Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Caracterización molecular de bacterias productoras de celulasas aisladas de efluentes y torta de palma aceitera (*Elaeis guineensis*)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bromatología

AUTOR

Teresa Celina GALLARDO JUGO

ASESOR

Dra. Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Gallardo, T. (2025). *Caracterización molecular de bacterias productoras de celulasas aisladas de efluentes y torta de palma aceitera (Elaeis guineensis)*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Teresa Celina Gallardo Jugo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07727234
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8779-2220
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	17880045
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3844-7185
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Carlos Alejandro Bell Cortez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08479121
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Daniela Milagros Landa Acuña
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	43811089
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Celia Bertha Vargas De La Cruz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42354741
Datos de investigación	

Línea de investigación	Microorganismos de interés sanitario, industrial, ambiental y bioprocesos. Enzimas y fermentaciones
Grupo de investigación	Biotecnología Microbiana y Salud (BIOMIAS)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. PCONFIGI A21040231.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2012- 2021
URL de disciplinas OCDE 2.08.01	Biotecnología ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BROMATOLOGÍA

Siendo las **12:00 hrs. del 24 de junio del 2025** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (asesora), PhD. Daniela Milagros Landa Acuña y la Mg. Celia Bertha Vargas De La Cruz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE CELULASAS AISLADAS DE EFLUENTES Y TORTA DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis*),** presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Teresa Celina Gallardo Jugo.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Bromatología.** Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

17 (DIECISIETE) MUY BUENO

Luego el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Teresa Celina Gallardo Jugo**, el Grado Académico de **Magíster en Bromatología**.

Siendo las 12:45 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 13:00 hrs. del 24 de junio de 2025

Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez (P. P. T.C.)
Presidente

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P. P. T.C.)
Miembro - Asesora

PhD. Daniela Milagros Landa Acuña (P. Aux. T.C.)
Miembro

Mg. Celia Bertha Vargas De La Cruz (P. Aux T.C.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes, en mi condición de asesora acreditado con el Dictamen N° 00172/FFB-UPG/2023 de la tesis, cuyo título es: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE CELULASAS AISLADAS DE EFLUENTES Y TORTA DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis*),** presentado por la Bach**. Teresa Celina Gallardo Jugo,** para optar al Grado Académico de Magíster en Bromatología, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **6**% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Lima, 07 de Mayo de 2025

Firma del Asesora _____

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes

DNI: 17880045

Dedicatoria

A Dios por iluminar el camino de mi vida. A mis padres Dagoberto y Lolita en su memoria, por su amor incondicional.

A mis amados Samuel , Alejandro, José Luis y Alessia. A ustedes dedico con gratitud cada uno de mis logros. A mis hermanos, familiares y amigos. Por su acompañamiento y cariño en todas las etapas de mi vida.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra Amparo Zavaleta por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación. Su confianza, guía y apoyo constante fueron esenciales en la culminación de este estudio.

Mi sincero reconocimiento a la doctora Norma Ramos Cevallos por su gran apoyo y orientación en la realización del estudio.

Mi agradecimiento al equipo de profesores del CLEIBA, en especial a la Dra. Celia Vargas, Edwin Hualpa y Daniela Landa, quienes fueron un apoyo invaluable a lo largo de este proceso. Igualmente, al grupo de Investigación Biotecnología Microbiana y Salud (BIOMIAS).

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular y el CLEIBA de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San marcos. Fue financiado a través del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. PCONFIGI A21040231.

Índice

Resumen 6
Abstract 7
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 10
2.1 Antecedentes: 10
2.2 Aspectos teóricos: 14
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 21
3.1 Tipo de investigación 21
3.2 Diseño metodológico 21
3.3 Unidad de análisis 24
3.4 Población de estudio 25
3.5 Muestra o tamaño de muestra 25
3.6 Técnicas o instrumentos de recolección de la información o datos 25
3.7 Análisis e interpretación de la información 25
CAPÍTULO IV. RESULTADOS 26
4.1 Bacterias productoras de celulasas aisladas a partir de residuos industriales de palma aceitera 26
4.2 Características fenotípicas de las bacterias productoras de celulasas mediante métodos bacteriológicos tradicionales 27
4.3 Caracterización genotípica de las bacterias productoras de celulasas mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosómicos 16S 34
4.4 Actividad celulósica de las bacterias seleccionadas 35
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 37
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 41
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42

Resumen

El cultivo de la palma aceitera genera residuos que requieren tratamientos sostenibles y limpios, una alternativa es el uso de microorganismos nativos. Por ello, el objetivo del estudio fue caracterizar molecularmente bacterias productoras de celulasas aisladas de residuos industriales de palma aceitera (*Elais guineensis*). Se recolectaron por empresa cinco muestras de 100 g de torta de palmiste o efluente respectivamente en frascos estériles, se transportaron en contenedores refrigerados hasta el laboratorio. Las muestras pre enriquecidas se sembraron en medios sólidos conteniendo carboximetilcelulosa o celulosa cristalina para obtener bacterias productoras de celulasas. Se seleccionarán las colonias con características diferentes de color, forma, tamaño y consistencia para su posterior caracterización fenotípica y molecular. La caracterización fenotípica incluyó la degradación de sustratos, condiciones físicas y químicas variables de incubación y sensibilidad a los antibióticos. La caracterización molecular se realizó mediante la secuenciación de los productos de PCR del gen 16S utilizando cebadores 16SFB, 16SRB, 1100R y 359F. De las muestras de residuos agroindustriales de la palma aceitera se aislaron 50 bacterias de las cuales 18 presentaron actividad celulósica. Las 18 bacterias celulósicas fueron agrupadas por perfiles de hidrólisis de sustratos y de sensibilidad a los antimicrobianos en 10 grupos. Las mismas bacterias se agruparon mediante pruebas moleculares en nueve genotipos, pertenecientes a los géneros *Bacillus, Klebsiella, Enterobacter, Providencia y Acinetobacter*. Los aislamientos de residuos de la palma presentan condiciones fenotípicas y moleculares promisorias para su uso en la industria alimentaria y biotecnológica en general.

Palabras clave: *Elais guineensis,* palma aceitera, residuos, *Bacillus*, celulasas

Abstract

The cultivation of oil palm means that to be used, they require treatment with cellulolytic enzymes that can come from native microorganisms. Therefore, the objective of the study was to molecularly characterize cellulase-producing bacteria isolated from industrial oil palm waste (*Elais guineensis*). Five samples of 100 g of palm kernel cake or effluent, respectively, were collected per company in sterile bottles and transported in refrigerated containers to the laboratory. The pre-enriched samples were seeded on solid media containing carboxymethylcellulose or crystalline cellulose to obtain cellulase-producing bacteria. Colonies with different characteristics of color, shape, size and consistency will be selected for subsequent phenotypic and molecular characterization. Phenotypic characterization included substrate degradation, variable physical and chemical incubation conditions, and antibiotic sensitivity. Molecular characterization was performed by sequencing the PCR products of the 16S gene using primers 16SFB, 16SRB, 1100R and 359F. From the samples of agroindustrial waste from oil palm, 50 bacteria were isolated, of which 18 showed cellulolytic activity. The 18 cellulolytic bacteria were grouped by substrate hydrolysis profiles and sensitivity to antimicrobials into 10 groups. The same bacteria were grouped by molecular tests into 9 genotypes, belonging to the genera *Bacillus, Klebsiella, Enterobacter, Providencia and Acinetobacter*. Palm residue isolates present promising phenotypic and molecular conditions for use in the food and biotechnology industry in general.

Keywords: cellulases, microorganisms, oil palm, waste

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El sector agroindustrial libera altos volúmenes de residuos vegetales que dificultan su manejo, además ocupan espacio físico, y son fuente de plagas. Así. la industria del aceite de palma genera una gran cantidad de residuos, entre los cuales, los racimos vacíos de palma aceitera y la torta de palma representan los residuos de mayor producción. Estos subproductos, ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, poseen un alto potencial para aplicaciones industriales y agrícolas. Sin embargo, su estructura compleja dificulta su biodegradación eficiente (1,2). Debido a esto, es fundamental el desarrollo de estrategias que permitan su transformación sostenible mediante procesos biotecnológicos, como el uso de microorganismos. En este aspecto, la industria de la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) se ha consolidado como la segunda del mundo con relación a producción; y la primera en aceite vegetal, con referencia a volúmenes de venta de derivados oleosos (3-5). La producción de palma aceitera en el Perú en el 2024 logró un incremento cercano al 14,50% en el mes de julio comparado al mismo periodo del 2023. Esta variación estuvo relacionada a una siembra elevada y asociada con las variaciones climáticas diferentes en diversas regiones del país. Varios departamentos peruanos (San Martín, Ucayali y Huánuco) se han destacado debido a que han incrementado la producción de este producto a 20,59%, 22,92% y 18,23%, respectivamente. Sin embargo, Loreto mostró una disminución del 15,90% en su producción anual. A pesar del incremento en la producción, las exportaciones de palma en el Perú en el año 2024 no lograron superar lo alcanzado en el 2023. Los principales destinos de exportación fueron Colombia, Chile y México, con participaciones de 25,2%, 25,0% y 24,1%, respectivamente (6-9). Durante la extracción del aceite se genera gran cantidad de residuos lignocelulósicos de difícil tratamiento, los cuales son utilizados en alimentos de animales y compostaje. Del producto cosechado de la palma aceitera tan solo el 10% es aceite y lo demás son residuos como frutos vacíos, fibras, cáscaras, semillas de palma, follaje y troncos (10-14).

A nivel industrial, una alternativa emergente y prospectiva para el tratamiento de estos residuos es el empleo de microorganismos nativos catalogados que presenten la capacidad de fermentar los compuestos lignocelulósicos en azucares fermentables, los cuales son fuentes de carbono para la producción de biomasa, polioles, bioetanol, ácidos orgánicos, edulcorantes, productos farmacéuticos, alimentos para animales, y de otros compuestos de interés industrial. Además, estos microorganismos nativos pueden ser utilizados en

procesos de biorremediación para la eliminación de otros residuos agroindustriales constituyendo una opción sostenible y respetuosa con el medio ambiente, ya que permiten el aprovechamiento de los residuos orgánicos de una manera eficiente y rentable. La producción de azúcares fermentables a partir de la degradación de residuos vegetales contribuye a la economía circular y a la reducción de la dependencia de materias primas no renovables. En definitiva, la utilización de microorganismos nativos en la degradación de residuos abre un amplio abanico de oportunidades para la industria, promoviendo la innovación y la sostenibilidad en los procesos productivos. (15-17).

Los microorganismos con estas propiedades catalíticas producen celulasas (EC3.2.1.4), las cuales han mostrado ser robustas y de aplicación en las industrias: alimentaria, farmacéutica, cosmética, química, textil, vinícola, pecuaria, así como en la elaboración de bioetanol. Las celulasas son enzimas clave en la industria alimentaria, ya que descomponen esta compleja red polimérica presente en alimentos vegetales, mejorando la textura y liberando nutrientes. Esto facilita la producción de jugos, purés y salsas, mejorando la calidad y la digestibilidad de los alimentos, a la vez, los residuos lignocelulósicos disminuyen evitando impacto ambiental (18-19).

En este contexto, el objetivo de la investigación fue aislar y caracterizar molecularmente bacterias productoras de celulasas procedentes de residuos industriales de palma aceitera (*Elais guineensis*) para su aplicación prospectiva en el tratamiento de los residuos lignocelulósicos de la palma aceitera.

Objetivos específicos:

1. Aislar bacterias productoras de celulasas a partir de residuos industriales de palma aceitera.
2. Determinar las características fenotípicas de las bacterias productoras de celulasas mediante métodos bacteriológicos tradicionales.
3. Caracterizar genotípicamente las bacterias productoras de celulasas mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosómicos 16S.
4. Determinar la actividad celulósica de las bacterias seleccionadas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Los residuos vegetales de la industria de la palma aceitera presentan estructura celulósica compleja, son ricos en nutrientes y proporcionan un hábitat para diversos microorganismos.

Lee et al. (2023) aislaron y caracterizaron *Bacillus sp., Bacillus pumilus, Pseudomonas tuomuerensis*, P. *aeruginosa*; y los hongos *Talaromyces oumae-annae* y *Meira* sp. a partir de lodos de palma aceitera. A los microorganismos se evaluó su capacidad para solubilizar fosfato insoluble, producir ácido indolacético (IAA) y fijar nitrógeno atmosférico, *T. oumae-annae* solubilizaba potasio. El co-cultivo (antagonismo) reveló que *P. aeruginosa* inhibió el crecimiento de *T. oumae-annae*. Además, se produjo carbón vegetal (biochar) de fibra de palma (OPF) bajo flujo de aire comprimido y en presencia de nitrógeno, los cuales fueron evaluados en la adsorción de nitrógeno amoniacal (NH_3-N). Al inocular *B. pumilus*, su crecimiento en el biochar tratado con nitrógeno aumentó tres veces, mientras que no hubo crecimiento en el biochar tratado con aire. La microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmó la adhesión de *B. pumilus* a la superficie e interior del biocarbón. Estos hallazgos sugieren que los microorganismos aislados tienen potencial en la promoción del crecimiento vegetal y que el biocarbón tratado con nitrógeno es un portador para su aplicación agrícola (20).

Popoola et al. (2022) realizaron el aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial para la biorremediación de suelos contaminados. Las muestras de suelos se recolectaron de un molino de aceite en Oyo, Nigeria, y de suelos contaminados artificialmente en la Universidad Ajayi Crowther. Los aislamientos se caracterizaron morfológica y bioquímica, además de un cribado preliminar de actividad lipolítica, confirmado mediante crecimiento en medio de sales minerales durante siete días. Se identificaron 41 bacterias, predominando *Bacillus* spp. (80%) y *Pseudomonas s*pp. (20%) en suelos contaminados naturalmente, mientras que en suelos artificialmente se detectó exclusivamente *Bacillus* spp. (100%). Asimismo, se aislaron 29 hongos, destacando *Aspergillus fumigatus* (37,5%) en suelos contaminados artificialmente y *Saccharomyces*

spp. (91%) en suelos del molino de aceite. Todos los aislados presentaron actividad lipolítica, excepto *B. mycoides* y *Oidiodendron* sp. Estos resultados evidencian el potencial de los microorganismos para la descontaminación de suelos afectados por residuos de aceite de palma, ofreciendo una alternativa biotecnológica para la reducción del impacto ambiental (21).

Dermiyati et al. (2020) caracterizaron las bacterias presentes en estos residuos bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas y facultativas anaeróbicas. Se preparó una suspensión de extracto de OPEFB e inoculó en medio Agar de Recuento en placa para el aislamiento y la cuantificación de bacterias. La caracterización incluyó pruebas morfológicas, reacción de Gram con KOH al 3%, pruebas fermentativas-oxidativas, de pudrición en tubérculos de papa, hipersensibilidad en hojas de tabaco y virulencia en plántulas de pepino. Se obtuvieron 220 aislados bacterianos: 84 aeróbicos, 68 anaeróbicos y 68 anaerobios facultativos. La mayor concentración celular se registró en condiciones aeróbicas con $285{,}60 \times 10^{10}$ UFC mL^{-1}. Predominaron bacterias de color blanco turbio (34,55%), forma redonda (69,55%), Grampositivas (76,36%) y fermentativas (89,55%). Además, el 71,82% no presentó actividad de pudrición, el 97,27% fue negativo en hipersensibilidad y el 74,55% mostró características virulentas. Estos hallazgos destacan el potencial de estas bacterias para aplicaciones biotecnológicas en el tratamiento de residuos de palma y su conversión en productos de valor agregado (22).

Félicité et al. (2021) usaron bacterias para la biorremediación, para ello se recolectaron muestras de aguas residuales de molinos de aceite de palma y se caracterizaron parámetros como temperatura, pH, conductividad (CND), sólidos suspendidos (SS), demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO) y contenido de aceites y grasas (O/F). Además, se aislaron bacterias a partir de suelos contaminados y se evaluó su capacidad para producir enzimas lipolíticas, degradar aceites y reducir la carga contaminante. Se identificaron 28 aislados con potencial de descontaminación, destacando *Bacillus sp.* (D17 y D23) y *Acinetobacter* sp. (D22) como los más eficientes. La caracterización del efluente mostró valores superiores a los límites recomendados, lo que resalta la urgencia de tratamientos efectivos. Los resultados indican que estas cepas bacterianas pueden ser utilizadas en estrategias de biorremediación para el tratamiento de aguas residuales de la industria de palma aceitera, reduciendo su impacto ambiental (23).

Luthfi et al (2023) aislaron e identificaron una cepa bacteriana productora de biohidrógeno en muestras de suelo. Se caracterizó mediante análisis morfológicos, bioquímicos y secuenciación del gen rRNA 16S. La capacidad fermentativa del aislado se evaluó en un biorreactor anaeróbico utilizando dos fuentes de carbono derivadas de racimos vacíos de palma aceitera (OPEFB): hidrolizado pretratado con amoníaco (AFEX) y melaza pretratada con ácido acético diluido (DAA). *Enterobacter sp*. KBH 6958 mostró una conversión de hidrolizado AFEX un 45% superior a la de melaza DAA, con una producción de 1,55 mol H_2/mol de azúcar y una productividad de 98,1 mL H_2/h. Se identificaron butirato, acetato y etanol como los principales metabolitos. Los resultados evidencian el potencial biotecnológico de esta cepa para transformar residuos lignocelulósicos en biohidrógeno, ofreciendo una alternativa sostenible para reducir la contaminación y mejorar la seguridad energética (24).

Kusumawati et al. (2023) aislaron y caracterizaron levaduras capaces de utilizar xilosa y para la producción de xilitol y etanol. El crecimiento de 19 aislados se determinó en medios sólidos y líquidos con xilosa como única fuente de carbono, incubados entre 30 °C y 45 °C. Se seleccionaron los aislados: SL1, SL3, SL6, SL7, R5 y OPT4B por su alto consumo de xilosa; y (SL1, SL6, SL7 y R5 demostraron la producción de xilitol entre 5,0 y 6,0 g/L según cromatografía líquida de alta presión. Asimismo, los aislados: SL1(1), SL6, SL3, R5 y OPT4B produjeron etanol entre 0,85 a 1,34 g/L determinado por cromatografía de gases. Los aislados SL1(1), R5 y SL6 fueron capaces de fermentar hidrolizado líquido de residuos de tronco de palma aceitera pretratados con agua subcrítica. El análisis del gen rDNA18S identificó SL1(1) y R5 como *Pichia kudriavzevii*, y SL6 como *Candida xylopsoci*. Estos hallazgos destacan el potencial de estas levaduras para la producción de biocombustibles y compuestos de valor agregado a partir de residuos agroindustriales (25).

Andini et al. (2024) identificaron bacterias productoras de biosurfactantes con potencial para la degradación de aceites a partir de lagunas aeróbicas de aguas residuales de palma aceitera en PT. Aek Loba Plantation. Se realizaron pruebas de caracterización morfológica, tinción Gram, pruebas bioquímicas y análisis por PCR en los aislados con mayor índice de emulsificación. Se identificaron ocho aislados pertenecientes a seis géneros bacterianos y una especie, con índices de emulsificación variables: *Citrobacter* sp. (30%), *Enterobacter* sp. (42,2%), *Escherichia* sp. (35,9% y 36,5%), *Pseudomonas* sp.

(32%), *Micrococcus* sp. (37,5%), *Bacillus* sp. y *Klebsiella variicola* (42.8%), siendo esta última la de mayor capacidad emulsificante. Los resultados sugieren que estas bacterias podrían emplearse en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con residuos oleosos, proporcionando una alternativa biotecnológica sostenible para la descontaminación ambiental (26).

Al-Obeidi et al. (2023) llevaron a cabo un estudio para obtener aceite de célula única (SCO) a partir de *Bacillus subtilis* utilizando residuos ambientales como fuente de carbono. Se aislaron y seleccionaron cepas de suelos locales y desechos orgánicos, evaluando su eficiencia en la producción de SCO. Cuatro aislados destacaron por su rendimiento, siendo el aislado C4 el de mayor producción. Se determinó que los residuos de frondas de palma fueron la mejor fuente de carbono en comparación con paja de trigo y salvado de trigo a diferentes condiciones: pH 7, 30 °C, 3 g/100 mL Carbono, inóculo de 3 mL/100 mL, densidad 20×10^7 células y tiempo de incubación de 72 h. La extracción por Soxhlet reveló altos porcentajes de ácidos grasos insaturados, destacando el ácido linoleico (46,03%) y el ácido palmitoleico (16,57%). Además, se comprobó su solubilidad en cloroformo y etanol, y la prueba de saponificación indicó su viabilidad en la producción de jabón. Estos hallazgos resaltan el potencial de *B. subtilis* para la producción sostenible de aceites microbianos con aplicaciones en la industria alimentaria (27).

Tri et al. (2021), aislaron bacterias para la obtención de celulasas a partir de la cáscara de *Reutealis trisperma* y racimos de los frutos de palma aceitera para evaluar su actividad enzimática. El contenido de celulosa y hemicelulosa en los racimos fue de 48,55% y 28,06% respectivamente. Además, el mayor crecimiento bacteriano se obtuvo a las 32 h en la que se observó una absorbancia de 1,14 a 660 nm (28). Febryanti et al. (2021). La morfología y la identidad de microorganismos potenciales en la degradación de los residuos de racimos de palma aceitera fueron determinados, asimismo se evaluó la actividad enzimática con el método DNS a 530 nm. Además, se estimó el porcentaje de degradación del 13,27 % (25). Fitri et al. (2023), aislaron actinobacterias en Agar Ácido Húmico Vitamina B de muestras del estanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria aceitera de Teupín Lada (Tailandia). Se obtuvieron ocho aislados, siete produjeron celulasas en agar carboxicelulosa rojo de Congo, los diámetros de hidrólisis se midieron en la zona clara, el aislado ATLS-05 mostró 8,38 mm e índice

celulolítico más alto (29). Tope et al. (2019) identificaron microorganismos aislados a partir del raquis de la Palma tales como: B*acillus subtilis, Micrococcus varians, M. leteus, Cellulomonas blazotes, C. flavigina, Sarcina ventriculi, B. cereus, C. fimi, Aspergillus niger, Rhizopus stolonifer, Saccharomyces cerevisiae y Trichoderma viridae.* La actividad celulósica bacteriana mostró un comportamiento a 0,238 y 0,590 µmol/ml, en el caso de los hongos este rango osciló entre 0,452 µmol/ml a 0,775 µmol/ml (27-30). Finlmente, Miller et al. (2021), aislaron siete hongos capaces de degradar la carboximetilcelulosa a azúcares con extremos reductores que reaccionaban con el ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Aspergillus alabamensis* presentó alta capacidad de degradar residuos de palma aceitera (31).

2.2 Aspectos teóricos

2.2.1 Origen de la palma aceitera

Elaeis guineensis conocida como palma aceitera es originaria de África, actualmente está ampliamente distribuida como una especie de plantación exótica a nivel mundial. Estas plantas se extienden en los bosques tropicales húmedos de África. Sin embargo, incluso en su área nativa, las variaciones en el ecosistema tienen un impacto negativo sobre su ecología, lo cual ha sido más evidente por las prácticas de la domesticación. La mayor colección mundial del germoplasma de *Elaeis guineensis* y *E. oleifera* se encuentra ubicada en Malasia. El árbol de la palma aceitera representa un recurso de relevancia económica enfocado a la producción de aceite, empleado en las industrias de alimentos y cosméticos. Varias investigaciones se han enfocado al mejoramiento, rendimiento y resistencia a plagas en la palma aceitera. En este contexto, el Instituto de Investigación del Aceite de Palma de Malasia se ha centrado en la conservación de varios genotipos de la palma aceitera, garantizando el desarrollo de variedades mejoradas. Debido a estas acciones, la industria del aceite de la palma es competitiva en los distintos mercados a nivel mundial, generando grandes divisas para los países productores, así como para Malasia. Adicionalmente, este tipo de políticas han permitido la sostenibilidad del cultivo y la obtención de certificaciones como RSPO (Mesa Redonda sobre el Aceite de Palma Sostenible), la cual está encargada de promover el cultivo responsable y amigable con el ambiente. Por lo tanto, este recurso vegetal forma parte relevante en la economía mundial, que impulsa el desarrollo e innovación en las industrias alimentaria y cosmética (32-34).

2.2.2 Descripción botánica de la palma aceitera

Elaeis guineensis es una especie de palma de tipo monocotiledónea perteneciente al grupo de los cocoides, alcanza una altura de 15 m a lo largo de su desarrollo (100 años o más). Su vida comercial productiva es entre 20 y 30 años, después de los cuales la recolección se vuelve cada vez más difícil y los rendimientos disminuyen lentamente. Siendo esta planta originaria de África Occidental, se ha extendido a otras regiones tropicales del mundo, como el sudeste asiático y América Latina. Su fruto, conocido como racimo de fruta, contiene una gran cantidad de aceite de palma utilizada en la industria alimentaria, cosmética y en biocombustibles. A pesar de su versatilidad, la expansión de los cultivos de palma aceitera ha llevado a la destrucción de ecosistemas naturales y ha generado controversias en torno a su producción sostenible (35).

El árbol tiene numerosas hojas, erectas, extendidas hasta caídas, largas, que alcanzan 3-5 m en árboles adultos; tallos de las hojas cortos con una base ancha. Existen proyecciones fibrosas y espinosas a lo largo de los márgenes de las hojas desde la vaina de la hoja, que se desgastan en las hojas viejas hasta formar espinas dentadas. Las láminas de las hojas tienen numerosos (100 a 160 pares) de folíolos largos con nervaduras centrales prominentes, ahusadas hasta llegar a una punta; dispuestos en grupos o individualmente a lo largo de la nervadura central, surgiendo a veces en diferentes planos. Las hojas son de color verde brillante, proporcionan sombra debajo del árbol. Además, las hojas del árbol son una fuente de alimento para insectos y animales que habitan en el ecosistema. Por su estructura única y atractiva, el árbol se convierte en un punto focal en cualquier paisaje donde se encuentre (36).

Las inflorescencias masculinas y femeninas se encuentran en una sola planta; a veces una inflorescencia contiene flores masculinas y femeninas. Las inflorescencias surgen entre las bases de las hojas en grandes racimos densos, con innumerables flores pequeñas, encerradas en el estado de yema en dos grandes brácteas fibrosas, que finalmente se vuelven caducifolias. Las flores del árbol son blanco lechosas y emiten un aroma dulce y penetrante que atrae a polinizadores como abejas y mariposas. Una vez polinizadas, las flores se convierten en frutos que son consumidos por aves, mamíferos e incluso humanos. De esta manera, el árbol no solo embellece el paisaje, sino que también cumple un papel fundamental en la cadena alimenticia del ecosistema (37).

2.2.3 Especies de palma aceitera

Se han reportado dos especies de *Elaeis*, *E. guineensis*, la palma aceitera de África occidental, que constituye la principal especie comercial, y *E. oleifera*, la palma aceitera de América del Sur, con estatura más baja, aceite más líquido y resistencia a la enfermedad del marchitamiento. La proporción de racimos de aceite es pobre en *E. oleifera*, pero se ha utilizado ampliamente en programas de hibridación con *E. Guineensis*. En cuanto a la palma aceitera de África occidental, *E. guineensis*, su presencia en la región ha sido de gran importancia económica y ambiental. Sus frutos son una fuente clave de aceite de palma, ampliamente utilizado en la industria alimentaria y cosmética. Además, la palma aceitera de América del Sur, *E. oleifera*, ha demostrado ser una alternativa interesante en programas de hibridación para mejorar la resistencia y productividad de las plantaciones. Ambas especies juegan un papel crucial en la cadena alimenticia y en la sostenibilidad de los ecosistemas donde se encuentran (38).

2.2.4 Aceite extraído de la palma aceitera

La palma aceitera proporciona aproximadamente el 16% de los aceites vegetales del mundo y ocupa el segundo lugar en importancia sólo después de la soja. El producto principal es el aceite de palma, obtenido del mesocarpio carnoso del fruto y que contiene proporciones aproximadamente iguales de ácidos palmítico y oleico con cantidades menores de ácidos linoleico y esteárico en sus triglicéridos. El aceite de palmiste, por otro lado, está compuesto predominantemente por ácidos grasos de cadena más corta, principalmente láurico y mirístico, lo que le confiere una composición similar a la del aceite de coco. La industria del aceite de palma ha sido objeto de críticas debido a su impacto ambiental, especialmente en relación con la deforestación y la pérdida de hábitat de especies en peligro de extinción, como el orangután. Sin embargo, también se ha argumentado que la producción sostenible de aceite de palma puede ser beneficiosa para las comunidades locales al proporcionar empleo y oportunidades económicas. Además, el aceite de palma se utiliza en una amplia variedad de productos, desde alimentos y cosméticos hasta biocombustibles, lo que hace que su demanda siga creciendo a nivel mundial (39).

2.2.5 Torta de harina de la palma aceitera

La harina de palma (torta de palma), es un subproducto generado en el procesamiento de extracción del aceite de palma. Es un derivado del tratamiento de las semillas de los frutos de la palma, principalmente palma africana (*E. guineensis*) y americana (*E. oleifera*). Este subproducto está catalogado como un producto valioso en la industria de alimentos, que se emplea para la alimentación animal debido básicamente por su alto contenido nutricional, sin embargo, dicha composición depende en gran medida de distintos factores como las estrategias y métodos de procesamiento, asociado adicionalmente al tipo y calidad de semillas de palma utilizadas. La torta de palma es rica en proteínas, grasas y fibra, lo que la hace ideal para la alimentación de animales de granja como cerdos, aves y bovinos. Además, su alto contenido de energía la convierte en una excelente fuente de alimento para el ganado, ayudando a promover un crecimiento saludable y un aumento en la producción de leche y carne. A medida que la demanda de productos agrícolas sostenibles y respetuosos con el medio ambiente sigue aumentando, la torta de palma se ha convertido en una opción popular para los agricultores que buscan maximizar la eficiencia de sus operaciones (40).

2.2.6 Efluentes de palma aceitera

El agua residual producida durante el procesamiento de la palma aceitera está compuesta de diferentes materiales en suspensión, donde la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO) son muy elevadas. Estos efluentes contienen grandes concentraciones de compuestos orgánicos como: nitrógeno orgánico, fósforo y distintas sustancias suplementarias. Aunque este es un residuo no nocivo; es un problema medioambiental debido a la enorme capacidad de drenar oxígeno al sistema oceánico sustancias naturales y suplementarias. Los productos de desecho generados durante el procesamiento del aceite de palma consisten en troncos de palma de aceite, hojas de palma de aceite, racimos de fruta vacíos, fibras prensadas de palma y cáscaras de palmiste, material menos fibroso como la torta de palmiste. Los desechos se presentan en forma de alta concentración de materia orgánica como desechos celulósicos con una mezcla de carbohidratos y aceites. La gestión inadecuada de estos residuos puede provocar la contaminación del suelo y del agua, afectando negativamente a la biodiversidad local. Es importante implementar prácticas sostenibles para el manejo de los desechos de la industria del aceite de palma, como el compostaje o la producción de biogás a partir de la materia orgánica. Además, es fundamental concienciar a las empresas y a la sociedad en

general sobre la importancia de reducir, reutilizar y reciclar estos residuos para minimizar su impacto ambiental (41).

2.2.7 Celulasas para el aprovechamiento de residuos agroindustriales

Las celulasas degradan celulosa, el biopolímero más abundante en la naturaleza, así como en muchos residuos agroindustriales y forestales, como, por ejemplo, los residuos de la industria de la palma aceitera (14-17). El valor de estas enzimas se debe a su capacidad de sustituir productos químicos con mejores prestaciones ambientales. Se emplean en diversos procesos como en la refinación de aceites, en la extracción y la clarificación de frutas y hortalizas. En el procesamiento del café y en la mejora de la digestibilidad de algas y frijoles. También en la industria de las bebidas como el vino y la cerveza. El valor de estas enzimas se debe a su capacidad de sustituir productos químicos con mejores prestaciones ambientales. Se emplean en diversos procesos como en la refinación de aceites, en la extracción y la clarificación de frutas y hortalizas. En el procesamiento del café y en la mejora de la digestibilidad de algas y frijoles. También en la industria de las bebidas como el vino y la cerveza. Estas enzimas son clave para la transformación de residuos agroindustriales en productos de valor añadido, contribuyendo así a la economía circular y a la sostenibilidad ambiental. Su uso permite reducir la dependencia de productos químicos nocivos y disminuir la generación de residuos contaminantes. Además, su aplicación en diferentes sectores industriales demuestra el potencial de las celulasas para promover la eficiencia y la responsabilidad ambiental en la producción de alimentos y bebidas (42).

2.2.8 Uso de la celulosa como recurso renovable

A diferencia de otros recursos tales como los combustibles fósiles y minerales, la celulosa como producto primario de la fotosíntesis puede ser constantemente renovada a través de la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas y ha servido como la fuente renovable más abundante producido en la biosfera (100 mil millones de toneladas secas / año). Existe una gran cantidad de desechos asociados a la celulosa, debido a su potencial como sustrato que pueden transformarse en diversos productos biotecnológicos de valor agregado. Además, es importante el manejo de estos residuos para disminuir el carbono atmosférico y el impacto ambiental. Por consiguiente, es fundamental desarrollar tecnologías que optimicen el uso de la celulosa y sus subproductos, tanto en el ámbito industrial como agrícola. Una de las maneras más prevalentes de utilizar la celulosa es mediante su

transformación en biocombustibles, como el etanol, que puede servir como una alternativa más sostenible a los combustibles fósiles. Asimismo, la celulosa puede emplearse en la producción de materiales biodegradables, tales como envases y bolsas compostables, esto que contribuye a la disminución de desechos plásticos en el entorno (43,44).

2.2.9 Fuentes de celulasas

Las celulasas son producidas por bacterias, hongos y protozoos, capaces de descomponer la celulosa en pequeños fragmentos. Incluso en los animales, las enzimas capaces de degradar la celulosa provienen de su carga microbiana simbiótica estomacal. Esto demuestra que las celulasas son enzimas clave en el proceso de descomposición de la celulosa en la naturaleza. Gracias a estas fuentes naturales de celulasas, se pueden desarrollar procesos industriales más sostenibles para la producción de biocombustibles y materiales biodegradables. La investigación en torno a las celulasas y su aplicación en diferentes industrias sigue siendo un campo prometedor en la búsqueda de alternativas más amigables con el medio ambiente. Estas fuentes naturales de celulasas son clave para la descomposición de la celulosa en la naturaleza, permitiendo el reciclaje de nutrientes y la generación de energía a partir de biomasa. Los trabajos relacionados a la investigación de células orientados a su producción y aplicación continúan en progreso, donde se busca potenciar y aprovechar el uso de estas enzimas, y así plantear aplicaciones n diferentes áreas industriales, así como también, la protección ambiental (45).

2.2.10 Tipos de celulosa

Las proteínas de naturaleza catalítica presentan una clasificación dependiendo de su actividad, dentro del grupo de enzimas celulósicas catalíticas existen diferentes tipos de celulosas diferenciadas por su estructura química. Por ello, se describen las celulasas según el código universal EC 3.2.1.4, este sistema enzimático consta de tres principales componentes, endoglucanasas, exoglucanasas y celudextrinasas.

Una biomolecula de tipo estructural es la celulosa la cual presenta distintas propiedades físicas y químicas, esta diferencia influye en su capacidad para ser degradada por las enzimas celulósicas. Además, esta estructura puede ser variable, lo cual depende de la fuente del polisacárido, adicionalmente tendrá un efecto sobre la acción de las enzimas celulósicas para su degradación. Por lo tanto, un aspecto importante debe enfocarse a la comprensión estructural y composición de este polímero, todo ello con la finalidad de

optimizar su uso en aplicaciones industriales y ambientales. Un claro ejemplo de estructura distinta es la celulosa cristalina, conocida por su elevada resistencia y cohesión molecular, esta característica la hace más difícil de degradar en comparación con la celulosa amorfa. Por otro lado, la celulosa bacteriana sintetizada por microorganismos presenta propiedades únicas que pueden ser de interés en aplicaciones biomédicas. Por lo tanto, estudiar la estructura de la celulosa es primordial con la finalidad de diseñar enzimas más efectivas y sostenibles que puedan degradar este material de manera más eficiente y respetuosa con el medio ambiente (46).

2.2.11 Caracterización molecular de bacterias

Para realizar la caracterización molecular de bacterias se aplican un conjunto de técnicas y métodos moleculares, los cuales permiten identificar y estudiar bacterias a nivel genético y molecular. Estas estrategias permiten comprender la diversidad, la evolución, y la patogenicidad microbiana. Mediante ensayos de secuenciamiento del ADN bacteriano se logra la caracterización molecular e identificación filogenética los microorganismos de interés. Esta técnica de secuenciamiento proporciona información sobre la organización y el orden de las bases nitrogenadas en el ADN bacteriano, permitiendo identificar la identidad parcial de la bacteria y su relación con otros géneros microbianos. Varios marcadores moleculares son empleados para este fin, dentro de ellos el más empleado es el gen ARNr 16S, que presenta varias regiones hipervariables las cuales se conservan de manera elevada en los distintos géneros bacterianos. Comparar las secuencias de este gen permite clasificar bacterias en diferentes grupos taxonómicos. La filogenia molecular se utiliza para reconstruir la historia evolutiva de las bacterias utilizando datos genómicos. Esto permite trazar la relación entre diferentes especies y cepas (47).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo de investigación

Se llevó a cabo una investigación de método deductivo y diseño de carácter descriptivo, con el fin de obtener información de la caracterización molecular de bacterias productoras de celulasas aisladas de residuos industriales de palma aceitera (E*laeis guineensis*).

3.2 Diseño metodológico

Los ensayos de la investigación fueron desarrollados en los laboratorios de Biología Molecular y el CLEIBA de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y contempla las siguientes etapas:

3.2.1 Recolección de muestras

Se recolectaron por empresa cinco muestras de 100 g o 100 mL de torta de palmiste o efluente respectivamente en frascos estériles, se transportaron en contenedores refrigerados hasta el laboratorio de análisis (48).



Figura1. Mapa de la Región San Martin – Perú

3.2.2 Aislamiento de bacterias

Las muestras fueron pre-enriquecidas con 45 mL de caldo soya tripticasa, adicionalmente se agregaron 5 mL o 5 g de residuos de la palma aceitera (torta), se procedió a incubar a 37 °C durante 72 h. Seguidamente, se sembró mediante estriado sobre medios de cultivo sólidos suplementados con carboximetilcelulosa o celulosa cristalina con la finalidad de obtener bacterias con capacidad de producir celulasas. A partir de ello, se seleccionaron las colonias que mostraban características distintivas en color, forma, tamaño y consistencia. Finalmente, los aislados fueron cultivados por tres pasajes sucesivos para luego proceder a su conservación en medio líquido conteniendo glicerol 20% a -20 °C (30, 49).

3.2.3 Fenotipificación de las bacterias

a. Caracterización morfológica

Las colonias aisladas fueron sometidas a una tinción Gram y se verificó su morfología empleando un microscopio, con la finalidad de identificar Gram (+) o (-) (51).

b. Características fisiológicas

Con la finalidad de incrementar la producción de celulasas por parte de las cepas seleccionadas, se evaluó el crecimiento bacteriano a distintas concentraciones salinas. Los aislados se inocularon en una serie de caldos de cultivo con concentraciones de NaCl desde 0 hasta 20%; Luego se procedió a incubar a 37 °C por 24 h. El crecimiento bacteriano fue determinado midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm empleando un espectrofotómetro (52).

3.2.3 Determinación de actividad celulósica

Las cepas aisladas fueron sembradas en medios de cultivos solidos suplementados con diversos sustratos celulósicos: celulosa 1%, papel filtro, residuos orgánicos previamente tratados, todos ellos fueron incubados a 37 °C por 72 h. Luego se adicionó una solución acuosa de rojo de Congo al 1%, la actividad celulósica se evidenció por la presencia de halos claros alrededor de la colonia (53).

3.2.4 Pruebas bioquímicas

Se realizaron una serie de distintas pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa**,** movilidad, producción de indol, producción de sulfuros, prueba de oxidación-fermentación y acidificación de azúcares (54).

3.2.4.1 Pruebas Nutricionales

a. Hidrólisis del almidón

Se realizó según el método descrito por Cowan & Steel. Los aislados fueron sembrados en agar almidón e incubaron a 37 °C por 24 h; luego se le adicionó una solución acuosa de yodo; la actividad amilolítica se evidenció por la presencia de halos claros alrededor de las colonias (55).

b. Hidrólisis de la caseína

Los aislados fueron sembrados en agar Skim Milk y se incubaron a 37 °C por un lapso de 5 días. La actividad proteolítica sobre caseína se evidenció por la presencia de halos alrededor de las colonias (56).

c. Hidrólisis de la gelatina

Los aislados fueron sembrados en agar gelatina y se incubarán a 37 °C hasta por 5 días. La actividad proteolítica sobre gelatina se evidenció por licuefacción del medio a temperatura ambiente (57).

3.2.4.2 Pruebas moleculares

a. Extracción de ADN genómico mediante hervido

Los aislados se cultivaron en caldo tripticasa de soya durante 18 h, luego se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min y re-suspendieron en 300 µL de agua bidestilada ultrapura. Las células resuspendidas se rompieron a 100 °C durante 10 min, centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min y el sobrenadante se conservó en congelación. La concentración del ADN se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE 1X y un marcador de ADN de concentración conocida (30).

b. Purificación de ADN genómico

El ADN extraído se purificó mediante columnas de intercambio iónico utilizando el Kit (Amresco) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN se verificó a través de una electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE 1X y un marcador de ADN de concentración conocida (30).

c. Amplificación de genes ribosómicos 16S

Aproximadamente 50 ng de ADN genómico se amplificó mediante PCR en un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción estuvo compuesta por: KCl 50 mM, Tris/HCl (pH 9 a 25 °C) 10 mM, triton X-100 0,1% (v/v), $MgCl_2$ 1,5 mM, de cada desoxinucleótico (dATP, dCTP, dGT, dTTP) 200 µM, de cada cebador 25 pmoles y *Taq* ADN polimerasa 1,5 U. Las condiciones de cada ciclo de reacción programadas en un termociclador fueron: desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación a 55 °C durante 1 min y polimerización a 72 °C durante 2 min. En todos los casos se consideraron controles negativos de la reacción de PCR sin añadir ADN molde. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X separados a voltaje constante de 80V. Posteriormente, los ácidos nucleicos se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron sobre luz UV. La cuantificación del ADN obtenido se realizó por espectrofotometría a 260 nm (30).

d. Secuenciación de ADN ribosómico 16S y análisis bioinformático

La secuenciación de los productos de PCR obtenidos se realizó por solicitud de servicios técnicos a la Universidad Peruana Cayetano Heredia utilizando los cebadores 16SFB, 16SRB, 1100R y 359F. Las secuencias nucleotídicas se analizaron mediante los programas bioinformáticos: Bioedit, BLASTn, Clustal X y Mega de libre acceso (30).

3.3 Unidad de análisis

La unidad de análisis fue cada una de las cepas bacterianas aisladas de los residuos de la palma aceitera.

3.4 Población de estudio

Se empleó muestras de efluentes y torta de palmiste de fábricas que elaboran aceite de palma del departamento de San Martín.

3.5 Muestra o tamaño de muestra

Se aplicó el muestreo intencional o por conveniencia aplicado a los residuos de cada una de las fábricas identificadas como fuentes de aislamiento en la región San Martín.

3.6 Técnicas o instrumentos de recolección de la información o datos

Se emplearon cartillas de recolección de datos respecto a la actividad celulósica de cada uno de los aislamientos y las pruebas de caracterización respectivas de naturaleza descriptiva.

3.7 Análisis e interpretación de la información

Se realizó mediante la comparación de las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias productoras de celulasas con los bancos de datos de libre acceso.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Bacterias productoras de celulasas aisladas a partir de residuos industriales de palma aceitera

De las muestras de efluentes de las industrias de palma aceitera de la región San Martín, se aislaron 50 bacterias con características diferentes en cuanto a forma, color, tamaño y consistencia de la colonia. Luego, en la selección de las bacterias con capacidad de degradar la celulosa, éstas se sembraron en agar carboximetilcelulosa 1%. El 36% (18/50) de las bacterias presentaron actividad celulósica. De las 18 bacterias, 12 fueron bacilos Gram positivos y seis Gram negativos. En la Figura 1 se puede apreciar, los halos de hidrólisis de tres de los cuatro aislados, uno de ellos presenta mayor actividad hidrolítica sobre la carboximetilcelulosa.

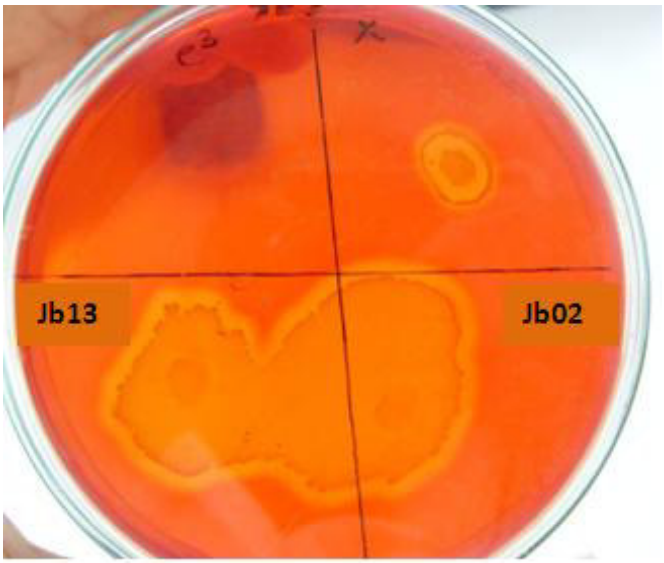


Figura 1. Placa de agar mostrando la hidrólisis de la celulosa coloreado con Rojo de Congo

4.2 Características fenotípicas de las bacterias productoras de celulasas mediante métodos bacteriológicos tradicionales

Las características fisiológicas que presentaron las bacterias degradadoras de celulosas aisladas de efluentes de la industria de palma aceitera fueron diversas, constituyendo fuentes potenciales para transformar los residuos vegetales de esta industria y de otras. Para el caso de la concentración salina, seis bacterias crecieron entre 1 y 15% de sales; 12 soportan entre 4 a 45 °C y 15 son resistentes a pH entre 5 a 10 (Figuras 2-4). Las bacterias con capacidad celulósica crecieron en diferentes rangos de temperatura, pH y concentración de NaCl (Tabla 1, Figura 2).

El 44% (8/18) de las bacterias utilizó como sustrato la gelatina, el mismo porcentaje hidrolizó la tributirina. El 39% (7/18) y el 50% (9/18) degradaron almidón y ADN respectivamente. Según la hidrólisis de almidón, ADN, gelatina, tween 80 y tributirina, las 18 bacterias se agrupan en 10 perfiles de hidrólisis. En cuanto a las pruebas nutricionales, el 100% de las bacterias utilizó glucosa como fuente de carbono y sólo el 17% (3/18) la lactosa (Tabla 1, Figura 5).

Tabla 1. Características fenotípicas de las bacterias celulósicas aisladas de residuos industriales de palma aceitera - San Martin.

Cepa/ Características	TJB02	TJB07	TJB09	TJB13	TJC91	TJC96	TJE12	TJE14	TJF31	TJF32	TJF36	TJF41	TJF42	TJF46	TJF51	TJF52	TJF54	TJP60
Tinción Gram	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Morfología	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	Bacilo[a]	bacilo	bacilo	Bacilo[a]	bacilo	Bacilo[a]	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	Bacilo[a]	Bacilo[a]
Rango NaCl	1 a 15	1 a 15	1 a 15	1 a 10	1 a 15	1 a 2.5	1 a 2.5	1 a 20	1 a 5	1 a 5	1 a 15	1 a 10	1 a 10	1 a 15	1 a 5	1 a 10	1 a 5	1 a 15
Rango de T (°C)	4 a 45	25 a 45	25 a 37	4 a 45	4 a 45	25 a 40	4 a 45	4 a 45	4 a 45	4 a 45	4 a 40	4 a 45	4 a 45	4 a 45	4 a 45	25 a 37	4 a 45	4 a 45
Rango de pH	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	7 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	7 a 8	5 a 10	7 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10
Catalasa	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Motilidad	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H_2S	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato Simmons	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Descarb. Lisina	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gelatina [b]	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Almidón [b]	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
ADN [b]	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Tween 80 [b]	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tributirina [b]	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Glucosa [c]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa [c]	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa [c]	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	ND	-	+	+	+	ND	+	+
Lactosa [c]	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Sucrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+

a, pleomórfico; b, hidrólisis de sustratos; c, fermentación de carbohidratos

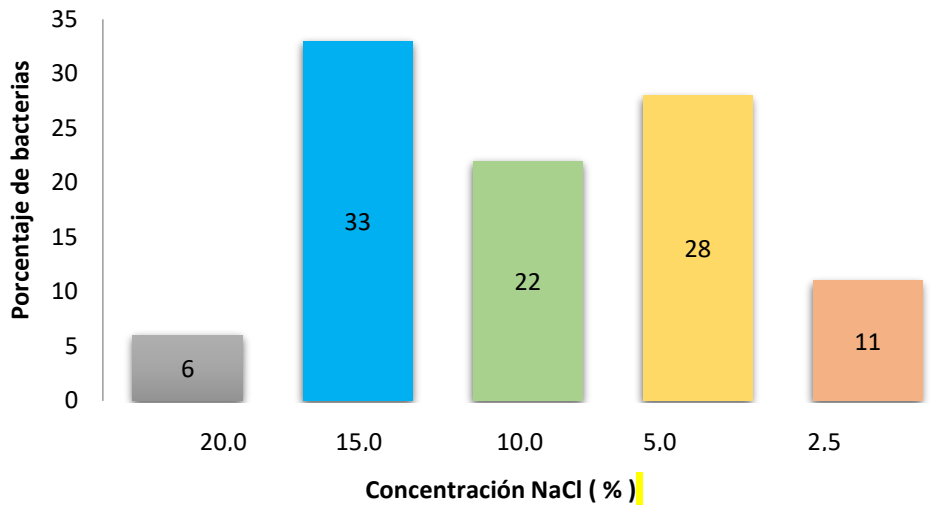


Figura 2. Porcentaje de bacterias celulósicas con crecimiento a diferentes rangos de cloruro de sodio.

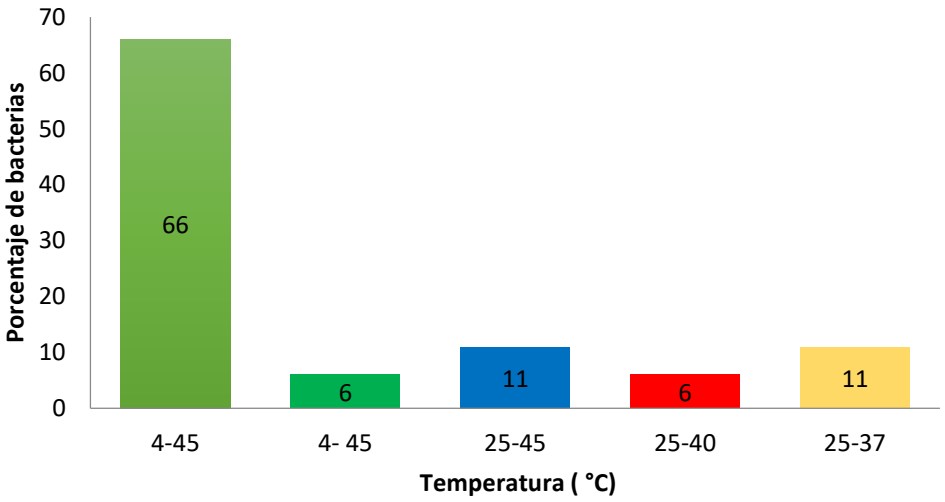


Figura 3. Porcentaje de bacterias celulósicas crecidas a diferentes rangos de temperatura.

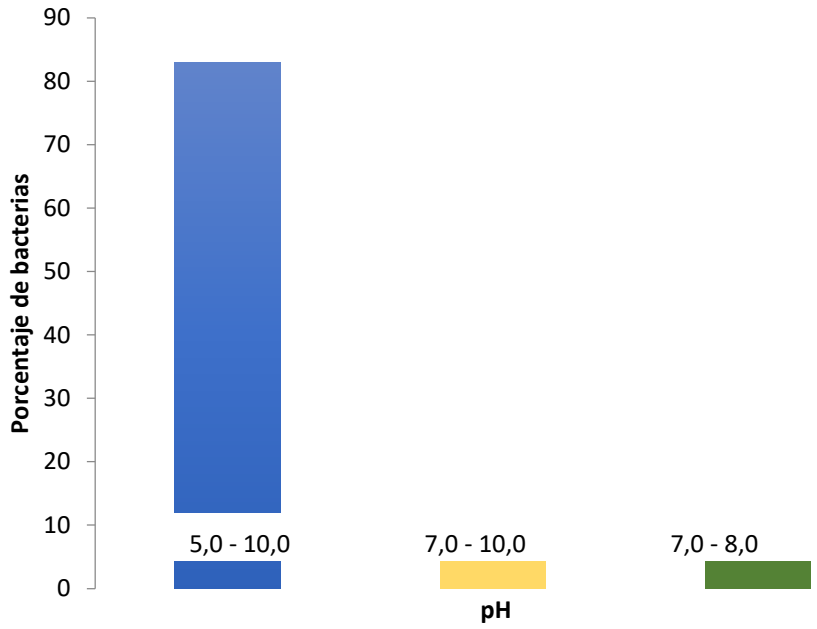


Figura 4. Porcentaje de bacterias celulósicas crecidas a diferentes rangos de pH

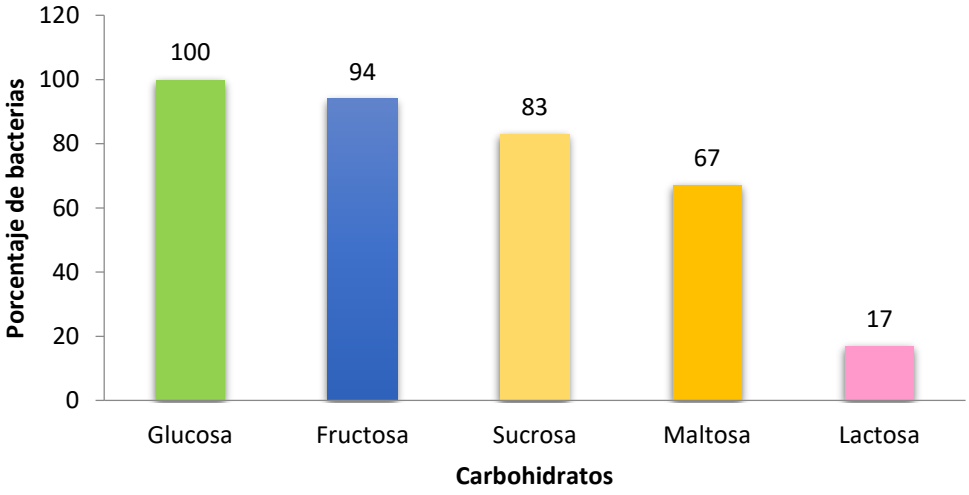


Figura 5. Porcentaje de bacterias celulósicas que utilizan carbohidratos

El 89% (16/18) de las bacterias mostraron reacción positiva a la prueba de oxidasa, asimismo, el 44% (8/18) fueron negativas a la prueba de catalasa. Los aislados TJE14 Y TJP60 fueron los únicos que presentaron movilidad en el medio de cultivo SIM. En la prueba de oxidación y fermentación de glucosa el 28 % (5/18) de las bacterias oxida y fermenta la glucosa. Los aislados TJB09 Y TJE14 produjeron H_2S y gas, mientras que el aislado TJE36 solo produce H_2S (Tabla 1).

Con respecto a la sensibilidad antimicrobiana, el 83% (15/18) y el 44% (8/18) son sensibles a carbenicilina y penicilina respectivamente. Los aislados TJF31, TJF46, TJF52, TJB02, TJB09 y el TJB13 son sensibles a los ocho antimicrobianos analizados (Tabla 2). Sobre la base de los perfiles de sensibilidad, las bacterias con actividad celulósica se agrupan en 10 fenotipos (Tabla 3). El fenotipo I es el más frecuente, agrupa a las bacterias sensibles a ocho antimicrobianos, los fenotipos del III al IX están representados por un solo aislado. Por el contrario, el fenotipo X corresponde a un aislado que es resistente a los ocho antimicrobianos estudiados.

Tabla 2. Sensibilidad antimicrobiana de las bacterias celulósicas aisladas de residuos industriales de palma aceitera

Antimicrobianos	TJE14	TJE42	TJF54	TJF41	TJF51	TJE12	TJC91	TJF31	TJF32	TJP60	TJC96	TJF52	TJF36	TJF46	JB07	JB09	JB02	JB13
Ampicilina (25 µg)	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	ND	S	R	S	S	S
Bacitracina (10 µg)	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	ND	S	R	S	S	S
Carbenicilina (100 µg)	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	ND	S	S	S	S	S
Penicilina (5 µg)	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	ND	R	R	S	S	S
Novobiocina (30 µg)	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	ND	S	S	S	S	S
Cloranfenicol (30 µg)	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	ND	S	S	S	S	S
Estreptomicina (25 µg)	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	ND	S	S	S	S	S
Tetraciclina (30 µg)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	ND	S	R	S	S	S

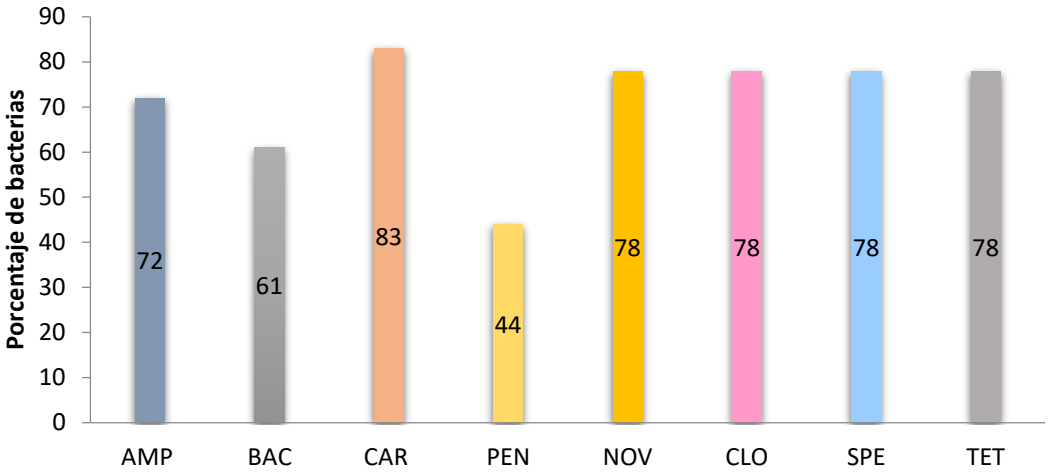


Figura 6. Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana de bacterias celulósicas. Ampicilina (AMP), Bacitracina (BAC), Carbenicilina (CAR), Penicilina (PEN), Novobiocina (NOV), Cloranfenicol (CLO), Estreptomicina (SPE) y Tetraciclina (TET).

Tabla 3. Fenotipos de sensibilidad de las bacterias celulósicas

Fenotipo	Aislados	N°	Sensibilidad antimicrobiana
I	TJF31, TJF52, JB09, JB02, JB13	5	AMP, BAC, CAR, PEN, NOV, CLO, SPE, TET
II	TJE42, TJF51, TJE12, TJF46	4	AMP, BAC, CAR, NOV, CLO, SPE, TET
III	TJF32	1	AMP, CAR, PEN, NOV, CLO, SPE, TET
IV	TJE14	1	AMP, BAC, CAR, PEN, NOV, SPE,
V	TJF41	1	AMP, CAR, PEN, NOV, CLO, TET
VI	TJP60	1	AMP, BAC, CAR, CLO, SPE, TET
VII	JB07	1	CAR, NOV, CLO, SPE,
VIII	TJF54	1	NOV, CLO, TET
IX	TJC91	1	CAR, SPE, TET
X	TJC96	1	Ninguno

4.3 Caracterización genotípica de las bacterias productoras de celulasas mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosómicos 16S

Los genes ribosómicos 16S fueron amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa, a partir del ADN genómico obtenido de cultivos bacterianos de 18 h. Sin embargo, cada una de las bacterias mostraron características fenotípicas particulares lo cual influyó en la extracción del ADN, por ejemplo, las bacterias Gram negativas se lisan fácilmente, sin embargo, las Gram positivas son difíciles por el gran contenido de peptidoglicano en su pared celular. Además, en ambos grupos de bacterias se observó la capacidad de producir exopolisácaridos que tienen la función de proteger a las bacterias frente a la lisis inducida. Estas características de las bacterias aisladas exigieron utilizar diversas estrategias para la obtención de ADN genómico, en algunos casos se emplearon columnas de purificación mediante intercambio iónico.

Asimismo, los genes ribosómicos 16S amplificados fueron cortados con la enzima *Hae* III y separados por electroforesis en geles mostraron nueve perfiles diferentes. En la Figura 7 se observan siete bacterias agrupadas en cuatro perfiles (genotipos), los cuales están señalados en números romanos. Por tanto, las bacterias celulósicas se agruparon en nueve perfiles (genotipos). Del análisis parcial de secuencias se logró deducir cinco géneros distintos que pertenecen a *Bacillus, Klebsiella, Enterobacter, Providencia y Acinetobacter,* a pesar de ello, se requiere estudiar otros marcadores moleculares y fenotípicos para definir con mayor precisión las especies asociadas al género *Bacillus* agrupado con 12 cepas.

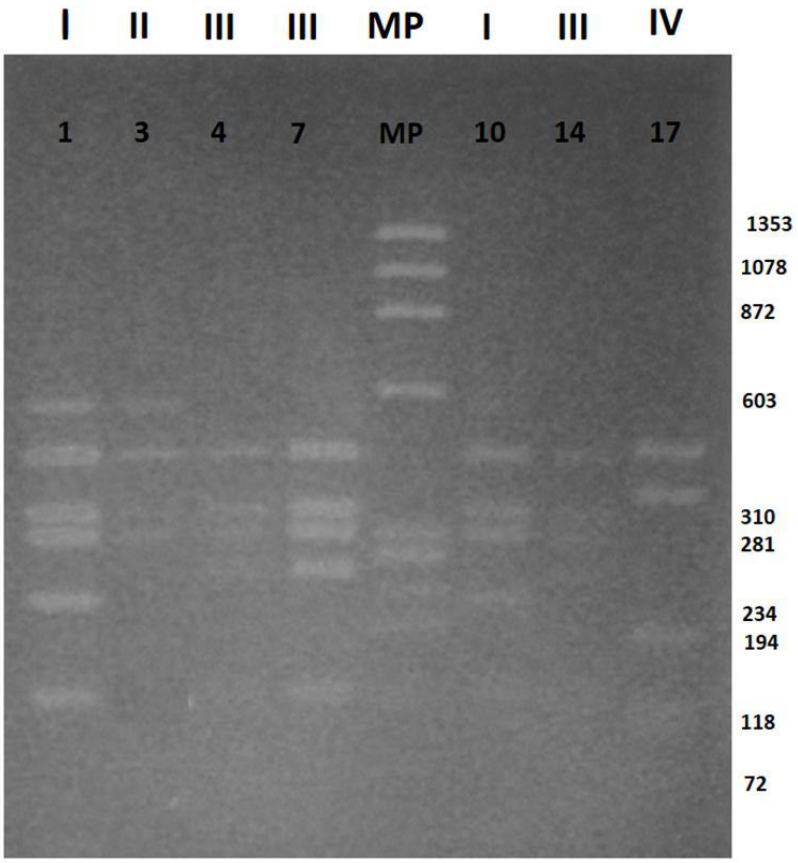


Figura 7. Gel de agarosa conteniendo los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados y cortados con *Hae* III de bacterias celulósicas. MP, marcador de peso; números romanos indican los genotipos y los arábigos el número de cepas.

4.4 Actividad celulósica de las bacterias seleccionadas

Se presenta la medida de los halos de inhibición de los aislamientos en medio enriquecido con carboximetilcelulosa. Los halos varían entre 1,85 cm y 5,49 cm (Tabla 4).

Tabla 4. Halos de degradación de celulosa *in vitro* de las cepas bacterianas aisladas de residuos de palma aceitera

Características	Halo (cm)
TJB07	1,85
TJF41	1,98
TJF54	2,41
TJE14	2,43
TJC91	3,24
TJF46	3,58
TJF36	3,64
TJF31	3,75
TJF52	3,93
TJP60	4,15
TJB13	4,20
TJF32	4,26
TJC96	4,29
TJF42	4.33
TJB09	5,04
TJB02	5,21
TJE12	5,36
TJF51	5,49

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

La observación de que el 36% de las bacterias aisladas a partir de residuos industriales de palma aceitera presentaron actividad celulósica es un hallazgo significativo que resalta la presencia de microorganismos capaces de degradar la celulosa en este entorno específico. Adicionalmente, la presencia de bacterias celulósicas reveló una proporción de 12 bacilos Gram positivos y 6 bacilos Gram negativos (Figura 1, Tabla 1). Esta abundancia de proporción considerable de bacterias con actividad celulósica es relevante en el contexto de la valorización de residuos de palma aceitera. Estas bacterias pueden desempeñar un papel crucial en la descomposición de la celulosa, convirtiendo en oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos, compuestos utilizados como insumos en la producción de biomasa, metabolitos primarios y secundarios (58).

La mayoría de las bacterias celulósicas aisladas de los residuos de palma, mostraron pertenecer al grupo de los bacilos Gram positivos. En este aspecto, el género *Bacillus* agrupa a diversas especies y cepas productoras de diferentes enzimas incluyendo las celulasas. Aunque la proporción de bacilos Gram positivos es mayor, la presencia de bacilos Gram negativos también sugiere una diversidad microbiana en la comunidad celulósica. Esta diversidad puede ser beneficiosa para el tratamiento de distintos sustratos celulósicos en condiciones ambientales variables (59).

Las características fenotípicas de los aislados fueron determinadas mediante métodos bacteriológicos tradicionales, mostrando y revelando valiosa información sobre su adaptabilidad a condiciones ambientales específicas. Así, los aspectos son: temperatura, pH y concentración de NaCl (Figuras 2-4). La habilidad de tolerar el crecimiento en un rango de concentración salina del 1 al 15% indica una notable tolerancia a la salinidad de seis asilados con capacidad celulósica. Esta característica es importante, especialmente si se considera que los residuos provenientes de la palma aceitera contienen distintos niveles de sales, y que en la mayoría de los procesos industriales se requieren condiciones extremas (60).

Con relación al crecimiento de los aislados en un amplio rango de temperatura entre 4 a 45 °C, infiere una gran versatilidad metabólica. Estudios previos resaltan la habilidad de

las bacterias con características celulósicas de adaptarse a condiciones térmicas variables (57). Así también, la capacidad de adaptación a bajas temperaturas puede ser aprovechada para el trabajo en condiciones frías donde las enzimas presentan una estabilidad, por el contrario, aquellas bacterias con capacidad de tolerar temperaturas elevadas pueden ser utilizadas en ambientes calurosos. Por otro lado, la tolerancia a distintos rangos de pH (5 - 10) de quince aislados es otra característica importante en procesos industriales que requieren condiciones variables. Esta característica suele ser importante en procesos agroindustriales (61) a la vez, muestra gran potencial prospectivo para su uso en residuos agrícolas.

El 89% de las cepas aisladas mostraron una reacción positiva a la prueba de oxidasa, siendo este un indicador relevante dentro de las características metabólicas en estos microorganismos (Tabla 1). Esta prueba es empleada para la detección de enzimas como el citocromo C oxidasa, la cual participa en la cadena respiratoria bacteriana. Un resultado positivo indica que las cepas aisladas poseen la capacidad de oxidar diferentes sustratos empleando esta enzima. Cabe resaltar que este rasgo metabólico estuvo presente en la mayoría de las bacterias evaluadas. Sin embargo, aunque la prueba de oxidasa proporciona información valiosa, se debe considerar que es una prueba inespecífica y puede no ser representativa de todas las capacidades metabólicas de las bacterias bajo estudio (62). Evidencia adicional es requerida para validar estos resultados, por ejemplo, estudios de genómica y transcriptómica podrían proporcionar información global y conjunta de la diversidad funcional en estas cepas celulósicas.

De los aislados obtenidos el 44% fueron negativas a la prueba de catalasa, siendo un dato relevante que proporciona información sobre las características metabólicas específicas de este conjunto de bacterias (Tabla 1). La prueba de catalasa se emplea con la finalidad de detectar la presencia de la enzima catalasa, la cual tiene la función de transformar y convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Un resultado negativo indica que la bacteria carece de esta enzima, que normalmente está involucrada en la protección contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Este resultado sugiere ciertas características metabólicas en las bacterias evaluadas. En aplicaciones industriales, la información sobre la presencia o ausencia de la enzima catalasa puede ser crucial (63). Por ejemplo, si se buscan bacterias para procesos donde la presencia de oxígeno es limitada o no deseada, la negatividad en la prueba de catalasa podría ser un criterio de selección importante.

Las cepas TJB09, TJE14 y TJE36 mostraron la capacidad de producción de H_2S (gas de sulfuro de hidrógeno) (Tabla 1). La producción de H_2S es un rasgo bioquímico específico que se asocia comúnmente con ciertos grupos bacterianos, especialmente aquellas capaces de realizar la reducción del sulfato. Este proceso metabólico implica la conversión de sulfato a sulfuro de hidrógeno (H_2S) y puede desempeñar un papel en el ciclo del azufre. La capacidad de producir H_2S es un criterio utilizado en la identificación bacteriana y puede contribuir a clasificar las bacterias en grupos taxonómicos específicos (64). La producción de H_2S es particularmente notable en bacterias como algunas Enterobacterias.

La fermentación de lactosa fue mostrada por un grupo reducido de cepas aisladas (17%) (Tabla 1, Figura 5), esta característica ha sido encontrada en diversos grupos bacterianos con la misma propiedad asilados de distintas matrices biológicas (65). Mientras que la celulosa es una fuente de carbono compleja, la fermentación de la lactosa indica que al menos un subconjunto de estas bacterias tiene la capacidad de utilizar azúcares más simples. La fermentación de la lactosa es un proceso metabólico que involucra la descomposición de azúcares para producir productos finales como ácidos orgánicos y gases. Esta capacidad sugiere que estas bacterias pueden utilizar una variedad de sustratos carbonados, lo que puede ser relevante en entornos donde hay diversidad de fuentes de carbono disponibles.

La sensibilidad antimicrobiana de las cepas celulósicas a carbenicilina (83%) y penicilina (44%), sugieren varios beneficios los cuales pueden ser aprovechados y aplicados en diversas industrias y procesos (Tabla 3). La mayor sensibilidad a carbenicilina y penicilina en estas bacterias celulósicas podrían ser potencialmente utilizadas en procesos industriales donde se requiere controlar la proliferación bacteriana (66). Esta habilidad puede ser aprovechada en procesos de la industria alimentaria o la biotecnología. Al seleccionar bacterias con mayor sensibilidad a ciertos antimicrobianos, se pueden minimizar los riesgos de contaminación bacteriana no deseada durante la producción de bioproductos, como enzimas celulósicas para la industria alimentaria, contribuyendo a la calidad y pureza del producto final.

La caracterización genotípica de las bacterias productoras de celulasas a través de la amplificación y secuenciación de los genes ribosómicos 16S proporciona una valiosa información sobre la diversidad genética y la identificación taxonómica de estos

microorganismos. La presencia de los géneros *Bacillus, Klebsiella, Enterobacter, Providencia y Acinetobacter* revela información de las comunidades bacterianas asociadas con la actividad celulósica (Figura 7). La identificación nueve perfiles genéticos mediante amplificación y corte de los genes ribosómicos 16S sugiere que al menos existen nueve especies entre las bacterias celulósicas aisladas de residuos de palma aceitera. Esta diversidad puede ser ventajosa en términos de adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y su potencial para descomponer una variedad de sustratos celulósicos (67).

Cada uno de los géneros identificados tiene características metabólicas únicas. *Bacillus*, por ejemplo, es conocido por su capacidad para producir diversas enzimas, incluidas las celulasas. *Klebsiella y Enterobacter* también han sido asociados con la actividad celulósica. La presencia de múltiples géneros sugiere un potencial variado para desempeñar roles específicos en la descomposición de la celulosa. Respecto a la actividad celulósica de las bacterias seleccionadas (Tabla 4), los halos son mayores a los reportados en la literatura como en el caso de Fitri et al. (2023) que reporta 8,38 mm para el caso de actinobacterias no específicas (49, 68).

De las 18 cepas con actividad celulósica, indicando su capacidad para degradar celulosa en oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos, insumos para la producción de diversos compuestos. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que sugiere un potencial biotecnológico significativo de estas bacterias para aplicaciones en residuos de la industria alimentaria, producción de biocombustibles y optimización de procesos agroindustriales mediante la valorización de desechos lignocelulósicos. Además, la identificación de estas bacterias con actividad celulósica abre la posibilidad de futuras investigaciones enfocadas en la caracterización enzimática y genética de estos microorganismos, con el objetivo de optimizar su aplicación en sistemas industriales y ambientales.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES

1. De los residuos de palma aceitera se aislaron 50 bacterias, 18 presentaron actividad celulósica.

2. Las bacterias con actividad celulósica fueron bacilos, 12 Gram positivos y seis Gram negativos con crecimiento en diferentes rangos de temperatura, pH y concentración de NaCl. Las bacterias se agruparon en 10 perfiles de hidrólisis, el 100% utilizó glucosa como fuente carbono y el 17% también utilizó la lactosa, lo cual demuestra su gran potencial biotecnológico para procesar residuos de palma aceitera.

3. Las 18 cepas analizadas mediante amplificación de los genes ribosómicos 16S y corte con la enzima *Hae* III presentaron nueve perfiles genéticos. Asimismo, de la secuenciación parcial de este gen se obtuvieron los géneros *Bacillus (12), Klebsiella (2), Enterobacter (2), Providencia (1)* y *Acinetobacter (1)*

4. Las bacterias presentaron actividad celulósica con halos de hidrólisis desde 1,85 hasta 5,49 cm.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devi D, Ratnasari IFD, Astutik D, Widodo H, Ismoyojati R, Sajjad N. Physical, Chemical, and Biological Pretreatment of Lignocellulose in Oil Palm Empty Fruit Bunches (OPEFB). Journal of Agri-Food Science and Technology. 30 de noviembre de 2024;5(2):134-43.
2. Hambali E, Rivai M. The Potential of Palm Oil Waste Biomass in Indonesia in 2020 and 2030. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci. 2017 May;65(1):012050.
3. Oktaviani M, Kamaluddin NN, Simarmata T. A Enhancing the Composting Process and Quality of Oil Palm Empty Fruit Bunches (EFB) Using Indigenous Cellulolytic Microbes: A Review. International Journal of Life Science and Agriculture Research. 11 de abril de 2024;3(4):274-83.
4. Murphy DJ, Goggin K, Paterson RRM. Oil palm in the 2020s and beyond: challenges and solutions. CABI Agriculture and Bioscience. 11 de octubre de 2021;2(1):39.
5. Alhaji AM, Almeida ES, Carneiro CR, da Silva CAS, Monteiro S, Coimbra JS dos R. Palm Oil (Elaeis guineensis): A Journey through Sustainability, Processing, and Utilization. Foods. enero de 2024;13(17):2814.
6. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Informe de Producción Nacional. Lima: INEI; 2024 Jul. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/informe-de-producion.pdf
7. BBVA Research. Sembrando el futuro: sector agropecuario. Informe Palma de Aceite. Madrid: BBVA Research; 2024 Oct. Disponible en: https://www.bbvaresearch.com/wp-content/uploads/2024/11/Sembrando-el-futuro-Informe-palma-de-aceite.pdf?utm_source
8. Gobierno del Perú. Resolución Directoral Nº 00663-2024-PRODUCE/DGAAMI. Lima: Ministerio de la Producción; 2024. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/6793284/5883252-rd-663-2024-produce-dgaami.pdf?utm_source
9. AgroPerú. La exportación de palma peruana en 2024 no logró superar los despachos del 2023. AgroPerú Informa. 2025 Jan 14. Disponible en: https://www.agroperu.pe/la-exportacion-de-palma-peruana-en-2024-no-logro-superar-los-despachos-del-2023/?utm_source

10. Wondi MH, Haris NIN, Shamsudin R, Yunus R, Mohd Ali M, Iswardi AH. Development and testing of an oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) fruit digester process for kernel free in crude palm oil production. Industrial Crops and Products. 1 de febrero de 2024;208:117755.
11. Darkwah DO, Ong-Abdullah M, Darkwah DO, Ong-Abdullah M. Sustainability of the Oil Palm Industry. En: Elaeis guineensis [Internet]. IntechOpen; 2021 [citado 7 de marzo de 2025]. Disponible en: https://www.intechopen.com/chapters/78807
12. Awoh ET, Kiplagat J, Kimutai SK, Mecha AC. Current trends in palm oil waste management: A comparative review of Cameroon and Malaysia. Heliyon. 1 de noviembre de 2023;9(11):e21410.
13. Sibhatu KT. Oil palm boom: its socioeconomic use and abuse. Front Sustain Food Syst [Internet]. 23 de junio de 2023 [citado 7 de marzo de 2025];7. Disponible en: https://www.frontiersin.org/journals/sustainable-food-systems/articles/10.3389/fsufs.2023.1083022/full
14. Pulingam T, Lakshmanan M, Chuah JA, Surendran A, Zainab-L I, Foroozandeh P, et al. Oil palm trunk waste: Environmental impacts and management strategies. Industrial Crops and Products. 1 de diciembre de 2022;189:115827.
15. Zahara M, Larassati D, Rahmawati L, Harahap D, Hayatillah R, Kamaliah K. The effect of palm oil (Elaeis guineensis Jacq) solid waste on the stomatal density and chlorophyll content of the pepper (Piper nigrum L.). IOP Conf Ser: Earth Environ Sci. febrero de 2024;1297(1):012013.
16. Rapi N, Jane C, Azni ME, Hitam SMS, Mohamad R, Noorain R. Biological treatment of palm oil mill effluent by using a downflow hanging sponge reactor. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci. noviembre de 2021;922(1):012049.
17. Che Hussian CHA, Seman-Kamarulzaman AF, Othman NW, Nor Muhammad NA, Jalinas J, Zainal Abidin CMR, et al. Global research trends in oil palm pests and their potential threat: a bibliometric analysis. International Journal of Pest Management. 0(0):1-22.
18. Che Hussian CHA, Seman-Kamarulzaman AF, Othman NW, Nor Muhammad NA, Jalinas J, Zainal Abidin CMR, et al. Global research trends in oil palm pests and their potential threat: a bibliometric analysis. International Journal of Pest Management. 0(0):1-22.

19. K. Bikash, A. Komal, V. Pradeep, Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review, (2021). https://link.springer.com/article/10.1186/S40643-021-00447-6.
20. Lee JA, Cheah ESG, Sethupathi S, Mohd Ismail NI. Isolation and characterization of effective microorganisms from palm oil sludge for enhancement of spent bio-adsorbents from aquaculture wastewater treatment. Materials Today: Proceedings [Internet]. 13 de mayo de 2023 [citado 7 de marzo de 2025]; Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785323024689
21. Popoola BM, Famakinwa PB, Adeyemi OA. Isolation of Microorganisms Associated with Palm Oil Contaminated Soil. Journal of Environmental Pollution and Control. 5(2):1. 2022.
22. Dermiyati D, Suharjo R, Telaumbanua M, Yosita R, Sari AW, Andayani AP. Abundance and characterization of microorganisms isolated from oil palm empty fruit bunches waste under aerobic, anaerobic, and facultative anaerobic conditions. Biodiversitas Journal of Biological Diversity [Internet]. 24 de agosto de 2020 [citado 7 de marzo de 2025];21(9). Disponible en: https://smujo.id/biodiv/article/view/6434
23. Félicité DN, Daïna NT, Roméo FT, Joël TS, Fatima N, Joël NN, et al. Isolation of Bacteria with Purifying Potential and Application in the Treatment of Effluents from an Artisanal Palm Oil Mill in the Littoral Region of Cameroon. Journal of Environmental Protection. 5 de julio de 2021;12(7):462-71.
24. Luthfi AAI, Abdul PM, Jahim JM, Engliman NS, Jamali NS, Tan JP, et al. Isolation and Characterization of Biohydrogen-Producing Bacteria for Biohydrogen Fermentation Using Oil Palm Biomass-Based Carbon Source. Applied Sciences. enero de 2023;13(1):656.
25. Kusumawati N, Sumarlan SH, Zubaidah E, Wardani AK. Isolation of xylose-utilizing yeasts from oil palm waste for xylitol and ethanol production. Bioresour Bioprocess. 13 de octubre de 2023;10(1):71.
26. Andini DA, Rasyidah R, Mayasari U. Isolation and Identification of Biosurfactantproducing Bacteria from the Aerobic Pond of Oil Palm Liquid Waste at PT. Aek Loba Plantation. Jurnal Biologi Tropis. 21 de octubre de 2024;24(4):413-23.
27. Al-Obeidi WDM, Al-Rawi DF, Ali LH. Production of Single-Cell Oil from a Local Isolate Bacillus subtilis Using Palm Fronds. International Journal of Biomaterials. 2023;2023(1):8882842.

28. Tri Yuliana, Mardawati, E., Febrianti, E. A., Hartono, A. T., & Rahimah, S. (s/f). Screening and enzyme activity of cellulase-producing bacteria isolated from kemiri Sunan (Reutealis trisperma (Blanco) airy Shaw) and emppty fruit bunches of the palm oil (. Semanticscholar.org. Recuperado el 11 de septiembre de 2023, de https://pdfs.semanticscholar.org/3508/15462647d7bfe38c588bca2d557b0082f51d.pdf
29. Febryanti A, Baharuddin M, Rahayu I. Isolation of cellulose-degrading bacteria from luwu Timur in oil palm empty fruits bunch. Walisongo J Chem [Internet]. 2021 [citado el 11 de septiembre de 2023];4(2):139–46. Disponible en: https://journal.walisongo.ac.id/index.php/wjc/article/view/9173
30. Fitri, Lenni, Yurnita Yurnita, and Suhartono Suhartono. "Isolation and Celulolytic Activity Assay of Actinobacteria Isolated from Palm Oil Wastewater." Trends in Sciences 20.6 (2023): 6715-6715. [citado el 11 de septiembre de 2023];4(2):139–46. Disponible en: https://tis.wu.ac.th/index.php/tis/article/view/6715
31. Tope, AK, Oluyemi BM, Soji F, Saanu AB, Anangwureyi JT, & Temidire OS. "Isolation and screening of microbial isolates from decomposing palm kernel shaft for cellulase production." Environmental Microbiology 5.5 (2019): 100-105. [citado el 11 de septiembre de 2023];4(2):139–46. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Bartholomew-Adeleke/publication/342892972_Isolation_and_Screening_of_Microbial_Isolates_from_Decomposing_Palm_Kernel_Shaft_for_Cellulase_Production/links/5f168b6ca6fdcc3ed71b37fd/Isolation-and-Screening-of-Microbial-Isolates-from-Decomposing-Palm-Kernel-Shaft-for-Cellulase-Production.pdf
32. Miller T, Waturangi DE, Purwadaria T. Screening and characterization of cellulolytic molds from empty fruit bunches and soils in palm oil plantation area in Indonesia. BMC Res Notes 2021;14. https://doi.org/10.1186/s13104-021-05668-8.
33. Bhagat SA, Kokitkar SS. Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production. J Appl Biol Biotechnol [Internet]. 2021 [citado el 11 de septiembre de 2023];9(6):154–61. https://doi.org/10.7324/jabb.2021.96020
34. Henson IE. 1 - A Brief History of the Oil Palm. En: Lai OM, Tan CP, Akoh CC, editores. Palm Oil [Internet]. AOCS Press; 2012 [citado 7 de marzo de 2025]. p. 1-29. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780981893693500046

35. Mohd Nain FN, Ahamed Hassain Malim NH, Abdullah R, Abdul Rahim MF, Ahmad Mokhtar MA, Mohamad Fauzi NS. A Review of an Artificial Intelligence Framework for Identifying the Most Effective Palm Oil Prediction. Algorithms. junio de 2022;15(6):218.
36. Md. Tahir P, Liew WPP, Lee SY, Ang AF, Lee SH, Mohamed R, et al. Diversity and characterization of lignocellulolytic fungi isolated from oil palm empty fruit bunch, and identification of influencing factors of natural composting process. Waste Management. 2019 Dec 1;100:128–37.
37. Murphy DJ. The future of oil palm as a major global crop: opportunities and challenges. Journal of Oil Palm Research. 2014;
38. Adam H, Collin M, Richaud F, Beulé T, Cros D, Omoré A, et al. Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. Annals of Botany. 1 de diciembre de 2011;108(8):1529-37.
39. Wei L, John Martin JJ, Zhang H, Zhang R, Cao H. Problems and Prospects of Improving Abiotic Stress Tolerance and Pathogen Resistance of Oil Palm. Plants. diciembre de 2021;10(12):2622.
40. Roy S. Silicon: A Tool in Host Plant Resistance Against Insects. 11 de octubre de 2020;2:415.
41. Adam H, Jouannic S, Morcillo F, Verdeil JL, Duval Y, Tregear JW. Determination of Flower Structure in Elaeis guineensis: Do Palms use the Same Homeotic Genes as Other Species? Annals of Botany. 1 de julio de 2007;100(1):1-12.
42. Murugesan P, Aswathy G, Kumar K, Poomaruthai M, Kumar V, Ravi V. Oil palm (Elaeis guineensis) genetic resources for abiotic stress tolerance: A review. Indian Journal of Agricultural Sciences. 1 de abril de 2017;171:12-7.
43. Matei JC, Oliveira JADS, Pamphile JA, Polonio JC. Agro-industrial wastes for biotechnological production as potential substrates to obtain fungal enzymes. CeN. 30 de junio de 2021;43:e72.
44. Eichhorn SJ, Gandini A. Materials from Renewable Resources. MRS Bulletin. 1 de marzo de 2010;35(3):187-93.
45. Zihare L, Blumberga D. Market Opportunities for Cellulose Products From Combined Renewable Resources. Environmental and Climate Technologies. 13 de julio de 2017;19(1):33-8.
46. Zhang XZ, Zhang YHP. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In: Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable

Production of Fuels, Chemicals, and Polymers [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; [cited 2025 Mar 8]. p. 131–46. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118642047.ch8

47. Sperotto G, Stasiak LG, Godoi JPMG, Gabiatti NC, De Souza SS. A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. Cellulose. 2021 Mar 1;28(5):2649–73.
48. Theron J, Cloete TE. Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. Critical Reviews in Microbiology. 1 de enero de 2000;26(1):37-57.
49. Singh RP, Ibrahim MH, Esa N, Iliyana MS. Composting of waste from palm oil mill: a sustainable waste management practice. Rev Environ Sci Biotechnol. 1 de diciembre de 2010;9(4):331-44.
50. Fitri, Lenni, Yurnita Yurnita, and Suhartono Suhartono. "Isolation and Celulolytic Activity Assay of Actinobacteria Isolated from Palm Oil Wastewater." Trends in Sciences 20.6 (2023): 6715-6715. [citado el 11 de septiembre de 2023];4(2):139–46. Disponible en: https://tis.wu.ac.th/index.php/tis/article/view/6715
51. Yang W, Meng F, Peng J, Han P, Fang F, Ma L, et al. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. Electronic Journal of Biotechnology. 2014 Nov;17(6):262–7.
52. Ilić N, Milić M, Beluhan S, Dimitrijević-Branković S. Cellulases: From lignocellulosic biomass to improved production. Energies 2023; 16:3598. https://doi.org/10.3390/en16083598.
53. Michelin M, Gomes DG, Romaní A, Polizeli M de LTM, Teixeira JA. Nanocellulose production: Exploring the enzymatic route and residues of pulp and paper industry. Molecules 2020; 25:3411. https://doi.org/10.3390/molecules25153411.
54. Velvizhi G, Goswami C, Shetti NP, Ahmad E, Kishore Pant K, Aminabhavi TM. Valorisation of lignocellulosic biomass to value-added products: Paving the pathway towards low-carbon footprint. Fuel (Lond) 2022; 313:122678. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122678.
55. Thapa S, Mishra J, Arora N, Mishra P, Li H, O'Hair J, et al. Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. Rev Environ Sci Biotechnol 2020; 19:621–48. https://doi.org/10.1007/s11157-020-09536-y

56. Gong X, Yu Y, Hao Y, Wang Q, Ma J, Jiang Y, et al. Characterizing corn-straw-degrading actinomycetes and evaluating application efficiency in straw-returning experiments. Front Microbiol 2022;13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1003157.
57. Theron J, Cloete TE. Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. Critical Reviews in Microbiology. 1 de enero de 2000;26(1):37-57.
58. Dobrzyński J, Wróbel B, Górska EB. Taxonomy, Ecology, and Cellulolytic Properties of the Genus Bacillus and Related Genera. Agriculture. octubre de 2023;13(10):1979.
59. Balla A, Silini A, Cherif-Silini H, Bouket AC, Boudechicha A, Luptakova L, et al. Screening of Cellulolytic Bacteria from Various Ecosystems and Their Cellulases Production under Multi-Stress Conditions. Catalysts. 2022 Jul;12(7):769.
60. Fang C, Thomsen MH, Frankær CG, Bastidas-Oyanedel JR, Brudecki GP, Schmidt JE. Factors affecting seawater-based pretreatment of lignocellulosic date palm residues. Bioresource Technology. 1 de diciembre de 2017;245:540-8.
61. Gupta SK, Kataki S, Chatterjee S, Prasad RK, Datta S, Vairale MG, et al. Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application. Journal of Cleaner Production. 10 de junio de 2020;258:120351.
62. Foroozandeh Shahraki M, Ariaeenejad S, Fallah Atanaki F, Zolfaghari B, Koshiba T, Kavousi K, et al. MCIC: Automated Identification of Cellulases From Metagenomic Data and Characterization Based on Temperature and pH Dependence. Frontiers in Microbiology [Internet]. 2020 [citado 19 de noviembre de 2023];11. Disponible en: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.567863
63. Zimmermann J, Kaleta C, Waschina S. gapseq: informed prediction of bacterial metabolic pathways and reconstruction of accurate metabolic models. Genome Biology. 2021 Mar 10;22(1):81.
64. Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 1 de diciembre de 2018;140:5-12.
65. Gutierrez MPV. Caracterización de la diversidad microbiana cultivable, asociada al residuo lignocelulosico del proceso de beneficio de la hoja fique (furcraea andina) en mogotes, santander. 2018.
66. Guo G, Shen C, Liu Q, Zhang S lin, Shao T, Wang C, et al. The effect of lactic acid bacteria inoculums on in vitro rumen fermentation, methane production, ruminal cellulolytic bacteria populations and cellulase activities of corn stover silage. Journal of Integrative Agriculture. 1 de marzo de 2020;19(3):838-47.

67. 1. Ren W, Xu X, Long H, Zhang X, Cai X, Huang A, et al. Tropical Cellulolytic Bacteria: Potential Utilization of Sugarcane Bagasse as Low-Cost Carbon Source in Aquaculture. Front Microbiol [Internet]. 2021 Oct 29 [cited 2025 Mar 8];12. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.745853/full
68. Kuhad RC, Deswal D, Sharma S, Bhattacharya A, Jain KK, Kaur A, et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 1 de marzo de 2016;55:249-72.