPACIDADE ANTAGONISTA E QUITINOLÍTICA DE MICROORGANISMOS ISOLADOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA MAMONEIRA (*Ricinus communis*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12.
<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/328/523>
- Canseco, M., Aráoz, M., Gusils, C., & Zossi, S. (2015). Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. *Revista Industrial y Agrícola de Tucuman*.
<http://www.scielo.org.ar/pdf/riat/v92n2/v92n2a05.pdf>
- Castro, R., Alvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la sociedad química del Perú*, 77. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000200002
- Govindrao, A., & Bassappa, A. (2018). Microbial Tools for environmental waste management. *IGI Global*. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-3540-9.ch002>
- Granados, M., Navarrete, J., & López, T. (2005). Páramos: Hidrosistemas Sensibles. *revista de ingeniería*.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-49932005000200008
- Hernández, D., & Lizarazo, L. (2015). BACTERIAS HETERÓTROFAS Y OLIGOTRÓFICAS EN ZONAS CONSERVADAS E INTERVENIDAS DEL PÁRAMO DE LA CORTADERA, BOYACÁ, COLOMBIA. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n2.2015.178>
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A., &

- Cerra, M. (2014). Los Páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. *UICN, Quito, Ecuador*. www.uicn.org/sur
- Ireland, N., & Trivandrum, K. (2009). *Biotechnology for AgroIndustrial Residues Utilisation*. Poonam Singh nee' Nigam · Ashok Pandey. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7>
- Kumar, A. (2019). Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries: Enzymes in Industrial Food Processing. *Green Bio-processes*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_17
- Lira, R., Méndez, B., & Santos, G. (2019). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta universitaria, Mexico*. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1575>
- Lizarazo, P., & Gómez, D. (2014). MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DE *Espeletia* spp. DE LOS PÁRAMOS DE SANTA INÉS Y DE FRONTINO-URRAO EN ANTIOQUIA, COLOMBIA. *Acta Biológica Colombiana*. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42827> .
- Llambí, L. D., Soto-W, A., Célleri, R., Bievre, B. De, Ochoa, B., & Borja, P. (2012). ECOLOGÍA, HIDROLOGÍA Y SUELOS DE PÁRAMOS. En *Los suelos de paramo*. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56480.pdf>
- Lynd, lee R., Paul, W., & Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Malherble, S., & Cloete, T. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020858910646>
- Martínez, E., & Fuentes, Juan Pablo Acevedo, E. (2008). CARBONO ORGÁNICO Y PROPIEDADES DEL SUELO. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006> %0A
- Pacheco, A. (2013). *EXTRACCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE QUITINA PARA LA PRODU*. <https://core.ac.uk/download/pdf/52647946.pdf>
- Pinos, D., Morales, O., & Durán, M. (2021). Suelos de páramo: Análisis de

percepciones de los servicios ecosistémicos y valoración económica del contenido de carbono en la sierra sureste del Ecuador. *Ciencias Ambientales*.

<http://dx.doi.org/10.15359/rca.55-2.8>

- Quintero, M., Montoya, O., & Gutierrez, P. (2009). *PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA α -AMILASA PRODUCIDA POR LA CEPA NATIVA Bacillus sp. BBM1*.
- Rincon, C. (2013). “ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE TRIGO EN SUELOS DE AGRICULTURA DE CONSERVACIÓN Y AGRICULTURA CONVENCIONAL. INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
- Rinnan, R., & Baath, E. (2009). Differential Utilization of Carbon Substrates by Bacteria and Fungi in Tundra Soil. *American Society for Microbiology*.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02865-08>
- Rodas, B., Quero, M., Magaña, H., & Reyes, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad quitino-Proteolítica de bacillus sp. aisladas de suelos tropicales. *Revisata Colombiana de Biotecnología*.
https://www.researchgate.net/publication/26849646_Seleccion_de_cepas_nativas_con_actividad_Quitino-Proteolitica_de_Bacillus_sp_aisladas_de_suelos_tropicales_Selecting_native
- Rodriguez, L., & Llenque, L. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*.
- Sánchez, E., Heredia, J., Buitrago, S., & Medina, J. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Universidad Nacional de Colombia*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>
- Sanchez, K., Mejia, C., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L., Zapata, N., & Gomez, M. (2005). ESTUDIO DE CEPAS NATIVAS AMILOLÍTICAS. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*.
<https://www.redalyc.org/pdf/1698/169813259003.pdf>
- Sastoque, C., Mercado, M., Martínez, M., Quevedo, B., & Pedroza, A. (2007).

PRODUCCIÓN DE QUITINASAS EXTRACELULARES CON UNA CEPA ALCALÓFILA HALOTOLERANTE DE *Streptomyces* sp. AISLADA DE RESIDUOS DE CAMARÓN. *REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA*.
<https://www.redalyc.org/pdf/620/62060202.pdf>

Sethi, S., Datta, A., Gupta, L., & Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *Nacional Center for Biotechnology Information*. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>

Singh, R., Kumar, S., Singh, M., & Sharma, I. (2020). Chitin, Chitinases and Chitin Derivatives in Biopharmaceutical, Agricultural and Environmental Perspective. *Biointerface Research in Applied Chemistry*.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC113.998510005>

Tolosa, S. (2023). *Caracterización enzimática de bacterias aisladas de un compostaje doméstico con potencial aplicación en el aprovechamiento de residuos orgánicos*.

Valle, U., Actividades, E. D. E., En, A., Capacidad, L. A., Del, S., Del, P., Valle, U., & Sumapaz, P. D. E. L. (2009). *Disponible en:*
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231116390004>.

Vargas Ríos, O. (2013). Disturbios en los páramos andinos. *Instituto von Humboldt*.
https://www.researchgate.net/publication/260438569_Disturbios_en_los_paramos_andinos

Vásquez, E., & Millones, C. (2023). Isolation and Identification of Bacteria of Genus *Bacillus* from Composting Urban Solid Waste and Palm Forest in Northern Peru. *Environmental Microbiology*.

Viteri, P. A., Castillo, D. A., & Viteri, S. E. (2015). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *362 Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos / Biodiversity and Ecosystem Services*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>

Zambrano, D. E., Guzmán, Á., & Rondón, A. J. (2011). AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CELULOSA Y ALMIDÓN. *EspamCiencia*.
http://revistasespam.esпам.edu.ec/index.php/Revista_ESPAMCIENCIA/article/view/173/173

- Żymańczyk, E., Klimek, M., Brzezińska, M., & Duda, M. (2016). Biochemistry - knowledge to practical applications - examples. *Basic biochemistry*.
https://www.researchgate.net/publication/321759280_Biochemistry_-_knowledge_to_practical_applications_-_examples
- Alves, J., Mario Da Rosa, G., Corteze, A., Wastowski, D., Hildebrand, H., & Wever da Silva, D. (2021). Biotecnología: identification and evaluation of the *Bacillus cereus* amylolytic activity. *Research, Society and Development*.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21301>
- Cabra, T., Rodríguez, A., & Villota, C. (2014). CAPACIDADE ANTAGONISTA E QUITINOLÍTICA DE MICROORGANISMOS ISOLADOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA MAMONEIRA (*Ricinus communis*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12.
<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/328/523>
- Canseco, M., Aráoz, M., Gusils, C., & Zossi, S. (2015). Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. *Revista Industrial y Agrícola de Tucuman*.
<http://www.scielo.org.ar/pdf/riat/v92n2/v92n2a05.pdf>
- Castro, R., Alvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la sociedad química del Perú*, 77. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000200002
- Govindrao, A., & Bassappa, A. (2018). Microbial Tools for environmental waste management. *IGI Global*. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-3540-9.ch002>
- Granados, M., Navarrete, J., & López, T. (2005). Páramos: Hidrosistemas Sensibles. *revista de ingeniería*.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-49932005000200008
- Hernández, D., & Lizarazo, L. (2015). BACTERIAS HETERÓTROFAS Y OLIGOTRÓFICAS EN ZONAS CONSERVADAS E INTERVENIDAS DEL

PÁRAMO DE LA CORTADERA, BOYACÁ, COLOMBIA. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.

<https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n2.2015.178>

Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A., & Cerra, M. (2014). Los Páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. *UICN, Quito, Ecuador*. www.uicn.org/sur

Ireland, N., & Trivandrum, K. (2009). *Biotechnology for AgroIndustrial Residues Utilisation*. Poonam Singh nee' Nigam · Ashok Pandey. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7>

Kumar, A. (2019). Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries: Enzymes in Industrial Food Processing. *Green Bio-processes*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_17

Lira, R., Méndez, B., & Santos, G. (2019). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta universitaria, Mexico*. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1575>

Lizarazo, P., & Gómez, D. (2014). MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DE *Espeletia* spp. DE LOS PÁRAMOS DE SANTA INÉS Y DE FRONTINO-URRAO EN ANTIOQUIA, COLOMBIA. *Acta Biológica Colombiana*. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42827> .

Llambí, L. D., Soto-W, A., Célleri, R., Bievre, B. De, Ochoa, B., & Borja, P. (2012). ECOLOGÍA, HIDROLOGÍA Y SUELOS DE PÁRAMOS. En *Los suelos de paramo*. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56480.pdf>

Lynd, lee R., Paul, W., & Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>

Malherble, S., & Cloete, T. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020858910646>

Martínez, E., & Fuentes, Juan Pablo Acevedo, E. (2008). CARBONO ORGÁNICO Y PROPIEDADES DEL SUELO. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*.

<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006> %0A

Pacheco, A. (2013). *EXTRACCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE QUITINA PARA LA PRODUCCIÓN*. <https://core.ac.uk/download/pdf/52647946.pdf>

Pinos, D., Morales, O., & Durán, M. (2021). Suelos de páramo: Análisis de percepciones de los servicios ecosistémicos y valoración económica del contenido de carbono en la sierra sureste del Ecuador. *Ciencias Ambientales*. <http://dx.doi.org/10.15359/rca.55-2.8>

Quintero, M., Montoya, O., & Gutierrez, P. (2009). *PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA α -AMILASA PRODUCIDA POR LA CEPA NATIVA *Bacillus* sp. BBM1*.

Rincon, C. (2013). *“ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE TRIGO EN SUELOS DE AGRICULTURA DE CONSERVACIÓN Y AGRICULTURA CONVENCIONAL*. INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.

Rinnan, R., & Baath, E. (2009). Differential Utilization of Carbon Substrates by Bacteria and Fungi in Tundra Soil. *American Society for Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02865-08>

Rodas, B., Quero, M., Magaña, H., & Reyes, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad quitino-Proteolítica de bacillus sp. aisladas de suelos tropicales. *Revisata Colombiana de Biotecnología*. https://www.researchgate.net/publication/26849646_Seleccion_de_cepas_nativas_con_actividad_Quitino-Proteolitica_de_Bacillus_sp_aisladas_de_suelos_tropicales_Selecting_native

Rodriguez, L., & Llenque, L. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*.

Sánchez, E., Heredia, J., Buitrago, S., & Medina, J. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Universidad Nacional de Colombia*. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>

- Sanchez, K., Mejia, C., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L., Zapata, N., & Gomez, M. (2005). ESTUDIO DE CEPAS NATIVAS AMIOLÓTICAS. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*.
<https://www.redalyc.org/pdf/1698/169813259003.pdf>
- Sastoque, C., Mercado, M., Martínez, M., Quevedo, B., & Pedroza, A. (2007). PRODUCCIÓN DE QUITINASAS EXTRACELULARES CON UNA CEPA ALCALÓFILA HALOTOLERANTE DE *Streptomyces* sp. AISLADA DE RESIDUOS DE CAMARÓN. *REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA*.
<https://www.redalyc.org/pdf/620/62060202.pdf>
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, L., & Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *Nacional Center for Biotechnology Information*. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>
- Singh, R., Kumar, S., Singh, M., & Sharma, I. (2020). Chitin, Chitinases and Chitin Derivatives in Biopharmaceutical, Agricultural and Environmental Perspective. *Biointerface Research in Applied Chemistry*.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC113.998510005>
- Tolozá, S. (2023). *Caracterización enzimática de bacterias aisladas de un compostaje doméstico con potencial aplicación en el aprovechamiento de residuos orgánicos*.
- Valle, U., Actividades, E. D. E., En, A., Capacidad, L. A., Del, S., Del, P., Valle, U., & Sumapaz, P. D. E. L. (2009). *Disponible en:*
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231116390004>.
- Vargas Ríos, O. (2013). Disturbios en los páramos andinos. *Instituto von Humboldt*.
https://www.researchgate.net/publication/260438569_Disturbios_en_los_paramos_andinos
- Vásquez, E., & Millones, C. (2023). Isolation and Identification of Bacteria of Genus *Bacillus* from Composting Urban Solid Waste and Palm Forest in Northern Peru. *Environmental Microbiology*.
- Viteri, P. A., Castillo, D. A., & Viteri, S. E. (2015). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *362 Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos / Biodiversity and Ecosystem Services*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>

- Zambrano, D. E., Guzmán, Á., & Rondón, A. J. (2011). AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CELULOSA Y ALMIDÓN. *EspamCiencia*.
http://revistasepam.esпам.edu.ec/index.php/Revista_ESPAMCIENCIA/article/view/173/173
- Żyłańczyk, E., Klimek, M., Brzezińska, M., & Duda, M. (2016). Biochemistry - knowledge to practical applications - examples. *Basic biochemistry*.
https://www.researchgate.net/publication/321759280_Biochemistry_-_knowledge_to_practical_applications_-_examples
- Alves, J., Mario Da Rosa, G., Corteze, A., Wastowski, D., Hildebrand, H., & Wever da Silva, D. (2021). Biotecnología: identification and evaluation of the *Bacillus cereus* amylolytic activity. *Research, Society and Development*.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21301>
- Cabra, T., Rodríguez, A., & Villota, C. (2014). CAPACIDADE ANTAGONISTA E QUITINOLÍTICA DE MICROORGANISMOS ISOLADOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA MAMONEIRA (*Ricinus communis*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12.
<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/328/523>
- Canseco, M., Aráoz, M., Gusils, C., & Zossi, S. (2015). Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. *Revista Industrial y Agrícola de Tucuman*.
<http://www.scielo.org.ar/pdf/riat/v92n2/v92n2a05.pdf>
- Castro, R., Alvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la sociedad química del Perú*, 77. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000200002
- Govindrao, A., & Bassappa, A. (2018). Microbial Tools for environmental waste management. *IGI Global*. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-3540-9.ch002>
- Granados, M., Navarrete, J., & López, T. (2005). Páramos: Hidrosistemas Sensibles.

revista de ingeniería.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-49932005000200008

- Hernández, D., & Lizarazo, L. (2015). BACTERIAS HETERÓTROFAS Y OLIGOTRÓFICAS EN ZONAS CONSERVADAS E INTERVENIDAS DEL PÁRAMO DE LA CORTADERA, BOYACÁ, COLOMBIA. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n2.2015.178>
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A., & Cerra, M. (2014). Los Páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. *UICN, Quito, Ecuador*. www.uicn.org/sur
- Ireland, N., & Trivandrum, K. (2009). *Biotechnology for AgroIndustrial Residues Utilisation*. Poonam Singh nee' Nigam · Ashok Pandey.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7>
- Kumar, A. (2019). Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries: Enzymes in Industrial Food Processing. *Green Bio-processes*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_17
- Lira, R., Méndez, B., & Santos, G. (2019). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta universitaria, Mexico*. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1575>
- Lizarazo, P., & Gómez, D. (2014). MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DE *Espeletia* spp. DE LOS PÁRAMOS DE SANTA INÉS Y DE FRONTINO-URRAO EN ANTIOQUIA, COLOMBIA. *Acta Biológica Colombiana*.
<https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42827> .
- Llambí, L. D., Soto-W, A., Céleri, R., Bievre, B. De, Ochoa, B., & Borja, P. (2012). ECOLOGÍA, HIDROLOGÍA Y SUELOS DE PÁRAMOS. En *Los suelos de paramo*. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56480.pdf>
- Lynd, lee R., Paul, W., & Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>

- Malherble, S., & Cloete, T. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*.
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020858910646>
- Martínez, E., & Fuentes, Juan Pablo Acevedo, E. (2008). CARBONO ORGÁNICO Y PROPIEDADES DEL SUELO. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006> %0A
- Pacheco, A. (2013). *EXTRACCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE QUITINA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS*. <https://core.ac.uk/download/pdf/52647946.pdf>
- Pinos, D., Morales, O., & Durán, M. (2021). Suelos de páramo: Análisis de percepciones de los servicios ecosistémicos y valoración económica del contenido de carbono en la sierra sureste del Ecuador. *Ciencias Ambientales*.
<http://dx.doi.org/10.15359/rca.55-2.8>
- Quintero, M., Montoya, O., & Gutierrez, P. (2009). *PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA α -AMILASA PRODUCIDA POR LA CEPA NATIVA *Bacillus* sp. *BBM1**.
- Rincon, C. (2013). *“ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE TRIGO EN SUELOS DE AGRICULTURA DE CONSERVACIÓN Y AGRICULTURA CONVENCIONAL*. INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
- Rinnan, R., & Baath, E. (2009). Differential Utilization of Carbon Substrates by Bacteria and Fungi in Tundra Soil. *American Society for Microbiology*.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02865-08>
- Rodas, B., Quero, M., Magaña, H., & Reyes, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad quitino-Proteolítica de bacillus sp. aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*.
https://www.researchgate.net/publication/26849646_Seleccion_de_cepas_nativas_con_actividad_Quitino-Proteolitica_de_Bacillus_sp_aisladas_de_suelos_tropicales_Selecting_native
- Rodriguez, L., & Llenque, L. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*.

- Sánchez, E., Heredia, J., Buitrago, S., & Medina, J. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Universidad Nacional de Colombia*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>
- Sanchez, K., Mejia, C., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L., Zapata, N., & Gomez, M. (2005). ESTUDIO DE CEPAS NATIVAS AMIOLÍTICAS. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*.
<https://www.redalyc.org/pdf/1698/169813259003.pdf>
- Sastoque, C., Mercado, M., Martínez, M., Quevedo, B., & Pedroza, A. (2007). PRODUCCIÓN DE QUITINASAS EXTRACELULARES CON UNA CEPA ALCALÓFILA HALOTOLERANTE DE *Streptomyces* sp. AISLADA DE RESIDUOS DE CAMARÓN. *REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA*.
<https://www.redalyc.org/pdf/620/62060202.pdf>
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, L., & Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *Nacional Center for Biotechnology Information*. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>
- Singh, R., Kumar, S., Singh, M., & Sharma, I. (2020). Chitin, Chitinases and Chitin Derivatives in Biopharmaceutical, Agricultural and Environmental Perspective. *Biointerface Research in Applied Chemistry*.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC113.998510005>
- Tolosa, S. (2023). *Caracterización enzimática de bacterias aisladas de un compostaje doméstico con potencial aplicación en el aprovechamiento de residuos orgánicos*.
- Valle, U., Actividades, E. D. E., En, A., Capacidad, L. A., Del, S., Del, P., Valle, U., & Sumapaz, P. D. E. L. (2009). *Disponible en:*
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231116390004>.
- Vargas Ríos, O. (2013). Disturbios en los páramos andinos. *Instituto von Humboldt*.
https://www.researchgate.net/publication/260438569_Disturbios_en_los_paramos_andinos
- Vásquez, E., & Millones, C. (2023). Isolation and Identification of Bacteria of Genus *Bacillus* from Composting Urban Solid Waste and Palm Forest in Northern Peru. *Environmental Microbiology*.

- Viteri, P. A., Castillo, D. A., & Viteri, S. E. (2015). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *362 Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos / Biodiversity and Ecosystem Services*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>
- Zambrano, D. E., Guzmán, Á., & Rondón, A. J. (2011). AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CELULOSA Y ALMIDÓN. *EspamCiencia*.
http://revistasepam.esпам.edu.ec/index.php/Revista_ESPAMCIENCIA/article/view/173/173
- Żymańczyk, E., Klimek, M., Brzezińska, M., & Duda, M. (2016). Biochemistry - knowledge to practical applications - examples. *Basic biochemistry*.
https://www.researchgate.net/publication/321759280_Biochemistry_-_knowledge_to_practical_applications_-_examples

