



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

DEGRADACIÓN DE CELULOSA DE PAÑALES DESECHABLES USADOS
CON *BACILLUS SP.*

AUTOR

JHONNY EMILIO PLAZA VERDUGA

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

DEGRADACIÓN DE CELULOSA DE PAÑALES DESECHABLES USADOS
CON *BACILLUS SP.*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero Ambiental en Prevención y
Remediación.

Profesor guía

M. Sc. Miguel Ángel Gualoto Oñate

Autor

Jhonny Emilio Plaza Verduga

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Degradación de celulosa de pañales desechables usados con *bacillus sp.*, a través de reuniones periódicas con el estudiante Jhonny Emilio Plaza Verduga, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Miguel Ángel Gualoto Oñate

Master of Science en Biología

CI.: 1707429351

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Degradación de celulosa de pañales desechables usados con *bacillus sp.*, del estudiante Jhonny Emilio Plaza Verduga, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Indira Fernandina Black Solís

Magister en Conservación y Gestión del Medio Natural

CI.: 171127356-3

DECLARACIÓN DE AUDITORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Jhonny Emilio Plaza Verduga

CI.: 0802973016

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por cada una de sus bendiciones a lo largo de este camino y con su infinito amor poderme permitir superar cada uno de los obstáculos que se me presentaron.

A mis padres, Betty Verduga y Jhonny Plaza por su confianza, su apoyo incondicional durante este proceso ayudándome a sobreponerme a todas las adversidades y ayudarme a cumplir mis metas.

A mi hermana Zuleyka por ser parte de este proceso con su apoyo.

A todos quienes siempre estuvieron conmigo, sobre todo a Keyla Herrera por su apoyo, su paciencia en todo momento y amor incondicional al nunca dejarme solo a pesar de las adversidades.

A todos quienes me facilitaron las instalaciones, los equipos, los reactivos y su tiempo para poder lograr culminar con éxito mi proyecto. Sobre todo, a la carrera de Ingeniería Ambiental con su coordinador, Alejandro González.

DEDICATORIA.

Se lo quiero dedicar por completo a mi madre, Betty Isabel Verduga Alvarez, porque con su esfuerzo, dedicación y amor fue la impulsora para que logre culminar mi carrera con éxitos, sin ella no estaría aquí se merece todos los reconocimientos del mundo.

Y por último a uno de los grandes profesores y ser humano que pude conocer, MSc. Daniel Hidalgo siendo el principal pionero en la realización de este trabajo aportando con su conocimiento para la iniciación de este trabajo, ganándose mi admiración y respeto.

RESÚMEN

El presente estudio buscó generar una alternativa de gestión eficiente de pañales usados con la finalidad de aprovechar la celulosa y transformarlo de un problema ambiental, en materia prima para otros procesos industriales.

La biorremediación es una de las alternativas eficientes que se puede emplear para solventar problemas de contaminación ambiental, aprovechando las capacidades metabólicas de los microorganismos capaces de usar a los residuos como fuente de carbono necesario para su metabolismo.

En la investigación, se empleó la bacteria *Bacillus sp.*, aislada en la Antártida, en la que se evidenció la actividad de β glucanasa, en consecuencia, tiene la capacidad de emplear material lignocelulósico como fuente de carbono. Se ejecutaron pruebas de degradación del algodón procedente de pañales desechables en medio mineral líquido Difco Bushnell- Haas Broth, en presencia de una pequeña fuente de lignina (cascarilla de arroz). Las pruebas se ejecutaron durante 30 días bajo una temperatura constante de 15°C. Se investigó la influencia de NPK sobre el proceso de degradación de celulosa

La transformación de la celulosa en azúcares se monitoreo con ayuda del reactivo Somogyi-Nelson, que permitió medir la concentración de los azúcares fermentables por espectrofotometría. Adicionalmente se midieron los grados brix obteniéndose valores de: 3.2, 4.8 y 5.6. La eficiencia de la cepa empleada fue de apenas 2%, con la mayor concentración de NPK.

Palabras claves: *Bacillus sp.*, celulosa, hidrólisis enzimática, lignocelulosa, pañales desechables, azúcares fermentables, Antártida.

ABSTRACT

This study sought to generate an alternative efficient management of used diapers in order to take advantage of cellulose and transform it from an environmental problem into raw material for other industrial processes.

Bioremediation is one of the efficient alternatives that can be used to solve environmental contamination problems, taking advantage of the metabolic capacities of microorganisms capable of using waste as a necessary source of carbon for its metabolism.

In the research, the bacterium *Bacillus sp.*, Isolated in the Antarctic, was used, in which the activity of β -glucanase was evidenced, consequently, it has the capacity to use lignocellulosic material as a carbon source. Degradation tests were carried out on cotton from disposable diapers in Difco Bushnell-Haas Broth liquid mineral medium, in the presence of a small source of lignin (rice husk). The tests were carried out for 30 days under a constant temperature of 15 ° C. The influence of NPK on the cellulose degradation process was investigated.

The transformation of cellulose into sugars was monitored with the help of the Somogyi-Nelson reagent, which allowed to measure the concentration of fermentable sugars by spectrophotometry. In addition, the brix degrees were measured, obtaining values of: 3.2, 4.8 and 5.6. The efficiency of the strain used was barely 2%, with the highest concentration of NPK

Keywords: *Bacillus sp.*, Cellulose, enzymatic hydrolysis, lignocellulose, disposable diapers, fermentable sugars, Antarctica.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
2. Capítulo II. Marco Teórico.....	4
2.1. Compuestos ligno celulósicos	4
2.1.1. Propiedades físico químicas	4
2.1.2. Degradación enzimática de lignocelulosa.....	5
2.1.3. Degradación de celulosa	6
2.1.4. Tipos y fuente de materiales ligno celulósicos.....	7
2.1.5. Generación mundial.....	10
2.2. Desechos ligno – celulósicos.....	13
2.2.1. Clasificaciones.....	13
2.2.2. Uso potencial.....	14
2.2.3. Que se hace en el mundo y en la región sobre los pañales desechables.....	15
2.2.4. Problema ambiental asociados a los pañales desechables.....	19
2.3. Microorganismos degradadores de celulosa	20
2.3.1. Hongos	21
2.3.2. Bacterias.....	22
2.4. <i>Bacillus</i>	23
2.4.1. Caracterización de <i>bacillus sp</i>	25
2.4.2. Degradación de celulosa con <i>bacillus sp</i>	26
2.4.3. Experiencias de <i>bacillus sp</i> en la antártida.....	27
3. Capítulo III. Metodología.....	28
4.1. Diseño experimental.....	28

4.1.1. Variables independientes	28
3.1.2. Variables respuesta	28
4.2. Recolección y preparación de la celulosa.....	31
4.3. Preparación del cultivo microbiano.....	31
4.4. Preparación de los reactivos	31
4.4.1. Somogyi 1.....	32
4.4.2. Somogyi 2.....	32
4.4.3. Nelson	33
4.5. Preparación de las soluciones de glucosa.....	33
4.6. Lectura de absorbancia de glucosa.....	34
4. Capítulo IV. Resultados y Discusión.....	35
4.1. Determinación de parámetros cinéticos	35
4.1.1. Tasa de crecimiento.....	35
4.1.2. Tasa de degradación	37
4.1.3. Tiempo de vida media y eficiencia comparativa	44
4.2. Medición de grados brixs	45
4.3. Análisis estadístico	46
5. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES.....	51
5.1. Conclusiones	51
5.2. Recomendaciones	51
REFERENCIAS	53
ANEXOS	64

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

La sociedad de consumo en la que vivimos, genera grandes cantidades de residuos, en la producción de recursos y servicios que cubren la demanda social y en los hogares de los consumidores que los liberan al ambiente (Rodríguez S. , 2012). Los residuos generados en hogares, mercados, industrias, hospitales, etc., no son gestionados en forma segura, generando impactos socio- ambientales desfavorables. Tan solo en los últimos años, un modesto porcentaje de los residuos generados, son aprovechados en diversos ámbitos. (Arroyo, 2012).

La gestión de estos residuos, solo se ha centrado en la eliminación a través de rellenos sanitarios o en algunos casos la incineración. (Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, 2016). De los componentes de los residuos sólidos, los residuos que mayor impacto ambiental generan, son los pañales desechables (Rodríguez H. , 2012), su generación incrementa anualmente, tan solo en México, el volumen de generación diaria es de 26.7 toneladas. (Ramírez & Andrade, 2012)

La busca de alternativas que reduzcan el volumen de residuos generados, está ligada al poco espacio disponible para su disposición final y por la resistencia social al emplazamiento de rellenos cercanos a sitios poblados (Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, 2016).

Muchas de las alternativas propuestas e implementadas de reducción y tratamiento de residuos, impulsadas por los avances tecnológicos e investigación; han permitido reducir sustancialmente sus volúmenes e impactos ambientales. Entre las tecnologías implementadas están: incineración, acumulación en rellenos sanitarios, pirolisis, reciclaje, separación en la fuente. Estos procesos no son una solución definitiva debido a que generan contaminación secundaria. (Cabrera, 2014)

Una de las metodologías propuestas es la biorremediación, que emplea microorganismos para su mineralización hasta componentes inorgánicos inocuos simples, como CO₂, H₂O, N₂, etc. (Cordero, 2014). La biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por el hongo *pleurotus*, es un ejemplo de esta alternativa, el fin de este procedimiento es de reducir la biomasa de celulosa y lignina, presentes en los desechos de tipo urbano. (Delfín & Durán, 2013), esto se consigue, por inoculación de bacterias y hongos de la podredumbre blanca, que son los mejores degradadores de materiales lignocelulósicos presentes en los residuos vegetales y que con frecuencia, contienen productos fitosanitarios en altas concentraciones. (Grijalva, 2013)

Como se mencionó anteriormente, los pañales desechables constituyen un problema ambiental (Ramírez & Andrade, 2012), con el propósito de reducir su impacto, se han implementado iniciativas de aprovechar la celulosa y producir subproductos de interés industrial, esto es, transformar los residuos en una nueva materia prima. El proceso de Biodegradación de la celulosa libera azúcares fermentecibles que pudiéndose utilizar en la elaboración de etanol o edulcorantes. (Llenque & Rodriguez, 2016)

En el Ecuador entre los años 2002 hasta el 2010 no se ha obtenido avances en la gestión de residuos, de 221 municipios del país, solo 160 poseen rellenos sanitarios a cielo abierto donde depositan sus desechos, generando contaminación de recursos como el agua, suelo y aire; con afectaciones en la salud de la población. (Ministerio del Medio Ambiente, 2010).

En el Ecuador, el reciclaje se ha ido incrementando paulatinamente al pasar de los años. Actualmente en el país hay 20 empresas que se dedican al reciclaje, de acuerdo a Mario Bravo, 2013, Presidente Ejecutivo actual de la Cámara Ecuatoriana Americana de Comercio, en ninguna de estas, se tiene ningún proceso de reciclaje de pañales desechables que permita su aprovechamiento.

1.2. Planteamiento del problema

El aumento de la generación de residuos, genera contaminación al aire, suelo y agua, y se constituye en fuente de enfermedades y pérdida de recursos.

(Quintero, Teutli, & Gonzalez, 2015). El 40 % de estos residuos, son de pañales desechables que contienen celulosa o lignina, además de productos que se derivan del petróleo como los plásticos , polietileno y elásticos, los no reciben un tratamiento. (Delfín & Durán, 2013). Por esta razón, llegando a convertirse en las principales causas de contaminación ambiental a nivel mundial.

Son pocos procesos de tipo químicos y físicos que se han empleado para dar soluciones reales a la reducción de la carga contaminante que generan estos residuos. Las pocas tecnologías empleadas son costosas y de baja eficiencia, con frecuencia requieren tratamientos adicionales, que no contribuyen a su degradación completa. (Buenrostro & Israde, 2013)

En nuestro país, son pocas las investigaciones y propuestas dirigidas a disminuir la generación, eliminación y aprovechamiento energético de residuos que llegan a los rellenos sanitarios. La biorremediación es una alternativa, sin embargo, no existen antecedentes de utilización de microorganismos, y existe poco conocimiento sobre su uso y eficiencia en la reducción del impacto ambiental generado por estos residuos, en la pérdida de recursos naturales y biodiversidad, que incrementa la insatisfacción social.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la degradación de celulosa de pañales desechables usados con *Bacillus sp.*

1.3.2. Objetivos específicos

- Calcular los parámetros cinéticos del proceso de degradación de celulosa empleando *Bacillus sp.*
- Evaluar la influencia de distintas concentraciones de NPK, sobre la tasa de degradación de la celulosa.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Compuestos ligno celulósicos

La lignocelulosa es el principal compuesto de pared celular de las plantas, la cual se produce mediante la fotosíntesis, es la principal fuente de carbono de la naturaleza y de materia prima para la producción de energía con una amplia gama de bienes y servicios. (A.Alvarez–Castillo & Salgado–Delgado, 2012). Los compuestos ligno celulósicos contienen elementos fermentables abundantes, que son renovables y sus emisiones de CO₂ son prácticamente de cero, razón por la que, constituyen una alternativa energética al uso de derivados del petróleo. (García, 2008).

El material ligno celulósico, por medio de procesos de pirólisis, gasificación, hidrólisis enzimática o química y por fermentación, es empleado para la producción de elementos energéticos secundarios como la producción de etanol. (Nuñez, 2016). Las enzimas de carácter ligno celulítico transforman compuestos ligno celulósicos en azúcares, como por ejemplo glucosa que puede aplicarse en la producción de etanol u otros alcoholes de carácter industrial, también puede ser utilizada para la manufactura en la producción de alimento tanto para humanos como para animales. (Rodríguez et al., 1990; FAO, 2011).

La biomasa de origen lignocelulítico siendo materia prima que aparte de ser abundante también es renovable, produciendo anualmente en el mundo cerca de 10 a 50 mil millones de toneladas de materia secas (Galbe & Zacchi, 2002).

2.1.1. Propiedades físico químicas

La lignina tiene una densidad de 1,3 g/ml a unos 25°C. La lignina difiere de la celulosa al poseer características estructurales contrarias a la celulosa. La lignina está conformada por distintas unidades estructurales, que no se repiten

y que dependen del material de origen y de la metodología de extracción y/o aislamiento. (Sifontes & Domine, 2013). La celulosa en cambio, se estructura por unidades químicas que se repiten (Figura 1)

Los componentes de los materiales ligno celulósicos, su estructura química, su grado de entrecruzamiento y su configuración dependen del material de origen. La estructura determina las propiedades mecánicas, y su invulnerabilidad a la acción de cualquiera de los microorganismos (Salsedo, López, & Flórez, 2011)

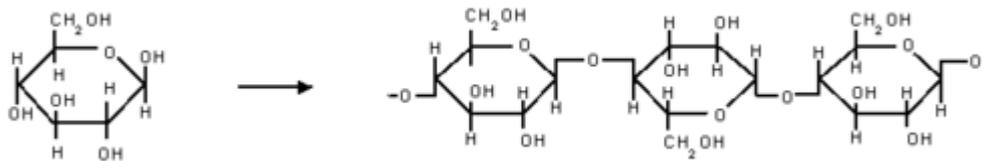


Figura 1. Estructura química de la celulosa.

Tomado de (Jiménez, 2015)

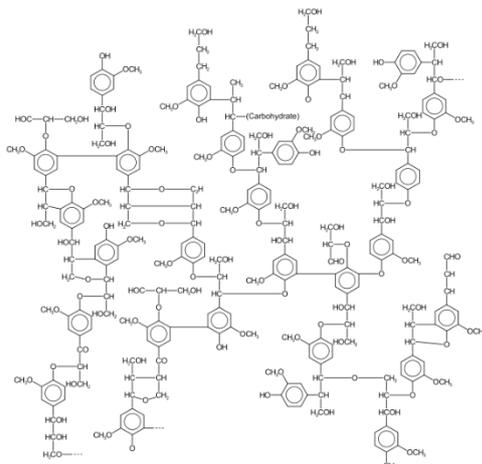


Figura 2. Estructura de la lignina.

Tomado de (Miró, 2004)

2.1.2. Degradación enzimática de lignocelulosa

En la hidrólisis de los compuestos ligno celulósicos participan distintas enzimas extracelulares microbianas de hongos o bacterias como la lignina per oxidasa abreviada LiP, el mono fenil oxidasa con su abreviación Lac, el manganeso per

oxidasa abreviándose como MnP y las oxidasas productoras de H₂O₂. En la etapa de la degradación enzimática desde celulosa hasta glucosa intervienen tres enzimas: exoglucanasas, endo-glucanasas y β- glucosidasas., en las etapas de la degradación de la hemicelulosa participan enzimas como xilanasas y mananasas, de las cuales la β xilosidasa degrada los xilo-oligosacáridos. (Salsedo, López, & Flórez, 2011).

2.1.3. Degradación de celulosa

La celulosa, es de los elementos poliméricos con más abundancia en el mundo (Martínez, 2005), la cual se compone por moléculas de D-glucosa ensambladas por una serie de enlaces glicosídicos β1-4 (Mejía-Castillo, 2002), su degradación en la naturaleza se da mediante procesos enzimáticos que se conforman por endo β1-4 glucanasas, exo β1-4 glucanasas y β glucosidasas, que sinérgicamente, convierten el polímero en Dglucosa (Maki, 2011). La aplicación de la celulasa no solo se basa para las industrias de alimentos y químicas (Sheble & El-dewany, 2007), sino también se aplica en la fabricación de textiles, cueros y de papel, necesitando enzimas que se desempeñen a temperaturas y pH extremos, por esta razón es marcado el interés por la investigación de organismos termófilos celulolíticos. (Liang, 2010).

Las celulasas son parte importante para la producción de biocombustibles, debido a la producción de glucosa que se genera al degradarse los compuestos celulósicos procedentes de materiales lignocelulósicos, la cual posteriormente, mediante tecnologías biológicas se va a transformar en etanol (Maki, 2011).

La degradación de celulosa puede ocurrir bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas con sistemas enzimáticos específicos. (Cuervo, 2009).

En los organismos aerobios, los procesos enzimáticos se hallan como moléculas aisladas, medios no agregativos, que constantemente se emiten al

medio de cultivo y que vinculan la celulosa, asegurando la eficiencia de la hidrólisis enzimática. (Mingardon, 2011).

Las enzimas capaces de degradar la celulosa, genéricamente denominadas celulasas, son producidas por hongos y bacterias. Entre los hongos celulolíticos, los mejores productores son: *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* y entre las bacterias: *Cellulomonas*, *Bacillus* y *Clostridium*. Gran parte de estos microorganismos producen enzimas extracelulares y esto permite que puedan ser separadas fácilmente del medio de cultivo para su posterior utilización. (Alfonseel, Negro, Saez, & Moreno, 2016)

2.1.4. Tipos y fuente de materiales ligno celulósicos

2.1.4.1. Tipos

La clasificación de los compuestos ligno celulósicos se basa en la relación de los componentes estructurales. Más de la mitad, es celulosa unida a la lignina, que forma la hemicelulosa y los componentes secundarios obtenidos por solventes orgánicos llamados extractos y el material mineral llamadas cenizas. (Barroso, Universidad Politécnica de Madrid, 2010)

Los compuestos ligno celulósicos, conformados por una relación 4:3:3 de celulosa, lignina y hemicelulosa, cuya relación varía de acuerdo a la especie vegetal. Todos estos son fuentes de materiales poliméricos de utilidad industrial. (Nuñez, 2016).

La representación de lignina es de 20 a 35 % de materia seca en fibras procedente de maderera y de 10 a 25 % en fibras que no pertenecen a la maderera. Presenta una estructura polimérica macromolecular. Mientras que la cantidad de lignina en hierba elefante es de 20.5 %, 3 % más que en la paja de trigo, 6 % más que en el sisal y el abacá. (Prinsen, 2010). Como podemos observar en la Tabla 1.

Tabla 1.

Porcentajes de los tipos y fuentes de materiales ligno celulíticos.

Material	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
lignocelulítico			
Maderas blandas	40	31	34
Maderas duras	49	40	30
Paja	42	38	21
Bambú	43	26	32
Algodón	85	--	--
Hoja del maíz	40	31	19
Tallo de clavel	50	45	25
Corona de piña	45	50	30
Tallo rosa	50	25	25
Cáscara de naranja	16.2	13.8	1
Tallo maíz	50	20	30
Bagazo de plátano	55.65	14	11.58

Tomado de (Prinsen, 2010)

2.1.4.2. Fuentes

Las fuentes de materiales ligno celulíticos es muy amplia, desde especies maderables hasta plantas herbáceas. Las plantas herbáceas poseen en su mayoría tallos verdes, finos y blandos, con bajo contenido leñoso, razón por la que son de interés en el sector de biomasa y cultivos energéticos por su renovabilidad y su disponibilidad. Los contenidos de lignina en cultivos herbáceos, es relativamente escasa y poco uniforme en comparación con las especies maderables. (Fengel y Wegener, Sjöström, & Oggiano, 1997). En la Tabla 2 se muestra ejemplos de fuentes de lignina en distintos cultivos.

Tabla 2.

Fuente de celulosa en distintos materiales.

Cultivo	Extraíbles	Lignina	Ácido urónico	Xilano	Manano	Galactano	Celulosa
Bagazo de caña	3.78	23.09	2.16	22.05	0.35	0.46	39.01
Rastrojo de maíz	5.61	18.59	2.99	21.61	0.38	0.87	37.69
Paja de trigo	12.95	16.85	2.24	19.22	0.31	0.75	32.64
Pinus radiata	2.7	25.9	2.5	5.9	10.7	2.4	41.7
Alamo Híbrido	6.89	25.18	4.31	13.07	1.81	0.88	39.23
Eucalipto	4.15	26.91	4.07	10.42	1.23	0.74	48.07
Sorgo dulce	22.03	16.09	1.07	14.14	0.2	0.52	34.01

Adaptado de (Fengel y Wegener, Sjöström, & Oggiano, 1997)

La biomasa que procede de árboles, de residuos agro-forestales, de cultivos y plantas macrófitas, sirven como materia prima o también como recursos renovables con la facilidad de utilizarse en la industria química. (A.Alvarez–Castillo & Salgado–Delgado, 2012).

2.1.4.3. Usos

Debido a sus características químicas por su componente lignocelulítico la madera es el material que más se usa en el mundo, principalmente en la fabricación de materiales papeleros, también se utiliza en gran cantidad para las industrias de construcción y de combustible. (Rodríguez et al. & FAO, 2001)

En la producción de fibras no madereras como: hemp, kenaf, residuos agrícolas, paja de trigo, de maíz, de arroz, etc. Al compararlo con las características de los componentes de la madera existe menor proporción de lignina con más contenido de sílice y cenizas, siendo equiparables el contenido en celulosa (Atchison, 1983). El aprovechamiento de estas fibras solo se basa en la elaboración de productos textiles y papeleros ya que las investigaciones para la utilización de fibras de origen natural no se han desarrollado. (Barba, 2002).

Una visión de la diversidad de fuentes de materiales ligno celulósicos maderables, puede obtenerse en la Tabla 3.

Tabla 3.

Procedencia de materiales lignocelulíticos.

Material ligno celulósico		
Maderas de coníferas	Maderas de frondosas	Materiales alternativos
Picea glauca	Abedul	Bagazo de caña
Picea mariana	Átamo	Cascarilla de arroz
Picea Rubens	Arce	Paja de cebada
Pseudotsuga	Eucalyptus globulus	Tallos de maíz
Picea abies	Fagus sytvatica	Zuros de maíz
Larix decidua	Ulmus	Paja de arroz
Pinus radiata	Quercus falcata	Paja de sorgo
Pinus resinosa		Paja de trigo
Pinus rigida		
Pinus sylvestris		
Pinus taeda		

Tomado de (Barba, 2002)

2.1.5. Generación mundial

Como ya se ha mencionado existen distintas clases de materiales con compuestos lignocelulíticos, siendo el bagazo de caña con más abundancia de biomasa lignocelulítica en América Latina. Se ha llegado a calcular que, de cada 1,000 kg de caña, se llega a perder cerca del 23% en el campo, llegando a utilizarse en distintos procesos industriales el 77%. (Almenares-Verdecía, 2011).

Según estadísticas emitidas por la ONU para la Agricultura, la producción mundial de azúcares es cerca de 607 millones de toneladas en el 2007, suponiendo una cantidad disponible para el uso del bagazo de 13 millones de toneladas de bagazo, por ende, esto indica que es de las mayores fuentes de

biomasa lignocelulósica que puede existir, utilizándose para la producción de etanol entre otros. (Martinez, 2014)

Las producciones de estas fibras naturales son de plantas procedentes de países en desarrollo como en algunos países latinoamericanos. Principalmente de acuerdo a su disponibilidad las más usadas son: pajas de cereales, los tallos del maíz y el bagazo de la caña de azúcar. (Sierra, Contreras, & Carlos, 2012). Como podemos observar en la Tabla 4 hace referencia a la producción anual de distintas clases de biomasa lignocelulítica.

Tabla 4.

Generación de materiales ligno celulíticos.

Fuente	Generación en toneladas
Madera	1 750 000
Paja comúnmente de trigo, arroz y avena.	1 145 000
Tallos como los del maíz y algodón	970 000
Bagazo de la caña de azúcar	75 000
Cañas	30 000
Bambú	30 000
Fibras de algodón	15 000
Tallos del yute, kenaf y hemp	8 000
Papiro	5 000
Alfa, esparto	500
Hojas provenientes del sisal, abacá y henequén	480
Hierbas y pastos como la hierba elefante	200

Tomado de (Sierra, Contreras, & Carlos, 2012)

Se estima una producción de 607.000.000 Tm mundialmente de la cascarilla de arroz según reportes de la FAO. de la producción mundial en América Latina, Colombia produce 2.720.9081 Tm. Sin embargo el aporte de la biomasa celulítica es de entre 134.000.000 Tm a nivel mundial y 544.182 Tm en Latino

América ya que el peso de la cascarilla es el 20% del grano del maíz. (Riaño, Gutierrez, Hernández, & Barrero, 2010)

Para la producción del etanol donde se utiliza la lignocelulosa, material compuesto por 2 de los componentes principales para la producción de etanol siendo la hemicelulosa y celulosa debido a que están compuestos por azúcares, material ideal para la conversión a etanol, destacando como los principales productores, Brasil y Estados Unidos en América usándolo como combustible, con la caña de azúcar y el almidón de maíz como materia prima. Estos productos también son comercializados como alimento y sus derivados usados para distintos ámbitos hacen que este aumente su valor independientemente de la efectividad del maíz y caña de en la producción de etanol. (Medina, Lara, Aguilar, & De La Garza, 2011)

Los principales materiales usados para la producción de bioetanol a nivel mundial son los cultivos de maíz, cebada, avena, arroz, trigo, sorgo y caña de azúcar. La estimación de pérdidas del material lignocelulítico solo se basa en el de desperdicio, que se puede considerar como materia prima, pudiéndose observar en la Tabla 5.

Realizando una serie de balances la producción de bioetanol solo con los desperdicios de estos cultivos llegaría a producirse cerca de 49.1 GL/año de bioetanol. Por otro lado, para utilizar el mayor porcentaje de estos cultivos se ha llegado a estimar que al usar la materia cerca de estos junto con los desperdicios ya mencionados la producción de bioetanol sería de 442 GL/año. Por ende, el potencial aprovechamiento de los cultivos y de material con contenido lignocelulítico como pañales, papel y cartón para la producción de bioetanol es de 491 GL/año, lo que supera en 16 veces toda la producción de etanol en producida al año en el mundo. (Zamora & Almada, 2013)

Tabla 5.

Cantidad de pérdidas de materiales ligno celulíticos generados por continente en Teragramos.

Biomasa ligno	Europa	América del	América del sur
----------------------	---------------	--------------------	------------------------

celulósica		norte	
perdida			
Rastrojo de maíz	28.61	133.66	7.20
Paja de cebada	44.24	9.85	0.29
Paja de avena	6.83	2.80	0.21
Paja de arroz	3.92	10.95	23.51
Paja de trigo	132.59	50.05	9.80
Paja de sorgo	0.35	6.97	1.52
Bagazo de caña	0.001	4.62	63.77
Subtotal	216.56	218.90	106.30

Tomado de (Zamora & Almada, 2013)

En nuestro país existen alrededor de 79.913 ha de cultivos de caña de azúcar produciendo 5 millones de toneladas de material lignocelulítico y una producción de 159 mil Ton. del bagazo de caña. Para utilizarse en la fabricación de balanceados para animales, pulpa de papel, entre otros, donde no figura la producción de bioetanol, por contraparte estos tipos de aprovechamiento evitan que se importen alrededor de 150 millones de dólares en celulosa, al país. (eluniverso.com, 2014).

2.2. Desechos ligno – celulósicos

2.2.1. Clasificaciones

Los desechos de la biomasa lignocelulítica, se clasifican según Sánchez y Cardona (2008) en los siguientes grupos principales:

- Los residuos de origen agrícola como el bagazo de caña de azúcar y la paja de trigo.
- De maderas duras como el álamo.
- De maderas blandas como el pino.
- Residuos celulíticos como lo son el papel, cartón y pañales usados.

- Residuos sólidos urbanos.

De toda la clasificación de desechos lignocelulíticos, los residuos agrícolas y los desechos celulíticos, los pañales, el papel y sobre todo la paja de trigo son los que más biomasa para aprovechar cuentan. La producción de la paja de trigo es de 1.1 kg por cada kilogramo de trigo. (Bamaga, 2003) donde, de acuerdo a la ONU para la Agricultura se producen cerca de 670 millones de toneladas de paja de trigo que está disponible para sus distintos usos. Como ya se ha mencionado por su gran cantidad de celulosa se convierte en alternativas de materia prima para la producción de bioetanol y de azúcares. (Pejó, 2009)

2.2.2. Uso potencial

La demanda energética creciente en el mundo, ha fomentado las investigaciones para la obtención de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos de desecho, procedente de actividades industriales: químicas, textiles, papelera, alimentos, farmacéutica, entre otras. En previsión del agotamiento del petróleo y materiales fósiles, se está dirigiendo una gran atención a la posibilidad de utilizarla residuos ligno celulósicos renovables, para la producción de energía y de compuestos químicos. (Viviano, Medina, Ramos, Amaíz, & Valbuena, 2011).

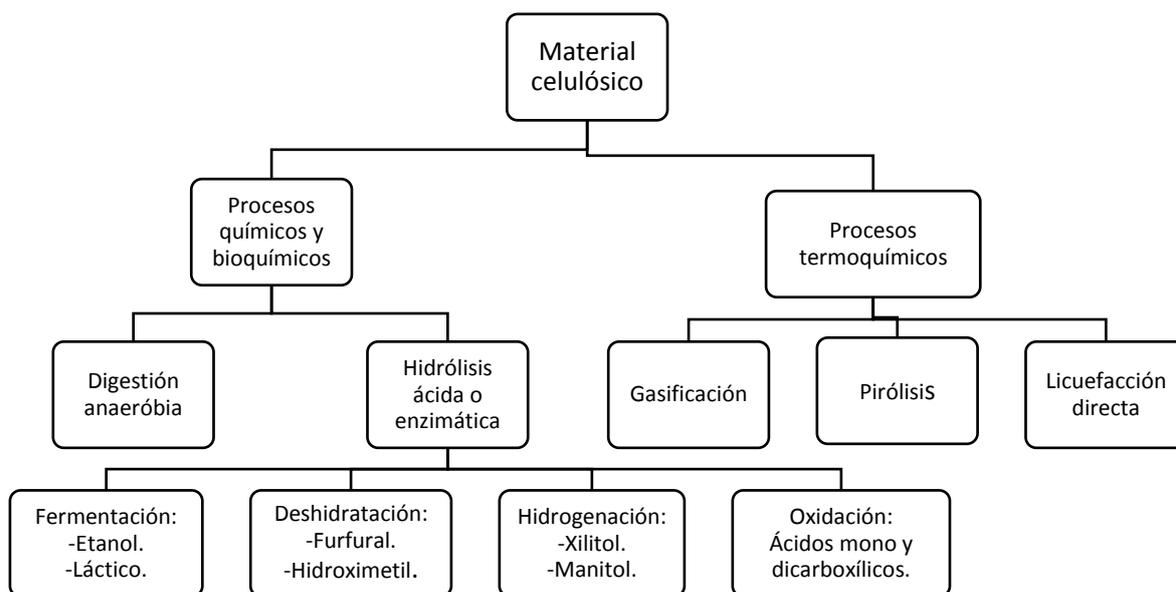


Figura 3. Uso de los residuos ligno celulósicos.

Adaptado de (Valbuena, 2011).

Para la producción de productos azucarados y bioetanol industrialmente su materia prima es la biomasa amilácea siendo de alto porcentaje contaminante, lo que crea una controversia de sostenibilidad. A partir de ahí, la producción de bioetanol y de productos alimenticios a base de residuos procedentes de biomasa lignocelulítica aparece como alternativa más limpia debido a que no se necesitan procesos industriales altamente contaminantes como las emisiones de gases de efecto invernadero para su procesamiento lo que deriva en una menor de emisión de CO₂ comparándolos con la producción de biocombustibles provenientes de materias amiláceas. (Pejó, 2009)

2.2.3. Que se hace en el mundo y en la región sobre los pañales desechables

Las reservas mundiales finitas de energía, exigen la búsqueda de alternativas energéticas a partir de materias primas secundarias de desecho obtenidas de

fuentes tradicionales, materias primas renovables y no renovables sometidas a procesos productivos. Una alternativa de este tipo, constituyen los pañales desechables usados, así en México, se han desarrollado tratamientos a escala de laboratorio para su aprovechamiento. (Cabrera, 2014).

A continuación, presentamos un breve recorrido sobre las estrategias de gestión de pañales desechables, que se ha implementad en distintas partes del mundo.

❖ **México:** Es el país con más investigación sobre el manejo de los residuos de pañales desechables donde podemos mencionar algunos:

- En la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco desde 1992 se empezó con una línea de investigación con la finalidad de proponer e implementar métodos que sirvan para el tratamiento de los residuos de pañal desechable usados. (Estrada, 2005).
- Se desarrolló la biodegradación de residuos urbanos con biomasa lignocelulítica mediante el hongo *Pleurotus* con el objetivo de reducir la masa de estos desechos, como por ejemplo el contenido de celulosa en los pañales desechables usados, utilizándolos como sustrato para cultivar dos clases de hongos de *Pleurotus spp.* Donde se ha obtenido una reducción del 80% de la masa. (Delfín-Alcalá y Durán de Bazúa, 2003).
- Otro de los métodos para la biodegradación de los pañales desechables usados es el uso del hongo *Pleurotus ostreatus*. Donde se obtuvieron dos conclusiones después de realizar las pruebas la primera señala que el cultivo de *P. ostreatus* en los pañales sería una alternativa tanto como para la reducción de los residuos sólidos urbanos como para la disponibilidad de alimentos ricos en proteínas (Espinosa et al., 2011)

❖ **Canadá.**

- En Halton, Canadá, se propuso una iniciativa llamada “etiqueta bolsa de pañales”, dirigiéndose principalmente a los hogares con niños pequeños y sobre todo centros de cuidado de infantes, donde los pañales y los productos sanitarios se va a recolectar cada dos semanas, serán almacenados de una manera adecuada hasta su recogida para que así se reduzca las afectaciones a la salud humana. Se entregan 30 etiquetas por os 12 meses del año, estas serán seriadas y de no ocupar su totalidad se trasferirían para el siguiente año o a su defecto volver a registrarse para poder optar para recibir otras 30 etiquetas. Los pañales almacenados en bolsas transparentes con su respectivo etiquetado se colocarán en el borde de las aceras de los hogares según sea su día de recolección. (Halton Región, 2013)
- Del mismo modo en Toronto, Canadá, los pañales son recogidos al igual que otros residuos de origen orgánico mediante un programa el cual se lo denominó "cubo verde". Una vez son recogidos, se los transporta a las instalaciones especializadas para su procesamiento donde el plástico procedente de los pañales se los elimina por completo como residuo sin aprovecharlo, sin embargo, el resto del material se lo utiliza como compost el cual se los redistribuye a las jardinerías y áreas verdes de la localidad. (Toronto, 2013).

❖ Reino Unido.

- En lo que a Europa se refiere el Reino Unido es uno de los que hace énfasis en la economía para la reducción de la carga contaminante que producen los pañales desechables proponiendo el uso de pañales de tela. Publicando los balances donde al usar los pañales de tele la economía familiar se ve favorecida. (West London Waste, 2013; Staffordshire Country Council, 2012).

❖ Otros países en general.

- Existen algunas publicaciones para solucionar el problema de los pañales alrededor del mundo, aparte de los ya mencionados donde uno de estos es el ensayo de la descomposición de los pañales desechables usados solo con orina por la acción de microorganismos procedentes de las astillas de madera de la *Cryptomeria*. Al implantar esta investigación se llegó a descomponer cerca del 85% de la celulosa presente en el pañal en función de las acciones de los microorganismos. Al finalizar esta investigación se llegó a una hipótesis que puede ser usada para posteriores investigaciones la cual sugiere que la velocidad con la que estos microorganismos actúan puede acelerarse debido al excremento presente en estos debido a una fuente de nutrientes extra para su accionar. Con base en esto se espera la implementación de sistemas de eliminación estables para la eliminación de los pañales desechables. (Yichun et al., 2006).
- Otros de los estudios es el que se realizó un estudio a gran escala del compostaje de los pañales desechables en conjunto con la materia orgánica generado de los residuos sólidos municipales, haciendo una separación desde el origen. La finalidad de este estudio es entender el funcionamiento para el proceso y características para la implantación de la composta obtenida comparándola con el compostaje de residuos orgánicos sin pañales (Colón et al., 2010).

Debido a que el uso de los pañales va en aumento y de uso diario, su eliminación se basa principalmente en almacenamientos de los rellenos sanitarios donde permanecen durante años junto con los demás residuos sólidos urbanos. A día de hoy, por su composición mixta entre orgánica e inorgánica, no existe ni tratamientos ni mucho menos aprovechamiento debido a su dificultad en la degradación. Lo que agrava más la situación es que del total de los desechos sólidos urbanos, los pañales presentan más del 5% del total siendo necesarias acciones eficientes para su manejo. (Cabrera, 2014).

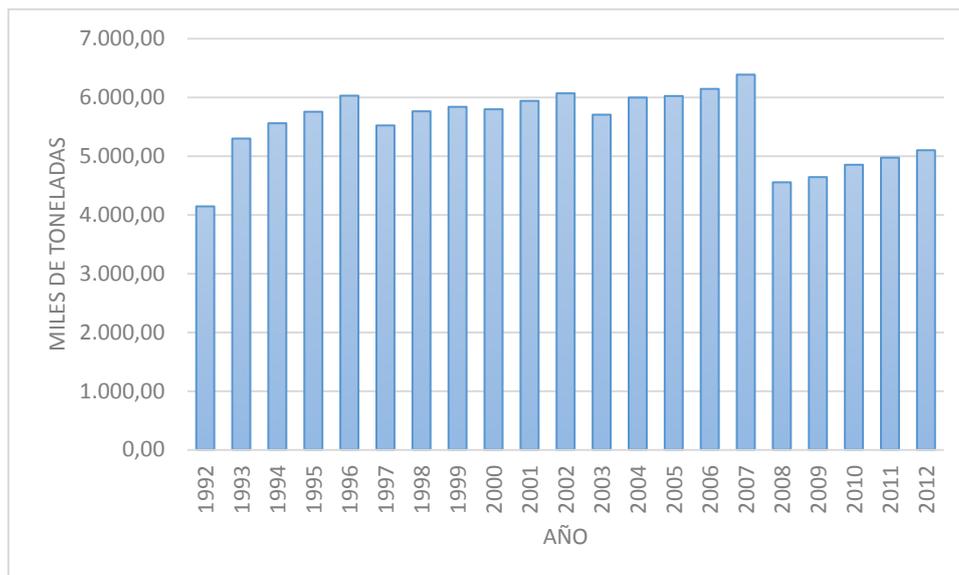


Figura 4. Generación de residuos finos pañales y otros a nivel nacional en México.

Adaptado de (SEMARNAT. SNIARN, 2012)

2.2.4. Problema ambiental asociados a los pañales desechables

La inadecuada gestión de los pañales desechables y de los materiales asociados a ellos, generan graves problemas de contaminación ambiental. Su degradación anaeróbica en rellenos sanitarios o en vertederos a cielo abierto, genera gases de tipo invernadero (CO_2 , CH_4 y N_2O) a la atmósfera. La degradación por la acción de microorganismos aeróbicos con actividad celulolítica es una de las propuestas como alternativas posibles y amigables para evitar las afectaciones al ambiente. (Guailupo, Motta, & Quiroz, 2017)

El empleo de aislados bacterianos, fúngicos de suelos y cultivos disminuirá la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera. (Valbuena, 2010).

La producción de pañales desechables requiere la producción de ingentes cantidades de celulosa, lo que a su vez implica tala de bosques para su elaboración. Así por cada niño se necesitan consumir un total de 5 árboles. Adicionalmente, a la celulosa se necesita consumir otros derivados del petróleo aspecto que incrementa su daño ambiental. Si analizamos la cantidad de

pañales que necesita un niño por día para los primeros 30 meses de vida necesitará 5.400 pañales, que representan casi una tonelada por cada niño a más de la cantidad de bebés en el país solo en generación de pañales como residuos se obtienen 900.00 toneladas al año. Si sumamos todo lo descrito anteriormente, al hecho de que no se cuenta con una gestión para el tratamiento o un mecanismo de reutilización tenemos un grave problema ambiental, que a medida que pase el tiempo irá creciendo. (Pilar & Perea, 2010).

2.3. Microorganismos degradadores de celulosa

Los microorganismos (hongo y bacterias), capaces de degradar celulosa emplean enzimas especializadas como: celulosomas, endoxilanasas y poligalacturonasas. Las celulasas son enzimas extracelulares, que son producidas por distintos microorganismos como los hongos, bacterias y protozoarios, que hidrolizan la celulosa. (Paredes, 2014).

La función de que poseen las enzimas extracelulares son las de hidrolizar las moléculas de gran tamaño como el almidón, la celulosa, la hemicelulosa, la pectina, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, normalmente presente en materiales como la madera, papel y pañales usados, las cuales son utilizadas por estos microorganismos como una fuente de carbono y energía para realizar sus procesos. Las moléculas como hemicelulosa y celulosa son más abundantes en compost con material agrícola convirtiéndolo en un sustrato favorable para su aislamiento de estos microorganismos. (Rodríguez A. , 2015)

La literatura cita la existencia de muchos microorganismos que poseen características para la degradación del xilano, principalmente los hongos. Dentro de ellos los hongos filamentosos tienen la capacidad de producir una gran cantidad de xilanasas extracelulares, en comparación con las bacterias. Los estudios para la degradación de celulosa y sus derivados han sido basados principalmente en hongos debido a sus enzimas celulolíticas, sin embargo, en

las bacterias sobresalen los actinomicetos por poseer la capacidad de degradador este sustrato. (Cruz, Castellanos, & Helliodoro, 2009)

El complejo enzimático empleado por estos microorganismos está constituido al menos por tres grupos enzimáticos de diferente acción como los mencionados a continuación:

- Endoglucanasas: Son los que hidrolizan al azar enlaces 1, 4, 3 glucosídicos, generando extremos no reductores.
- Exoglucanasas: Que, al contrario, actúan sobre los extremos no reductores que son generados por la acción de las endoglucanasas liberando unidades de glucosa y celobiosa respectivamente.
- Glucosidasa o celobiasa: Es la que actúa sobre celobiosa y oligosacaridos transformándolos en glucosa. (Lynd, 2002).

2.3.1. Hongos

Como ya se mencionó con una breve descripción, por su eficiencia, su variedad en las características lignocelulíticas presentes en los microorganismos y por su adaptabilidad, la mayor tasa de degradación de los compuestos de la celulosa en la naturaleza se las atribuye a los hongos filamentosos. Dentro de las especies más estudiadas, se encuentra el género *Trichoderma*, como el mejor productor de enzima degradadora de celulosa, sin embargo, las especies que pertenecen al *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora*, se destacan por la cantidad de celulasas producida. (Ferrer-Marcelo, y otros, 2011). Estos hongos no pueden realizar fotosíntesis y se alimentan de la materia orgánica. (Arias & Piñeros, 2008).

Estos hongos, son los más usado en la industria debido a que cumplen con alguno de los parámetros para su uso, como la producción de sustancias de alto interés industrial; su fácil disponibilidad al estar en cultivos puros; y son genéticamente estables creciendo en cultivos a gran escala. (Morales, 2012).

Dentro del uso industrial de estos hongos existen limitaciones en su aplicación debido a que las enzimas y sus actividades hidrolíticas se ven afectadas por factores químicos y físicos. Debido a esto se ha sugerido la utilización de microorganismos termófilos como fuentes de producción de celulasas, por la termo estabilidad de sus enzimas, lo que resulta una propiedad muy ventajosa en aplicaciones industriales. (Ramirez & Cocha, 2003).

2.3.2. Bacterias

Existe una gran diversidad de bacterias en los distintos suelos y horizontes, se ha llegado a determinar cerca de 109 bacterias por gramo de suelo, con una alta diversidad de hasta 4 600 genomas distintos, uno de los microorganismos que existen dentro de esta variedad son los microorganismos celulíticos aeróbicos, los cuales por sus características transforman a la celulosa en dos productos principales: CO₂ y biomasa; no ocurren acumulaciones propias de intermediarios carbonados y la concentración de ácidos orgánicos ocasionalmente adquiere un nivel apreciable. (Rodríguez V. , 2008).

En los suelos que existe una buena aireación la celulosa se puede metabolizar hasta un 90% por acción de bacterias aeróbicas, mixobacterias y también de diferentes tipos de eubacterias. Las bacterias con características celulolíticas; fermentan celulosa, hemicelulosa y pectina. (Chacón, 2011)

Las bacterias con características celulolíticas con más abundancia y de más conocimiento mundial son las aerobias, en las que podemos encontrar los siguientes géneros: *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Cytophaga*. Erigiéndose especies como las siguientes: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *Bacillus sp.*, *Butirivibrio sp.* *Clostridium thermocellum* destacándose entre las anerobias: *Streptomyces drozdowiczii*, *S. cellulolyticus*, *Thermomonospora curvata*, *T. chromogena*, *T. alba* y *Thermomobifida fusca*. (Rodríguez A. , 2015).

Mientras que, el género *Bacillus* es muy reconocido por su uso industrial debido a sus altas tasas de crecimiento, junto a su capacidad para producir y liberar enzimas extracelulares, sin embargo, lo más importante y de gran utilidad en

cualquier ámbito es su desarrollo en condiciones ambientales extremas. Es de conocimiento general que es capaz de metabolizar una amplia diversidad de azúcares las cuales incluyen la xilosa, arabinosa, sobre todo la celulosa, sacarosa, celobiosa y glucosa, sin la ayuda de ningún otro complemento, es decir, naturalmente; sin embargo, aún con estos conocimientos tanto genético como bioquímico no existen investigaciones de carácter biogenergético, de crecimiento o metabólicos para la fabricación de productos en condiciones aeróbicas para la utilización de la carboximetil-celulosa. (Ramirez H. , 2014).

2.4. *Bacillus*

El investigador que descubrió por primera vez el género *Bacillus* fue Ferdinand Julius Cohn entre los 1870 y 1880, debido a su variedad en la facultad ecológica es lo que dificultó su sistematización genética. A través de distintas técnicas moleculares del RNAr 16s, este generó se pudo subdividir en cuatro conjuntos: siendo el primero de ellos el *Bacillus sensu* donde se halla el *Bacillus subtilis*, el segundo conjunto pertenece al *Bacillus sensu lato* que contiene primordialmente bacterias termófilas como *B. anthracis*, *Bacillus sp.*, *B. thuringiensis* y *B.cereus*, en los dos grupos restantes se encuentran nuevas especies, donde se destaca *B. horti*, *B. carboniphilus*, *B. chitinolytus*, y *B. infernus*, entre otros. Los *Bacillus* son un género de mucho interés, debido a su amplio perfil fisiológico destacando el parasitismo, ya que le permite estar presente en otros ambientes como los acuáticos y los terrestres sin importar las temperaturas. (Constanza & Lozano, 2016)

Su interacción con los distintos hábitats puede ser directa o indirectamente. En primer lugar, la forma directa es cuando actúa como un agente rizosférico, con la capacidad de poder degradar sustratos provenientes de la flora, fauna y los combinados de origen orgánico como los derivados del petróleo; también sirve para la obtención de antibióticos, incentiva el incremento vegetal y sobre todo participa en los tecnologías de adherencia de nitrógeno y solubilizando fosfatos, mientras que la forma indirecta, es cuando interviene en la creación

de compuestos antagónicos de patógenos o produciendo mecanismos de resistencia. (Cruz M. , 2007).

Esta clase de bacterias son microorganismos distribuidos por todo el medio ambiente encontrándolos en el suelo principalmente, también en medios acuáticos soportando tanto agua dulce como salada, apareciendo también en material vegetal en vías de descomposición, al ser termófilas aguantan altas y bajas temperaturas por lo que podemos encontrarlas en los desiertos y en la Antártida. Sus esporas tienen la capacidad de dispersarse por el aire, por consiguiente, llegan a recorrer grandes distancias lo que permite que puedan desarrollarse en cualquier medio ambiente. (Constanza & Consuelo, 2011). Algunas variedades del género *Bacillus* también tienen aplicaciones comerciales:

- Como por ejemplo una variedad de *B. subtilis* se las conocía como *Bacillus natto* la cual se las usa para elaborar manjar japonés Nattō.
- Otra de las clasificaciones tenemos al *B. subtilis* QST 713 encontrado comúnmente como Serenade que posee la capacidad fungicida de manera natural, lo cual sirve como un controlador biológico.
- Las enzimas que producen los *B. subtilis* *popoy B. licheniformis* se usan como agregados dentro de los detergentes para lavandería.
- *B. subtilis* pBE2C1, *Bacillus sp.*, *B. subtilis* pBE2C1AB, se los usa para la fabricación de polihidroxialcanoatos (PHA) desde desechos de la malta como fuente de bajo costo para la realización de PHA.

Esta clase de microorganismos tienen un diámetro en sus colonias de 2 a 4 mm, poseen hemólisis completa, tienen un aspecto liso, con un color blanco crema translúcida y bordes regulares. Estos, segregan ácido indolacético o citoquininas en la rizosfera de las plantas, lo que sirve como estimulante para el desarrollo y es un biocontrolador. (Constanza & Consuelo, 2011).

2.4.1. Caracterización de *Bacillus sp*

Esta bacteria pertenece a la familia Bacillaceae siendo miembro del género *Bacillus*, es una bacteria Gram positiva, catalasa-positiva, de hábitat aerobio encontrada por lo general en el suelo, posee la habilidad de crear una endospora protectora, lo que le permite poder soportar situaciones ambientalmente extremas. Forma parte en el proceso de desintegración de la celulosa, forma parte de las familias de microorganismos bacterianos con altas actividades bioquímicas, siendo referenciado por la literatura científica, participando en las políticas de control biológico debido al uso de estos en productos gracias a su metabolismo para la industria. (Cervantes, Muhammad, Gonzalez, & Adesogan, 2016).

La mejor propagación que se puede dar del microorganismo es superficies húmedas. Mientras que las células en pleno crecimiento presentan dificultad en la propagación en medios acuáticos. En el año 1876, los científicos Cohn y Koch descubrieron que, dentro de estas especies, *B. subtilis*, *Bacillus sp.*, y *B. anthracis*, se forman una estructura especial llamada endospora bacteriana, la cual permite a la bacteria subsistir en ambientes con temperaturas y no pueden ser eliminadas con facilidad por ebullición o congelamiento extremos. (Peñaherrera, 2013).

El interés comercial del *Bacillus sp.* es de hospedador para poder expresar los productos de genes recombinantes por su gran capacidad reproductora, su facultad regulatoria y su desarrollada fermentación. Algunas de las cepas del género *Bacillus*, como por ejemplo las cepas del *Bacillus sp* produce eficazmente altas cantidades de enzimas directamente en el medio de crecimiento. Esta secreción ayuda a simplificar la restauración del producto debido a que deja la proteína de forma soluble y pura comparándolos con productos intracelulares insolubles. También permite la acumulación de productos a niveles muy altos en forma activa, a diferencia de la proteína desnaturalizada recuperada de cuerpos de inclusión que resultan de la expresión y acumulación de alto nivel intracelularmente. Las ventajas de

procesamiento descendente que ofrece la secreción son la razón principal por la que las exoenzimas de *Bacillus sp*, en su mayoría proteasas y amilasas, representan actualmente alrededor del 45% del mercado comercial de enzimas. (Harwood, 1989).

2.4.2. Degradación de celulosa con *bacillus sp*

Una de las propiedades de *Bacillus sp*. es de convertir a la celulosa en dióxido de carbono, etanol y en biomasa. La posibilidad del *Bacillus sp.*, de formar esporas las cuales subsisten metabólicamente apáticas pero son viables a pesar de condiciones ambientales adversas, lo que los hace apropiados en la elaboración de elementos invariables que favorecen la degradación de la celulosa y sus derivados como podemos verificar en la Tabla 6 a continuación donde se evidencia la actividad de celulasas de *Bacillus sp*. (J.V.López, Arraiza, M.Aguilar, A.Fernando, & Gómez, 2010).

Tabla 6.

Actividad lignocelulítica de microorganismos.

Microorganismo	Actividad de celulasas (umol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
<i>Bacillus subtilis</i>	514
<i>Clostridium thermocellum</i>	428
<i>Bacillus macerans</i>	5030
<i>Bacillus sp</i>	370

Tomado de (Howard, 2003)

La especie *Bacillus sp* como ya se mencionó, al ser termófilas puede producir enzimas termoestables esto permite el crecimiento en temperaturas muy elevadas debido a la presencia de endo β - 1,4 glucanasa y exo β - 1,4 glucanasa, pero también es capaz de crear resistencia de ser asumida por la propia glucosa o de la celobiosa, debido a estas características la convierte en una excelente bacteria generadora de enzimas celulasas, por lo tanto se atribuye la producción de celulasas con altas actividades a las cepas de

Bacillus, al poseer la capacidad para liberar glucosa a partir de celulosa. (Gaitan & Perez, 2007).

2.4.3. Experiencias de *Bacillus sp* en la antártida

La abundante cantidad de microorganismos en la superficie de la nieve de la Antártida y el Ártico varía desde 0.2×10^3 y 5×10^3 hasta 6×10^4 bacterias por ml de nieve derretida. (Amato, 2007). Dentro de estos microorganismos que habitan en la Antártida se encuentra la bacteria denominada *Bacillus sp.*, desarrollándose en la Antártida soportando, altos niveles de radiación ultravioleta (Miteva, 2008), bajas temperaturas de hasta -54°C , poca disponibilidad de nutrientes para su desarrollo y ausencia de agua líquida, lo que afecta su crecimiento, no obstante en las épocas de verano dentro de la capa de nieve se forman micro espacios donde se encuentra agua líquida, esto favorece el crecimiento bacteriano utilizando sales y materia orgánica proveniente del agua de mar, la erosión de las rocas. (Tranter y Jones, 2001).

Según reportes las bacterias *Bacillus sp.*, muestran su empleo en trabajos experimentales de biorremediación de hidrocarburos, en terrarios de la Estación Pedro Vicente Maldonado (Gualoto 2011) y en la remediación del derrame de combustible de 1999, mediante biopilas reactivas permeables (Vazquez, 2011).

Se registró una cepa bacteriana que fue aislada a partir de añgas en la Isla Rey Jorge (Antártica), donde se realizaron algunos estudios que arrojaron análisis del gen ribosomal 16S, la cual fue identificada como perteneciente al género *Bacillus*. la cual presentó actividad de agarasa y de alginatoliasa. Encontrándose encontraron diferencias significativas sobre la temperatura óptima para hidrolizar agarosa y alginato. Siendo evaluada en rangos de 4 a 30°C . Presentándose una mayor actividad en temperaturas de 4°C , mientras que se presentaron mayor actividad alginatoliasa en temperaturas de a 30°C . Estos resultados indican que se tienen altos valores biotecnológicos y podría ser utilizada con fines industriales. (Lavi, 2013).

Según reportes de (Lavi, 2013), una bacteria polar designada como JSP1, identificada como *Bacillus sp* en según el análisis de cadena genética 16S ARNr, es capaz de producir azúcares a partir de agarosa a 4 °C.

3. Capítulo III. Metodología

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental, tuvo como propósito, evaluar a degradación de celulosa proveniente de pañales desechables usados, mediante hidrólisis enzimática donde se produjo glucosa como indicador de la degradación del componente.

4.1. Diseño experimental

4.1.1. Variables independientes

Tabla 7.

Variables independientes.

Factores	Niveles	Tratamientos	Repeticiones
Microorganismo	<i>Bacillus</i> sp. (B)	T1: Celulosa+NPK ₁ +B+Lingnina	3 Repeticiones
		T2: Celulosa+NPK ₂ +B+Lingnina	
		T3: Celulosa+NPK ₃ +B+Lingnina	
NPK	NPK ₁ → 3:1:1	T4: Celulosa+B+Lingnina T0: Celulosa+Lingnina	Erlenmeyers
	NPK ₂ → 3:1:1		
	NPK ₃ → 3:1:1		

3.1.2. Variables respuesta

- **Producción de glucosa:** Medida en concentración (g/lit). La glucosa se genera a partir del proceso de degradación de la celulosa de los pañales desechables.

Se calcula la tasa de degradación con ayuda de la evacuación:

$$\frac{\ln C_0}{C} = kt, \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde

- $\ln C_0 = \ln C_0$ es la concentración inicial
- $C =$ es la concentración medida en el tiempo t .
- $K =$ pendiente
- $T =$ tiempo transcurrido.

La ecuación empleada es la ecuación modificada de Monod, que considera a las reacciones de biorremediación, reacciones de primer orden.

Para la determinación de K , se empleará la ecuación de la pendiente

$$K = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad (\text{ecuación 2})$$

donde:

- Y_2 y $Y_1 =$ valores de $[C]$ final e inicial.
 - X_2 y $X_1 =$ el tiempo final e inicial respectivamente.
- **Crecimiento bacteriano:** Medido en unidades formadoras de colonias (UFCs) por unidad de tiempo (inicio y fin del tiempo de experimentación). Se obtuvo a partir de la siembra de 1 ml de las muestras, diluido al 10%. Para determinar la tasa de crecimiento bacteriano, se realizó el conteo de UFCs a las 4 y 24 horas de la siembra en medio sólido, mediante la fórmula y se calculó mediante la ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{ecuación 3})$$

donde:

- N_1 es el número de UFCs a las 4 horas.
- N_2 es el número de UFCs a las 24 horas
- T_1 es el tiempo de 4 horas
- T_2 es el tiempo de 24 horas.

La determinación de vida media se ve relacionada con el crecimiento bacteriano y se calcula con la siguiente fórmula:

$$t = -\frac{\ln(0.5)}{k} \quad (\text{ecuación 4})$$

donde k son los valores previamente obtenidos de la tasa de degradación.

Usando la siguiente fórmula se determina la eficiencia de los tratamientos.

$$Y = \frac{C_{final}}{C_{inicial}} \times 100 \quad (\text{ecuación 5})$$

- **Calidad del azúcar:** Medida en grados brixs %, representado por el cociente total de azúcar disuelta en un líquido.

Para los ensayos se trabajó en erlenmeyers de 500 ml, se añadió 400 del medio mineral líquido Difco Bushnell- Haas Broth, posteriormente se añadió 25 gr de celulosa junto con 2.5 gr de lignina aportada por la cascarilla de arroz más 5 ml de la solución bacteriana y finalmente las distintas concentraciones de NPK donde 3,6 gr de N es aportado por el nitrito de amonio, los otros 2 componentes se aplicarán en relación al nitrógeno en proporción 3:1:1 respectivamente en forma cloruro de potasio con una cantidad de 2,1 gr y 2,3 gr de fosfato de sodio. Según los cálculos realizados las cantidades de NPK serían las siguientes: NPK₁= 3,3: 1,88: 0,91 gr NPK₂= 3,6: 2,1: 1,011 gr y NPK₃= 4: 2,3: 1,1gr junto con los componentes antes descritos donde se harán 3 repeticiones con cada concentración.

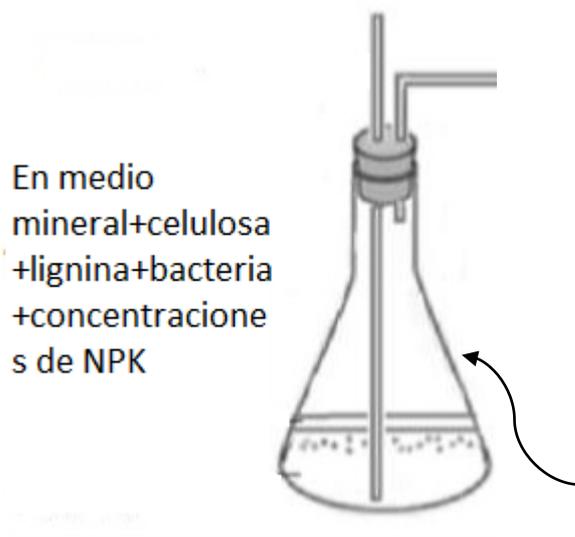


Figura 5. Elaboración de los ensayos.

4.2. Recolección y preparación de la celulosa

Se recolectaron 90 pañales que contenían residuos líquidos de niños de la guardería Monteserrín, de la ciudad de Quito. La celulosa fue separada manualmente del pañal, se realizó un pesaje inicial para determinar el peso de la celulosa en relación al pañal completo. Posteriormente se realizó una esterilización mediante autoclave a una temperatura de 120 °C aproximadamente por 90 minutos en porciones de 25g.

4.3. Preparación del cultivo microbiano

El cultivo fue preparado en agua peptonada en un volumen de 100 ml, luego se le añadió 1 mm² de la bacteria aislada previamente y finalmente se le incubó por 24 horas a 20 °C para su crecimiento.

4.4. Preparación de los reactivos

Se prepararon tres reactivos para la determinación de azúcares reductores.

4.4.1. Somogyi 1

Tabla 8.

Materiales para preparar el reactivo de Somogyi 1.

Compuesto	g/100 mL
Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)	2.4 g
Tartrato de Sodio y Potasio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) * $4\text{H}_2\text{O}$	1.2 g
Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3)	1.6 g
Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)	14.4 g
Agua destilada	Aforar hasta 100 mL

Adaptado de (Pachón & Perea, 2010)

En un vaso de precipitación de 250 ml se disolvió 50mL de agua destilada, agitando constantemente se le agregó cada uno de los compuestos hasta llegar a alcanzar una composición homogénea. Seguido se completó el volumen de 100 ml con agua destilada. Por último, para mantener las propiedades se almacenó en un frasco ámbar y en un ambiente donde no le llegue la luz del sol.

4.4.2. Somogyi 2

Tabla 9.

Materiales para preparar el reactivo de Somogyi 2.

Compuesto	g/50 mL
Sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1 g
Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)	9 g
Agua destilada	Aforar hasta 50 mL

Adaptado de (Pachón & Perea, 2010).

Del mismo modo en un vaso de precipitación de 100 ml se le añadió 25 ml de agua destilada para posteriormente se le agregó en agitación constante los demás componentes hasta que se consiguió una composición homogénea. Para terminar, se aforó hasta un volumen de 50 ml con agua destilada.

4.4.3. Nelson

Tabla 10.

Materiales para preparar el reactivo de Nelson.

Compuesto	g/100 mL
Ácido Sulfúrico concentrado (H ₂ SO ₄)	5,3 mL
Arsenito De Sodio (Na ₂ AsO ₄ .7H ₂ O)	6.4 mL
Amonio Molibdato ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O):	6.3 g
Agua destilada	Aforar a 125 mL

Adaptado de (Pachón & Perea, 2010).

En un vaso de precipitación con un volumen de 250 ml se le añadió 125 ml de agua destilada mientras se le agregó poco a poco el molibdato de amonio, a continuación, se le agregó el ácido sulfúrico paulatinamente hasta lograr una mezcla homogénea. Finalmente, se le va añadió el arsenito de sodio, mientras se aforó a un volumen total de 125 ml con agua destilada. Se almacenó en un frasco ámbar sin contacto con la luz solar.

4.5. Preparación de las soluciones de glucosa

Se prepararon 8 soluciones de glucosa en un volumen de 100 ml cada uno. Esta glucosa se utilizó para determinar la degradación de la celulosa de los ensayos, utilizando la fórmula de cálculo para soluciones $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$.

Tabla 11.

Concentraciones patrones de glucosa.

Volumen de agua destilada	Volumen []de glucosa en ml	Concentración de glucosa g/ml
100	0	6
25	75	4.5
50	50	3
75	25	1.5
91.67	8.33	1
95.84	4.16	0.5
97.5	2.5	0.3
99.167	0,833	0.1

4.6. Lectura de absorbancia de glucosa

Para conocer la eficiencia de los tratamientos se utilizó la técnica de lectura de absorbancia mediante la determinación de azúcares reductores con el método de somogyi- Nelson, el cual consiste en que, mediante agitación constante, debido a que el reactivo de Nelson tiende a precipitarse, se agregó paulatinamente cada compuesto a la muestra de los ensayos hasta que se disuelva por completo para continuar con la metodología de medición:

- Se extrajo 250 μL de las muestras de los Erlenmeyers mediante una propipeta manual de 1 ml (ver Anexo 12), agregando a tubos de ensayo con rosca.
- Seguido se añadió 200 μL del reactivo Somogyi 1 a los tubos de ensayos, vale recalcar que debido a sus propiedades se debe evitar el contacto con la luz del sol ya que es fotosensible.
- A continuación, en los mismos tubos de ensayo se colocó 100 μL del reactivo Somogyi 2 tapándolos para que no ingrese vapor de agua en los tubos y así altere los resultados finales debido a que se deben colocar a baño maría por 30 minutos (ver Anexo 12).
- Una vez transcurrido los 30 minutos se le añadió 250 μL del reactivo de Nelson a los tubos de ensayo.

- Finalmente se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm.

Se debe añadir poco a poco los reactivos debido a sus propiedades químicas, la evidencia de que esta técnica funcione es la mezcla con el reactivo de Nelson, debido a que la determinación de azúcares reductores mediante el método espectrofotométrico de somogyi-nelson se basa en el uso de dos reactivos que reaccionará con cualquier muestra con glucosa o cualquier otro hidrato de carbono reductor, lo que reduce la primera sustancia cúprico alcalino, dando el óxido cuproso en presencia de calor para luego ser enfriado junto al reactivo arsenomolibdico de Nelson, lo que produce un complejo de óxido de molibdeno con coloración azul cuya intensidad del paso de luz se mide a través de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

4. Capítulo IV. Resultados y Discusión

4.1. Determinación de parámetros cinéticos

4.1.1. Tasa de crecimiento

Tabla 12.

Identificación de las UFCs con la fórmula de la tasa de crecimiento μ .

Tiempo en horas	Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4
4	0	2	5	7	1
24	0	119	368	852	44
μ	0	0.20	0.21	0.24	0.19

Se pudo observar que la bacteria se reproduce en 4 de los tratamientos esto debido en primer lugar a la presencia de nutrientes para la bacteria mientras que el tratamiento T0 que es el testigo no presenta unidades formadoras de colonias (UFCs) debido a que no se le adicionó bacteria con el fin de saber el comportamiento de la celulosa frente a la bacteria y que ocurriría si no se le

adiciona esta, del mismo modo se realizó un tratamiento sin NPK para conocer el comportamiento frente a la cantidad de nutrientes presentes para la bacteria.

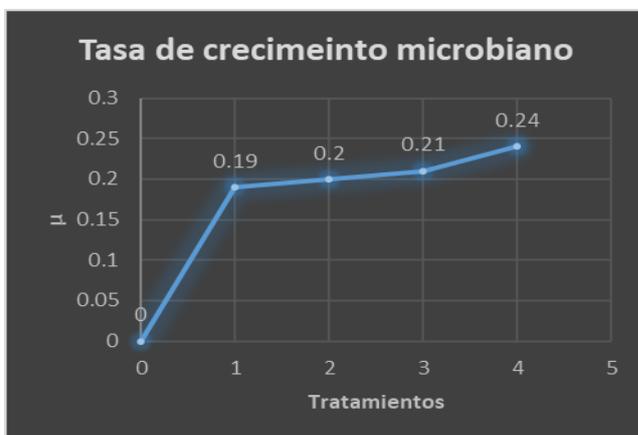


Figura 6. Tasa de crecimiento microbiano.

Los resultados de la tasa de crecimiento bajo distintas concentraciones de NPK con *Bacillus sp.*, muestran que la tasa de crecimiento bacteriano fue mayor en el tratamiento número 3.

El conteo de crecimiento bacteriano es de gran importancia para la determinación de la tasa de degradación para predecir la evolución de cultivo, consumo del sustrato y la manera en que se van a ir acumulando los productos del cultivo. Conociendo estos factores es posible iniciar el cultivo a mayores escalas lo que supone un ahorro de costos.

El género *Bacillus* empleado para este estudio, ha sido parte de otros estudios como en el estudio de (Contois, 2009). Sobre la cinética del crecimiento bacteriano en relación entre densidad de población y tasa de crecimiento específica de las culturas continuas en diferentes ensayos se obtuvieron resultados de 0.24, 0.22, 0.21, 0.19 y 0.00001 en la tasa de crecimiento donde describe que la relación entre la tasa de crecimiento específica de una población bacteriana y la concentración de un nutriente limitante está representada por la fórmula:

$$R = \frac{Rm S}{A+S} \quad (\text{ecuación 6})$$

Los parámetros representados por R y A son:

- La tasa de crecimiento específica máxima del cultivo
- La concentración del nutriente limitante.

La misma relación fue encontrada por Schaefer (1948) y por Longmuir (1954). Se pueden obtener estimaciones de la tasa de crecimiento para cada cultivo a partir de la intersección en el eje “y” de la curva que da R. De particular interés es el hecho de que las estimaciones de R son las mismas para cada cultivo con las mismas fuentes de nitrógeno y carbono, independientemente de la clase o concentración. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que en el tratamiento 3, resultan cercanos a los obtenidos por estos autores; sin embargo; es necesario recalcar que la cepa empleada por nosotros es antártica, y que las pruebas se ejecutaron a 15°C, en tanto que, los valores de referencia a 27°C.

La temperatura va a ser determinante para el crecimiento de las bacterias, ya que algunas son delicadas a los cambios de temperatura debido a que la persistencia de las proteínas de la membrana y de la actividad enzimática van a depender de la temperatura del medio (Prescott; Harley & Klein, 1995). La temperatura va a afectar en las velocidades de las reacciones fisiológicas y en la actividad metabólica de los microorganismos en la biotransformación de los sustratos, la velocidad de degradación se va a duplicar con el aumento de 10°C de temperatura. (Ballerini, Gatellier, Vogel, 1998).

4.1.2. Tasa de degradación

Para la determinación de la tasa de degradación se procedió a medir la absorbancia de la solución de las celdas experimentales en las que se incrementa la turbiedad a medida que la celulosa se transforma en azúcar fermentable.

Tabla 14.

Valores de absorbancia en los ensayos.

Días	T1	T2	T3	T4	T0
1	0.075	0.0853	0.1887	0.01	0.004
6	0.194	0.2680	0.3460	0.07	0.005
12	0.327	0.4143	0.4850	0.12	0.007
18	0.476	0.5567	0.6453	0.18	0.008
24	0.658	0.7127	0.7770	0.23	0.008
30	0.766	0.8347	0.9147	0.28	0.008

Según la tabla se puede observar un aumento de absorbancia en los tratamientos a medida que pasan los días obteniéndose valores más altos en el tratamiento 3 esto se debe a la presencia de más nutrientes para que la bacteria realice su proceso degradativo mientras que en el tratamiento T0 no se observan crecimientos proporcionales de absorbancia debido a que este tratamiento no posee bacteria solo consta de la celulosa y lignina. Estos datos fueron transformados a valores de concentración donde se evidencia la producción de glucosa como parámetro de degradación de la celulosa como se muestra en la siguiente Tabla

Tabla 15.

Valores de concentraciones en los ensayos.

Días	T1	T2	T3	T4	T0
1	0.0387	0.1877	0.2327	0.0022	0.0001
6	0.1927	0.3720	0.3937	0.0291	0.00012
12	0.3593	0.5463	0.6360	0.0824	0.00013
18	0.5623	0.7727	0.8090	0.1623	0.00014
24	0.7913	0.9500	1.0343	0.2422	0.00014
30	0.9353	1.1097	1.2303	0.2955	0.00014

En la tabla se presentan los resultados de la producción de glucosa como parámetro de determinación de la celulosa, estos datos fueron obtenidos mediante interpolaciones de la curva de calibración realizada con glucosa en diferentes concentraciones, obteniendo valores de absorbancia mediante la determinación de azúcares reductores de Somogyi-Nelson, una vez obtenidos valores de absorbancia se asocian con los valores de concentración ya conocidos lo que va a permitir realizar interpolaciones en los ensayos para determinar la concentración de glucosa producida que a su vez va a determinar la concentración en la degradación de la celulosa.

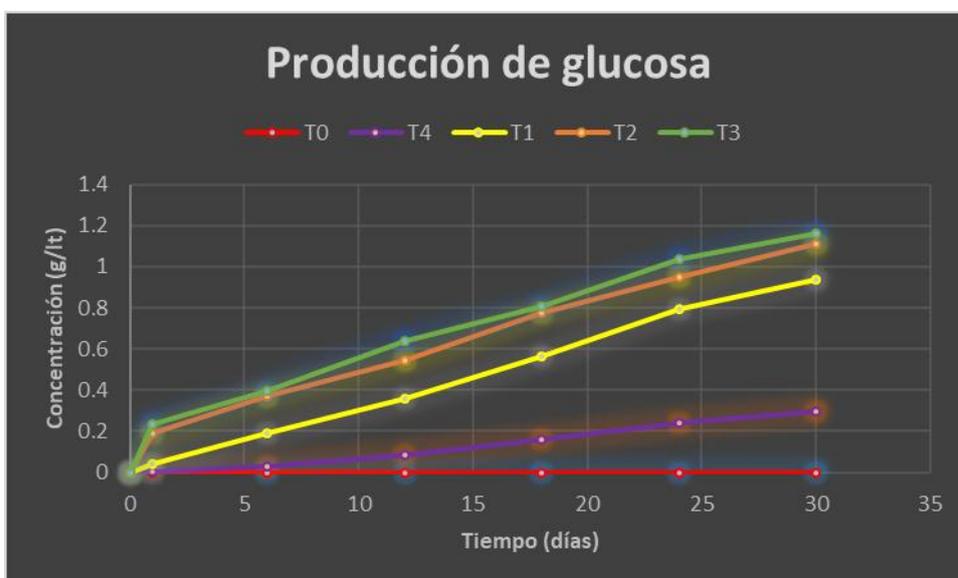


Figura 7. Incremento de la absorbancia

En el gráfico se puede apreciar el crecimiento en la producción de la glucosa al paso de los días obteniendo los datos más elevados en el tratamiento 3. Con estos valores de concentración se calculó la degradación de cada tratamiento como se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 16.

Valores de $[C]$ resultantes, $\ln Co/C$ de los ensayos.

Días	$[Co]$ [g/l]	$\ln Co/C$ [T1]	$\ln Co/C$ [T2]	$\ln Co/C$ [T3]	$\ln Co/C$ [T4]	$\ln Co/C$ [T0]	$\ln Co/C$ [T0]
------	-----------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

1	62.46	0.0006	62.31	0.0030	62.26	0.0037	62.497	3.5E-05	62.49	1.6E-06	
6	62.30	0.0031	62.12	0.0060	62.10	0.0063	62.470	4.7E-04	62.49	1.9E-06	
12	62.14	0.0058	61.95	0.0088	61.86	0.0102	62.417	1.3E-03	62.49	2.1E-06	
18	62.5	61.93	0.0090	61.72	0.0124	61.69	0.0130	62.337	2.6E-03	62.49	2.2E-06
24	61.70	0.0127	61.55	0.0153	61.46	0.0167	62.257	3.9E-03	62.49	2.2E-06	
30	61.58	0.0151	61.39	0.0179	61.27	0.0187	62.204	4.7E-03	62.49	2.2E-06	



Figura 8. Tasa de degradación.

Una vez que se obtuvieron los valores de la producción de glucosa se puede determinar la degradación de la celulosa como se muestra en el gráfico ya que mientras más glucosa se va a producir la celulosa se va a degradar en la misma cantidad de producción de glucosa.

Tabla 17.

Valores de la tasa de degradación Vs la tasa de crecimiento microbiano.

Tratamientos	Degradación	Crecimiento
T1	0.000518	0.20634
T2	0.000525	0.20643
T3	0.000558	0.10674

T4	0.000127	0.18921
T0	1.068E-07	0.0000001

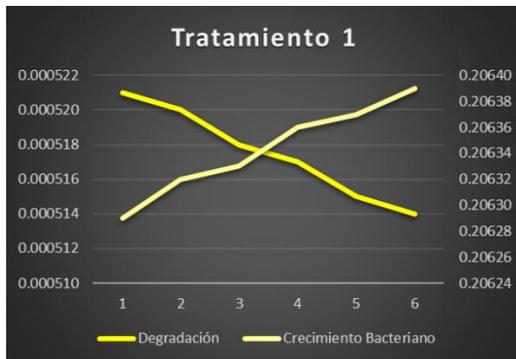


Figura 9. Tasa de degradación Vs tasa de crecimiento



Figura 10. Tasa de degradación Vs tasa de crecimiento



Figura 11. Tasa de degradación Vs tasa de crecimiento

La degradación de la celulosa presentaron mejores resultados en los tratamientos donde existe NPK relacionándose con el crecimiento de la bacteria debido a que posee lo suficientes componentes para realizar su degradación como se demostraron en las figuras previas, las tasas de degradación calculadas en base a los resultados de la medición de la

absorbancia, nos muestran que, el tratamiento 1, con 0.000518 g/día; presenta los menores valores, en tanto que la mayor tasa de degradación es en el tratamiento 3, con 0.000558 g/día. Así de 62,5 g/l en 30 días la concentración se redujo a 61,27g.



Figura 12. Tasa de degradación Vs tasa de crecimiento

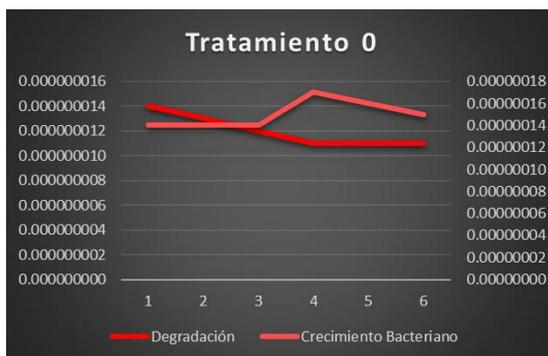


Figura 13. Tasa de degradación Vs tasa de crecimiento

Mientras que como se pudo evidenciar en los tratamientos sin la presencia de NPK tratamiento 4 con una tasa de degradación de 0.000127 g/lit demuestra que es menos de la mitad del tratamiento 1 siendo el tratamiento con menor NPK, por ende, la presencia de NPK influye muy positivamente a que la bacteria pueda degradar el contaminante. Si bien la bacteria realiza su proceso degradativo, es muy lento ya que no posee los nutrientes suficientes para realizar su labor al mismo tiempo que su crecimiento es menor ya que no tiene nutrientes con los que alimentarse y así poder crecer y su periodo de latencia es bajo, lo que provoca la muerte de la bacteria más rápido a diferencia de los tratamientos con nutrientes. No obstante, en el tratamiento 0 no presenta

actividad degradativa esto se debe a la ausencia tanto de la bacteria como la de nutrientes y eso se evidencia en los resultados descritos anteriormente.

La tasa de degradación es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento bacteriano ya que mientras la bacteria crece, la concentración del contaminante (sustrato), se reduce. Como parámetro de medición de la degradación, se midieron los grados Brix, ya que es una medida de la producción de glucosa.

La razón de haber tasa de degradación relativamente bajas, como se acotó, en relación a la tasa de crecimiento; es por la naturaleza de la cepa empleada; para la cual es característica un metabolismo lento en virtud de las condiciones en las cuales habita, sin embargo, si comparamos nuestra tasa de degradación con otros resultados obtenidos con esta misma cepa a 27°C, vemos que los resultados del presente trabajo son mejores, si consideramos que la temperatura experimental fue de 15°C. Mientras que los resultados de la tasa de degradación vs la tasa de crecimiento bacteriano con la misma bacteria en la degradación de los herbicidas diurón y monolinurón se evidencia que la producción de la biomasa es lenta por ende la degradación es igualmente es lenta, así lo confirman estudios que la producción de biomasa es inversamente proporcional a la disminución del contaminante. (Ruiz, 2001).

Según (Avila, Rivas, Hernández, & Chirinos, 2012), se emparejaron 7 cepas con capacidad celulolítica perteneciente a la familia bacillaceae como: *Bacillus megaterium*, *Bacillus macerans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp.* y *Bacillus cereus*. De las cuales se llegaron a cuantificar de 3.3 mg/mL a 6 mg/mL de un azúcar reductor como la glucosa a partir de CMC (carboximetilcelulosa). También se identificaron bacterias con capacidad de provocar enzimas celulolíticas y amilolíticas, las cuales pueden se pueden producir a gran escala con el fin de degradar residuos celulósicos. Demostrando que es posible la utilización de estos extractos para crear edulcorantes simples desde la hidrólisis de un material celulósico

Estos resultados evidencian que la producción de glucosa en nuestro estudio es relativamente el mismo con lo de otros autores.

4.1.3. Tiempo de vida media y eficiencia comparativa

La determinación de vida media se usa para estimar tiempos necesario para realizar una biorremediación y estimar los costos operativos.

Tabla 19.

Valores de vida media de los tratamientos.

Tratamientos	K	Días	Años
T1	0.000512	1354.6	3.7
T2	0.000554	1321.1	3.6
T3	0.000557	1197.8	3.2
T4	0.000160	4309.0	11.8
T0	2.068E-05	33502.7	92



Figura 14. Comparación del tiempo de los tratamientos.

Con la determinación de la eficiencia comparativa se puede escoger el tratamiento más idóneo para realizar un trabajo de biorremediación.

Tabla 20.

Comparación de la eficiencia de los tratamientos.

Tratamientos	[] inicial	[] final	Eficiencia
T1		61.538	1.5
T2	62.5	61.309	1.9
T3		61.274	2.0

T4	62.204	0.47
T0	62.49	0.016



Figura 15. Comparación de la eficiencia de los tratamientos.

Para la determinación del tiempo de vida media es indispensable definir el tiempo necesario para la degradación del sustrato lo que permite definir los costos de tratamiento. (Canabillas, 2017).

En los resultados del presente estudio son comparativamente muy altos en relación a los obtenidos por Morgan 2007, que muestran valores de 131 a 372 días, en tanto que nuestros resultados presentan valores de 1.197,8, a 1.354,6 días. Valores que confirman una vez más el reducido metabolismo característico de los microorganismos antárticos.

4.2. Medición de grados brixs

Como un parámetro de evidencia sobre la degradación de la celulosa es la generación de glucosa disuelta en un líquido que fueron medidos como grados brixs obteniendo los siguientes datos a continuación:

Tabla 21.

Valores en % de sacarosa.

Grados Brixs	
T1	3.2
T2	4.8
T3	5.6
T4	1.1
T0	0.0001

La producción de glucosa a partir de la celulosa es otra de las variables medidas predeterminar la degradación de la celulosa presente en los pañales. En el presente estudio se obtuvieron resultados donde muestran que los grados brix varían de 3,2 (tratamiento 1 con menor relación de NPK) a 5,6 (tratamiento 3 con mayor relación de NPK). Si se comparan estos resultados con los de otros estudios vemos que los valores de brix, para la degradación de celulosa de desechos orgánicos, con *Aspergillum niger*, son de 0,26, durante 17 días a temperatura ambiente (García, 2012). El porcentaje de eficiencia de la transformación de celulosa en azúcar fermentable en nuestra mejor variante es de 8,96%.

$$\% = (5,6/62,5 \text{ g/l}) \times 100 = 8,96$$

Como se ha mencionado en apartados anteriores la inferencia de NPK para el proceso de degradación del contaminante es alto ya que como se evidencia en el tratamiento número 4 la producción de grados brixs es de 1.1 siendo 75% menos que la producción del tratamiento 1 y cerca del 140% menos que el tratamiento 3 ambos con NPK a diferencia del tratamiento 1 sin NPK.

4.3. Análisis estadístico

Para determinar la validez de los resultados, se realizó un análisis de normalidad para constatar la confiabilidad de los datos obteniendo como resultado el 99% constatando así que no importa, que dato se elija; cualquiera es confiable.

Tabla 22.

Prueba de normalidad (Shapiro.Wilks)

Variable	n	Media	D.E	W*	p (Unilateral D)
P. Glucosa	90	0.40	0.38	0.85	<0.0001

El análisis realizado detalla que los datos de la producción de glucosa, que es el parámetro de la degradación de la celulosa, son normales lo que reafirma la precisión de los datos de la degradación y la confiabilidad del presente trabajo de investigación.

Tabla 23.

Análisis de la varianza.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P. Glucosa	90	0.55	0.53	66.23

Tabla 24.

Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7.17	4	1.79	25.99	<0.0001
Tratamiento	7.17	4	1.79	25.99	<0.0001
Error	5.81	85	0.07		
Total	13.04	89			

Tabla 25.

Significancia de las variables (Test de Tukey)

Alfa= 0.05 DMS= 0.24406

Error: 0.0690 gl: 85

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
3	0.71	18	0.06	A
2	0.66	18	0.06	A
1	0.48	18	0.06	A

4	0.14	18	0.06	B
0	1.34E-04	18	0.06	B

Según se demuestra en los análisis de la significancia de los tratamientos la producción de glucosa en comparación con las concentraciones de nutrientes, se evidenció que, existen similitudes en los tratamientos con más contenido de NPK mientras que del mismo modo se observa una igualdad en los tratamientos 4 y 0 los cuales no cuenta con NPK resultando en diferencias significativas entre los tratamientos con contenido de nutrientes en comparación a los que no poseen nutrientes.

La concentración de nutrientes no incide sobre la producción de glucosa ya que con cualquier concentración de NPK se va a producir glucosa, razón por la que la hipótesis H_0 : Las concentraciones de NPK influyen en la producción de glucosa, se desecha, porque el valor $p > 0.05$, razón por lo que se acepta la hipótesis alternativa, H_A : El transcurso de los días influyen en la producción de glucosa.

El análisis demuestra que, el tiempo incide sobre la producción de glucosa, a medida que pasa el tiempo sin importar la concentración de NPK se va a producir glucosa, sin embargo, los resultados muestran que las medias de producción de glucosa, los días con más producción de glucosa son el 24 y el 30 demostrando poca diferencia entre estos dos, siendo similares, obteniéndose la media más alta en el día treinta en el tratamiento 3.

Tabla 26.

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
P. Glucosa	90	0.87	0.85	36.93

Tabla 27.

Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11.32	9	1.26	58.65	<0.0001
Día	4.15	5	0.83	38.68	<0.0001
Tratamiento	7.17	4	1.79	83.61	<0.0001
Error	1.72	80	0.02		
Total	13.04	89			

Tabla 28.

Significancia de las variables (Test de Tukey)

Alfa= 0.05 DMS= 0.15617

Error: 0.0215 gl: 80

Días	Medias	n	E.E.				
30	0.70	15	0.04	A			
24	0.60	15	0.04	A	B		
18	0.46	15	0.04		B	C	
12	0.32	15	0.04			C	D
6	0.20	15	0.04				D
1	0.009	15	0.04				E

De acuerdo a los análisis realizados por (Barzán, 2016), la degradación de materiales celulósicos, son equiparables a los obtenidos en el presente estudio debido a que se detallan los resultados obtenidos en pruebas de degradación de materiales celulósicos ejecutadas durante el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% mostró que los pretratamientos físicos como la molienda, químico (Ca(OH)_2) y su combinación no exhibieron efecto significativo ($p = 0.207$) sobre la actividad celulolítica del extracto obtenido a partir de cada ensayo.

Lo anterior también se pudo comprobar mediante el análisis de medias, donde ninguna media obtenida resultó ser significativamente diferente entre sí. El análisis para la respuesta de los pretratamientos, mostraron que no hay

interacción ($p > 0.05$) y sus efectos en sus distintos niveles no fueron estadísticamente significativos ($p > 0.05$).

Donde se puede apreciar que existe una interacción entre las variables del experimento, siendo el tratamiento 3 el que más glucosa produce debido a la existencia de más nutrientes para que la bacteria realice su proceso.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Una vez concluido el trabajo de investigación se determina que existió una degradación de la celulosa presente en los pañales desechables usados mediante la acción de la bacteria conocida como *Bacillus sp.*

La tasa de crecimiento bacteriano (μ) para *Bacillus sp.*, es de 0,24, cuyo valor es similar a los obtenidos por otros autores, y se corresponde a la dinámica de crecimiento típica de un organismo adaptado a bajas temperaturas.

Los valores de k son extremadamente bajos, aspecto explicable si consideramos el empleo de una cepa antártica cuyo metabolismo es reducido ya que el proceso se efectuó a 15°C mostrando que los tiempos necesarios para la degradación del material celulósico con *Bacillus sp.*, antártico son elevados, variando de 1197,8 días en la unidad experimental tres con una proporción de 4: 2,3: 1,1 gr de NPK hasta 1354,6 en la unidad experimental uno conteniendo una proporción en NPK de 3,3: 1,88: 0,91 gr.

La degradación de celulosa con *Bacillus sp.*, a 15°C es de baja eficiencia, habiendo obtenido mejores resultados en el tratamiento número 3 con un 2% de eficiencia, debido a que la bacteria es de origen antártico donde se pudo demostrar que la bacteria si realiza un proceso degradativo como se mostró con el tratamiento número 4 al cual no se le añadió nutrientes y se obtuvo una degradación de 0.296 g/lt, sin embargo al contar con nutrientes la bacteria va a aumentar su capacidad degradativa, por consiguiente la acción de NPK es de vital importancia para reducir tiempos de degradación de la celulosa y aumentar la eficiencia.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de degradación de celulosa con *Bacillus sp.*, a temperaturas superiores e inferiores a 15°C debido al origen de la bacteria

podrá utilizarse a distintas temperaturas para mejorar los procesos de degradación de la celulosa y al mismo tiempo producir fuentes de energía. Como confirman fuentes bibliográficas *Bacillus sp.*, es capaz de producir enzimas termoestables a altas temperaturas (Rodríguez, 2012).

La bibliografía recomienda el uso de lignina como cosustrato (estimulante) del proceso de degradación de celulosa, se estima necesario el empleo de otros materiales en calidad de cosustratos, de naturaleza polimérica que estimulen y mejoren el proceso de degradación de celulosa.

Para mejorar el rendimiento de la degradación, se recomienda realizar pruebas con agitación inyección de oxígeno y adición de aminoácidos esenciales para el metabolismo de *Bacillus sp.*

Mejorados los parámetros de degradación, el uso de *Bacillus sp.*, es una alternativa importante para la recuperación energética de material celulósico de desecho, que debe priorizarse al uso de fuentes alimenticias, en calidad de materias primas para la producción de energía.

REFERENCIAS

- A.Alvarez–Castillo, & Salgado–Delgado, R. (2012). APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS. Revista Iberoamericana de Polímeros, 141. Recuperado el 01 de Octubre de 2018, de <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/SEPT12/alvarez.pdf>
- Alfonse, J., Negro, A., Saez, Á., & Moreno, M. (2016). Plasticidad ecológica de microorganismos productores de carbohidrasas aislados a partir de material sometido a compostaje. Recuperado el 09 de Noviembre de 2018, de http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/5903/17100_TFM.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Almenares-Verdecía. (2011). Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de la biomasa lignocelulosica II. Recuperado el 15 de Noviembre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852011000300012
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Atchison, y. M. (1983). Material lignocelulítico. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018, de <https://www.tesisred.net/bitstream/handle/10803/8503/Fundamentos-5.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Avila, R., Rivas, B., Hernández, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. Multiciencias, 129-135. Recuperado el 24 de Octubre de 2018, de <https://www.redalyc.org/html/904/90424216002/>
- Barba. (2002). Material lignocelulítico. Recuperado el 02 de Noviembre de 2018, de

<https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8503/Fundamentos-5.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

Barroso, M. (2010). Forma estructural de la lignina. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018, de Universidad Politécnica de Madrid: http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf

Barroso, M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol . Recuperado el 01 de Octubre de 2018, de http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf

Barzán, E. (2016). Efecto del pretratamiento de la paja de trigo sobre el rendimiento de biomasa y la producción de un extracto con actividad celulolítica empleando *Pseudomonas aeruginosa*. *multidisciplinary scientific journal*, 27(5), 26-33. Recuperado el 14 de Diciembre de 2018, de <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/download/1276/pdf>

Buenrostro, O., & Israde, I. (2013). La gestión de los residuos sólidos municipales en México. *Contaminación Ambiental*, 3-4. Recuperado el 26 de Septiembre de 2018, de <http://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/23589>

Cabrera, S. (2014). Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco. Recuperado el 24 de Mayo de 2018, de <file:///C:/Users/JHONNY/Desktop/Tesis/BIODEGRADACION-DE-PAALES-DESECHABLES-USADOS-MEZCLADOS-CON%20RESIDUOS%20DE%20JARDINERIA%20POR%20HONGOS.pdf>

Canabillas, M. (2017). Incorporación de bacillus coagulans a productos derivados de cereal. Universidad Autónoma de Barcelona, 20-57. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018, de <file:///C:/Users/JHONNY/Desktop/Tesis/Eficiencia%20y%20tiempo%20de%20vida.pdf>

- Cervantes, Muhammad, Gonzalez, & Adesogan. (2016). *Expression and purification of a novel bacterial expansin from Bacillus subtilis that synergistically degrades cellulose with fibrolytic enzymes*. Journal of Animal Science, 64. Recuperado el 14 de Octubre de 2018, de https://academic.oup.com/jas/article-abstract/94/suppl_5/791/4767500?redirectedFrom=fulltext
- Chacón, O. (2011). DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA. Recuperado el 28 de Octubre de 2018, de <https://es.scribd.com/doc/59540171/DEGRADACION-DE-LA-CELULOSA>
- Constanza, L., & Consuelo, L. (2011). BASILLUS SPP.; PERSPECTIVA DE SU EFECTO BIOCONTROLADOR MEDIANTE ANTIBIOSIS EN CULTIVOS AFECTADOS POR FITOPATÓGENOS. NOVA, 177-181. Recuperado el 25 de Octubre de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/316651571_Bacillus_spp_perspectiva_de_su_efecto_biocontrolador_mediante_antibiosis_en_cultivos_afectados_por_fitopatogenos
- Constanza, L., & Lozano, L. (2016). Bacillus spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. Recuperado el 20 de Octubre de 2018, de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00046.pdf>
- Contois, D. (2009). *Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures*. Gen Microbial, 40-50. Recuperado el 23 de Octubre de 2018, de <file:///C:/Users/JHONNY/Desktop/Tesis/tasa%20de%20crecimiento.pdf>
- Cordero, D. (2014). Uso de microorganismos en el tratamiento de aguas, suelos y residuos. Microbiología Ambiental, 3. Recuperado el 23 de Agosto de 2018
- Cruz, M. (2007). Identificación y control de Bacillus sp., contaminante del establecimiento in vitro de Guadua angustifolia Kunth. Biotecnología

- Vegetal, 7, 9-13. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/350/html>
- Cruz, N., Castellanos, D., & Helliodoro, A. (2009). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. Recuperado el 16 de Octubre de 2018, de <http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/vol3/vol.3.%20no.2/pathogen%20compost%20patogenos%20degradation%20cellulose.pdf>
- Delfín, I., & Durán, C. (2013). Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por el hongo pleurotus. Contaminación Ambiental , 1-2. Recuperado el 18 de Septiembre de 2018
- eluniverso.com. (2014). Cultivos de caña de azúcar se expanden en Ecuador reemplazando a arrozales. El Universo. Recuperado el 07 de Diciembre de 2018, de <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/cultivos-de-cana-de-azucar-se-expanden-en-ecuador-reemplazando-arrozales>
- Fengel y Wegener, 1., Sjöström, 1. M., & Oggiano, 1. (1997). Fuentes de lignina. Recuperado el 03 de Noviembre de 2018, de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8503/Fundamentos-5.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Ferrer-Marcelo, Y., León-Rodríguez, M., Michelena-Álvarez, G., Dustet-Mendoza, J. C., Duque-Ortiz, A., Ibañez-Fuentes, M.-L., & Tortoló-Cabañas, K. (2011). Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *IC/DCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 45(1), 3-12. Recuperado el 12 de Octubre de 2018, de <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223122251001.pdf>
- Gaitan, D., & Perez, L. (2007). AISLAMIENTO Y EVALUACION DE MICROORGANISMOS CELULITICOS A PARTIR DE RESIDUOS VEGETALES FRESCOS Y EN COMPOST GENERADOS EN CULTIVO

DE CRISANTEMO. Recuperado el 10 de Octubre de 2018, de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34688468/tesis274.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1546477350&Signature=Xw89n%2BH0BRkttgzejmtNX6ewiik%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DAISLAMAMIENTO_Y_EVALUACION_DE_MICROOR

García, M. C. (2008). Producción de biodiesel mediante fermentación en estado sólido de compuestos lignocelulósicos. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 66-72. Recuperado el 02 de Octubre de 2018

Grijalva, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de <http://oaji.net/articles/2015/1783-1426290326.pdf>

Guailupo, J., Motta, D., & Quiroz, S. (2017). GESTIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN EL RESTAURANTE EL MESÓN – SANTA ANITA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS. Recuperado el 08 de Septiembre de 2018, de http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/9266/GUAILUPO_MOTTA QUIROZ_GESTION_DE_RESIDUOS_ORGANICOS_EN_EL_RESTAURANTE.pdf?sequence=1

Harwood, C. (1989). Bacillus. *BIOTECHNOLOGY HANDBOOKS*, 2, 5-27. Recuperado el 11 de Octubre de 2018, de <file:///C:/Users/JHONNY/Desktop/Tesis/Bacillus.pdf>

J.V.López, Arraiza, M., M.Aguilar, A.Fernando, & Gómez, M. (2010). BIODEGRADACION DE RESIDUOS DE BOLSAS OXODEGRADABLES DE PEAD BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE COMPOST. Recuperado el 13 de Octubre de 2018, de <file:///C:/Users/JHONNY/Desktop/Tesis/calculo%20de%20la%20dgradacion%20de%20la%20celulosa.html>

- Jiménez, B. (2015). EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS COMBINADAS PARA LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE BIOCOMBUSTIBLES LÍQUIDOS. Recuperado el 16 de Diciembre de 2018, de <http://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/16893/1/TFG-i-363.pdf>
- Lavi, P. (2013). Cepa antártica de *Bacillus* sp., con actividad extracelular de tipo agarolítica y alginatoliasa. CIENCIAS DE LA TIERRA, ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MEDIOAMBIENTAL, 77. Recuperado el 25 de Octubre de 2018, de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382013000200001
- Llenque, L., & Rodriguez, L. A. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas, 20. Recuperado el 14 de Mayo de 2018
- Martinez, Y. (2014). SELECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS CON POTENCIAL PARA LA DEGRADACIÓN DE LIGNOCELULOSA AISLADOS DE DESECHOS AGROINDUSTRIALES DE CAFÉ E HIGUERILLA. Recuperado el 24 de Noviembre de 2018, de <https://docplayer.es/23313868-Seleccion-de-hongos-filamentosos-con-potencial-para-la-degradacion-de-lignocelulosa-aislados-de-desechos-agroindustriales-de-cafe-e-higuerilla.html>
- Medina, M., Lara, L., Aguilar, C., & De La Garza, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, III(6), 35-39. Recuperado el 15 de Noviembre de 2018, de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/Art%204.pdf>
- Miró, N. (2004). Actividades exocelulares producidas por *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes elegans* y *Pleurotus* sp. en bagazo de caña y corteza de pino. Recuperado el 13 de Diciembre de 2018, de

https://www.researchgate.net/figure/Estructura-de-la-Lignina-Tomado-de-14-12-03_fig1_44517334

Morales, B. (2012). *Microorganismos en la industria*. Recuperado el 14 de Octubre de 2018, de <http://biotecindustrial.blogspot.com/>

Municipalidad Provincial de Andahuaylas. (2013). Mejoramiento y Ampliación de la gestión Integral de los residuos sólidos municipales en la zona urbana del distrito de Andahuaylas. Andahuaylas. Recuperado el 03 de Octubre de 2018, de http://ofi5.mef.gob.pe/appFs/Download.aspx?f=2054_JGUIBO_20131031_123334.pdf

Núñez, N. (2016). Desarrollo de formulaciones de grasas lubricantes biodegradables basadas en aceites vegetales y derivados celulósicos. Recuperado el 04 de Octubre de 2018, de http://rabida.uhu.es/dspace/bitstream/handle/10272/12426/Desarrollo_de_formulaciones.pdf?sequence=2

Pachón, A., & Perea, D. (2010). DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ. Recuperado el 03 de Diciembre de 2018, de <http://www.academia.edu/download/44519541/tesis586.pdf>

Paredes, O. (2014). Caracterización de Bacterias Degradadoras de Celulosa y Almidón. Recuperado el 28 de Septiembre de 2018, de https://www.researchgate.net/profile/Octavio_Paredes-Lopez/publication/221705146_Caracterizacion_de_Bacterias_Degradadoras_de_Celulosa_y_Amidon/links/0c96053ac7fd3237dc000000/Caracterizacion-de-Bacterias-Degradadoras-de-Celulosa-y-Almidon.pdf?origin=publ

Pejó, T. (2009). BIOETANOL DE PAJA DE TRIGO. Recuperado el 19 de Noviembre de 2018, de

file:///C:/Users/JHONNY/Desktop/Tesis/Bioetanol%20de%20paja%20de%20trigo%20madrid.pdf

- Peñaherrera, S. (2013). COMBINACION DE AGENTES BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DEL FRUTO DE CACAO. *UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO*, 2-13. Recuperado el 22 de Octubre de 2018, de <https://docplayer.es/40660069-Universidad-tecnica-estatal-de-quevedo-unidad-de-estudios-a-distancia-modalidad-semipresencial-carrera-ingenieria-agropecuaria.html>
- Pilar, A., & Perea, D. (2010). DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ. Recuperado el 27 de Septiembre de 2018, de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8626/tesis586.pdf?sequence=1>
- Prinsen, P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Investigación, INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGIA DE SEVILLA, Departamento de Biotecnología Vegetal, Sevilla. Recuperado el 05 de Noviembre de 2018, de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/66265/1/Composici%C3%B3n%20qu%C3%ADmica%20de%20diversos%20materiales%20lignocelul%C3%B3sicos.pdf>
- Quintero, C. B., Teutli, M., & Gonzalez, M. (2015). Manejo de residuos sólidos en instituciones educativas. Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. Recuperado el 14 de Octubre de 2018, de <http://www.academia.edu/download/34637374/escuelas.pdf>
- Ramírez, G., & Andrade, E. (2012). Ciclo integral de tratamiento de residuos sólidos de pañal. Recuperado el 22 de Abril de 2018, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/resisoli/mexicona/R-0170.pdf>

- Ramirez, H. (2014). Efecto de diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa sobre la cinetica de crecimiento de *Bacillus* sp. Recuperado el 23 de Octubre de 2018, de <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4130/Ram%C3%A9rez%20Romero%20Jonathann%20Humberto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ramirez, P., & Cocha, J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10. Recuperado el 24 de Octubre de 2018, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332003000100008
- Riaño, Gutierrez, Hernández, & Barrero. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Tumbaga*, 61-91. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018, de <file:///C:/Users/JHONNY/Downloads/Dialnet-ProduccionDeBioetanolAPartirDeSubproductosAgroindu-3628225.pdf>
- Rodríguez et al., 1., & FAO. (2001). MATERIALES LIGNOCELULOSICOS. Recuperado el 27 de Noviembre de 2018, de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8503/Fundamentos-5.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Rodriguez, A. (2015). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. Recuperado el 30 de Octubre de 2018, de <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4586/Rodr%C3%A9guez%20Silva%2C%20Luis%20Arturo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodriguez, H. (2012). *Gestión Integral de residuos sólidos*. (C. d. distancia, Ed.) Bogotá, Colombia: Fundación Universitaria del Área Andina. Recuperado el 18 de Abril de 2018, de

<http://digitk.areandina.edu.co/repositorio/bitstream/123456789/518/1/Gesti%C3%B3n%20Integral%20de%20Residuos%20S%C3%B3lidos.pdf>

Rodriguez, S. (2012). Consumismo y Sociedad: Una visión crítica del Homo Consumens. *Revista Crítica de Ciencias Sociales y Jurídicas*, 3-4. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018, de <http://revistas.ucm.es/index.php/NOMA/article/viewFile/40739/39058>

Rodriguez, V. (2008). Efecto Antagónico Y Biocontrolador De Algunos Microorganismos Saprofíticos Contra *Rhizoctonia Solani* Un Fitopatogeno Causante Del (Damping Off) En Plantas De Tomate. Recuperado el 28 de Octubre de 2018, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Rodriguez_LV/Introduccion.PDF

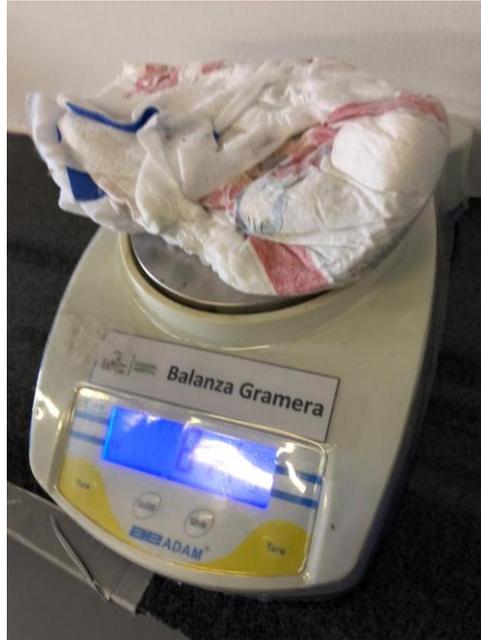
Ruiz, S. (2001). Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar. Aplicación al análisis de herbicidas y de sus productos de degradación. *Universidad Politècnica de Catalunya*, 220-234. Recuperado el 21 de Octubre de 2018, de <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/93734>

Salsedo, J., López, J., & Flórez, L. (2011). EVALUACIÓN DE ENZIMAS PARA LA HIDRÓLISIS DE RESIDUOS DE LA COSECHA CAÑA DE AZÚCAR. *DYNA*, 78(169), 182-190. Recuperado el 05 de Octubre de 2018, de https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:S-TXHXG_llkJ:https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/18079/48744+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec

Sierra, F., Contreras, I., & Carlos, G. (2012). ETANOL LIGNOCELULÓSICO: ENERGÉTICO OBTENIDO DE PROCESOS FERMENTATIVOS DE LA BIOMASA PRESENTE EN EL JACINTO DE AGUA. Recuperado el 23 de Noviembre de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/264457964_Etanol_lignocelulosico_Energetico_obtenido_de_Procesos_Fermentativos_de_la_Biomasa_presente_en_el_Jacinto_de_Agua

- Viviano, F., Medina, L., Ramos, N., Amaíz, L., & Valbuena, O. (2011). Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de aguas termales. Recuperado el 29 de Septiembre de 2018, de <https://www.google.com/search?q=Degradaci%C3%B3n+de+celulosa+por+bacterias+de+aguas+termales+de+Las+Trincheras%2C+Venezuela&oq=Degradaci%C3%B3n+de+celulosa+por+bacterias+de+aguas+termales+de++Las+Trincheras%2C+Venezuela&aqs=chrome..69i57&sourceid=chrome&i>
- Zamora, V., & Almada, G. (2013). Uso de residuos agrícolas para la producción de etanol. *CienciAcierta*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018, de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC33/2.html#.XCpIB1xKjIV>

ANEXOS



Anexo 1. Peso inicial del pañal.



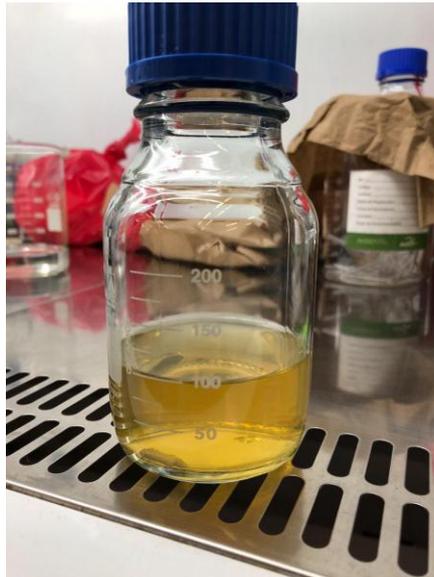
Anexo 2. Separación manual de los componentes del pañal.



Anexo 3. Peso final del pañal.



Anexo 4. Inoculación de la bacteria en agua peptonada.



Anexo 5. Bacteria sumergida en agua peptonada para su desarrollo.



Anexo 6. Incubación de la bacteria por 24 horas a 27 °C.



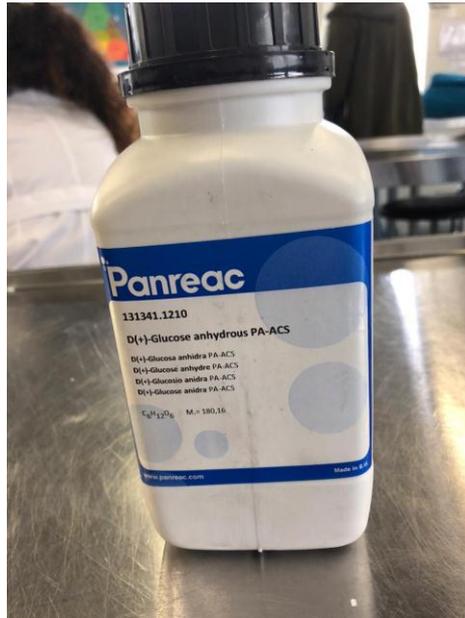
Anexo 7. Nutrientes para introducir junto con la bacteria.



Anexo 8. Preparación de los ensayos.



Anexo 9. Ensayos.



Anexo 10. Glucosa en polvo.



Anexo 11. Concentraciones conocidas de glucosa para determinar la curva de equilibrio.



Anexo 12. Extracción del líquido de los ensayos para determinar la glucosa producida.



Anexo 13. Introducción de las muestras en baño maría por 30 min.



Anexo 14. Cambio de coloración después del baño maría.

