



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**E. A. P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS CON  
ACTIVIDAD CELULOLÍTICA AISLADAS DEL LÍQUIDO  
RUMINAL Y ESTIÉRCOL DE GANADO VACUNO, CAJAMARCA  
2022**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**BACH. SARA RAQUEL BRIONES RAMÍREZ**

**ASESORA:**

**Dra. CLAUDIA CAROLINA RODRÍGUEZ ULLOA**

**CO-ASESORES:**

**M. Cs. Mblgo. OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ**

**MV. CRISTIAN ÁNGEL HOBÁN VERGARA**

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2024**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria - JQ - 115 - Av. Atahualpa Nº 1051-Cajamarca -

☎ 076-595227 📠 anexo 1272



La Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Cajamarca, Doctora Martha Vicenta Abanto Villar que suscribe, deja

## CONSTANCIA

Que, la tesis titulada **CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA AISLADAS DEL LÍQUIDO RUMINAL Y ESTIÉRCOL DE GANADO VACUNO, CAJAMARCA - 2022**, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas **SARA RAQUEL BRIONES RAMÍREZ**, ha sido revisada en el Software Antiplagio **TURNITIN** de la Universidad Nacional de Cajamarca, obteniendo un puntaje de 18% de similitud, considerado dentro de los parámetros requeridos. Teniendo como Asesora a la Docente **Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa**, Co- Asesor **M.Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz** y **M.V. Cristian Ángel Hobán Vergara**.

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que considere convenientes.

Cajamarca, 29 de febrero del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
*Dr. Martha Vicenta Abanto Villar*  
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

COPYRIGHT ©

**SARA RAQUEL BRIONES RAMÍREZ**

Todos los derechos reservados

## FICHA CATALOGRÁFICA

Briones, S. 2023. **Caracterización microbiológica de bacterias con actividad celulolítica aisladas del líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno, Cajamarca 2022**/ Sara Raquel Briones Ramírez

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co-asesores: M. Cs. Mblgo. Omar Daniel Pairazamán Quiroz / MV. Cristian Ángel Hobán Vergara

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo  
UNC -2024

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS CON  
ACTIVIDAD CELULOLÍTICA AISLADAS DEL LÍQUIDO RUMINAL Y  
ESTIÉRCOL DE GANADO VACUNO, CAJAMARCA 2022**

**AUTOR:** Bach. Sara Raquel Briones Ramírez

**ASESORA:** Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

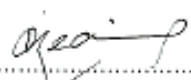
**CO-ASESORES:** M. Cs. Mblgo. Omar Daniel Pairazamán Quiroz / MV. Cristian Ángel  
Hobán Vergara

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo  
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

**JURADO EVALUADOR**

  
.....  
PRESIDENTE  
M.Cs. Rodolfo Raúl Orejuela

  
.....  
SECRETARIA (O)  
M. Cs. Arturo Díaz Aliaga

  
.....  
VOCAL  
Dra. Carmen Eddy Medina Rodríguez

Cajamarca, 2024 – Perú



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Alzhuaga 1650

Teléfono/ Fax 36-3345



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 05:30 pm del 05 de Febrero del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 18102 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Caracterización microbiológica de bacterias con actividad celulolítica aisladas de líquido ruminal y estirpe de ganado vacuno, Cajamarca 2022

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Sara Raquel Batoris Rautroz

Siendo las 06:20 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: Muy bueno, con el calificativo de: 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas, se encuentra apta para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador		Firma
Nombres y Apellidos		
Presidente:	MCS <u>Rodolfo Raúl Orejuela Chimpos</u>	<u>[Firma]</u>
Secretario(a):	MCS <u>Arturo Díaz Alaga</u>	<u>[Firma]</u>
Vocal:	Bra. <u>Carmen Eddy Medica Redupuz</u>	<u>[Firma]</u>
Accesitaria:	—	—
Asesor (a):	Bra. <u>Claudia Rodríguez Ulloa</u>	<u>[Firma]</u>
Asesor (a):	—	—

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)

REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Dedico esta tesis a mis padres y a mis hermanos, quienes en todo momento me brindaron su apoyo incondicional y la motivación necesaria para alcanzar esta meta tan anhelada en mi vida. Sus consejos siempre acertados me permitieron enfrentar todas las dificultades que se presentaron a lo largo del desarrollo de esta investigación, y así nunca quitar la mirada del objetivo final.

## **Agradecimiento**

A Dios, quien me brindó toda la fortaleza necesaria y me permitió llegar hasta este momento; a mis padres y hermanos, quienes son mis mejores guías de vida y el motor que me impulsa a alcanzar todos mis objetivos propuestos, por su apoyo incondicional y los consejos que me brindaron durante todo este importante camino en mi vida profesional.

A mi asesora, la Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa, mis Co- Asesores el MCs. Mblgo. Omar Pairazamán y el MV. Cristian Hobán, y al Dr. Marco Rivera, quienes me brindaron su apoyo en todo momento, y que gracias a sus conocimientos y experiencia me fue posible culminar exitosamente este trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y consejos en los momentos en los que las dudas se hacían presentes durante la ejecución de este trabajo de investigación.



## TABLA DE CONTENIDOS

TÍTULO .....	xv
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO II.....	3
MARCO TEÓRICO .....	3
2.1    Antecedentes de la investigación.....	3
2.2    Bases teóricas .....	7
2.2.1    Celulosa.....	7
2.2.2    Degradación de la celulosa .....	9
2.2.3    Microorganismos productores de celulasas .....	10
2.2.3.1    Determinación de la actividad celulolítica .....	12
2.2.4    Rumiantes .....	14
2.2.4.1    Bovinos .....	14
2.2.4.2    Aparato digestivo .....	15
2.2.4.3    Líquido ruminal.....	17
2.2.4.3.1    Microorganismos ruminales .....	17
2.2.4.4    Estiércol.....	19
2.2.4.4.1    Microorganismos del estiércol.....	19
2.2.5    Bacterias celulolíticas ruminales.....	20
2.2.6    Bacterias celulolíticas del estiércol .....	20
2.2.7    Identificación bacteriana .....	21
2.2.7.1    Identificación fenotípica.....	21
2.2.7.2    Identificación molecular.....	21
CAPÍTULO III.....	23
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS .....	23
3.1    Diseño de investigación.....	23
3.2    Diseño metodológico.....	23
3.2.1    Localización del lugar de muestreo .....	23
3.2.2    Material biológico .....	23
3.2.3    Recolección de material biológico.....	23
3.2.4    Aislamiento de bacterias de líquido ruminal y estiércol .....	24

3.2.5	Selección de bacterias con actividad celulolítica .....	25
3.2.6	Caracterización de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica.	25
3.2.6.1	Caracterización morfológica e identificación bioquímica .....	25
3.2.6.2	Identificación molecular.....	26
3.2.6.2.1	Extracción de ADN mediante shock térmico .....	26
3.2.6.2.2	Evaluación de la calidad de ADN extraído.....	26
3.2.6.2.3	Amplificación del gen 16S ARNr.....	27
3.2.6.2.4	Electroforesis en gel de agarosa .....	27
3.2.6.2.5	Secuenciación del gen 16S ARNr.....	28
3.2.6.2.6	Alineamiento y obtención de secuencias consenso .....	28
3.2.6.2.7	Análisis Filogenético .....	28
3.2.7	Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica de las bacterias.....	29
3.2.8	Análisis estadístico.....	30
CAPÍTULO IV .....		31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		31
4.1	Resultados.....	31
4.1.1	Selección de bacterias con actividad celulolítica .....	31
4.1.2	Caracterización de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica.	33
4.1.2.1	Caracterización morfológica macroscópica y microscópica.....	33
4.1.2.2	Identificación bioquímica de los aislamientos bacterianos celulolíticos	36
4.1.2.3	Identificación molecular de los aislamientos bacterianos celulolíticos	38
4.1.3	Determinación de la actividad celulolítica de los aislamientos bacterianos	41
4.2	Discusión .....	43
CAPÍTULO V.....		52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		52
5.1	Conclusiones.....	52
5.2	Recomendaciones .....	53
LISTA DE REFERENCIAS .....		54
APÉNDICES Y ANEXOS .....		72
APÉNDICES .....		72
Apéndice 1. Lugar de muestreo .....		72
Apéndice 2. Toma de muestras .....		72
Apéndice 3. Condiciones de transporte de muestras.....		73
Apéndice 4. Cultivo inicial de bacterias celulolíticas .....		73

Apéndice 5. Evaluación de la actividad celulolítica en medio mínimo suplementado con 1% de CMC. ....	74
Apéndice 6. Valoración de la actividad celulolítica de los aislamientos bacterianos seleccionados.....	74
Apéndice 7. Pruebas bioquímicas .....	75
Apéndice 8. Cromatograma de secuencia del gen 16S ARNr .....	76
Apéndice 9. Curva patrón de glucosa.....	77
Apéndice 10. Análisis estadístico .....	77
ANEXOS .....	80
Anexo 1. Composición del medio para selección de bacterias celulolíticas.....	80
Anexo 2. Composición del medio de fermentación .....	80
Anexo 3. Ecuación para determinar la actividad enzimática .....	80

## LISTA DE ILUSTRACIONES

- Figura 1.** Diagrama de un segmento de la molécula de celulosa: cada unidad de glucosa gira 180° con respecto a la anterior, unidos mediante enlaces de hidrógeno (H) que estabilizan la hebra (Blanco y Blanco, 2017). ..... 8
- Figura 2.** Esquema de la hidrólisis enzimática de la celulosa: la endoglucanasa produce cortes aleatorios en una posición interna de la celulosa liberando celooligosacáridos, las exoglucanasas o celobiohidrolasas actúan sobre los extremos de la cadena liberando celobiosa que interactúa con la  $\beta$ -glucosidasa para liberar glucosa (Xie et al., 2007). .. 10
- Figura 3.** Esquema del celulosoma del modelo *C. thermocellum*. El conjunto extracelular multienzimático está unido a la pared celular a través de un módulo similar a la homología de la capa superficial (SLH) de andamio de anclaje y las cohesinas y dockerinas tipo II, el módulo de unión a celulosa (CBM3a) del andamio primario localiza al sustrato celulósico y las enzimas que se unen a cohesinas homólogas (Coh) tipo I por interacción con dockerinas tipo I (Doc) permitiendo la degradación de la celulosa (Yaniv et al., 2014). ..... 11
- Figura 4.** Esquema del aparato digestivo de un rumiante (Grilli, 2015)..... 16
- Figura 5.** Observación macroscópica y microscópica de los aislamientos, la columna 1 muestra colonias en medio CMC y la columna 2 tinción Gram: a) LR2E, b) LR3A, c) LR3B, d) LR5A, e) E4C, f) E4H. .... 34
- Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen 16S ARNr de los 11 aislamientos obtenidos. .... 38
- Figura 7.** Árbol filogenético de las secuencias 16S ARNr de los aislamientos de líquido ruminal, marcados con un triángulo rojo, comparados con las secuencias homólogas del GenBank. .... 40
- Figura 8.** Árbol filogenético de las secuencias 16S ARNr de los aislamientos de estiércol, marcados con un triángulo rojo, comparados con secuencias homólogas del GenBank. .... 41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características morfométricas, función, fuentes de energía y productos finales de las principales bacterias ruminales.....	18
<b>Tabla 2.</b> Métodos de identificación microbiana.....	22
<b>Tabla 3.</b> Aislamientos de líquido ruminal que expresan actividad celulolítica agrupados en base a la medida de la zona de hidrólisis.....	31
<b>Tabla 4.</b> Aislamientos de estiércol que expresan actividad celulolítica agrupados en base a la medida de la zona de hidrólisis.....	32
<b>Tabla 5.</b> Características macroscópicas de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica en Medio Mínimo Suplementado 1% CMC.....	35
<b>Tabla 6.</b> Características microscópicas de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica.....	36
<b>Tabla 7.</b> Características bioquímicas de los aislamientos bacterianos celulolíticos.....	37
<b>Tabla 8.</b> Análisis de secuencias consenso con la herramienta BLASTn del NCBI.....	39
<b>Tabla 9.</b> Actividad celulolítica (U/mL) de los 11 aislamientos bacterianos obtenidos. .	42

## LISTA DE ABREVIACIONES

CMC	Carboximetilcelulosa
NaCl	Cloruro de sodio
g	Gramos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
°C	Grados Celsius
mm	Milímetros
h	Horas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosomal
PCR	Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris Borato EDTA
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version
DNS	3,5-Dinitrosalicic acid

## **GLOSARIO**

### **Biomoléculas**

Son moléculas orgánicas importantes para la supervivencia de las células vivas, ya que desencadenan reacciones bioquímicas esenciales; y se pueden clasificar en macromoléculas como proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y enzimas; y micromoléculas como aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, neurotransmisores y hormonas (Kumar, Narnoliya y Alok, 2019; Suresh *et al.*, 2019).

### **Polímero**

Sustancia natural o sintética que consta de macromoléculas compuestas de subunidades repetitivas vinculadas, llamadas monómeros. Los polímeros orgánicos juegan un papel crucial en los seres vivos, proporcionando materiales estructurales básicos y participando en procesos vitales; como las partes sólidas de las plantas compuestas por polímeros como celulosa, lignina y varias resinas (Encyclopedia Britannica, 2023).

### **Carboximetilcelulosa**

Derivado de la celulosa que contiene grupos carboximetilo, es soluble en agua, renovable, biodegradable, no tóxico y susceptible a la actividad hidrolítica de celulasas siendo un aditivo útil para detectarla (McDonald, Rooks y McCarthy, 2012; Noreen *et al.*, 2020).

### **Hidrólisis enzimática**

Proceso de digestión en el que macromoléculas se dividen en compuestos más simples por la adición enzimática en medio acuoso (Yin *et al.*, 2012).

### **Microorganismos coprófilos**

Microorganismos que crecen o viven en el estiércol (Collins English Dictionary, 2019).

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS CON  
ACTIVIDAD CELULOLÍTICA AISLADAS DEL LÍQUIDO RUMINAL Y  
ESTIÉRCOL DE GANADO VACUNO, CAJAMARCA 2022**



## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar bacterias con actividad celulolítica aisladas del líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno de Cajamarca, Perú. Para ello, se tomaron muestras de líquido ruminal y estiércol en forma aleatoria de cinco vacunos adultos beneficiados en el Camal Municipal de Cajamarca, las cuales fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca para su procesamiento y análisis. Todas las muestras se homogenizaron y diluyeron en serie, incubando las diluciones de líquido ruminal a 38 °C durante 1 hora y las de estiércol a 37 °C durante 20 minutos; luego de este tiempo, se inocularon en placas que contenían medio mínimo suplementado con 1% de CMC, las cuales se incubaron durante 48 horas a 38 °C las placas de líquido ruminal y a 37 °C las de estiércol. La capacidad de las bacterias para producir celulasas se evidenció por la formación de un halo de hidrólisis, obteniéndose un total de 11 aislamientos bacterianos que mostraron zonas de hidrólisis mayores e iguales a 3 mm de diámetro, los cuales fueron caracterizados a través de la observación de sus características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y moleculares a través de la amplificación del gen 16S ARNr y su secuenciación en MacroGen - Chile. Además, se cuantificó su actividad celulolítica utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los resultados mostraron que todas las bacterias procedentes de líquido ruminal pertenecen al género *Bacillus* y los aislamientos procedentes de estiércol pertenecen a los géneros *Escherichia* y *Pantoea*, observándose que la actividad celulolítica de los aislamientos de líquido ruminal fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a la actividad celulolítica de los aislamientos de estiércol, y que la mayor actividad enzimática de las bacterias ruminales y de estiércol correspondieron a los códigos LR3E del género *Bacillus* con  $2.1643 \pm 0.0488$  U/mL y E4H del género *Pantoea* con  $0.3975 \pm 0.0157$ , respectivamente. Concluyendo que las bacterias celulolíticas aisladas del líquido

ruminal pertenecientes al género *Bacillus* son más eficientes en la degradación de celulosa y producción de celulasas.

**Palabras clave:** celulasas, bacterias celulolíticas, ganado vacuno, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pantoea*

## ABSTRACT

The objective of this research was to characterize bacteria with cellulolytic activity isolated from ruminal fluid and manure of cattle from Cajamarca, Peru. To do this, samples of ruminal fluid and manure were taken randomly from five benefited adult cattle in the Camal Municipal de Cajamarca, which were transported to the Microbiology Laboratory of the National University of Cajamarca for processing and analysis. All the samples were homogenized and diluted in serie, incubating the ruminal fluid dilutions at 38 °C for 1 hour and those of manure at 37 °C for 20 minutes; after this time, plates containing minimal medium supplemented with 1% CMC were inoculated, which were incubated for 48 hours at 38 °C for the ruminal fluid plates and at 37 °C for the manure plates. The ability of bacteria to produce cellulases was evidenced by the formation of a hydrolysis halo, obtaining a total of 11 bacterial isolates that showed hydrolysis zones greater and equal than 3 mm in diameter, which were characterized by observing their characteristics macroscopic, microscopic, biochemical and molecular through the amplification of the 16S rRNA gene and its sequencing at Macrogen - Chile. In addition, their cellulolytic activity was quantified using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). The results showed that all the bacteria from rumen fluid belong to the genus *Bacillus* and the isolates from manure belong to the genera *Escherichia* and *Pantoea*, observing that the cellulolytic activity of the rumen fluid isolates was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the cellulolytic activity of the manure isolates, and that the higher enzymatic activity of the rumen and manure bacteria correspond to the codes LR3E of the genus *Bacillus* with  $2.1643 \pm 0.0488$  U/mL and E4H of the genus *Pantoea* with  $0.3975 \pm 0.0157$ , respectively. Concluding that cellulolytic bacteria isolated from rumen fluid belonging to the genus *Bacillus* are more efficient in the degradation of cellulose and production of cellulases.

**Keywords:** cellulases, cellulolytic bacteria, cattle, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pantoea*

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La celulosa es un biopolímero estructural que forma parte de las paredes celulares de las plantas y que se encuentra en la mayoría de residuos orgánicos. Esta biomasa vegetal es un recurso renovable que se utiliza a nivel nacional y mundial en diversas industrias, para convertirla en productos de valor agregado y energía (Ministerio de Agricultura, 2009; García, 2013; Erba *et al.*, 2020). Su degradación se realiza mediante hidrólisis que, si bien puede ser ácida, el método enzimático que emplea celulasas es el más utilizado a nivel industrial por su mayor rendimiento y reducción de la formación de inhibidores en la fermentación y la corrosión del equipo (Vieira *et al.*, 2016). Es por ello que, en la actualidad existe una alta demanda de celulasas en la industria textil, alimentaria, farmacéutica y ambiental; sin embargo, los costos de producción son altos debido a que se utilizan sustratos puros comerciales y microorganismos con tasas de crecimiento no muy altas; además de los grandes gastos que se generan para mantener la estabilidad de las celulasas en su uso industrial (Menendez, Garcia y Rivas, 2015; Singh *et al.*, 2019).

Actualmente se sabe que los microorganismos más utilizados para la producción de celulasas son los hongos celulolíticos, pero estos poseen menor tasa de crecimiento con respecto a las bacterias celulolíticas, de allí la importancia de explorar nuevas cepas bacterianas que tengan alta producción enzimática y sean capaces de consumir fuentes de carbono poco costosas (Singh *et al.*, 2019). Es así que, residuos como el contenido ruminal y estiércol generados por la ganadería, una de las principales actividades económicas de la región Cajamarca, representan excelentes entornos para detectar bacterias celulolíticas procedentes de animales cuyas dietas son ricas en fibra vegetal. Sin embargo, los estudios sobre la identificación de bacterias celulolíticas presentes en el

líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno no están disponibles en nuestra región y en el resto del Perú aún son escasos (Cahuana, 2012; Carhuapoma-Delacruz *et al.*, 2022).

Ante todo lo expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar bacterias con actividad celulolítica aisladas del líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno de la región Cajamarca; y de esta manera se obtuvo como resultado un primer registro de bacterias productoras de celulasas aisladas de desechos de la actividad ganadera en nuestra región, conociendo las características morfológicas, bioquímicas y enzimáticas de las poblaciones bacterianas degradadoras de celulosa, cultivables, que habitan el contenido ruminal y el estiércol de bovinos en Cajamarca.

La caracterización de estas bacterias, constituye una base para la línea de investigación en producción de celulasas por microorganismos procedentes de residuos ganaderos; abriéndose un abanico de posibilidades para estudios posteriores en optimización de la producción enzimática, uso de sustratos de bajo costo e incursión en el mercado de los bioproductos y biocombustibles; que impactarán favorablemente en el desarrollo sostenible de nuestra región.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la investigación

Diversas investigaciones están orientadas a la caracterización de bacterias productoras de celulasas tanto de contenido ruminal como de estiércol. En un estudio realizado en Bangladesh, aislaron, identificaron y caracterizaron bioquímicamente bacterias con actividad celulolítica de líquido ruminal de ganado vacuno sacrificado en el matadero de Kajitula, Sylhet City Corporation, en medios suplementados con carboximetilcelulosa (CMC); encontrando un aislamiento identificado como *Pseudomona* spp., con un índice celulolítico de + 2,5 cm calculado por el diámetro de la zona clara en medio sólido; con valores máximos de actividad celulolítica de 0, 21 U/mL a 37°C, 0, 053 U/mL a las 48h y pH 7 en medio líquido, y con máxima degradación del papel de filtro en el ensayo enzimático al segundo día de incubación. Concluyendo que, *Pseudomonas* es un buen productor de la enzima celulasa extracelular pudiendo ser beneficiosa para la degradación de los contaminantes celulósicos del medio ambiente (Poly *et al.*, 2022).

Una investigación desarrollada en Indonesia tuvo como objetivo aislar e identificar especies bacterianas celulolíticas de rumen bovino y enzimas proteolíticas del fluido de rumen ovino, obtenidos del matadero en el área de Bandung y Bogor. En el caso de las muestras de líquido ruminal bovino, utilizaron diluciones al décimo y cultivos aeróbicos en medio CMC para el aislamiento, tinción Gram, observación macroscópica y el Kit API 50 CHL para la identificación; además de la tinción con Rojo Congo 0, 1 % y la Prueba de Yodo para cuantificar la actividad celulolítica. Se obtuvo como resultado trece colonias de bacterias celulolíticas de las cuales dos, CM2 y CM5, *Bacillus megaterium* y *Bacillus mycoides*, respectivamente, mostraron el índice celulolítico más alto, CM2 con un índice de 3,0 y diámetro de la zona clara de 1,20 cm, y CM5 con índice de 3,5 y 1,40

cm de zona clara. Los investigadores concluyeron que las bacterias celulolíticas aisladas exitosamente del líquido ruminal de ganado vacuno con puntajes de 3,0 y 3,5 pertenecen al género *Bacillus*; además, demostraron que el fluido ruminal tiene la posibilidad de ser un biodegradador de materiales alimentarios en acuicultura, los cuales contienen altos niveles de celulosa (Andriani y Pratiwy, 2020).

De igual manera, en un estudio ejecutado en Etiopía, aislaron e identificaron bacterias productoras de celulasas del fluido ruminal de bovinos, ovinos y caprinos del matadero de la ciudad de Haramaya, y evaluaron, paja de trigo, paja de sorgo y bagazo para la producción de celulasa, utilizando CMC como estándar. Los resultados mostraron una potencial bacteria degradadora de celulosa aislada del fluido ruminal vacuno, HUC-4b, identificada mediante microscopía y pruebas bioquímicas como *Aeromonas* spp., que produjo las más altas concentraciones de carboximetilcelulasa (CMCasa) y papelasa de filtro (FPasa) con  $2,31 \pm 0,17$  U/mL y  $1,50 \pm 0,02$  U/mL respectivamente, a partir de la fermentación de 1% y 2% de paja de trigo, en comparación a los aislados de rumen de ovino y caprino que correspondían a *Pseudomonas* spp. Concluyeron que la fermentación de paja de trigo al 1% y 2% por *Aeromonas* puede utilizarse para una máxima producción de celulasa; además, indican la necesidad de la identificación molecular de las especies bacterianas aisladas y seleccionadas (Erba *et al.*, 2020).

Investigadores de Sri Lanka aislaron una cepa bacteriana termoestable productora de celulasa alcalina de diversas fuentes naturales, como excretas de cabra, estiércol de vaca, suelo tropical y materia orgánica. Las bacterias aisladas inicialmente, fueron evaluadas para detectar actividad celulolítica utilizando diluciones en serie y el vertido en placa de medio con CMC, y así continuar con su caracterización. El aislado bacteriano obtenido del estiércol de vaca presentó la mayor capacidad hidrolítica de CMC, se identificó como *Bacillus* spp. de acuerdo al análisis morfológico, bioquímico y cultural, estrechamente

relacionado con *Bacillus cereus* (GenBank número de acceso AF290555) en base a la amplificación y secuenciamiento del gen 16S ARNr, además el aislado mostró una cinética de orden cero durante 20 minutos con un pH óptimo para la actividad de la celulasa de 9,0 a 45 °C. Concluyendo que, como la celulasa de *B. cereus* fue estable durante más de una hora a 45°C y en valores alcalinos de pH, esta podría ser un buen candidato para aplicaciones industriales (Croos, Rajendran y Ranganathan, 2019).

En Nigeria, investigadores estudiaron el potencial de las muestras de estiércol de vaca para albergar bacterias biotecnológicamente relevantes capaces de producir celulasa. Para ello, recolectaron muestras de estiércol de vaca y aserrín en recipientes utilizando una espátula, ambos estériles, de diferentes lugares dentro del establo en la granja de la Universidad de Calabar. Las bacterias celulolíticas fueron aisladas en medio sólido con CMC 1% para detectar zonas de hidrólisis y siembras en caldo con CMC para evaluar la producción de celulasas. Los resultados revelaron que solo 5 aislados bacterianos demostraron producción de celulasas, todos pertenecientes al género *Bacillus* por sus características morfológicas y fisiológicas; sin embargo, solo uno de ellos, CDS4, fue el más productivo, con valores de 128,52 U/mL a las 72 horas de incubación a 30°C y pH 6,5 utilizando sacarosa y sulfato de amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. De este modo, los investigadores concluyeron que la celulasa producida por *Bacillus* sp. CDS4 puede tener excelentes aplicaciones en diversas industrias, como el procesamiento de jeans y del papel; y que, un estudio de optimización aumentaría aún más la producción de celulasa por parte de este microorganismo (Asitok *et al.*, 2019).

En la zona agrícola de Ahmednagar en India, se aislaron, identificaron y detectaron bacterias con alta actividad celulasa a partir de estiércol de vaca; a través de siembras en medios de cribado con CMC, caracterización morfológica y bioquímica; además, optimizaron la producción de celulasa y determinación de su actividad específica. Se



detectó una especie celulolítica identificada como *Bacillus* spp., que produjo la máxima cantidad de celulasa a 37 °C, pH 7 y a las 72 horas; con una actividad enzimática óptima a 45°C, pH 5, y durante 15 min de incubación con CMC como sustrato; asimismo, esta bacteria mostró el 40,03% de rendimiento con una actividad específica de 15,31 unidades/mg después de la cromatografía de intercambio iónico. Por lo que, es necesario más estudios para optimizar la producción enzimática, aumentando la productividad y reduciendo costos (Deshmukh, Bhagat y More, 2018).

Al mismo tiempo, una investigación en India caracterizó nuevos aislados bacterianos capaces de degradar eficazmente la celulosa a partir de muestras de estiércol de ganado de Sagar. Se detectaron 10 aislamientos con actividad celulasa en medio CMC, de las cuales seleccionaron tres para continuar con la caracterización mediante tinción Gram, pruebas bioquímicas y uso de carbohidratos, y secuenciación del gen 16S ARNr; encontrando que los aislados AKPCD108, AKPCD109 y AKPBD1 estaban estrechamente relacionados con *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Serratia marcescens*, respectivamente. Sin embargo, los autores indican que es necesaria una investigación adicional para conocer el potencial de las cepas o maximizar la producción de celulasa y degradación de residuos agrícolas, concluyendo que el estiércol de ganado puede ser una muy buena fuente para aislar bacterias productoras de celulasa y aplicarlas en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica (Vyas y Kumar, 2018).

En el Perú, recientemente investigadores aislaron y evaluaron el potencial degradador *in vitro* de celulosa de las bacterias ruminales celulíticas de alpaca, ovino y vacuno, a partir de muestras obtenidas del matadero municipal de Huancavelica, Perú. Los resultados indicaron la presencia de las bacterias *Fibrobacter succinogenes*, *F. succinogenes elongata*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, por sus características microbiológicas y bioquímicas, en el líquido ruminal de todos los animales muestreados, evidenciando su

alta capacidad de degradación de celulosa con halos mayores a 14 mm; sin embargo, la frecuencia de estas bacterias en el líquido ruminal vacuno es menor respecto a la alpaca y ovino; además, la capacidad degradativa de cada bacteria encontrada varía respecto a su origen, siendo las más productoras aquellas procedentes del rumen de alpaca, en el caso del rumen vacuno solo se encontró alta capacidad en *F. succinogenes elongata* con un 50,0 %. Este hallazgo indica que los líquidos ruminales de alpaca, vacuno y ovino son excelentes fuentes de bacterias productoras de celulosa con alta capacidad degradadora de celulosa, y que las cepas de alpaca demostraron ser más eficientes para aplicaciones biotecnológicas (Carhuapoma-Delacruz *et al.*, 2022).

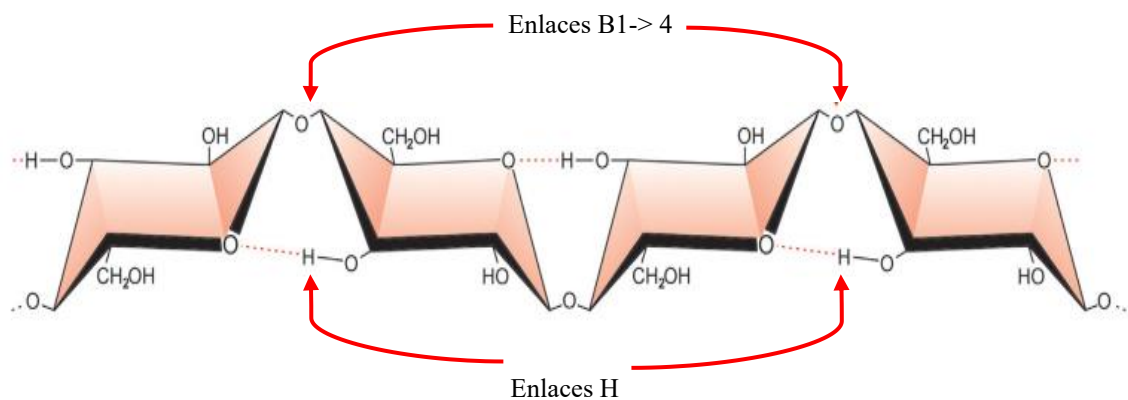
## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Celulosa**

La celulosa es la biomolécula más abundante del planeta, considerada como materia prima renovable; este polisacárido es sintetizado principalmente por las plantas superiores y se encuentra formando parte de una matriz compuesta por hemicelulosa, lignina y otros componentes de la pared celular desempeñando función estructural y de resistencia en las plantas, y que posee un 60% de retención de agua, característica que hace difícil su extracción y purificación; sin embargo, es posible encontrarla en un estado casi puro como en las semillas de algodón. Además, la celulosa también puede ser producida por algunos hongos, algas y bacterias como *Gluconacetobacter xylinus* anteriormente denominado *Acetobacter xylinum* (Ergun, Guo y Huebner-Keese, 2015; Brigham, 2017).

Estructuralmente, la celulosa es un polímero lineal compuesto por unidades repetitivas de anillos de glucosa; molecularmente se compone de bloques repetidos de  $\beta$ -D-glucopiranosil que están unidos covalentemente por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos entre los grupos C1-OH del extremo reductor que está en equilibrio con la estructura del aldehído y el grupo C4-OH en el extremo no reductor; el enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico crea una

conformación extendida y rígida con cada anillo de glucosa a  $180^\circ$  del siguiente anillo (Figura 1). Su composición simple de miles de unidades de glucosa idénticas, forman cadenas de glucanos, las cuales se agregan en paralelo mediante enlaces de hidrógeno para formar láminas cristalinas de celulosa ensambladas mediante interacciones de Van der Waals altamente compactas y completamente extendidas formando fibrillas elementales, luego estas se ensamblan en unidades más grandes, y forman microfibrillas, que a su vez se empaquetan en fibras, este homopolímero de cadena lineal altamente empaquetado es responsable de la estabilidad de la celulosa y su insolubilidad acuosa (Ergun, Guo y Huebner-Keese, 2015; Blanco y Blanco, 2017; Brigham, 2017). Por otro lado, posee 4 formas de estructuras cristalinas que se obtienen por tratamientos químico-físicos de la celulosa nativa o forma I, que es la más abundante y se encuentra principalmente en las plantas. Es necesario recalcar que su peso molecular y grado de polimerización dependerán de la fuente y tratamiento (Ergun, Guo y Huebner-Keese, 2015).



**Figura 1.** Diagrama de un segmento de la molécula de celulosa: cada unidad de glucosa gira  $180^\circ$  con respecto a la anterior, unidos mediante enlaces de hidrógeno (H) que estabilizan la hebra (Blanco y Blanco, 2017).

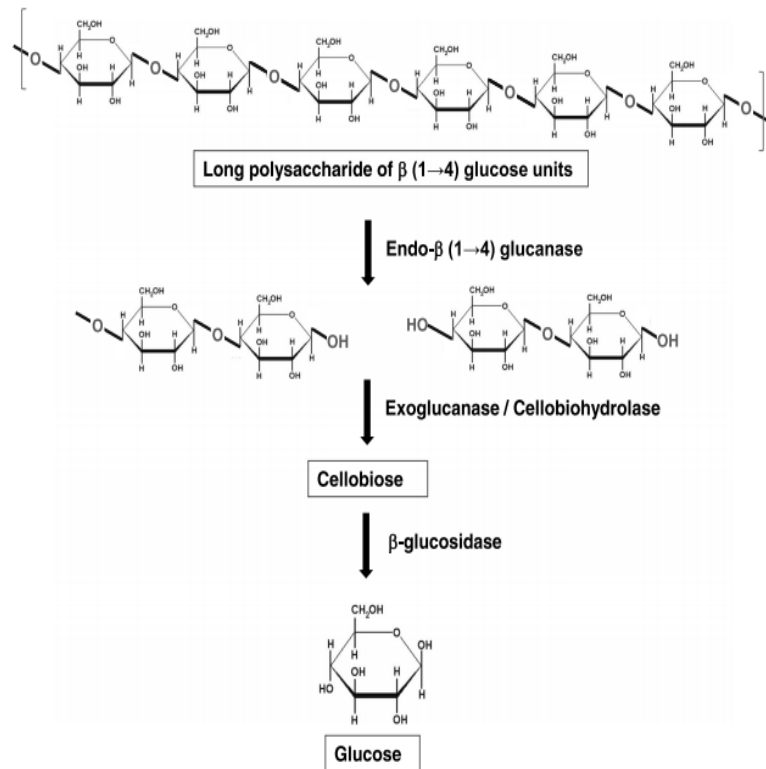
Las aplicaciones de la celulosa de origen vegetal y bacteriano son diversas y dependen del tipo de celulosa que se utilice. Se conoce que es el componente principal del papel,

así como de los textiles hechos de algodón, lino y otras fibras vegetales. La celulosa microcristalina se utiliza como relleno en la industria farmacéutica y alimentaria como la carboximetilcelulosa, también puede convertirse en celofán o nitrocelulosa para su uso fotográfico y doméstico, respectivamente, así como en pólvora. La nanocelulosa, o celulosa nanocristalina presenta estructuras a escala nanométrica, como fibras o cristales, que la hacen adecuada para aplicaciones en la fotónica u optoelectrónica, electrónica y materia prima para el envasado de alimentos (Brigham, 2017).

### **2.2.2 Degradación de la celulosa**

La degradación de la celulosa consiste en la hidrólisis enzimática de los enlaces  $\beta$ -1,4 presentes en su estructura y que debido a su naturaleza insoluble y cristalina es necesaria la acción sinérgica de un conjunto de enzimas del sistema enzimático celulolítico sintetizadas por microorganismos, denominadas celulasas, que se clasifican con base a su actividad enzimática como endoglucanasas, exoglucanasas (celodextrinasas o celobiohidrolasas), y  $\beta$ -glucosidasas (Lakhundi, Siddiqui y Khan, 2015).

El proceso inicia con la transformación de la celulosa insoluble o cristalina en celulosa soluble o amorfa por acción de las exo-1,4- $\beta$ -glucanasas o celobiohidrolasas, que hidrolizan los enlaces glucosídicos de los extremos, para el caso del extremo reductor interviene la celobiohidrolasa I, para el extremo no reductor interviene la celobiohidrolasa II; luego se da la transformación de celulosa soluble en oligosacáridos y celobiosa por acción de las endo-1,4- $\beta$ -glucanasas que hidrolizan aleatoriamente los enlaces internos en la cadena de celulosa; y finalmente la transformación de la celobiosa en glucosa, por acción de las  $\beta$ -glucosidasas que hidrolizan la celobiosa obteniéndose glucosa (Figura 2) (Ríos de Souza, Lo y Ximenes, 2016).

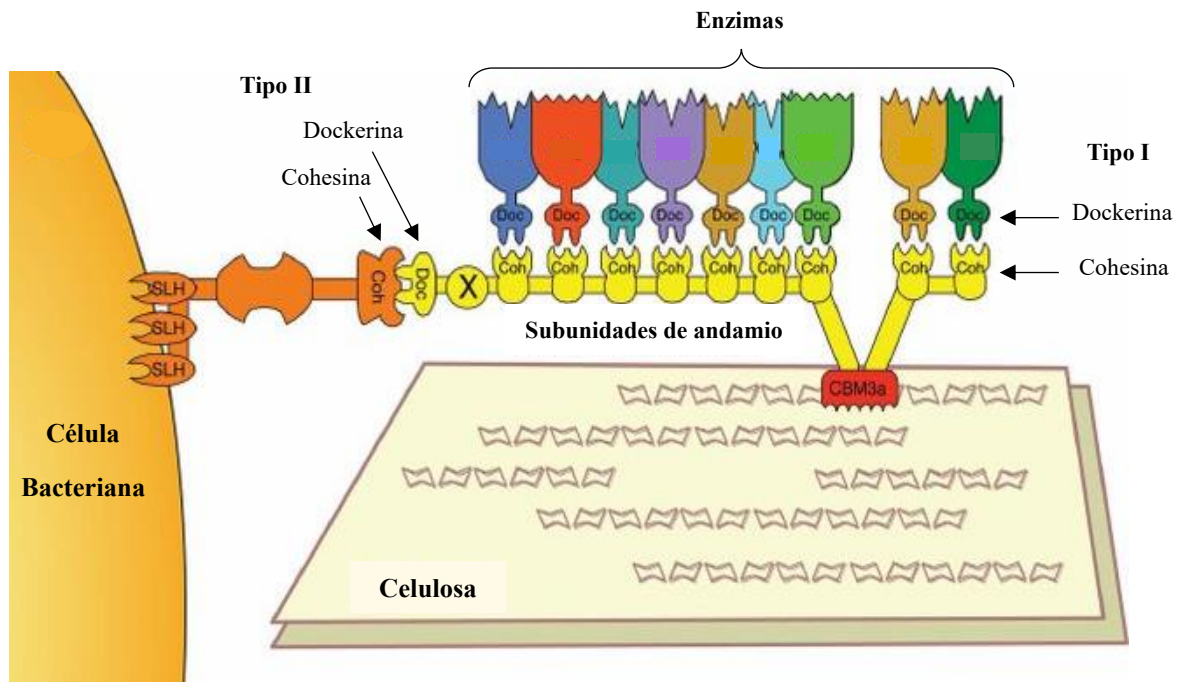


**Figura 2.** Esquema de la hidrólisis enzimática de la celulosa: la endoglucanasa produce cortes aleatorios en una posición interna de la celulosa liberando celooligosacáridos, las exoglucanasas o celobiohidrolasas actúan sobre los extremos de la cadena liberando celobiosa que interactúa con la  $\beta$ -glucosidasa para liberar glucosa (Xie *et al.*, 2007).

### 2.2.3 Microorganismos productores de celulosas

Los microorganismos productores de celulosas se encuentran en diversos grupos taxonómicos y en todo ambiente donde abunda la biomasa celulósica, los microorganismos aerobios generalmente secretan celulosas como moléculas monofuncionales independientes con funciones que se complementan entre sí para generar una combinación de enzimas sinérgicas intermoleculares, mientras que los microorganismos anaerobios celulolíticos han desarrollado un complejo multienzimático de celulosas que forman un andamio de proteínas adherido a la superficie celular denominado celulosoma (Figura 3), el cual se autoensambla mediante interacción no covalente, de alta afinidad, específica de tipo y especie, entre los módulos de cohesina

del andamio y los módulos de dockerina asociados a enzimas celulasas pertenecientes a la familia de las glucósido hidrolasas (Gupta, Samant y Sahu, 2012; Hobdey *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Esquema del celulosoma del modelo *C. thermocellum*. El conjunto extracelular multienzimático está unido a la pared celular a través de un módulo similar a la homología de la capa superficial (SLH) de andamio de anclaje y las cohesinas y dockerinas tipo II, el módulo de unión a celulosa (CBM3a) del andamio primario localiza al sustrato celulósico y las enzimas que se unen a cohesinas homólogas (Coh) tipo I por interacción con dockerinas tipo I (Doc) permitiendo la degradación de la celulosa (Yaniv *et al.*, 2014).

Los principales grupos con capacidad productora de celulasas son los hongos filamentosos, especialmente de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, etc (Helal, 2005); las actinobacterias aerobias como *Cellulomonas fimi*, *Thermobifida fusca*, *Thermomonospora curvata* y *Xylanimonas cellulosilytica*, y anaerobias como *Actinomyces bovis* y *Cellulomonas flavigena* (Anderson *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015); las bacterias de los géneros *Clostridium* y *Acetivibrio* en los anaerobios, y *Bacillus* y *Pseudomonas* en los aerobios (Kuhad, Gupta y Singh, 2011; Sadhu, 2013); y arqueas que reportan ciertos genes de celulasas como *Desulfurococcus fermentans* y *Thermogladius cellulolyticus* (Leo *et al.*, 2019); aunque,

también se han descrito protozoos anaeróbicos en el rumen de los animales que degradan la celulosa como *Eudiplodinium maggii* (Coleman, 1978), y la producción de celulasas por el fruto del palto y el moho del limo, relacionadas con la maduración de frutos y esporas, respectivamente (Awad y Lewis, 1980; Blumes y Ennis, 1991). Los microorganismos celulolíticos, suelen aparecer en poblaciones mixtas que comprenden especies celulolíticas y no celulolíticas que interactúan sinérgicamente, conduciendo a la degradación completa de la celulosa, que finalmente se convierte en dióxido de carbono y agua en condiciones aeróbicas, y en dióxido de carbono, metano y agua en condiciones anaeróbicas (Beguin y Aubert, 1994; Mekonnen et al., 2021).

Las aplicaciones de las celulasas microbianas se encuentran principalmente en las industrias textil, lavandería y detergente como suavizantes y eliminando manchas o exceso de tintes, en la industria del papel y pulpa, en la agricultura para mejorar el crecimiento de cultivos y como agentes de control de enfermedades de las plantas; en medicina se encuentra formando mezclas enzimáticas para mejorar la digestión de alimentos fibrosos ricos en celulosa; en la industria alimentaria son utilizadas para clarificar jugos de frutas y verduras, reducir la viscosidad de los néctares, concentrar purés y extraer pigmentos; y en la alimentación de animales para mejorar la digestibilidad de los alimentos a base de cereales y aumentar los valores nutritivos para una mayor calidad de los forrajes (Jayasekara y Ratnayake, 2019).

### **2.2.3.1 Determinación de la actividad celulolítica**

La actividad de la celulasa se evalúa en base a diversos métodos tradicionales en su mayoría a través de la fermentación de diversos sustratos. A continuación, se describen los métodos más representativos y que se utilizan ampliamente.

El método de zona clara se utiliza principalmente para la selección de bacterias que producen celulasas mediante la tinción del medio de cultivo en las regiones de la placa que no fue digerido y no estuvieron expuestas a la actividad celulolítica, mientras que las áreas expuestas a la celulasa dan halos claros alrededor de la fuente de la enzima (Jang, Lee y Lyoo, 2007), como en el caso de las tinciones con Rojo Congo y Yodo de Gram, que se asocian al medio carboximetilcelulosa, debido a su alta afinidad por los polisacáridos, generando una intensa coloración en el medio que se desvanece ante la presencia de actividad celulolítica (Teather y Wood, 1982; Kasana *et al.*, 2008; Ortiz Moreno y Urbina-Vélez, 2011).

El método de corte de hilo consiste en sumergir un extremo de un fino hilo de algodón en un tubo de ensayo que contiene la solución enzimática, a temperatura y pH óptimos y agitación constante. Por lo tanto, la actividad enzimática se puede obtener determinando el tiempo de corte requerido para el hilo fino de algodón (Thörig, Halperin y van Haeringen, 1984).

El método de la pérdida de peso del papel de filtro en el que se utiliza a este como sustrato, se lleva a cabo dentro de un tubo que contiene la solución enzimática, con agitación a temperatura y pH óptimos; luego de la interacción enzima sustrato, se realiza el secado y la determinación de la calidad y el peso del papel de filtro antes y después de la reacción, calculándose así la actividad enzimática (Toyama *et al.*, 2007).

El método espectrofotométrico calcula los carbohidratos generados en la reacción enzimática con agentes cromogénicos, la absorbancia se mide con el espectrofotómetro a una longitud de onda de alrededor de 500 nm, este método reduce en gran medida el tiempo requerido para determinar la actividad enzimática con una mayor precisión (Coleman, Studler y Naleway, 2007).



El principio del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se evalúa después de la hidrólisis enzimática de la celulosa; el azúcar reductor puede reducir el nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a amino, generando así un color marrón rojizo para los compuestos amino (Miller, 1959; Shuangqi *et al.*, 2011).

#### **2.2.4 Rumiantes**

Los rumiantes son animales herbívoros que se alimentan básicamente de plantas ricas en carbohidratos fibrosos, y la principal característica que los diferencia de las especies de estómago simple o no rumiantes, es la posibilidad de degradar el alimento compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosa y pectina. Los rumiantes por tener una dieta alta en celulosa, dependen de las poblaciones microbianas que se encuentran en su aparato digestivo ya que producen una hidrólisis preliminar de la celulosa antes de que alcance el intestino, para la degradación de la misma (Grilli, 2015; Ramírez, 2017).

Los animales rumiantes pertenecen al orden *Artiodactyla* que es muy diverso ya que abarca a los mamíferos de pezuña hendida. Dentro del suborden *Ruminantia* está el infraorden *Pecora* en el que se encuentra la familia *Bovidae*, a la que pertenecen los vacunos, ovinos, caprinos (Ramírez, 2017).

##### **2.2.4.1 Bovinos**

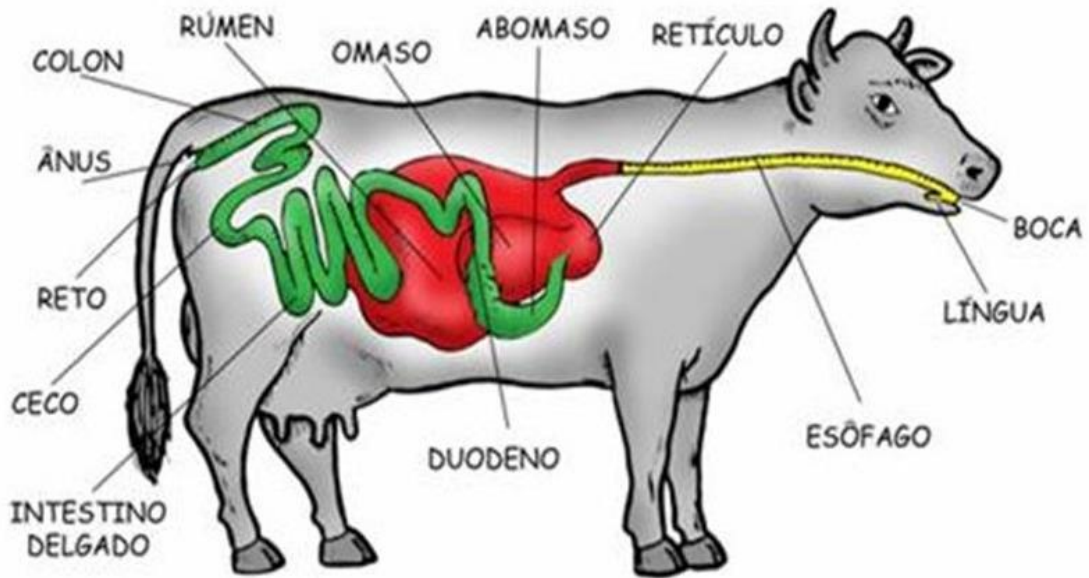
Los bovinos son animales rumiantes mamíferos grandes, robustos, de 120 a 150 cm de altura en promedio, y de 600 a 800 kg de peso vivo aproximadamente. El nombre científico de los bovinos (toro y vaca) es *Bos primigenius taurus* o *Bos taurus*, que fue determinado a partir del rumiante vacuno domesticado en Europa y el Norte de Asia, fue un grupo de bovinos domesticados provenientes de la subespecie de uro salvaje euroasiático llamado *Bos primigenius primigenius*; por otro lado, se llama *Bos primigenius indicus* a los cebúes y otras especies de bóvidos domesticados descendientes

de un tronco común y provenientes de la subespecie de uro primitivo del Sudeste Asiático llamado *Bos primigenius namadicus* (Ramírez, 2017).

La población de ganado bovino más abundante en Cajamarca y todo el Perú corresponde al ganado bovino criollo, seguido de las razas Brown Swiss y Holstein. En la Región Cajamarca, de acuerdo al Censo Nacional Agropecuario del 2012, de un total de 724 478 bovinos; el 68,61 % (497 119) corresponde al ganado criollo, el 12, 92% (93 571) al ganado de raza Brown Swiss, el 10% (72 603) al ganado de raza Holstein, el 4,95% (35 866) a otras razas como Jersey, Simmental y Hereford; y el 2,92% de ganado cebú (INEI, 2012), siendo la base alimenticia en su mayoría los pastos cultivados (Rye Grass, alfalfa, trébol), seguidos de pasturas naturales y residuos agrícolas.

#### **2.2.4.2 Aparato digestivo**

El aparato digestivo de los rumiantes califica de manera única a estos animales, capaces de utilizar de manera eficiente alimentos con alto contenido de fibra, incluidos los forrajes. La anatomía del sistema digestivo de los rumiantes, como se muestra en la figura 4, incluye la boca, la lengua, las glándulas salivales que producen saliva para amortiguar el pH del rumen, el esófago, el estómago de cuatro compartimentos llamados rumen, retículo, omaso y abomaso; páncreas, vesícula biliar, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (ciego, colon y recto). Los rumiantes se alimentan tragando gran parte de su alimento sin masticarlo lo suficiente, el esófago funciona bidireccionalmente, lo que les permite regurgitar su bolo alimenticio para masticar más, si es necesario (Parish, Rivera y Boland, 2017).



**Figura 4.** Esquema del aparato digestivo de un rumiante (Grilli, 2015).

El proceso de rumia se inicia cuando el material vegetal, después de haber sido cortado, masticado, mezclado con saliva y deglutido hacia el rumen a través del esófago, regresa a la boca en forma de bolo constituido por fragmentos grandes, para volver a ser masticados y mezclados con la saliva aumentando así la fragmentación, este ciclo se repite numerosas veces hasta que el alimento se reduce a partículas finas; en el proceso el bolo pasa al retículo en el que se retienen las porciones de mayor tamaño y se mueven lentamente hacia el rumen para la fermentación, mientras que gran parte de la porción líquida y partículas finas se mueven rápidamente al omaso donde se absorbe agua y nutrientes, y luego al abomaso para la digestión de proteínas que se absorberán en el intestino delgado. La porción sólida que queda en el rumen, junto con la parte líquida, permanece hasta 48 horas formando una esfera densa, donde los microbios pueden usar el material fibroso para formar precursores de energía (Parish, Rivera y Boland, 2017; Pérez-Barbería, 2020).

### **2.2.4.3 Líquido ruminal**

La porción líquida del contenido ruminal, es conocida como líquido ruminal, sus características físicas corresponden al color, olor y consistencia; normalmente es de color oliva a marrón verdoso, con un olor dulce y fermentativo resultado de la producción de ácidos grasos volátiles por la digestión de los carbohidratos, y de consistencia ligeramente viscosa; mientras que sus características químicas indican el pH que habitualmente varía entre 6,0 y 7,5 aproximadamente, y contiene gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ), ácidos grasos volátiles (ácido butírico, ácido acético, ácido propiónico, etc.), ácidos orgánicos ocasionalmente, aminoácidos y oligopéptidos, amoníaco y carbohidratos solubles, compuestos químicos obtenidos de la fermentación del material vegetal que aporta carbohidratos simples y complejos, proteínas, grasas y aceites, minerales y vitaminas; y su composición microbiológica comprende una población mixta de protozoos con motilidad activa, archaeas, hongos, bacterias con predominio de gram negativas y bacteriófagos; sin embargo, estas características varían de acuerdo al tipo de alimentación que recibe cada animal, que puede ser rica en granos, pastos, ensilajes y/o concentrados (Corberá *et al.*, 2004; Dervin Dean, 2015; Petrovski, 2017; Bayne y Edmondson, 2021).

#### **2.2.4.3.1 Microorganismos ruminales**

La comunidad microbiana del rumen varía con presencia de bacterias ( $10^{10}$  -  $10^{11}$  / g), archaea metanogénicas ( $10^7$  -  $10^9$  / g), protozoos ciliados ( $10^4$  -  $10^6$  / g), hongos anaeróbicos ( $10^3$  -  $10^6$  / g) y bacteriófagos ( $10^9$  -  $10^{10}$  partículas / mL). Esta composición está influenciada por la dieta y estado de salud del animal (Wright y Klieve, 2011). Las bacterias constituyen la mitad de la biomasa en el rumen normal y son responsables de la actividad metabólica (tabla 1), al igual que los protozoos que forman entre el 20 y 40% de la biomasa, aunque con menor contribución por su baja actividad metabólica. Por otro lado, los hongos constituyen hasta el 8% de la biomasa ruminal, se ubican en la zona de

ingesta con movimiento lento para evitar su rápido lavado y contribuyen a la digestión de forrajes de baja calidad (Araujo y Vergara, 2007).

Se han sugerido diversos criterios para caracterizar a un microorganismo como típico del rumen, esto debido a la dificultad para determinar si el microorganismo es un habitante normal o es exógeno. Por ello, para ser considerado como típico del rumen, un microorganismo debe ser capaz de vivir anaeróbicamente con temperaturas alrededor de 39 °C pudiendo variar entre 38 °C a 42 °C y pH entre 5,8 y 7,0, tener un metabolismo compatible con las reacciones que ocurren en el rumen, y encontrarse en número no inferior a 1 000 000/ml de contenido ruminal excluyendo a los protozoos (Grudsky y Arias, 1983; Jouany, 1991).

**Tabla 1.** Características morfométricas, función, fuentes de energía y productos finales de las principales bacterias ruminales.

Especie	Morfología	Gram	Medidas (µm)	M/Función principal	Algunas fuentes de energía*	Productos finales**
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Bacilar a cocoide	(-)	0,3 – 0,4 x 1 - 2	(-) / Celulolítica	G, C, A	S, A, F
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Cocos	(+)	0,8 - 1	(-) / Digestión de fibra	G, C, X	A, S, F, H
<i>Ruminococcus albus</i>	Cocos	(+)	0,8 - 2	(-) / Digestión de fibra	G, C, X	A, E, F, H
<i>Bacteroides amylophilus</i>	Bacilar a cocoide	(-)	0,9 – 1,6 x 1,6 - 4	(-) / Amilolítica	G, X, A	A, S, F, L
<i>Succinomonas amylofítica</i>	Cocoide a bacilar	(-)	1,0 – 1,5 x 2,2 - 3	(+) / Amilolítica	G, A	S
<i>Veillonella alcalescens</i>	Cocos	(-)	0,3 – 0,6	(-) / Fermentadora de lactato	L	A, P, H
<i>Methanobacterium ruminantium</i>	Bacilos curvados	(+)	0,7 – 0,8 a 1,8	(-) / Producción de metano	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , F, AGV	CH <sub>4</sub>
<i>Anaerovibrio lypolítica</i>	Bacilos	(-)	0,4 x 1,2- 3,6	(+) / Lipolítica	Gly, F	
<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>	Cocos	(-)	1,2 – 2,4	(-) / Fermentadora de lactato	G, L, Gly	A, P, B, H CO <sub>2</sub>
<i>Clostridium lochheadii</i>	Bacilos	(+)	0,7 – 1,7 x 2,6	(-) / Celulolítica	G, C, A	

<i>Lachnospira multiparus</i>	Bacilos curvados	(+)	0,4 – 0,6 x 2 - 4	(+) / Digeren pectina	G, A, (PECTINA)	A, E, F, L, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
<i>Cillibacterium cellulosolvans</i>	Cocoide a bacilar	(+)	0,5 – 0,7 x 1 - 2	(+) / Celulolítica	G, C	
<i>Butyrivibrio fi brisolvans</i>	Bacilos curvados	(-)	0,4 – 0,6 x 2 - 5	(+) / Amilolítico muy adaptable	G, C, X, A	B, F, H, L, CO <sub>2</sub>
<i>Bacteroides ruminícola</i>	Cocoide a bacilar	(-)	0,8 - 1 x 0,8 - 30	(-) / Muy adaptado	G, X, A	A, S, F, L,
<i>Selenomona ruminantium</i>	Bacilos curvados	(-)	0,8 – 2,5 x 2 - 7	(+) / Muy adaptado	G, A, Gly	A, P, L, B, CO <sub>2</sub>
<i>Succinivibrio dextrinesolvans</i>	Espirales	(-)	0,3 – 0,5 x 1 – 1,5	(-) / Fermentadoras de dextranos	G	A, S, L
<i>Streptococcus bovis</i>	Cocos	(+)	0,7 – 0,9	(-) / Amilolítico	G, A	L
<i>Eubacterium ruminantium</i>	Cocoide a bacilar	(+)	0,4 – 0,7 x 0,7 – 1,5	(-) / Azúcares, xilosa	G, X	B, F, L

Fuente: Cahuana, 2012

CLAVE:

(+): Positivo (-): Negativo

M: Motilidad

\*: G (glucosa); C (celulosa); X (xilosa); A (almidón); L (lactato); Gly (glicerol); F (fructosa); AGV (ácidos grasos volátiles).

\*\* : A (acetato); B (butirato); P (propionato); L (lactato); S (succinato); E (etanol); F (formiato); H (hidrógeno).

#### 2.2.4.4 Estiércol

El estiércol de ganado es el residuo no digerido de materia vegetal que ha pasado por el intestino del animal e incluye agua (80%), residuos no digeridos (14,4%) y microorganismos (5,6%); siendo el producto de desecho del ganado doméstico como vacas, bueyes y búfalos; yak y búfalos de agua. El pH del estiércol varía de 7,1 a 7,4; además es rico en minerales que incluyen nitrógeno, fósforo, potasio, hierro, azufre, magnesio, calcio, cobalto, manganeso, cloro; y desprendimiento del epitelio intestinal. La porción de materia fecal derivada del rumen mejora los componentes del estiércol al enriquecerlo con pigmentos biliares, bacterias intestinales y moco (Behera y Ray, 2021).

##### 2.2.4.4.1 Microorganismos del estiércol

La diversidad microbiana del estiércol comprende microorganismos coprófilos como bacterias (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*,

*Acinetobacter*, *Halomonas*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, etc.); actinomicetos (*Rhodococcus coprophillus*, *Micromonospora chalcae*, *Pseudonocardia thermophila* y *Streptomyces* spp.), y hongos y levaduras (*Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Cladosporium* spp., *Geotrichum* spp., *Monilia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Sporotrichum* spp., *Thamnidium* spp., *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp.), esta diversidad se ve influenciada directamente por la dieta de los animales, el ambiente y su estado de salud (Gupta, Aneja y Rana, 2016; Behera y Ray, 2021).

### **2.2.5 Bacterias celulolíticas ruminales**

Las bacterias que degradan la celulosa en el rumen son diversas, aunque los géneros principales son *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium*, *Butyrivibrio* y *Prevotella*, las más destacadas *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* por su mayor capacidad para digerir la celulosa respecto a otras bacterias celulolíticas, probablemente debido a que poseen una serie de genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de fibra. Los productos finales de la fermentación incluyen acetato, butirato, propionato y CO<sub>2</sub>; además de formar hidrógeno, etanol, ácido succínico, ácido fórmico y ácido láctico, que son sustratos para otras bacterias (Matthews *et al.*, 2019; Thapa *et al.*, 2020).

### **2.2.6 Bacterias celulolíticas del estiércol**

En el estiércol de ganado se ha informado la presencia de bacterias productoras de celulasas de los géneros *Halomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, y *Pseudomonas* (Girija *et al.*, 2013; Behera y Ray, 2021; Dhiman *et al.*, 2021); y al igual que en el líquido ruminal es posible encontrar bacterias de los géneros *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Fibrobacter* en estiércol fresco (Wong *et al.*, 2016; Ozbayram *et al.*, 2018).

## **2.2.7 Identificación bacteriana**

### **2.2.7.1 Identificación fenotípica**

En la actualidad existen diversos métodos de identificación bacteriana (Tabla 2), siendo la caracterización fenotípica uno de los métodos más utilizados; esta aplica métodos microbiológicos tradicionales, tales como el cultivo *in vitro* en placas de Petri para la observación macroscópica de colonias aisladas evaluando su color, tamaño, elevación, forma y textura en medios de cultivo simples o de todo propósito, enriquecidos, selectivos o diferenciales (Chauhan y Jindal, 2020b).

Además, tinciones microbiológicas simples en las que se aplica un solo colorante para la observación de la morfología bacteriana, diferenciales que utilizan varios colorantes combinados para diferenciar tipos de células de acuerdo a su composición química como la tinción Gram que permite visualizar la morfología y composición de la pared bacteriana; o selectivas para observar estructuras con una composición química afín a uno de los colorantes tiñéndose selectivamente como es el caso de la tinción de Wirtz-Conklin para reconocer esporas (Corrales Ramírez y Caycedo Lozano, 2020); y pruebas bioquímicas que permiten conocer las características metabólicas típicas de cada bacteria, como las pruebas de coagulasa, catalasa, oxidasa, reducción de nitrato, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Tres Azúcares Hierro (TSI), ureasa, utilización de citrato, licuefacción de gelatina, hidrólisis del orto-Nitrofenil- $\beta$ -galactosido (ONPG), hidrólisis del almidón y movilidad (Chauhan y Jindal, 2020a).

### **2.2.7.2 Identificación molecular**

Por otro lado, los métodos de microbiología molecular permiten identificar rápidamente cepas bacterianas cultivables y difíciles de cultivar en condiciones de laboratorio. Actualmente la identificación bacteriana a través de la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr se ha convertido en un método molecular estándar, ya que este se encuentra



altamente conservado entre las bacterias por su función esencial en el ensamblaje de los ribosomas y es muy específico para cada especie, convirtiéndolo en un objetivo ideal para la identificación. El método estándar implica la amplificación por PCR del gen de 16S ARNr, seguida de secuenciación y comparación con bases de datos conocidas para su identificación (Franco *et al.*, 2019; Chauhan y Jindal, 2020a).

**Tabla 2.** Métodos de identificación microbiana.

<b>Métodos de identificación</b>			
<b>Medios cromogénicos</b>	<b>Técnicas microscópicas</b>	<b>Técnicas bioquímicas</b>	<b>Técnicas moleculares</b>
Medios tradicionales: Chrom ID <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus cereus</i> ChromoSelect Agar, Agar Coliforme ChromoSelect, Enterococci ChromoSelect.	- Microscopía de campo claro - Microscopía de campo oscuro - SEM - TEM - ATM - Microscopía invertida, etc.	Tradicionales - API - BBL Crystal - Biolog System-Omnilog Espectrometría de masas - Cromatografía líquida y gaseosa - MALDI-TOF Espectrometría - FTIR - Espectroscopía Raman - Separación electrocinética, etc	- PCR tiempo real - RAPD-PCR - RFLP, etc.

Fuente: Franco *et al.*, 2019

## CAPÍTULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

#### 3.1 Diseño de investigación

La presente investigación fue de tipo básico, nivel descriptivo, diseño no experimental transversal-descriptivo.

#### 3.2 Diseño metodológico

##### 3.2.1 Localización del lugar de muestreo

El Camal Municipal de Cajamarca está ubicado en Prolongación Amalia Puga N°120 de la ciudad de Cajamarca, provincia Cajamarca, departamento Cajamarca. La geolocalización corresponde a latitud 7°09'12" S y longitud 78°31'19" O.

##### 3.2.2 Material biológico

Estuvo constituido por cinco muestras de líquido ruminal y cinco muestras de estiércol de ganado vacuno adulto (mayores de 2 años) según Sari *et al.* (2017), colectadas bajo condiciones de esterilidad.

##### 3.2.3 Recolección de material biológico

Las muestras de líquido ruminal y estiércol se tomaron en forma aleatoria de cinco vacunos adultos beneficiados en el Camal Municipal de Cajamarca, con un tiempo post mortem no mayor a los 15 minutos. Se recolectaron 400 g de contenido ruminal de cada animal utilizando bolsas de primer uso, luego se exprimieron con ayuda de un colador estéril y guantes estériles para obtener 300 mL de líquido ruminal fresco (Luna *et al.*, 2019) en un depósito estéril de boca amplia y se trasvasó en frascos estériles de 500 mL, los cuales contenían previamente agua estéril a 40 °C para evitar el cambio brusco de temperatura (Fortina *et al.*, 2022), y fueron introducidas en una bolsa con cierre hermético que contenía CO<sub>2</sub>. Para la recolección de estiércol fresco se colectaron 200 g de contenido

fecal (Rodríguez y Llenque, 2016) directamente del intestino grueso en bolsas de primer uso. Todas las muestras fueron debidamente rotuladas (hora, fecha, lugar y código), almacenadas a 38 °C en un recipiente debidamente acondicionado con bolsas de agua caliente para conservar la temperatura, y posteriormente transportadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca para su procesamiento.

#### **3.2.4 Aislamiento de bacterias de líquido ruminal y estiércol**

Inicialmente, se realizó el aislamiento de bacterias con actividad celulolítica del líquido ruminal, para ello se filtraron los 300 mL recolectados con yute y un embudo, ambos estériles y se homogeneizaron, con movimientos circulares, las muestras. Posteriormente, se realizaron 5 diluciones al décimo que consistieron en añadir 1 mL de cada muestra a 9 mL de solución salina fisiológica. De las tres últimas diluciones previamente incubadas durante 1 hora a 38 °C, se realizaron siembras microbiológicas utilizando la técnica de siembra en superficie, en medio mínimo suplementado con 1% de carboximetilcelulosa (CMC) a pH 7 (Anexo 1), incubándolas a 38 °C durante 48 horas (Das, Bhattacharya y Murali, 2010) en jarra Gaspak para minimizar la exposición a oxígeno.

Por otro lado, para el aislamiento de bacterias con actividad celulolítica del estiércol fresco, se pesaron 10 g de cada muestra homogeneizada y se agregaron a 90 mL de caldo peptona 0,1% (p/v) (Rodríguez y Llenque, 2016). Posteriormente, se realizaron 5 diluciones al décimo que consistieron en añadir 1 mL de cada muestra a 9 mL de solución salina fisiológica. De las tres últimas diluciones previamente incubadas a 37 °C durante 20 minutos, se realizaron siembras microbiológicas en superficie, en medio mínimo suplementado con 1% de CMC a pH 7 (Anexo 1), incubándolas a 37 °C durante 48 horas (Das, Bhattacharya y Murali, 2010).

Las colonias que crecieron en el medio mínimo suplementado con CMC fueron subcultivadas sucesivamente para aislar las bacterias y asegurar la pureza del cultivo.

### **3.2.5 Selección de bacterias con actividad celulolítica.**

Los aislamientos bacterianos obtenidos fueron evaluados en su capacidad degradativa de celulosa mediante la siembra por puntura de cada bacteria por cuadruplicado en el mismo medio de aislamiento y con el mismo pH, incubándolas a 37 – 38 °C durante 48 horas (Das, Bhattacharya y Murali,2010). Transcurrido el tiempo de incubación, se inundaron las placas con una solución de Rojo Congo al 0,1% durante 20 minutos, se eliminó el exceso, se añadió NaCl 1M durante 15 minutos y se retiró el exceso nuevamente (Vyas y Kumar, 2018). Los aislamientos que mostraron decoloración del Rojo Congo en forma de halos claros, fueron seleccionados como bacterias celulolíticas. Además, se obtuvo la medida de la zona de hidrólisis alrededor de la colonia en milímetros (mm) (Apéndice 6), mediante la resta de los diámetros de los halos y de las colonias (Teather y Wood, 1982; Rawway, Ali y Badawy, 2018), y se tomó el promedio de las 4 medidas para seleccionar a las bacterias con mayor actividad celulolítica. Los aislamientos seleccionados se subcultivaron en viales con agar nutritivo para continuar con su caracterización microbiológica, además fueron conservadas en ultracongelación a -86 °C en caldo BHI con 20% de glicerol.

### **3.2.6 Caracterización de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica**

#### **3.2.6.1 Caracterización morfológica e identificación bioquímica**

Para la caracterización microbiológica, los aislamientos bacterianos fueron cultivados en agar nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se realizó la descripción de la morfología de las colonias bacterianas, y se determinaron las características microscópicas a través de las coloraciones Gram y Wirtz-Conklin (para esporas) para observar la morfología de las bacterias, el tipo de Gram y la

presencia o ausencia de esporas. Además, los aislamientos se caracterizaron bioquímicamente utilizando los medios diferenciales TSI, LIA, agar citrato de Simmons, agar SIM y caldo RM-VP con incubación a 37 °C durante 24, 48, 72 y 96 horas, para evaluar la capacidad de fermentar azúcares, decarboxilar la lisina, utilizar el citrato como única fuente de carbono, evidenciar movilidad y metabolización del triptófano, y las vías de degradación de la glucosa respectivamente (Procop *et al.*, 2017).

### **3.2.6.2 Identificación molecular**

#### **3.2.6.2.1 Extracción de ADN mediante shock térmico**

El ADN genómico fue extraído de cada aislamiento bacteriano previamente cultivado en agar nutritivo durante 24 horas, utilizando el método de shock térmico. En un microtubo de 1,5 mL (estéril y de primer uso) se adicionaron 100 µL de agua grado molecular (agua ultra pura, desionizada, libre de nucleasas y proteasas) y se incorporaron colonias hasta obtener la ligera turbidez del agua grado molecular, y se selló. Para realizar el shock térmico, los microtubos de los aislamientos correspondientes a líquido ruminal fueron colocados en agua hirviendo durante 30 minutos, y posteriormente fueron congelados a -20 °C durante 30 minutos; y los microtubos de los aislamientos de estiércol fueron colocados en agua hirviendo durante 20 minutos y congelados a -20 °C durante 15 minutos, todos los aislamientos fueron centrifugados a 13 500 rpm por 5 minutos. Finalmente, se tomaron 50 uL del sobrenadante de cada microtubo, se los colocó en microtubos nuevos estériles, se sellaron con Parafilm y se los conservó a -20 °C hasta la evaluación de su calidad y uso para la PCR (Guion *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2016).

#### **3.2.6.2.2 Evaluación de la calidad de ADN extraído**

Para cuantificar y determinar la calidad del ADN extraído se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para ello, se colocó 1 µL de agua grado molecular en el capilar del equipo con la finalidad de blanquear el equipo, luego se procedió con la

medición del ADN de cada aislamiento. Se tomaron en cuenta los valores de las ratios 260/280 y 260/230, y de la concentración de ADN (Dar *et al* 2022).

### **3.2.6.2.3 Amplificación del gen 16S ARNr**

El ADN extraído de cada aislamiento se utilizó como molde para la amplificación por PCR del gen 16S ARNr, utilizando los cebadores universales: 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y el 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Baltaci y Adiguzel, 2016; Rawway, Ali y Badawy, 2018)

La PCR se realizó de acuerdo al protocolo descrito por el kit KOD Hot Start DNA Polymerase (Toyobo - Millipore), con un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L por muestra. Cada mezcla contuvo 0,5  $\mu$ L Buffer 10X para KOD Hot Start ADN Polimerasa, 1,5  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> 25 mM, 2,5  $\mu$ L de dNTPs (2 mM cada uno), 0,75  $\mu$ L del cebador Forward, 0,75  $\mu$ L del cebador Reverse, 0,5  $\mu$ L de la KOD Hot Start ADN Polimerasa (0,5 U/ $\mu$ L) y 0,7  $\mu$ L de cada ADN extraído, completando el volumen con agua grado molecular. Los tubos fueron sellados y colocados en el termociclador Bio-Rad, las condiciones de PCR fueron: activación de la polimerasa a 95 °C por 2 min seguido de 35 - 38 ciclos de: desnaturalización del templado a 95 °C por 20 s, hibridación de los iniciadores a la temperatura Melting más baja de los primers (54 °C x 30 s) y extensión a 70 °C por 20 s. Finalmente, una extensión final a 70 °C por 5 min.

### **3.2.6.2.4 Electroforesis en gel de agarosa**

La detección de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa en sistema horizontal. Se preparó agarosa al 1% con buffer TBE 0.5x, esta solución fue sometida a calor para disolver la agarosa, y se añadió 5  $\mu$ L de colorante SYBR-Safe para teñir el gen de interés. La mezcla homogenizada fue adicionada al molde de electroforesis horizontal, se dejó gelificar y se colocó el gel en la cubeta de electroforesis horizontal

junto con el buffer TBE 0,5x. Luego, se mezclaron 5 uL de cada producto de PCR con 1 uL de loading buffer, y se colocaron en cada carril del gel. El corrido electroforético fue a 100 V, 500 mA, por 30 minutos. Las bandas generadas fueron observadas en un transiluminador de luz UV (de la Mora y Sandoval Rodríguez, 2013; Hasan, 2021).

#### **3.2.6.2.5 Secuenciación del gen 16S ARNr**

Los productos de PCR del gen 16S ARNr de cada aislamiento fueron enviados para su secuenciamiento mediante el método de Sanger a Macrogen (Chile).

#### **3.2.6.2.6 Alineamiento y obtención de secuencias consenso**

Las secuencias obtenidas fueron evaluadas y editadas en el programa Chromas versión 2.6.6 para obtener la secuencia consenso. Luego, mediante el análisis con la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990, 1997) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se determinó el porcentaje de similitud con las especies bacterianas más cercanas para cada uno de los aislamientos, y aquellas con porcentajes de similitud mayor a 99 % a las secuencias del gen 16S ARNr obtenidas, fueron recuperadas de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Benson *et al.*, 2013) y colocados en un archivo multi-FASTA junto con las secuencias obtenidas en este estudio o secuencias query; todas las secuencias se alinearon y editaron con el programa AliView (Larsson, 2014).

#### **3.2.6.2.7 Análisis Filogenético**

Se utilizó el programa bioinformático MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11) (Tamura, Stecher y Kumar, 2021), el método Neighbor joining (Saitou y Nei, 1987) y 1000 bootstrapp para establecer las relaciones filogenéticas y construir el árbol filogenético (Dar *et al.*, 2022).

### 3.2.7 Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica de las bacterias

La determinación cuantitativa se realizó mediante la detección de azúcares reductores por el método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). Inicialmente, se obtuvo celulosa cruda mediante la fermentación de 100 mL del medio descrito en el anexo 2 (Khan *et al.*, 2011). Se consideró como inóculo para la fermentación, una suspensión bacteriana de un cultivo joven (cultivo de 18 horas de incubación) del aislamiento a evaluar en 5 mL de Solución Salina Fisiológica al 0,9% hasta que se alcanzó una concentración de  $1.5 \times 10^8$  cel/mL, utilizando el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. La fermentación se realizó en matraces de 250 mL a 38 °C, pH 7 del medio y 120 rpm, y el tiempo de incubación varió en base al tipo de muestra; los aislamientos provenientes de líquido ruminal se incubaron durante 48 horas (Patel *et al.*, 2015; Luna *et al.*, 2019) y los aislamientos provenientes de estiércol se incubaron durante 96 horas (Khan *et al.*, 2011). Se realizaron fermentaciones por triplicado para cada aislamiento.

Por otro lado, se elaboró una curva padrón de glucosa, que consistió en la preparación de una solución inicial de glucosa grado analítico a una concentración de 0,5 mg/mL en Buffer Citrato 0,05M, a partir de la cual se realizaron 11 diluciones (0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 y 0,50 mg/mL), se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, luego se añadió 1 mL de DNS y se incubó nuevamente en agua hirviendo durante 15 minutos; finalmente, se añadieron 5 mL de agua destilada para alcanzar valores dentro del límite del espectrofotómetro utilizado. Las diluciones fueron analizadas a una longitud de onda de 540 nm, y los valores de absorbancia obtenidos permitieron construir la ecuación de la recta, a partir de la cual se extrapolaron y confirmaron las concentraciones de glucosa previamente establecidas (Khan *et al.*, 2011).

Al término de la fermentación, se separaron físicamente las células del medio por centrifugación, los fermentados de líquido ruminal se centrifugaron a 5000 rpm durante



6 minutos a 4 °C y los de estiércol se centrifugaron a 10 000 rpm durante 7 minutos a 4 °C, el sobrenadante obtenido fue considerado como la enzima cruda.

Para el ensayo enzimático, se tomaron 0,5 mL de enzima cruda, y se los colocó en un tubo de ensayo junto con 0,5 mL de CMC 1% disuelto en Buffer Citrato 0,05 M (pH 4,8) y 1 mL del mismo Buffer Citrato. Luego, se incubó la solución en baño María a 50 °C durante 30 minutos, al cabo de este tiempo se añadió 1 mL de Ácido Dinitrosalicílico (DNS), y se volvió a incubar en agua hirviendo durante 15 minutos, se colocó la solución en agua fría para detener la reacción y se añadieron 5 mL de agua destilada para diluir la concentración de DNS. Finalmente, se midió la absorbancia de cada solución obtenida utilizando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, y aplicando la ecuación de la recta fue posible obtener la concentración de azúcar reductor liberado en la hidrólisis. Se consideró una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima requerida para formar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (Khan *et al.*, 2011; Lokapirnasari *et al.*, 2015; Erba *et al.*, 2020), y se calculó a partir de la ecuación indicada por Ghose, 1987 (Anexo 3).

### **3.2.8 Análisis estadístico**

Los datos fueron ingresados y procesados con el programa estadístico IBM SPSS versión 25. Se determinó medidas de tendencia central, dispersión de las variables cuantitativas, la normalidad de los datos mediante los test Kolmogorov-Smirnov y Shapiro – Wilk, y posteriormente se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney. Se trabajó con un nivel de significancia  $p \leq 0,05$ .

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Resultados

##### 4.1.1 Selección de bacterias con actividad celulolítica

De las 10 muestras procesadas (5 de líquido ruminal y 5 de estiércol de ganado vacuno) se obtuvieron un total de 54 aislamientos capaces de crecer en el medio de cultivo suplementado con 1 % de carboximetilcelulosa (CMC), de las cuales 27 corresponden a aislamientos de líquido ruminal cultivadas en microaerobiosis y 27 aislamientos que corresponde a estiércol cultivadas en aerobiosis.

Todas las bacterias fueron evaluadas para valorar de manera cualitativa su capacidad de degradación de celulosa mediante la revelación de la zona de hidrólisis con Rojo Congo 0, 1 %. La tabla 3 y 4 muestran los aislamientos de líquido ruminal y estiércol respectivamente, que presentaron actividad celulolítica; estos fueron agrupados en base a la medida de la zona de hidrólisis; si son mayores e iguales o menores a 3 mm de diámetro, y se utilizó el promedio de las zonas de hidrólisis como criterio de selección de bacterias con mayor degradación de celulosa.

**Tabla 3.** Aislamientos de líquido ruminal que expresan actividad celulolítica agrupados en base a la medida de la zona de hidrólisis.

<b>Código de aislamiento</b>	<b>Zona de hidrólisis * (mm)</b>	<b>Promedio (mm)</b>
<b>Halo de hidrólisis celulolítico <math>\geq</math> 3 mm</b>		
LR2E	10,0	
LR3A	15,7	
LR3B	13,3	14,2
LR3C	16,7	
LR3D	16,7	

LR3E	17,1	
LR3F	16,3	14,2
LR5A	8,0	
<b>Halo de hidrólisis celulolítico &lt; 3 mm</b>		
LR2C	2,8	
LR2D	2,1	
LR2F	0,6	
LR2G	0,5	
LR4A	2,9	
LR4B	2,8	
LR4C	0,9	
LR4D	2,8	1,6
LR4E	1,0	
LR4F	1,3	
LR4G	1,8	
LR4H	1,5	
LR4I	2,4	
LR5D	1,9	
LR5E	1,8	

\*Prueba U de Mann – Whitney ( $p < 0,05$ )

**Tabla 4.** Aislamientos de estiércol que expresan actividad celulolítica agrupados en base a la medida de la zona de hidrólisis.

<b>Código de aislamiento</b>	<b>Zona de hidrólisis * (mm)</b>	<b>Promedio (mm)</b>
<b>Halo de hidrólisis celulolítico <math>\geq 3</math> mm</b>		
E4C	3,7	
E4F	3,5	3,6
E4H	4,1	
<b>Halo de hidrólisis celulolítico &lt; 3 mm</b>		
E1A	0,5	
E1D	1,0	1,4
E2A	0,5	

E2B	1,0	
E2C	1,8	
E3D	1,9	
E4E	2,4	
E5A	2,7	
E5B	2,3	1,4
E5C	0,5	
E5D	2,0	
E5E	0,2	
E5F	1, 1	

\*Prueba U de Mann – Whitney ( $p < 0,05$ )

Los promedios de los aislamientos de líquido ruminal y estiércol que produjeron zonas de hidrólisis mayores e iguales a 3 mm fueron de 14,2 mm y 3,6 mm respectivamente, mientras que aquellos que produjeron una zona de hidrólisis menor a 3 mm fueron 1,6 mm en los aislamientos de líquido ruminal y 1,4 mm en los de estiércol; además, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las zonas de hidrólisis mayores e iguales y menores a 3 mm de los aislamientos procedentes de ambas muestras.

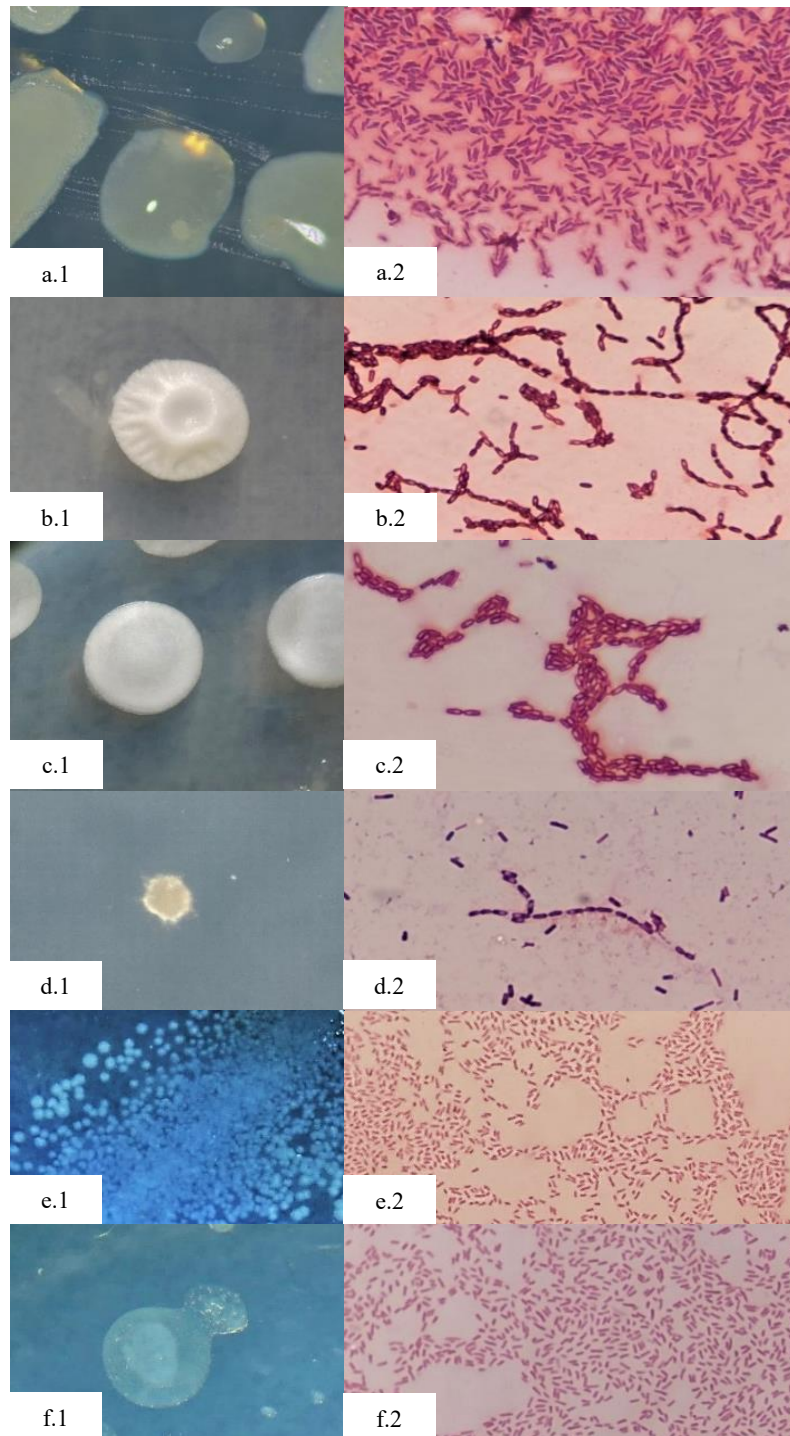
Por lo tanto, se seleccionaron los 11 aislamientos que lograron zonas de hidrólisis mayores e iguales a 3 mm, para continuar con el proceso de caracterización y cuantificación de la actividad enzimática.

#### **4.1.2 Caracterización de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica.**

##### **4.1.2.1 Caracterización morfológica macroscópica y microscópica**

La caracterización morfológica macroscópica de los 11 aislamientos se basó en el tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación y consistencia de las colonias en Medio Mínimo suplementado con 1% CMC, medio de cultivo selectivo en el que se aprecian las características de las colonias que varían ligeramente entre cada aislamiento.

Por otro lado, la caracterización microscópica indica el tipo de Gram, la forma, y la presencia y ubicación de la endospora. Todas las características se presentan a detalle en las Tablas 5 y 6, y en la figura 5 se presentan las colonias en medio suplementado con CMC y tinciones de los aislamientos con mayores diferencias morfológicas.



**Figura 5.** Observación macroscópica y microscópica de los aislamientos, la columna 1 muestra colonias en medio CMC y la columna 2 tinción Gram: a) LR2E, b) LR3A, c) LR3B, d) LR5A, e) E4C, f) E4H.

**Tabla 5.** Características macroscópicas de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica en Medio Mínimo Suplementado 1% CMC.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN								
	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color/pigmento	Textura	Elevación	Consistencia
LR2E	Mediana	Irregular	Ondulado	Opaco	Sí	Crema	Lisa	Convexa	Mucoide
LR3A	Mediana	Circular	Entero	Opaco	No	Crema	Rugosa	Umbilicada	Mucosa
LR3B	Mediana	Circular	Entero	Opaca	No	Crema	Lisa	Convexa	Mucoide
LR3C	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Sí	Crema	Lisa	Convexa	Cremosa
LR3D	Mediana	Irregular	Ondulado	Opaca	Sí	Crema	Lisa	Elevada	Mucoide
LR3E	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Sí	Crema	Lisa	Convexa	Mucosa
LR3F	Puntiforme	Irregular	Ondulado	Transparente	Sí	No	Lisa	Elevada	Suave
LR5A	Puntiforme	Rizoide	Rizoide	Opaca	Sí	Amarillo Oscuro	Rugosa	Pulvinada	Dura
E4C	Pequeña	Circular	Entero	Opaco	Sí	Blanca	Lisa	Convexa	Suave
E4F	Puntiforme	Circular	Entero	Opaco	Sí	Transparente	Lisa	Elevada	Suave
E4H	Puntiforme	Circular	Entero	Opaco	Sí	Transparente	Lisa	Convexa	Suave

**Tabla 6.** Características microscópicas de los aislamientos bacterianos con actividad celulolítica.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN		
	Tinción Gram	Morfología	Espora
LR2E	(+)	Bacilos medianos	
LR3A	(+)	Bacilos pequeños	Terminal no deformante (48 h)
LR3B	(+)	Bacilos pequeños	
LR3C	(+)	Bacilos pequeños	
LR3D	(+)	Bacilos pequeños	Terminal no deformante (60 h)
LR3E	(+)	Bacilos medianos	
LR3F	(+)	Bacilos pequeños	Terminal no deformante (48 h)
LR5A	(+)	Bacilos medianos	
E4C	(-)	Bacilos pequeños	
E4F	(-)	Bacilos pequeños	No presenta
E4H	(-)	Bacilos pequeños	

#### 4.1.2.2 Identificación bioquímica de los aislamientos bacterianos celulolíticos

Los resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de los 11 aislamientos se presentan en la tabla 7. Las pruebas utilizadas se basan en la observación del uso de sustratos específicos como la fermentación de los carbohidratos glucosa, lactosa y sacarosa, y la producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en el medio TSI, la decarboxilación y desaminación de la lisina, y producción de H<sub>2</sub>S en el medio LIA, la utilización del citrato como única fuente de carbono y energía en el medio Citrato de Simmons; la movilidad bacteriana, producción de indol y de H<sub>2</sub>S en el medio SIM, la detección de la vía metabólica de glucosa para dar lugar a productos ácidos o neutros en el medio RM-VP, la presencia de la enzima catalasa; y la utilización de urea como única fuente de nitrógeno en el medio Caldo Urea. Estas pruebas fueron realizadas a 37 °C y evaluadas a las 12 y 24 h. Sin embargo, en algunos aislamientos el tiempo de evaluación se extendió hasta por 96 h, ya que el proceso de adaptación al medio Citrato de Simmons y LIA implicó mayor tiempo de incubación.

**Tabla 7.** Características bioquímicas de los aislamientos bacterianos celulolíticos.

Código	Pruebas Bioquímicas												Género Bacteriano	
	Fermentación de azúcares			Producción de gas	Descarboxilación de Lisina	Utilización de citrato	Movilidad	Producción de H <sub>2</sub> S	Producción de indol	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Catalasa		Ureasa
	Gluc	Lac	Sac											
LR2E	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
LR3A	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
LR3B	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
LR3C	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus</i>
LR3D	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus</i>
LR3E	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
LR3F	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
LR5A	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
E4C	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>Escherichia</i>
E4F	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>Pantoea</i>
E4H	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>Pantoea</i>

- Gluc: Glucosa, Lac: Lactosa, Sac: Sacarosa

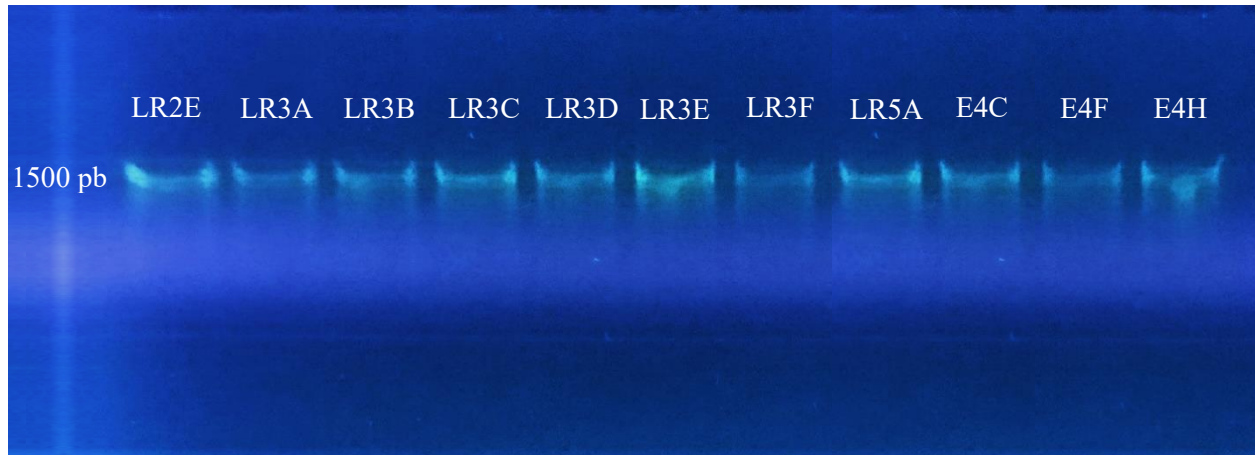
- Signo +: positivo, signo -: negativo

La caracterización microbiológica e identificación bioquímica de los aislamientos de líquido ruminal, mediante el programa ABIS online y la bibliografía indicada en los métodos, reveló que todos pertenecen al género *Bacillus* con una semejanza del 100 %, mientras que los aislamientos de estiércol pertenecen a dos géneros distintos, E4C al género *Escherichia* con 98, 4% de semejanza y, E4F y E4H al género *Pantoea* con 96% de semejanza.



#### 4.1.2.3 Identificación molecular de los aislamientos bacterianos celulolíticos

La amplificación del gen 16S ARNr de cada uno de los 11 aislamientos se muestra en la figura 5, confirmando que todos los aislamientos pertenecen al dominio Bacteria.



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen 16S ARNr de los 11 aislamientos obtenidos.

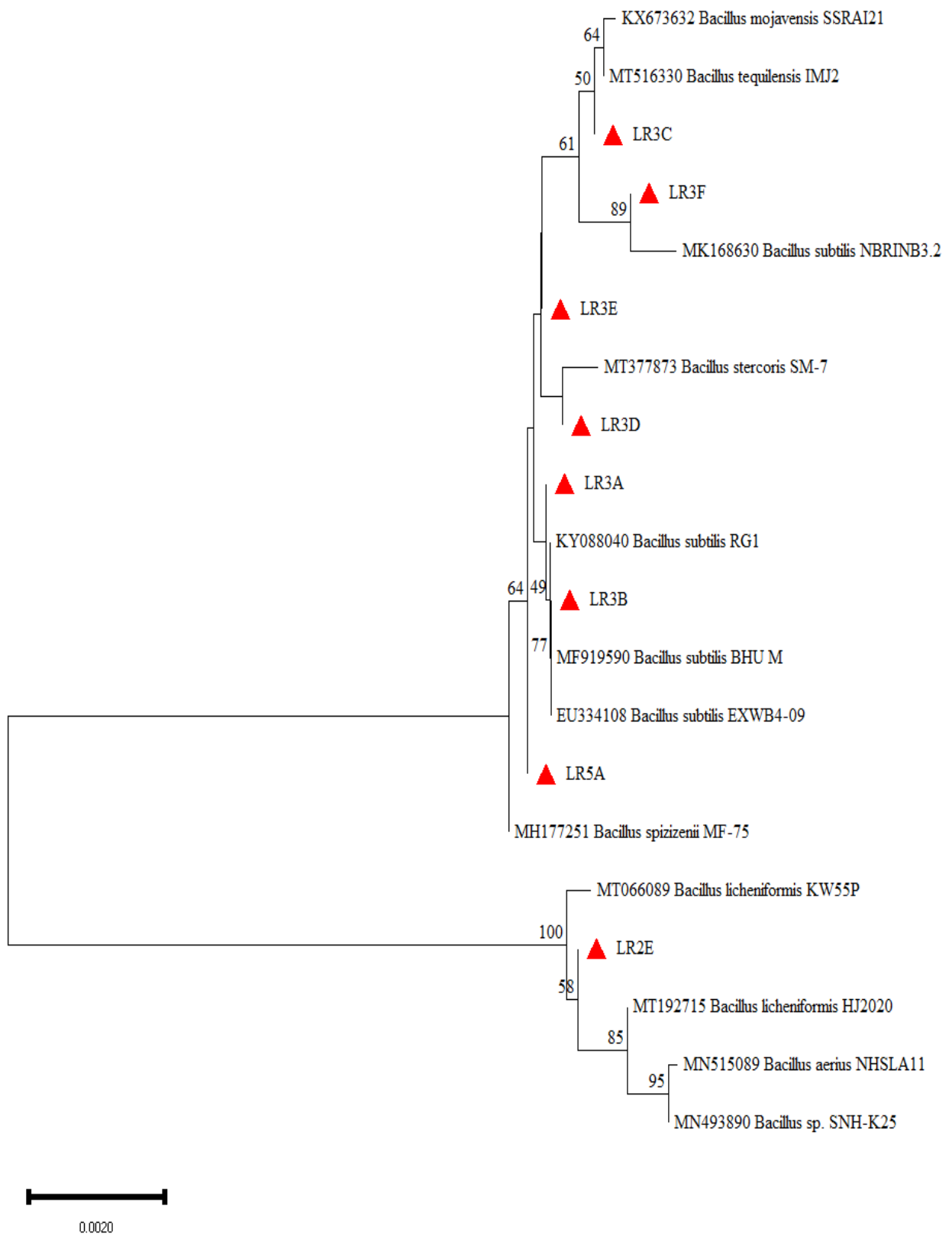
Los resultados de análisis de las secuencias consenso de cada aislamiento obtenidos con la herramienta de alineamientos local BLASTn se muestran en la tabla 6, y confirman los datos obtenidos en la caracterización morfológica e identificación bioquímica.

Se encontró que todos los aislamientos de líquido ruminal pertenecen al género *Bacillus*, LR2E presenta la secuencia de 16S ARNr homóloga a *Bacillus licheniformis* cepa HJ2020, LR3A a la especie *Bacillus subtilis* cepa RG1, LR3B a *Bacillus subtilis* cepa BHU M, LR3C a *Bacillus tequilensis* cepa IMJ2, LR3D y LR3E a *Bacillus stercoris* cepa SM-7, LR3F a *Bacillus subtilis* cepa NBRINB3.2 y LR5A a *Bacillus spizizenii* cepa MF75; todos con un porcentaje de similitud del 100% siendo la especie *Bacillus subtilis* la de mayor frecuencia en el estudio. Por otro lado, el aislamiento de estiércol E4C pertenece al género *Escherichia* con secuencia homóloga a *Escherichia coli* cepa ZD1-1, y los aislamientos E4F y E4H pertenecen al género *Pantoea*, homólogos a *Pantoea sp.* cepa ICMP20864, con porcentaje similitud del 100% y 99.85% respectivamente.

**Tabla 8.** Análisis de secuencias consenso con la herramienta BLASTn del NCBI.

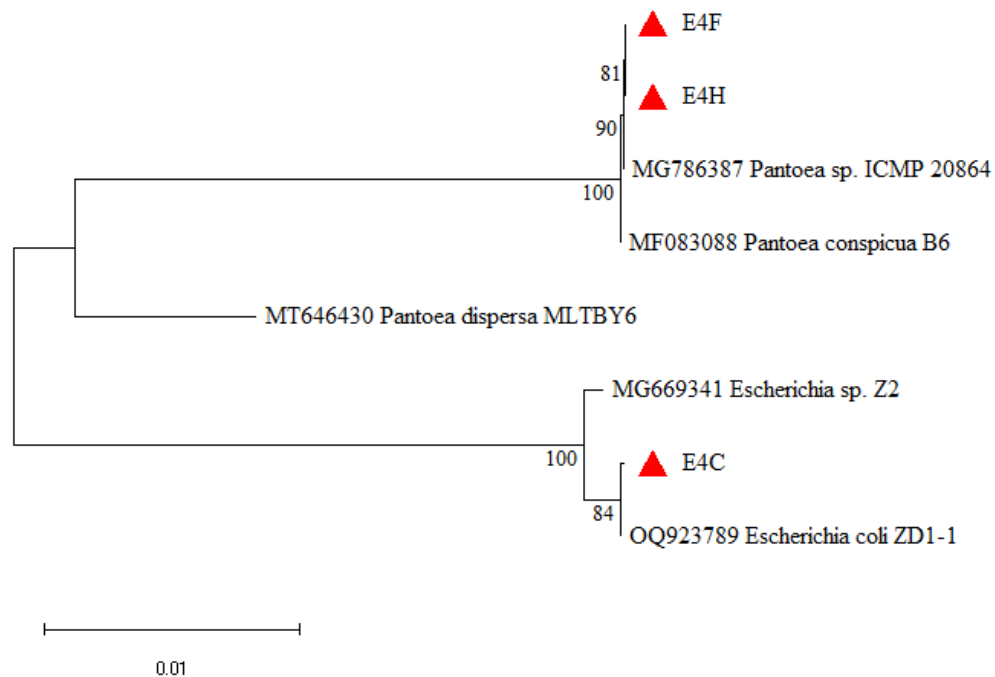
Código de aislamiento	Posible especie bacteriana	Cobertura (%)	E valor	Porcentaje de similitud (%)	Número de Acceso
LR2E	<i>Bacillus licheniformis</i> HJ2020	100	0	100	MT192715
LR3A	<i>Bacillus subtilis</i> RG1	100	0	100	KY088040
LR3B	<i>Bacillus subtilis</i> BHU M	100	0	100	MF919590
LR3C	<i>Bacillus tequilensis</i> IMJ2	100	0	100	MT516330
LR3D	<i>Bacillus stercoris</i> SM-7	100	0	100	MT377873
LR3E	<i>Bacillus stercoris</i> SM-7	100	0	100	MT377873
LR3F	<i>Bacillus subtilis</i> NBRINB3.2	100	0	100	MK168630
LR5A	<i>Bacillus spizizenii</i> MF-75	100	0	100	MH177251
E4C	<i>Escherichia coli</i> ZD1-1	100	0	100	OQ923789
E4F	<i>Pantoe sp.</i> ICMP20864	100	0	99.85	MG786387
E4H	<i>Pantoe sp.</i> ICMP20864	100	0	99.85	MG786387

La relación filogenética de los aislamientos de líquido ruminal y estiércol con las secuencias obtenidas de la base de datos Gen Bank se muestran a través de dos árboles filogenéticos construidos con el método de Neighbor-Joining, y el valor bootstrap del análisis fue de 1000 réplicas; en el árbol correspondiente a líquido ruminal la barra de 0.002 representa el 0,2 % de la divergencia entre especies (figura 7); observándose que, si bien todos los aislamientos pertenecen al género *Bacillus*, posiblemente sean especies y cepas diferentes a las comparadas con la herramienta BLASTn.



**Figura 7.** Árbol filogenético de las secuencias 16S ARNr de los aislamientos de líquido ruminal, marcados con un triángulo rojo, comparados con las secuencias homólogas del GenBank.

Mientras que, en el árbol correspondiente a los aislamientos de estiércol la barra de 0.01 representa el 1 % de la divergencia entre especies (figura 8); encontrando que los aislamientos pertenecen a los géneros *Escherichia* y *Pantoea*, de especies y cepas posiblemente distintas a las comparadas con la herramienta BLASTn.



**Figura 8.** Árbol filogenético de las secuencias 16S ARNr de los aislamientos de estiércol, marcados con un triángulo rojo, comparados con secuencias homólogas del GenBank.

#### 4.1.3 Determinación de la actividad celulolítica de los aislamientos bacterianos

La determinación de la actividad celulolítica realizada en base al método indicado por Khan *et al.*, 2011 y calculada según la ecuación propuesta por Ghose, 1987; permitió medir la producción de celulasas en unidades por mL de enzima (U/mL), considerando una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima requerida para formar 1  $\mu$ mol de azúcar reductor (glucosa) por minuto en las condiciones del ensayo aplicado.

La tabla 9 presenta la actividad enzimática de los aislamientos procedentes de ambos tipos de muestras, siendo la actividad enzimática de las bacterias de líquido ruminal significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la actividad enzimática de las bacterias de estiércol;

en el caso del líquido ruminal, el aislamiento LR3E homólogo a *Bacillus stercoris* cepa SM-7, quien mostró la mayor zona de hidrólisis con 17,1 mm, fue el de mayor actividad enzimática con  $2,1643 \pm 0,0488$  U/mL; mientras que, el aislamiento LR2E homólogo a *Bacillus licheniformis* cepa HJ2020, que mostró una zona de hidrólisis de 10,0 mm, fue el de menor actividad enzimática con  $1,1931 \pm 0,0559$  U/mL. En estiércol, el aislamiento E4H homólogo a *Pantoea* sp. cepa ICMP 20864, que tuvo la mayor zona de hidrólisis con 4,1 mm, fue el produjo la mayor actividad enzimática con  $0,3975 \pm 0,0157$  U/mL; y, el aislamiento E4C homólogo a *Escherichia coli* cepa ZD1-1, quien tuvo una zona de hidrólisis de 3,7 mm, fue el que presentó la menor actividad enzimática con  $0,2699 \pm 0,0243$  U/mL.

**Tabla 9.** Actividad celulolítica (U/mL) de los 11 aislamientos bacterianos obtenidos.

Tipo de muestra	Código del aislamiento	Género bacteriano	Especie homóloga	Actividad enzimática según Ghose, 1987 * (U/mL)
Líquido ruminal	LR2E	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> cepa HJ2020	$1,1931 \pm 0,0559$
	LR3A	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> cepa RG1	$2,0634 \pm 0,0076$
	LR3B	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> cepa BHU M	$2,0768 \pm 0,0523$
	LR3C	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus tequilensis</i> cepa IMJ2	$2,0516 \pm 0,0246$
	LR3D	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus stercoris</i> cepa SM-7	$2,0800 \pm 0,0301$
	LR3E	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus stercoris</i> cepa SM-7	$2,1643 \pm 0,0488$
	LR3F	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> cepa NBRINB3.2	$2,0059 \pm 0,0451$
	LR5A	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus spizizenii</i> cepa MF-75	$1,8941 \pm 0,0377$
Estiércol	E4C	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa ZD1-1	$0,2699 \pm 0,0243$
	E4F	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp. cepa ICMP 20864	$0,3526 \pm 0,0369$
Estiércol	E4H	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp. cepa ICMP 20864	$0,3975 \pm 0,0157$

\*Prueba U de Mann – Whitney ( $p < 0,05$ )

Observándose que los aislamientos de líquido ruminal, correspondientes al género *Bacillus*, son los más eficientes degradadores de celulosa, por su producción de celulasas a las 48 h de fermentación y con una alta actividad celulolítica, respecto a los aislamientos de estiércol que produjeron celulasas a las 96 h de fermentación y que exhiben baja actividad enzimática.

## 4.2 Discusión

En este estudio, se consideró como objetivo general caracterizar bacterias con actividad celulolítica aisladas del líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno de Cajamarca. Para ello, inicialmente se realizó el aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir del cual se obtuvo un total de 54 colonias aisladas del líquido ruminal y estiércol, que fueron analizadas para detectar actividades de degradación de CMC; de las cuales solo 39 aislamientos mostraron crecimiento y zonas o halos de hidrólisis, 23 procedentes de líquido ruminal y 16 de estiércol (Tabla 3 y 4).

De estos aislamientos, únicamente 11 bacterias, 8 de líquido ruminal y 3 de estiércol, mostraron las máximas zonas de hidrólisis (hidrólisis  $\geq 3$  mm) reveladas mediante la tinción del medio con Rojo Congo, que si bien este es el método más utilizado por su sencillez para detección primaria de actividad celulolítica (Teather y Wood, 1982; Ortiz Moreno y Vélez-Urbina, 2011), se sabe también que el diámetro de la zona de hidrólisis puede no reflejar con precisión la verdadera actividad de la celulasa debido a la baja correlación entre la actividad enzimática y el tamaño del halo (Sadhu y Maiti, 2013); de allí que se decidió realizar la cuantificación de la actividad enzimática de los mismos aislamientos, previa caracterización e identificación.

Por otro lado, en cuanto a los 15 aislamientos restantes que no crecieron ni mostraron halos de hidrólisis pero fueron capaces de crecer en el medio suplementado con 1 % de CMC en

el aislamiento inicial, se tendría la explicación de este hecho en las interacciones que existen entre comunidades bacterianas, ya que estos aislamientos pertenecerían al grupo de bacterias que se nutren de proteínas y carbohidratos solubles provenientes de la hidrólisis de carbohidratos complejos como la celulosa, xilano o lignina, realizada por las bacterias fibrolíticas (Parra Oviedo, 2008; Fraga Coteló, 2010). Por ello, al momento de ser sembradas individualmente en el medio que contiene CMC como la mayor fuente de carbono, no fueron capaces de metabolizarla ni de encontrar la cantidad necesaria de carbohidratos simples para su crecimiento; además cabe resaltar que, si bien el medio utilizado posee características físicoquímicas muy similares a las del líquido ruminal como el pH 7 y, fuentes de carbono simples y complejas, fuentes de nitrógeno y sales minerales, y selecciona bacterias potencialmente celulolíticas; también soporta el crecimiento de bacterias que no lo son aunque en mínima cantidad como lo señala Fraga Coteló en 2010, formando colonias muy pequeñas; esto por la presencia de las sales minerales mínimas y dextrosa necesarias para el crecimiento.

El siguiente punto corresponde a la caracterización morfológica e identificación bioquímica y molecular de los 11 aislamientos seleccionados por su mayor zona de hidrólisis, necesaria para alcanzar el objetivo general. Los resultados presentados en las tablas 5, 6 y 7, revelan bacterias con morfología macroscópica y microscópica, y perfiles bioquímicos muy similares para cada tipo de muestra; indicando que todas bacterias procedentes de líquido ruminal pertenecerían al género *Bacillus* con semejanza del 100%, y aquellas aisladas de estiércol pertenecerían a los géneros *Escherichia* con 98, 4% y *Pantoea* con 96% de semejanza; sin embargo, estas similitudes podrían dar a entender que algunos aislamientos se tratarían de bacterias de la misma especie. En consecuencia, se procedió con la identificación molecular de los mismos aislamientos mediante el análisis de las secuencias del gen 16S ARNr con la finalidad de esclarecer estos resultados.

De esta manera, se confirmó que todos los aislamientos de líquido ruminal si pertenecen al género *Bacillus* con una homología del 100% en sus secuencias; mientras que, los aislamientos de estiércol pertenecen a los géneros *Escherichia* y *Pantoea* con porcentajes de homología del 100 y 99,85% respectivamente, en relación a las secuencias obtenidas del Gen Bank que corresponden a diferentes especies de estos géneros.

En base a estos resultados, se analizaron las relaciones filogenéticas de todos aislamientos, a nivel de especies como un aporte adicional a la presente investigación. El árbol filogenético de la figura 7, presenta las bacterias aisladas del rumen bovino que se identificaron con el género *Bacillus* y que se reagruparon entre diferentes especies con un 0,2 % de divergencia entre ellas, generándose 2 clados con marcada divergencia. En uno de ellos se encuentra el aislamiento LR2E evolutivamente cercano a *Bacillus licheniformis* cepa HJ2020, mientras que los demás aislamientos se encuentran en otro clado en el que se observa a LR3A y LR3B en clado en el que se agrupan *Bacillus subtilis* cepa RG1 y *Bacillus subtilis* cepa BHU M respectivamente, LR3C evolutivamente cercano al clado formado por *Bacillus tequilensis* cepa IMJ2 y *Bacillus mojavensis* cepa SSRAI21, LR3D relacionado con *Bacillus stercoris* cepa SM-7, LR3F con *Bacillus subtilis* cepa NBRINB3.2, mientras que los aislamientos LR3E y LR5A se encuentran evolutivamente lejanos a *Bacillus stercoris* cepa SM-7 y *Bacillus spizizenii* cepa MF-75, respectivamente.

El árbol filogenético de la figura 8, presenta las bacterias aisladas del estiércol bovino las cuales se agruparon en 2 clados con marcada divergencia genética entre los géneros *Escherichia* y *Pantoea*, y cada uno se reagrupó entre diferentes especies con un 1 % de divergencia entre ellas. En este caso en uno de los clados se encuentra el aislamiento E4C estrechamente relacionada a *Escherichia coli* cepa ZD1-1, y en el otro clado se encuentran los aislamientos E4F y E4H cercanos evolutivamente a *Pantoea* sp. cepa ICMP 20864.



Respecto a estos hallazgos, la predominancia de bacterias celulolíticas del género *Bacillus* en las muestras de líquido ruminal se explicaría, inicialmente debido a las condiciones ambientales microaerófilas en las que se realizó la colección de las muestras y el cultivo bacteriano, en estas condiciones las bacterias ruminales celulolíticas ampliamente reconocidas, tales como *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium*, *Butyrivibrio* y *Prevotella* (Matthews *et al.*, 2019; Thapa *et al.*, 2020), perecieron debido a que son estrictamente anaerobias (Bryant, 1959; Hua *et al.*, 2022); sin embargo, si fue posible el crecimiento de bacterias celulolíticas anaerobias facultativas como son los *Bacillus*, que son formadores de endosporas cuando se encuentran en condiciones no favorables para su crecimiento (Madigan *et al.*, 2015).

Además, otro fundamento para encontrar estas bacterias es el tipo de alimentación que reciben los bovinos en la región de Cajamarca, que es el pastoreo principalmente; respecto a ello, Sadet-Bourgeteau, Martin y Morgavi, 2010 indican que en animales que consumen pasturas los miembros del phylum *Firmicutes*, al cual pertenecen las bacterias del género *Bacillus*, representan un 50% de la comunidad bacteriana que se encuentra adherida al epitelio ruminal, y que bien pueden encontrar en la fase líquida del contenido ruminal debido a los movimientos rítmicos del rumen que permiten también el acceso continuo de estas bacterias a los potenciales sustratos (McCowan *et al.*, 1978; Fraga Coteló, 2010).

Asimismo, se sabe que más del 70% de la microbiota ruminal está asociada a la fase sólida del contenido ruminal (Forsberg y Lam, 1977); estos microorganismos pueden estar fuertemente adheridos, atrapados o asociados a las partículas del material ingerido (Weimer, 2022), constituyendo el grupo bacteriano que está débilmente asociado a las partículas, responsable de entre el 88 y 91% de la actividad endoglucanasa y xilanasa (Miron, Ben-Ghedalia y Morrison, 2001), que son fundamentales en la fermentación ruminal, estas bacterias también se pueden encontrar en el líquido ruminal debido a los movimientos

ruminales ya mencionados; es por esto que se explica la homología del 100% de las bacterias celulolíticas encontradas en nuestro estudio con las secuencias consenso analizadas con la herramienta de alineamientos local BLASTn, ya que la mayoría de ellas tienen como fuente de aislamiento el suelo rizosférico de cultivos de plantas a las que se encuentran asociadas, como *Bacillus subtilis* cepa RG1, *Bacillus subtilis* cepa BHU M, *Bacillus stercoris* cepa SM-7; o a la endosfera del trigo como *Bacillus spizizenii* cepa MF-75.

No obstante, las investigaciones realizadas previamente en las que se detectaron e identificaron de bacterias celulolíticas de líquido de ganado bovino (vacuno) reportan en su mayoría bacterias Gram negativas, como *Ruminococcus flavefaciens*, *Blautia obeum* y *Clostridium butyricum* en líquido ruminal de ganado bovino egipcio (Khatab, Abd El Tawab y Fouad, 2017), *Escherihcia coli* cepa ZH-4 aislada por primera vez del rumen bovino de Mongolia Interior (Pang *et al.*, 2017), *Enterobacter cloacae* en fluido ruminal de bovinos de Aceh (Sari *et al.*, 2017) y de bovinos de Surabaya (Lokapirnasari *et al.*, 2019) ambos en Indonesia, *Shigella sp.* en ganado Holstein del Estado de México (Luna *et al.*, 2019), *Aeromonas sp* en fluido ruminal de bovinos sacrificados en el matadero de la ciudad de Huramaya en Etiopía (Erba *et al.*, 2020), *Pseudomona sp.* en el fluido ruminal de ganado vacuno sacrificado en el Matadero Kajitula, Sylhet City Corporation en Bangladesh (Poly *et al.*, 2022); *Fibrobacter succinogenes*, *F. succinogenes elongata*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* en el líquido ruminal de ganado vacuno sacrificado en el matadero municipal de Huancavelica en Perú (Carhuapoma-Delacruz *et al.*, 2022); aunque quizás las únicas investigaciones que informan resultados similares a los obtenidos en este estudio son de Seo *et al.* en 2013 que identificaron a *Bacillus licheniformis* JK7 aislado del rumen de una cabra coreana nativa (Seo *et al.*, 2013); y, Andriani y Pratiwy en 2020 quienes identificaron a *Bacillus megaterium* y *Bacillus mycoides* en el fluido de rumen de ganado

bovino sacrificado en el matadero del área de Bandung y Bogor en Indonesia (Andriani y Pratiwy, 2020).

Esta diversidad bacteriana se sustenta, de cierta manera, por las condiciones de cultivo en las que fueron trabajadas las muestras en los estudios mencionados, que fueron en su mayoría anaeróbicas; al igual que en las diferencias que pueden existir entre las comunidades bacterianas ruminales del ganado bovino en base a sus regiones o países de origen (Khattab, Abd El Tawab y Fouad, 2017; Pang, Z. Y. Liu, *et al.*, 2017; Luna *et al.*, 2019; Carhuapoma-Delacruz *et al.*, 2022)

Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de estiércol revelaron la presencia de dos géneros bacterianos como son *Escherichia* y *Pantoea*, aún no reportados como celulolíticos provenientes del estiércol de ganado vacuno, esto probablemente debido a que se sabe muy poco acerca de la estructura de la comunidad de bacterias fecales y cómo es que cambian cuando son expuestas a diferentes tipos de estrés ambiental antes y después de su expulsión, inducido por la ingeniería y la intervención humana, como el tratamiento de aguas residuales, la dieta, la ingesta de antibióticos y la exposición a nanopartículas (Wong *et al.*, 2016); aunque, especies de ambos géneros encontrados en esta investigación son considerados habitantes normales del tracto intestinal en animales y en ocasiones se comportan como patógenos oportunistas (Walterson y Stavrinides, 2015; Mbuk *et al.*, 2016; Stein y Katz, 2017).

En el caso del género *Escherichia*, la especie *E. coli* es, también, ampliamente utilizada en la expresión heteróloga de enzimas como celulasas para una mayor producción (Munjal *et al.*, 2015; Banner, 2018); sin embargo, se ha reportado una *Escherichia spp.* celulolítica aislada del intestino de termitas (Loayza Centeno, 2017) y como ya se mencionó párrafos arriba la identificación, por primera vez, de una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli* cepa ZH-

4) celulolítica a partir del rumen de ganado vacuno en Mongolia (Pang, Z. Y. Liu, *et al.*, 2017).

Mientras que en el género *Pantoea* hay especies tanto patógenas vegetales como con potencial biotecnológico en biocontrol, biorremediación, biosensores e indicadores, y terapéuticos (Walterson y Stavrinides, 2015); y de igual manera, existen investigaciones en las que revelan especies pertenecientes al género *Pantoea* como degradadoras de carbohidratos complejos como la lignina aisladas de diferentes fuentes, tal es el caso de la bacteria endófito aislada de semillas de arroz *Pantoea ananatis* Sd-1 en la ciudad de Changsha, provincia de Hunan, China (Ma *et al.*, 2016), *Pantoea* sp. SL1\_M5 aislada de la avispa de madera invasiva *Sirex noctilio* recolectados de pino escocés infestado, *Pinus sylvestris* L, en el condado de Onondaga, NY, Estados Unidos (Adams *et al.*, 2011), *Pantoea* sp. RCT2 aislada del efluente de la Century Pulp Paper Mill Lalkuan, Uttarakhand, India (Chandra y Singh, 2012) y *Pantoea agglomerans* sp. aislada del suelo de dos experimentos de campo factoriales realizados en el Instituto de Agricultura, Centro de Investigación de Agricultura y Silvicultura de Lituania (Shamshitov *et al.*, 2023).

Otras investigaciones en estiércol de ganado vacuno comunican la identificación de diferentes bacterias en su mayoría Gram-positivas, como *Stenotrophomonas* sp. y *Bacillus cereus* sp. a partir de estiércol fresco de vaca en China (Hong-li *et al.*, 2015), géneros que tuvieron similitud con *Pseudomonas* spp. 96%, *Acinetobacter* spp. 95%, *Bacillus* spp. 97%, *Stenotrophomonas* spp. 88% y *Brachybacterium* spp. 97%, de heces del ganado bovino de Bali en Indonesia (Missa, Susilowati y Setyaningsih, 2016), aislados bacterianos estrechamente relacionados con *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Serratia marcescens* a partir de muestras de estiércol de ganado de Sagar en India (Vyas y Kumar, 2018); y, *Bacillus* sp. de estiércol de vaca recolectado de la zona agrícola de Ahmednagar, India (Deshmukh, Bhagat y More, 2018) , de estiércol de vacas del establo en la granja de la

Universidad de Calabar en Nigeria (Asitok *et al.*, 2019), y un *Bacillus* sp estrechamente relacionado con *Bacillus cereus* (GenBank número de acceso AF290555) de estiércol de vaca en la región norte de Sri Lanka (Croos, Rajendran y Ranganathan, 2019); las diferencias entre los resultados de estos estudios previos y los obtenidos en la presente investigación radicarían en la forma de colección de muestras, ya que en este caso se obtuvieron directamente de la porción final del intestino grueso evitando la exposición a rayos solares y al cambio brusco de temperatura.

Finalmente, el tercer punto corresponde a la determinación de la actividad celulolítica de los aislamientos identificados. Las bacterias procedentes de líquido ruminal tuvieron las mayores medidas tanto en la zona de hidrólisis como en la actividad celulolítica de esta investigación, esto debido a que la función principal de las bacterias en el rumen es la descomposición de celulosa y hemicelulosa (Cholewińska *et al.*, 2020), mediante la fermentación ruminal del alimento fibroso, en compuestos más simples que se absorben directamente a la sangre nutriendo al animal (van Lier y Regueiro, 2008).

Obteniéndose así, al aislamiento LR3E homólogo a la especie *Bacillus stercoris* cepa SM-7 como el mayor degradador de celulosa con una zona de hidrólisis de 17,1 mm y el mejor productor de celulasas con una actividad enzimática de  $2,1643 \pm 0,0488$  U/mL. Además, los resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Seo *et al.* en 2013 que reportaron a *Bacillus licheniformis* JK7 con actividad endoglucanasa de 0.75 U / ml a una temperatura óptima de 70 °C y de 1.10 U / ml a pH 5,0 (Seo *et al.*, 2013); y por Andriani y Pratiwy en 2020 quienes identificaron a *Bacillus megaterium* y *Bacillus mycoides* los cuales produjeron zonas de hidrólisis de 1.20 cm equivalente a 12 mm y 1.40 cm a 14 mm, respectivamente (Andriani y Pratiwy, 2020).

Con relación a los aislamientos de estiércol, que presentaron baja actividad celulolítica respecto a los de líquido ruminal, el aislamiento E4H homólogo a la especie *Pantoea* sp. cepa ICMP 20864 tiene la mayor zona de hidrólisis con 4,1 mm y una actividad enzimática de  $0,3975 \pm 0,0157$  U/mL; pudiendo comparar los resultados con los presentados por Missa, Susilowati y Setyaningsih en 2016 que obtuvieron zonas claras de entre 14.7 a 70.8 mm de los aislados homólogos a *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Stenotrophomonas* spp. y *Brachy bacterium* spp., y aquellos con potencial de ser nuevas especies bacterianas (Missa, Susilowati y Setyaningsih, 2016); y por Pang *et al.* en 2017 que identificaron a *Escherichia coli* cepa ZH-4 con una actividad exoglucanasa de 9,13 UI, endoglucanasa de 5,31 UI y  $\beta$ -glucosidasa de 7,27 UI a pH 6,8; sin embargo, el primer estudio no informa bacterias de los géneros identificados en esta investigación y los demás tienen como fuentes de aislamiento el rumen bovino.

Es necesario mencionar las limitaciones que existieron durante el desarrollo de la presente investigación. La primera fue la falta de información acerca del origen inicial y estado de salud de los animales de los que se obtuvieron las muestras estudiadas que definitivamente nos hubiese permitido interpretar los resultados de manera más integrada; y, la segunda fue falta de acceso a CO<sub>2</sub> para el posible cultivo e identificación de las típicas bacterias fibrolíticas ruminales que son estrictamente anaerobias; sin embargo, pese a estas limitaciones y por todo lo mencionado anteriormente, el líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno de Cajamarca representan ambientes propicios para encontrar diversidad bacteriana potencialmente productora de celulosas, lo que representa una gran oportunidad para futuros estudios complementarios que permitan aprovechar el potencial biotecnológico de estos ambientes considerados como desechos de la actividad pecuaria en la región Cajamarca.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Se caracterizaron 11 aislamientos bacterianos con actividad celulolítica a partir del líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno de Cajamarca.

Los géneros bacterianos con actividad celulolítica aislados del líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno de Cajamarca pertenecen al género *Bacillus*, y a los géneros *Escherichia* y *Pantoea*, respectivamente.

La actividad celulolítica de las bacterias procedentes de líquido ruminal fue considerablemente mayor que de las bacterias del estiércol, debido a que la función principal de las bacterias en el rumen es la descomposición de celulosa y hemicelulosa; mientras que en el estiércol se encuentran bacterias involucradas en el metabolismo de otros compuestos orgánicos e inorgánicos, además de los carbohidratos complejos, pero en concentraciones menores debido a que este es el producto de desecho del ganado.

El aislamiento bacteriano codificado como LR3E fue el más destacado, por producir la mayor zona de hidrólisis con 17,1 mm y la mejor actividad enzimática con  $2,1643 \pm 0,0488$  U/mL.

El líquido ruminal y estiércol de ganado vacuno de Cajamarca posee bacterias potencialmente productoras de celulasas, enzimas que pueden utilizarse en la generación de bioproductos para la industria textil, alimentaria, farmacéutica, ambiental; y, de biocombustibles a largo plazo.

## **5.2 Recomendaciones**

La presente investigación representa un importante primer paso en la exploración del potencial biotecnológico que tienen los desechos provenientes de la actividad pecuaria en Cajamarca, como el contenido ruminal y estiércol; por ello, se recomienda continuar en esta línea de investigación y para futuras investigaciones, el cultivo e identificación de microorganismos anaeróbicos, la caracterización de celulasas, optimización de sus procesos de producción y cuantificación y el escalamiento de la producción de estas enzimas, lo que podría permitir aplicarlas en un futuro dentro el campo industrial.



## LISTA DE REFERENCIAS

- Adams, A. S. *et al.* (2011) ‘Cellulose-degrading bacteria associated with the invasive woodwasp *Sirex noctilio*’, *The ISME Journal*, 5(8), pp. 1323–1331. doi: 10.1038/ismej.2011.14.
- Altschul, S. F. *et al.* (1990) ‘Basic local alignment search tool’, *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Altschul, S. F. *et al.* (1997) ‘Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.’, *Nucleic acids research*, 25(17), pp. 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Anderson, I. *et al.* (2012) ‘Genomics of aerobic cellulose utilization systems in actinobacteria’, *PLoS ONE*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0039331.
- Andriani, Y. y Pratiwy, F. M. (2020) ‘Isolation and identification of rumen microbes and rumen fluid enzymes to use as the bio-degradator feed in aquaculture’, *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 8(4), pp. 61–64.
- Araujo, O. y Vergara, J. (2007) ‘Propiedades físicas y químicas del rumen’, *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, p. 133. Disponible en: [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/manejo\\_del\\_alimento/49-rumen.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/49-rumen.pdf).
- Asitok, A. D. *et al.* (2019) ‘Cellulolytic Potentials of *Bacillus* Species CDS4 Isolated from Cow Dung Samples’, *Human Journal*, 13(4). Disponible en: <https://ijsrm.humanjournals.com/wp-content/uploads/2019/11/2.ASITOK-A.-D.-Ekpenyong-M.-G.-John-G.-E.-Antai-S.-P..pdf>.
- Awad, M. y Lewis, L. (1980) ‘Avocado cellulase extraction and purification’, *Journal of Food Science*, 45(6), pp. 1625–1628. doi: 10.1111/j.1365-2621.1980.tb07577.x.

Baltaci, M. O. y Adiguzel, A. (2016) 'Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey', *Research Journal of Biotechnology*, 11(2), pp. 32–38.

Banner, A. (2018) *Engineering Escherichia coli to degrade lignocellulose*. The University of Manchester. Disponible en: [https://research.manchester.ac.uk/files/157709954/FULL\\_TEXT.PDF](https://research.manchester.ac.uk/files/157709954/FULL_TEXT.PDF).

Bayne, J. E. y Edmondson, M. A. (2021) '5 - Diseases of the gastrointestinal system', en *Sheep, goat and cervid medicine*. Third Edit. Elsevier Inc., pp. 63–96. doi: 10.1016/B978-0-323-62463-3.00014-1.

Beguín, P. y Aubert, J.-P. (1994) 'The biological degradation of cellulose', *FEMS Microbiology Reviews*, 13(1), pp. 25–58. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x.

Behera, S. y Ray, R. (2021) 'Bioprospecting of cowdung microflora for sustainable agricultural, biotechnological and environmental applications', *Current Research in Microbial Sciences*, 2, p. 100018. doi: 10.1016/j.crmicr.2020.100018.

Benson, D. A. *et al.* (2013) 'GenBank.', *Nucleic acids research*, 41(Database issue), pp. D36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195.

Blanco, A. y Blanco, G. (2017) 'Carbohydrates', en *Medical Biochemistry*. Elsevier, pp. 73–97. doi: 10.1016/B978-0-12-803550-4.00004-5.

Blumes, J. E. y Ennis, H. L. (1991) 'A *Dictyostelium discoideum* Cellulase is a Member of a Spore Germination-specific Gene Family', *The Journal of Biological Chemistry*, 266(23), pp. 15432–15437. doi: 10.1016/S0021-9258(18)98634-5.

Brigham, C. (2017) 'Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics', en *Green Chemistry: An Inclusive Approach*. Elsevier Inc., pp. 753–770. doi: 10.1016/B978-

0-12-809270-5.00027-3.

Bryant, M. P. (1959) 'Bacterial species of the rumen', *Bacteriological reviews*, 23(3), pp. 125–153. doi: 10.1128/br.23.3.125-153.1959.

Cahuana, F. (2012) *Efecto de la actividad enzimática de Fibrobacter succinogenes sobre celulosa obtenida del paper periódico*. Universidad Nacional del Centro del Perú.

Huancayo. Disponible en:

[https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/1239/Cahuana\\_tesis](https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/1239/Cahuana_tesis)

2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Carhuapoma-Delacruz, V. *et al.* (2022) 'Bacterias fibrolíticas aisladas de rumen de alpaca, ovino y vacuno con capacidad biodegradadora de celulosa', *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, XXXII, pp. 1–7. doi: 10.52973/rcfcv-e32094.

Chandra, R. y Singh, R. (2012) 'Decolourisation and detoxification of rayon grade pulp paper mill effluent by mixed bacterial culture isolated from pulp paper mill effluent polluted site', *Biochemical Engineering Journal*, 61, pp. 49–58. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.12.004>.

Chauhan, A. y Jindal, T. (2020a) 'Biochemical and Molecular Methods for Bacterial Identification', en Chauhan, A. y Jindal, T. (eds) *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*. Cham: Springer International Publishing, pp. 425–468. doi: 10.1007/978-3-030-52024-3\_10.

Chauhan, A. y Jindal, T. (2020b) 'Microbiological Culture Media: Types, Role and Composition', en Chauhan, A. y Jindal, T. (eds) *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*. Cham: Springer International Publishing, pp. 23–66. doi: 10.1007/978-3-030-52024-3\_3.

Cholewińska, P. *et al.* (2020) 'The microbiome of the digestive system of ruminants – a review', *Animal Health Research Reviews*. 2020/01/10, 21(1), pp. 3–14. doi: 10.1017/S1466252319000069.

Coleman, D., Studler, M. y Naleway, J. (2007) 'A long-wavelength fluorescent substrate for continuous fluorometric determination of cellulase activity: resorufin- $\beta$ -d-cellobioside', *Analytical Biochemistry*, 371(2), pp. 146–153. doi: 10.1016/j.ab.2007.08.027.

Coleman, G. (1978) 'The metabolism of cellulose, glucose and starch by the rumen ciliate protozoon *Eudiplodinium maggii*', *Journal of General Microbiology*, 107(2), pp. 359–366. doi: 10.1099/00221287-107-2-359.

Collins English Dictionary (2019) *Coprophilous*, Penguin Random House LLC HarperCollins Publishers Ltd. Disponible en: <https://www.collinsdictionary.com/dictionary/english/coprophilous>.

Corberá, J. *et al.* (2004) *Análisis del líquido ruminal*, Unidad de Medicina Interna Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Disponible en: [https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/111142/1/08 Análisis del líquido ruminal Albéitar 2004%2C 80%2C 34-37.pdf](https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/111142/1/08_Análisis_del_líquido_ruminal_Albéitar_2004%2C_80%2C_34-37.pdf).

Corrales Ramírez, L. C. y Caycedo Lozano, L. (2020) 'Principios fisicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología', *Nova*, 18(33 SE-Artículo de Revisión). doi: 10.22490/24629448.3701.

Croos, A. M. B., Rajendran, S. y Ranganathan, K. (2019) 'Isolation of a cellulase producing *Bacillus cereus* from cow dung and determination of the kinetic properties of the crude enzyme', *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 47(2), pp. 261–267. doi: 10.4038/jnsfsr.v47i2.9168.

Dar, M. A. *et al.* (2022) 'Evaluation and characterization of the cellulolytic bacterium, *Bacillus pumilus* SL8 isolated from the gut of oriental leafworm *Spodoptera litura*: An assessment of its potential value for lignocellulose bioconversion', *Environmental Technology and Innovation*, 27, p. 102459. doi: 10.1016/j.eti.2022.102459.

Das, A., Bhattacharya, S. y Murali, L. (2010) 'Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolated from cow dung.', *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 8(6), pp. 685–691. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113009426>.

Dean, D. (2015) *Nutrir adecuadamente al rumen para mejorar la respuesta productiva del animal*. Ediciones, *Logros y Desafíos de la Ganadería Doble Propósito*. Ediciones. Edited by E. S. B. Carlos González-Stagnaro, Ninoska Madrid-Bury. Maracaibo: Fundación GIRARZ. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/nutrir-adecuadamente-rumen-mejorar-t32693.htm>.

Deshmukh, S. R., Bhagat, R. P. y More, N. V (2018) 'Optimization of cellulase production from cellulose degrading microorganism isolated from cow dung', *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*, pp. 19–25.

Dhiman, S. *et al.* (2021) 'Cattle Dung Manure Microbiota as a Substitute for Mineral Nutrients and Growth Management Practices in Plant', en Nature, S. (ed.) *Endophytes: Mineral Nutrient Management*. Uttarakhand, pp. 76–104. Disponible en: [https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=hqkhEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA76&dq=identification+of+cellulolytic+bacteria+from+bovine+manure&ots=fhz4O-BazD&sig=rxIOOnOCKJA2NS6rXr\\_kGJ8farBw#v=onepage&q=identification+of+cellulolytic+bacteria+from+bovine+manure&](https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=hqkhEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA76&dq=identification+of+cellulolytic+bacteria+from+bovine+manure&ots=fhz4O-BazD&sig=rxIOOnOCKJA2NS6rXr_kGJ8farBw#v=onepage&q=identification+of+cellulolytic+bacteria+from+bovine+manure&)

Encyclopedia Britannica (2023) *Polymer*, *Encyclopedia Britannica*. Disponible en:

<https://www.britannica.com/science/polymer>.

Erba, O. *et al.* (2020) 'Isolation of Cellulose Degrading Bacteria from Rumen and Evaluation of Cellulase Production Potential Using Lignocellulosic Substrate', *Ethiopian Journal of Science and Sustainable Development*, 7, p. 2020. doi: 10.20372/ejssdastu:v7.i1.2020.127.

Ergun, R., Guo, J. y Huebner-Keese, B. (2015) 'Cellulose', en *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Inc., pp. 694–702. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00127-6.

Forsberg, C. W. y Lam, K. (1977) 'Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents.', *Applied and environmental microbiology*, 33(3), pp. 528–537. doi: 10.1128/aem.33.3.528-537.1977.

Fortina, R. *et al.* (2022) 'Rumen Fluid from Slaughtered Animals: A Standardized Procedure for Sampling, Storage and Use in Digestibility Trials', *Methods and Protocols*, 5(4). doi: 10.3390/mps5040059.

Fraga Coteló, M. (2010) *Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos*. Universidad de la República. Montevideo. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/4110/1/uy24-15408.pdf>.

Franco, R. *et al.* (2019) 'Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present', *Microorganisms*. MDPI AG, p. 130. doi: 10.3390/microorganisms7050130.

García, H. (2013) 'Barreras para el desarrollo de la bioenergía', *Matriz Energética en el Perú y Energías Renovables*. Editado por C. H. Pecart. Lima - Perú: Tarea Asociación Gráfica Educativa, p. 53. Disponible en: <http://library.fes.de/pdf-files/bueros/peru/10183.pdf>.

Ghose, T. K. (1987) 'Measurement of cellulase activities', *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), pp. 257–268. doi: doi:10.1351/pac198759020257.

Girija, D. *et al.* (2013) 'Analysis of cow dung microbiota-A metagenomic approach', *Indian Journal of Biotechnology*, 12, pp. 372–378. Disponible en: [https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/21863/1/IJBT\\_12%283%29\\_372-378.pdf](https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/21863/1/IJBT_12%283%29_372-378.pdf).

Grilli, D. (2015) 'Aparato digestivo de los rumiantes'. Universidad Juan Agustín Maza. Mendoza, Argentina: Jenaro Holguin, p. 74. Disponible en: <https://slideplayer.es/slide/2908430/>.

Grudsky, R. y Arias, J. (1983) 'Aspectos generales de la microbiología del rumen', *Monografías de Medicina Veterinaria*, 5(2). Disponible en: [https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CD\\_A/mon\\_vet\\_completa/0,1421,SCID%253D7627%2526ISID%253D410,00.html](https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CD_A/mon_vet_completa/0,1421,SCID%253D7627%2526ISID%253D410,00.html).

Guion, C. E. *et al.* (2008) 'Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR.', *Journal of clinical microbiology*, 46(5), pp. 1752–1757. doi: 10.1128/JCM.02341-07.

Gupta, K., Aneja, K. y Rana, D. (2016) 'Current status of cow dung as a bioresource for sustainable development', *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1), p. 28. doi: 10.1186/s40643-016-0105-9.

Gupta, P., Samant, K. y Sahu, A. (2012) 'Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential', *International Journal of Microbiology*, 2012, p. 5. doi: 10.1155/2012/578925.

Hasan, N. A. (2021) 'Laboratory Manual of Basic Molecular Biology Techniques'. Zenodo, p. 99. doi: 10.5281/zenodo.4541490.

- Helal, G. A. (2005) 'Bioconversion of Straw into Improved Fodder: Fungal Flora Decomposing Rice Straw', *Mycobiology*, 33(3), p. 150. doi: 10.4489/myco.2005.33.3.150.
- Hobdey, S. E. *et al.* (2015) 'New Insights into Microbial Strategies for Biomass Conversion', en *Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels*. Elsevier, pp. 111–127. doi: 10.1016/B978-0-444-59592-8.00007-5.
- Hong-li, Z. *et al.* (2015) 'Isolation, Identification and Characterization of Cellulose-Degradation Bacteria from Fresh Cow Dung and Fermentation Biogas Slurry', *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(3). Disponible en: <https://www.rroj.com/open-access/isolation-identification-and-characterization-of-cellulosedegradation-bacteria-from-fresh-cow-dung-and-fermentation-biogas-slurry.pdf>.
- Hua, D. *et al.* (2022) 'Starch and Cellulose Degradation in the Rumen and Applications of Metagenomics on Ruminal Microorganisms', *Animals*. doi: 10.3390/ani12213020.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) (2012) *IV Censo Nacional Agropecuario*. Disponible en: <http://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinalesIVCENAGRO.pdf>.
- Jang, J., Lee, H. y Lyoo, W. S. (2007) 'Effect of UV irradiation on cellulase degradation of cellulose acetate containing TiO<sub>2</sub>', *Fibers and Polymers*, 8(1), pp. 19–24. Disponible en: <https://fddocuments.in/document/effect-of-uv-irradiation-on-cellulase-degradation-of-cellulose-acetate-containing.html>.
- Jayasekara, S. y Ratnayake, R. (2019) 'Microbial Cellulases: An Overview and Applications', en Pascual, A. R. y Martín, M. E. E. (eds) *Cellulose*. IntechOpen, p. 21. doi: 10.5772/intechopen.84531.



Jouany, J. (1991) *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. Quae (INRA editions). Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=Bcsa8Z4u-E4C>.

Kasana, R. *et al.* (2008) 'A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine', *Current microbiology*, 57, pp. 503–507. doi: 10.1007/s00284-008-9276-8.

Khan, J. *et al.* (2011) 'Deciphering Cow Dung for Cellulase Producing Bacteria', *European Journal of Experimental Biology*, 1(1), pp. 139–147. Disponible en: <https://www.primescholars.com/articles/deciphering-cow-dung-for-cellulase-producing-bacteria.pdf>.

Khattab, M., Abd El Tawab, A. y Fouad, M. (2017) 'Isolation and characterization of anaerobic bacteria from frozen rumen liquid and its potential characterizations', *International Journal of Dairy Science*, 12(1), pp. 47–51. doi: 10.3923/ijds.2017.47.51.

Kuhad, R., Gupta, R. y Singh, A. (2011) 'Microbial cellulases and their industrial applications', *Enzyme Research*, 2011(1), p. 10. doi: 10.4061/2011/280696.

Kumar, J., Narnoliya, L. K. y Alok, A. (2019) 'Chapter 6 - A CRISPR Technology and Biomolecule Production by Synthetic Biology Approach', en Singh, S. P. *et al.* (eds). Elsevier, pp. 143–161. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64085-7.00006-X>.

de la Mora, D. A. L. y Sandoval Rodríguez, A. S. (2013) 'Electroforesis', en Salazar Montes, A. M., Sandoval Rodríguez, A. S., y Armendáriz Borunda, J. S. (eds) *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. New York, NY: McGraw-Hill Education. Disponible en: <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1118679698>.

Lakhundi, S., Siddiqui, R. y Khan, N. A. (2015) 'Cellulose degradation: a therapeutic

strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections’, *Parasites & Vectors*, 8(1), p. 23. doi: 10.1186/s13071-015-0642-7.

Larsson, A. (2014) ‘AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets’, *Bioinformatics*, 30(22), pp. 3276–3278. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531.

Leo, V. *et al.* (2019) ‘Microorganisms as an efficient tool for cellulase production: Availability, diversity, and efficiency’, en *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: From Cellulose to Cellulase: Strategies to Improve Biofuel Production*. Elsevier, pp. 45–61. doi: 10.1016/B978-0-444-64223-3.00004-7.

van Lier, E. y Regueiro, M. (2008) *Digestión en Reticulo-Rumen*. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Disponible en: <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf>.

Loayza Centeno, D. S. (2017) *Bacterias celulolíticas con características probióticas del intestino de termitas y su evaluación como potenciales degradadoras de totora (Schoenoplectus tatora)*. Universidad Nacional del Altiplano. Puno. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/6165>.

Lokapirnasari, W. *et al.* (2019) ‘Characterization of Cellulolytic Bacteria as Candidate Probiotic for Animal’, *The Indian Veterinary Journal*, 29(08), pp. 29–31.

Lokapirnasari, W. P. *et al.* (2015) ‘Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Surabaya abattoir, Indonesia.’, *Veterinary world*, 8(3), pp. 367–371. doi: 10.14202/vetworld.2015.367-371.

Luna, L. *et al.* (2019) ‘Isolation, biochemical characterization and phylogeny of a cellulose-

degrading ruminal bacterium', *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 32(2), pp. 117–125. doi: 10.17533/udea.rccp.v32n2a05.

Ma, J. *et al.* (2016) 'Genomic and secretomic insight into lignocellulolytic system of an endophytic bacterium *Pantoea ananatis* Sd-1', *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), p. 25. doi: 10.1186/s13068-016-0439-8.

Madigan, M. *et al.* (2015) *Brock: Biología de los microorganismos*. 14th edn. Editado por M. Martín-Romo. Madrid (España): Pearson Educación, S.A.

Matthews, C. *et al.* (2019) 'The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency', *Gut Microbes*. Taylor & Francis Inc., pp. 115–132. doi: 10.1080/19490976.2018.1505176.

Mbuk, E. U. *et al.* (2016) 'Coliform organisms associated with milk of cows with mastitis and their sensitivity to commonly available antibiotics in Kaduna State, Nigeria', *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 8(12), pp. 228–236. doi: 10.5897/jvmah2016.0522.

McCowan, R. P. *et al.* (1978) 'Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle.', *Applied and environmental microbiology*, 35(1), pp. 149–155. doi: 10.1128/aem.35.1.149-155.1978.

McDonald, J. E., Rooks, D. J. y McCarthy, A. J. (2012) 'Chapter nineteen - Methods for the Isolation of Cellulose-Degrading Microorganisms', en Gilbert, H. J. (ed.) *Cellulases*. Academic Press, pp. 349–374. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00019-7>.

Mekonnen, A. (2021) 'A Review on Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin', *Global Journal of Biology*, 10(103). doi: 10.35248/2319-5584.21.10.103.

Menendez, E., Garcia, P. y Rivas, R. (2015) 'Biotechnological applications of bacterial cellulases', *AIMS Bioengineering*, 2(3), pp. 163–182. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.163.

Miller, G. L. (1959) 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030.

Ministerio de Agricultura (MINAG) (2009) *Propuesta Plan Nacional de Agroenergía 2009 - 2020*, *Minag*. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/novedades/propuesta-plan-nacional-agroenergia-plan.pdf>.

Miron, J., Ben-Ghedalia, D. y Morrison, M. (2001) 'Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria', *Journal of Dairy Science*, 84(6), pp. 1294–1309. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70159-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70159-2).

Missa, H., Susilowati, A. y Setyaningsih, R. (2016) 'Diversity and phylogenetic relationship of cellulolytic bacteria from the feces of Bali Cattle in South Central Timor, East Nusa Tenggara, Indonesia', *Biodiversitas*, 17(2), pp. 614–619. doi: 10.13057/biodiv/d170232.

Munjal, N. *et al.* (2015) 'A Constitutive Expression System for Cellulase Secretion in *Escherichia coli* and Its Use in Bioethanol Production', *PLOS ONE*, 10(3), p. e0119917. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119917>.

Noreen, A. *et al.* (2020) 'Chapter 12 - Protein-based bionanocomposites', en Mahmood Zia, K. *et al.* (eds) *Micro and Nano Technologies*. Elsevier, pp. 267–320. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816751-9.00012-X>.

Ortiz Moreno, M. y Urbina-Vélez, D. (2011) 'Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo', *Orinoquia*, 15(1). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-)

37092011000100002.

Ozbayram, E. *et al.* (2018) ‘Comparison of Rumen and Manure Microbiomes and Implications for the Inoculation of Anaerobic Digesters’, *Microorganisms*, 6(1), p. 15. doi: 10.3390/microorganisms6010015.

Pang, J. *et al.* (2017) ‘An isolated cellulolytic *Escherichia coli* from bovine rumen produces ethanol and hydrogen from corn straw’, *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), p. 165. doi: 10.1186/s13068-017-0852-7.

Parish, J., Rivera, D. y Boland, H. (2017) *Understanding the Ruminant Animal Digestive System*. Mississippi State University. Mississippi. Disponible en: <http://extension.msstate.edu/publications/publications/understanding-the-ruminant-animal-digestive-system>.

Parra Oviedo, C. (2008) *Caracterización de poblaciones microbianas en dos tipos de estiércol, durante el proceso de compostaje*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D. C. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8813/tesis760.pdf?sequence=1>.

Patel, K. *et al.* (2015) ‘Isolation and Characterization of Cellulase Producing Bacteria from Rumen Fluid’, *International Journal of Advanced Research*, 3(5), pp. 1103–1112. Disponible en: [https://www.journalijar.com/uploads/122\\_IJAR-5869.pdf](https://www.journalijar.com/uploads/122_IJAR-5869.pdf).

Pérez-Barbería, F. J. (2020) ‘The Ruminant: Life History and Digestive Physiology of a Symbiotic Animal BT - Sustainable and Environmentally Friendly Dairy Farms’, en García-Yuste, S. (ed.). Cham: Springer International Publishing, pp. 19–45. doi: 10.1007/978-3-030-46060-0\_2.

Petrovski, K. R. (2017) ‘Assessment of the Rumen Fluid of a Bovine Patient’, *Journal of*

*Dairy & Veterinary Sciences*, 2(3). doi: 10.19080/JDVS.2017.02.555588.

Poly, N. *et al.* (2022) ‘Isolation, documentation, and biochemical characterization of cellulolytic bacteria from rumen fluid of cattle’, *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 5, pp. 433–444. doi: 10.5455/jabet.2022.d126.

Procop, G. W. *et al.* (2017) *Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Seventh ed. China: Wolters Kluwer.

Ramírez, R. (2017) *Principios De Nutrición De Rumiantes*. Editado por Palibrio. México: Palibrio. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=Vv0sDwAAQBAJ>.

Rawway, M., Ali, S. G. y Badawy, A. S. (2018) ‘Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Different Sources at Assiut Governorate (Upper Egypt)’, *Journal of Ecology of Health & Environment*, 6(1), pp. 15–24. doi: 10.18576/jehe/060103.

Ribeiro, J. C. *et al.* (2016) ‘Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk’, *Semina: Ciências Agrárias*, 37(5), pp. 3069–3078. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069.

Ríos de Souza, L., Lo, D. y Ximenes, E. (2016) ‘An Overview of Cellulose-Degrading Enzymes and Their Applications in Textile Industry’, en *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications*. Elsevier Inc., pp. 165–175. doi: 10.1016/B978-0-444-63507-5.00014-9.

Rodríguez, L. y Llenque, L. (2016) ‘Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos | REBIOL’, *REBIOL Revista de Investigación Científica*, 36(1), pp. 19–28. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbbiol/article/view/1310>.

Sadet-Bourgeteau, S., Martin, C. y Morgavi, D. P. (2010) ‘Bacterial diversity dynamics in

rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets', *Veterinary Microbiology*, 146(1), pp. 98–104. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.029>.

Sadhu, S. y Maiti, T. K. (2013) 'Cellulase Production by Bacteria: A Review', *British Microbiology Research Journal*, 3(3), pp. 235–258. doi: [10.9734/bmrj/2013/2367](https://doi.org/10.9734/bmrj/2013/2367).

Saini, A. *et al.* (2015) 'Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes', *Enzyme Research*, 2015(1), p. 15. doi: [10.1155/2015/279381](https://doi.org/10.1155/2015/279381).

Saitou, N. y Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.', *Molecular biology and evolution*, 4(4), pp. 406–425. doi: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454).

Sari, W. N. *et al.* (2017) 'Isolation and identification of a cellulolytic *Enterobacter* from rumen of Aceh cattle', *Veterinary World*, 10(12), pp. 1515–1520. doi: [10.14202/vetworld.2017.1515-1520](https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1515-1520).

Seo, J. K. *et al.* (2013) 'Characterization of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 Isolated from the Rumen of a Native Korean Goat.', *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26(1), pp. 50–58. doi: [10.5713/ajas.2012.12506](https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12506).

Shamshitov, A. *et al.* (2023) 'Characterisation of Cellulolytic Bacteria Isolated from Agricultural Soil in Central Lithuania', *Sustainability (Switzerland)*, 15(1). doi: [10.3390/su15010598](https://doi.org/10.3390/su15010598).

Shuangqi, T. *et al.* (2011) 'Determination methods of cellulase activity', *African Journal of Biotechnology*, 10(37), pp. 7122–7125. doi: [10.5897/AJB10.2243](https://doi.org/10.5897/AJB10.2243).

Singh, S. *et al.* (2019) 'Developing Efficient Thermophilic Cellulose Degrading Consortium for Glucose Production From Different Agro-Residues', *Frontiers in Energy Research*. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2019.00061>.

Stein, R. A. y Katz, D. E. (2017) ‘*Escherichia coli*, cattle and the propagation of disease’, *FEMS microbiology letters*, 364(6). doi: 10.1093/femsle/fnx050.

Suresh, R. *et al.* (2019) ‘Chapter 6 - Graphene–Metal Chalcogenide Modified Electrochemical Sensors’, en Pandikumar, A. y Rameshkumar, P. (eds) *Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules*. Elsevier, pp. 139–153. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815394-9.00006-6>.

Tamura, K., Stecher, G. y Kumar, S. (2021) ‘MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11’, *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), pp. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120.

Teather, R. M. y Wood, P. J. (1982) ‘Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen’, *Applied and environmental microbiology*, 43(4), pp. 777–780. doi: 10.1128/aem.43.4.777-780.1982.

Thapa, S. *et al.* (2020) ‘Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation’, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Springer, pp. 621–648. doi: 10.1007/s11157-020-09536-y.

Thörig, L., Halperin, M. y van Haeringen, N. J. (1984) ‘Cotton-thread tear test: an experimental study for testing drugs suspected of side effects on lacrimation’, *Documenta Ophthalmologica*, 58(3), pp. 307–315. doi: 10.1007/BF00153632.

Toyama, H. *et al.* (2007) ‘Filter paper degrading ability of a *Trichoderma* strain with multinucleate conidia’, en *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer, pp. 155–160. doi: 10.1007/s12010-007-9047-1.

Vieira, L. *et al.* (2016) ‘Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality’,



*Industrial Biotechnology*. Mary Ann Liebert Inc., pp. 40–57. doi: 10.1089/ind.2015.0017.

Vyas, P. y Kumar, A. (2018) ‘Biochemical and molecular characterization of cellulase producing bacterial isolates from cattle dung samples’, *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 3(1), pp. 1–6. doi: 10.15226/2475-4714/3/1/00132.

Walterson, A. M. y Stavrinides, J. (2015) ‘*Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*’, *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), pp. 968–984. doi: 10.1093/femsre/fuv027.

Weimer, P. J. (2022) ‘Degradation of Cellulose and Hemicellulose by Ruminant Microorganisms.’, *Microorganisms*, 10(12). doi: 10.3390/microorganisms10122345.

Wong, K. *et al.* (2016) ‘Rapid microbiome changes in freshly deposited cow feces under field conditions’, *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). doi: 10.3389/fmicb.2016.00500.

Wright, A. y Klieve, A. (2011) ‘Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation?’, *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp. 248–253. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.04.015.

Xie, G. *et al.* (2007) ‘Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*’, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), pp. 3536–3546. doi: 10.1128/AEM.00225-07.

Yaniv, O. *et al.* (2014) ‘Fine-structural variance of family 3 carbohydrate-binding modules as extracellular biomass-sensing components of *Clostridium thermocellum* anti- $\sigma$ I factors’, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 70(2), pp. 522–534. doi: 10.1107/S139900471302926X.

Yin, X. B. *et al.* (2012) ‘3.22 - Mercury Speciation and Binding to Biomacromolecules’, en Pawliszyn, J. (ed.). Oxford: Academic Press, pp. 435–460. doi:

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00094-6>.

## APÉNDICES Y ANEXOS

### APÉNDICES

#### Apéndice 1. Lugar de muestreo



**Figura 9.** Mapa de ubicación geográfica del Camal Municipal de Cajamarca (Google Maps).

#### Apéndice 2. Toma de muestras



**Figura 10.** Toma de muestra del contenido ruminal.



**Figura 11.** Toma de muestra de estiércol.

### Apéndice 3. Condiciones de transporte de muestras



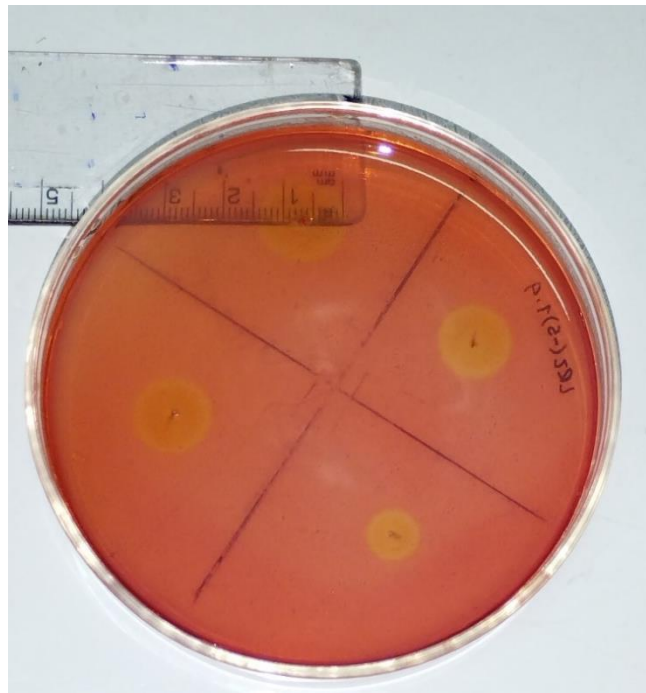
Figura 12. Transporte de muestras de líquido ruminal y estiércol a 38°C.

### Apéndice 4. Cultivo inicial de bacterias celulolíticas



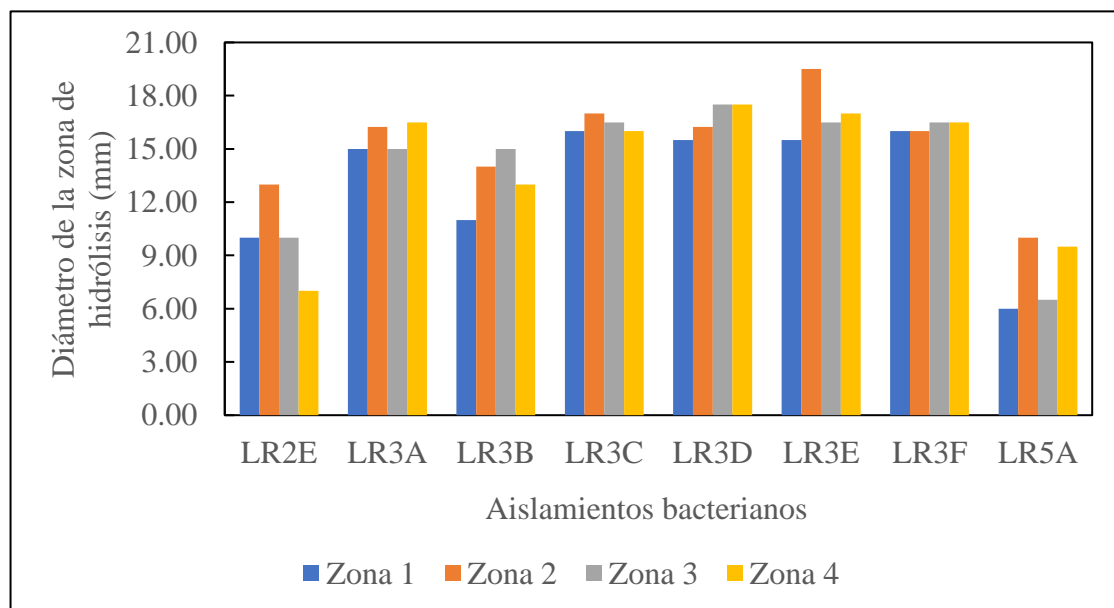
**Figura 13.** Condiciones de cultivo inicial de bacterias celulolíticas, a la izquierda se muestran cultivos de estiércol y a la derecha cultivos de líquido ruminal.

**Apéndice 5. Evaluación de la actividad celulolítica en medio mínimo suplementado con 1% de CMC.**

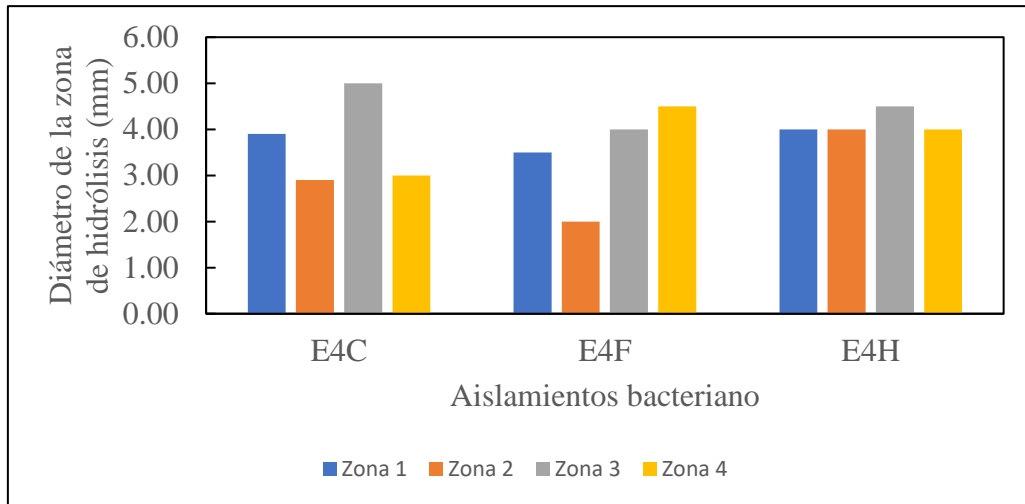


**Figura 15.** Medición de halos de hidrólisis mediante el revelado con Rojo Congo 0,1%.

**Apéndice 6. Valoración de la actividad celulolítica de los aislamientos bacterianos seleccionados**

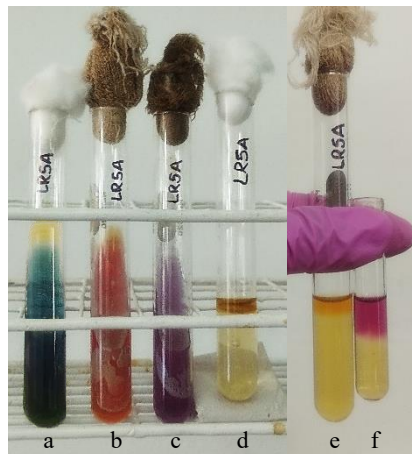


**Figura 14.** Diámetros de la zona de hidrólisis de los aislamientos bacterianos de líquido ruminal seleccionados, agrupados en series que corresponden a las repeticiones.

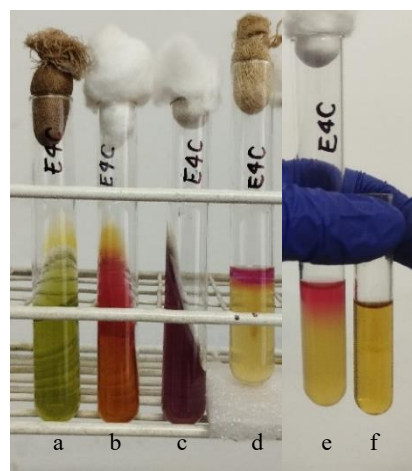


**Figura 16.** Diámetros de la zona de hidrólisis de los aislamientos bacterianos de estiércol, agrupados en series que corresponden a las repeticiones

### Apéndice 7. Pruebas bioquímicas



**Figura 17.** Resultados de las pruebas bioquímicas del aislamiento LR5A de líquido ruminal: a) Citrato de Simons, b) TSI, c) LIA, d) SIM, e) RM y f) VP



**Figura 18** Resultados de las pruebas bioquímicas del aislamiento E4C de estiércol: a) Citrato de Simons, b) TSI, c) LIA, d) SIM, e) RM y f) VP

## Apéndice 8. Cromatograma de secuencia del gen 16S ARNr

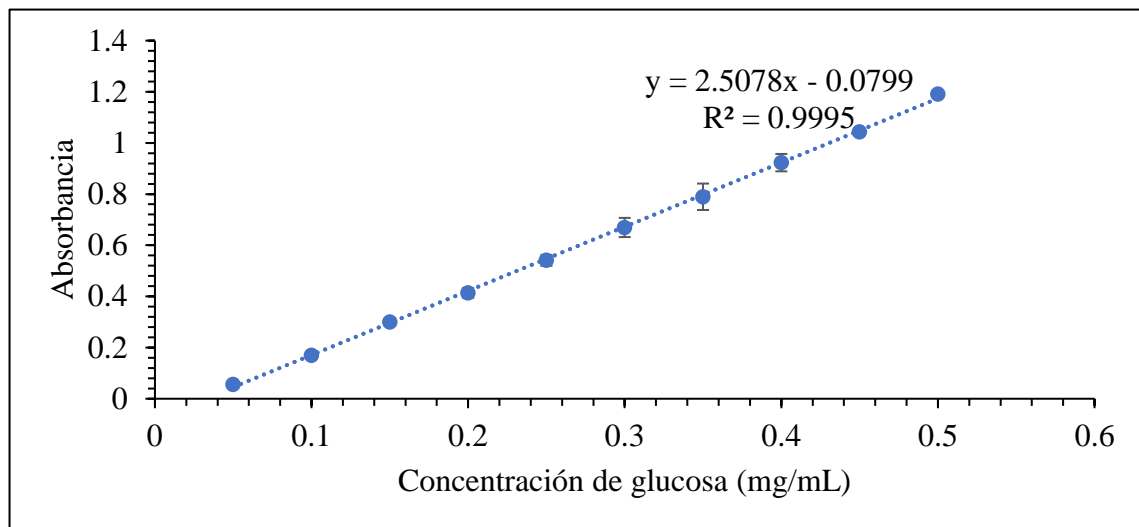


File: 1\_27F.ab1 Run Ended: 2023/5/9 15:53:25 Signal G:3602 A:5029 C:5993 T:4800  
Sample: 1\_27F Lane: 3 Base spacing: 16.68244 1165 bases in 13963 scans Page 1 of 2



Figura 19. Cromatograma de la secuencia del primer 27F del gen 16 ARNr del aislamiento LR3A.

## Apéndice 9. Curva padrón de glucosa



**Figura 20.** Gráfico de la curva padrón de glucosa en la que se muestra la ecuación de la recta:  $y = 2.5078x - 0.0799$ ; y el  $R^2 = 0.9995$

## Apéndice 10. Análisis estadístico

### PRUEBA DE NORMALIDAD

#### a) Hipótesis estadísticas:

Ho: Los datos de actividad enzimática siguen distribución normal

Ha: Los datos de actividad enzimática no siguen distribución normal.

#### b) Nivel de significación: $p \leq 0,05$

#### c) Estadístico de prueba:

Prueba estadística Shapiro-Wilk para determinar normalidad de datos de actividad enzimática en muestras de líquido ruminal y de estiércol

		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Actividad enzimática	Líquido ruminal	,644	24	,000
	Estiércol	,925	9	,433

#### d) Decisión:

$p > 0,05 \rightarrow$  No se rechaza la hipótesis nula.



$p \leq 0,05 \rightarrow$  Se rechaza la hipótesis nula

**e) Conclusiones:**

- Los datos de actividad enzimática en líquido ruminal no siguen distribución normal.
- Los datos de actividad enzimática en estiércol siguen distribución normal.

**PRUEBA NO PARAMÉTRICA**

**a) Hipótesis estadísticas:**

$H_0$ : No hay diferencias en el nivel de actividad enzimática entre líquido ruminal y estiércol.

$H_a$ : Hay diferencias en el nivel de actividad enzimática entre líquido ruminal y estiércol.

**b) Nivel de significación:  $p \leq 0,05$**

**c) Estadístico de prueba:**

Prueba estadística U de Mann-Whitney

<b>Rangos</b>				
	Muestra	N	Rango promedio	Suma de rangos
Actividad enzimática	Líquido ruminal	24	21,50	516,00
	Estiércol	9	5,00	45,00
	Total	33		

**Estadísticos de contraste<sup>a</sup>**

	Actividad enzimática
U de Mann-Whitney	,000
W de Wilcoxon	45,000
Z	-4,366
Sig. asintót. (bilateral)	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: Muestra

b. No corregidos para los empates.

**d) Decisión:**

$p > 0,05 \rightarrow$  No se rechaza la hipótesis nula.

$p \leq 0,05 \rightarrow$  Se rechaza la hipótesis nula

**e) Conclusiones:**

Hay diferencias en el nivel de actividad enzimática entre líquido ruminal y estiércol.

## ANEXOS

### Anexo 1. Composición del medio para selección de bacterias celulolíticas

Tabla 10. Medio Mínimo Suplementado con 1% CMC

Componentes	Cantidad (g/100mL)
Dextrosa	0,10
K <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub>	0,70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,10
Agar	2,00
Carboximetilcelulosa	1,00

Fuente. Das, Bhattacharya y Murali (2010)

### Anexo 2. Composición del medio de fermentación

Tabla 11. Medio de fermentación suplementado con 1% CMC

Componentes	Cantidad (g/mL)
Peptona	0,5
Extracto de levadura	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
NaCl	0,5
MgSO <sub>4</sub>	0,02
Carboximetilcelulosa	1,0

Fuente. Khan *et al.* (2011)

### Anexo 3. Ecuación para determinar la actividad enzimática

$$\text{Ecuación 1: } \frac{\text{concentración de glucosa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{Tiempo de incubación (min)} \times \text{vol.de enzima (mL)} \times \text{peso molecular de glucosa}} \times 1000$$

Fuente. Ghose (1987)