



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Química



**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DE CELULASAS EN SUELOS**

Tutor:
Dr. Arnaldo Armado

Autor:
Br. Teresa Cadenas

Junio, 2016



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Química



ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CELULASAS EN SUELOS

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de Carabobo como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Química

Tutor: Dr. Arnaldo Armado

Autor: Br. Teresa Cadenas

Junio, 2016



Estudio comparativo de dos métodos analíticos para la determinación de la actividad enzimática de celulasas en suelos



FACYT

Autor: Teresa Cadenas, C.I. 16.013.965

*Centro de Investigación en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM),
Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y
Tecnología, Universidad de Carabobo.*

Resumen

La celulosa es el principal constituyente carbonado de las plantas superiores, y probablemente el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza. Su descomposición aporta fuentes de energía y de carbono, que promueven la actividad microbiana y la estabilidad de los agregados del suelo. Esta descomposición es realizada por los microorganismos presentes en el suelo, responsables de la degradación de toda la materia orgánica muerta para formar el humus, retornando al suelo y a la atmósfera las sustancias transformadas por otros seres vivos. La liberación de enzimas es un proceso constante, para que ocurra la degradación de la celulosa, debe existir la enzima celulasa, capaz de degradar y romper los enlaces presentes en este polímero, producto de esta descomposición puede medirse la acción de estas enzimas. Existen distintas formas de cuantificar y evaluar la actividad celulasa en suelos. El objetivo de este trabajo fue estudiar comparativamente dos métodos analíticos para la determinación de la actividad enzimática de celulasas en suelos. Se tomaron 8 muestras de suelo con características distintas y se les determinó la actividad enzimática por el método colorimétrico de DNS, luego se seleccionaron las dos muestras con mayor actividad celulolítica y se

establecieron sistemas de suelo usando microdiscos de papel de filtro como sustrato. Aplicando un diseño de experimento, con diferentes condiciones de pH y temperatura, luego de transcurridos 45 días de incubación se realizó la medición con el método de papel de filtro propuesto, mediante el análisis de imágenes con el software ImageJ. Obteniéndose como condiciones de mayor degradación un pH 5 y temperatura ambiente (29-30°C). Para el estudio del efecto del tiempo de incubación se realizó la cuantificación en distintos intervalos de tiempo, donde se observaron valores de degradación considerables, desde los primeros 7 días de incubación. Mediante el método de análisis de imágenes propuesto, se obtuvo que las réplicas a 45 días de incubación no presentaron diferencia significativa, por lo que se llegó a la conclusión que el método es reproducible. Por último se realizó la comparación estadística entre ambos métodos, en la muestra N° 7 se obtuvo diferencia significativa y para la muestra N° 8, a pesar de ser poca población de estudio, se puede decir que el método propuesto es adecuado para realizar el cálculo de la cantidad de celulosa degradada y por ende de la actividad enzimática de la celulasa por medio del análisis de imágenes, también en base a esto concluimos que no existe diferencia significativa entre las réplicas de 45 días de incubación, por lo que el método es reproducible.

INDICE DE CONTENIDO

1.- INTRODUCCION.	1
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	3
3. OBJETIVOS.	5
3.1. General.	5
3.2. Específico.	5
4. JUSTIFICACIÓN.	5
5. BASES TEÓRICAS.	7
5.1 El Suelo.	7
5.1.1 Propiedades del Suelo.	8
5.1.1.1 Propiedades biológicas del suelo.	8
5.2. Materia Orgánica.	9
5.2.1 Actividad Enzimática.	9
5.3 Composición de la Celulosa.	10
5.3.1 Degradación de la Celulosa.	12
5.3.2 Medida de la Actividad de la celulasa.	13
5.3.2.1 Factores del medio que influyen sobre la Actividad Enzimática.	14
5.4. Métodos para la determinación de actividad enzimática en suelos.	14
5.4.1. Método de DNS.	15
5.4.2. Método de papel de filtro o Fpa.	16
5.4.3. Actividad individual de celulasa. Endoglucanasas. Método de CMC.	16
5.4.4. Actividad individual de celulasa. Exooglucanasas. Método de Avicel.	17
5.4.5. Actividad individual de celulasa. B-glucosidasas. Método pNPG.	17
5.4.6. Método de microbalanza de cristal de cuarzo.	17
5.4.7. Automatizado del método de FPA o papel de filtro.	17
5.4.8. Método de microfibrillas fluorescentes.	18
5.5. Análisis de Imágenes.	18
5.5.1. Fotomicroscopía Digital.	19
5.5.2. Densitometría óptica.	19
5.6. Software para el análisis de imágenes.	20
5.6.1. ImageJ.	20
6. ANTECEDENTES.	20
6.1.- Evaluación de indicadores de calidad en respuesta a	

<i>la aplicación de lodos papeleros como enmienda orgánica en suelos agrícolas (Luyando, 2014).</i>	20
<i>6.2.- Degradación de celulosa en lotes agrícolas bajo siembra directa (Gómez et. al, 2011).</i>	21
<i>6.3.- Ajuste y validación de un procedimiento de determinación de actividad enzimática celulasa en suelos a partir de la valoración espectrofotométrica de azúcares reductores (Albarrán, 2008).</i>	22
<i>6.4.- Capacidad de degradar celulosa a diferentes profundidades de muestreo (Romero et al, 2009).</i>	23
7. MARCO METODOLOGICO.	24
<i>7.1.- Selección de muestras de suelo a estudiar.</i>	24
<i>7.1.1. pH y conductividad eléctrica.</i>	25
<i>7.1.2. Materia orgánica.</i>	26
<i>7.2.- Procedimiento para el análisis de azucares reductores en suelo. Método DNS.</i>	26
<i>7.3.- Cuantificación de la degradación del papel de filtro: Método de Papel de filtro.</i>	28
<i>7.4.- Cuantificación de la degradación del papel de filtro: Análisis de Imágenes.</i>	29
<i>7.4.1. Estimación de la actividad enzimática mediante la degradación de papel de filtro.</i>	38
<i>7.5.- Estudio del efecto de la Temperatura, pH y tiempo de incubación.</i>	38
<i>7.6.- Análisis Estadístico.</i>	40
8.- DISCUSION DE RESULTADOS.	41
<i>8.1. Determinación de Actividad de celulasas mediante el método colorimétrico de DNS.</i>	41
<i>8.2. Determinación de la degradación del papel de filtro mediante el análisis de imágenes.</i>	44
<i>8.3. Actividad de celulasas en suelos por el método del papel de filtro.</i>	47
<i>8.4. Efecto de tiempo de incubación sobre la determinación de la actividad de celulasas.</i>	54
<i>8.5. Comparación de la actividad enzimática por el método colorimétrico de DNS y papel de filtro.</i>	64
9.- CONCLUSIONES.	67
10.- RECOMENDACIONES.	67
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	68

11.- APENDICE.	75
-------------------------------	-----------

INDICE DE FIGURAS

Figura Nº 1. Estructura de la Celulosa.	11
Figura Nº 2. Enzimas responsables de la degradación de la Celulosa.	13
Figura Nº 3. Microscopio digital utilizado.	29
Figura Nº 4. Montaje del sistema.	29
Figura Nº 5. Entorno del programa ImageJ.	30
Figura Nº 6. Abrir la imagen digital en el programa ImageJ.	30
Figura Nº 7. Selección del diámetro del disco.	31
Figura Nº 8. Calibrado de ImageJ.	32
Figura Nº 9. Cuadro de dialogo de calibrado.	33
Figura Nº 10. Cambio de profundidad de color a 8 Bit. . .	33
Figura Nº 11. Selección del disco con la herramienta "Oval".	34
Figura Nº 12. Ventana de la Herramienta "Threhold". . . .	35
Figura Nº 13. Ventana para seleccionar los parámetros a medir.	36
Figura Nº 14. Comando para acceder al Análisis de imágenes.	36
Figura Nº 15. Ventana para el Análisis de imágenes. . . .	37
Figura Nº 16. Ventanas de resultados obtenidos para cada imagen.	38
Figura Nº 17. Reacción de reducción del DNS.	43
Figura Nº 18. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de degradación.	45
Figura Nº 19. Diagrama de Pareto estandarizado, obtenido para el análisis de degradación.	46
Figura Nº 20. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-A1 (Izquierda) y M8-A1 (Derecha) (Condición pH 5 y Temperatura ambiente).	48
Figura Nº 21. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-A2 (Izquierda) y M8-A2 (Derecha) (Condición pH 5 y Temperatura 45°C).	49
Figura Nº 22. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-B1 (Izquierda) y M8-B1 (Derecha) (Condición	

pH 8 y Temperatura ambiente).	50
Figura N° 23. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-B2 (Izquierda) y M8-B2 (Derecha) (Condición pH 8 y Temperatura 45°C).	51
Figura N° 24. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 7 días de incubación.	54
Figura N° 25. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 15 días de incubación.	55
Figura N° 26. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 21 días de incubación.	56
Figura N° 27. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 28 días de incubación.	57
Figura N° 28. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 35 días de incubación.	58
Figura N° 29. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 45 días de incubación.	59
Figura N° 30. Efecto del tiempo de incubación sobre la degradación de celulosa en la Muestra N° 7.	61
Figura N° 31. Efecto del tiempo de incubación sobre la degradación de celulosa en la Muestra N° 8.	62
Figura N° 32. Gráfico de barras de la cantidad de celulosa degradada por cada método para las muestras N° 7 y N° 8.	65
Figura N° 33. Curva de calibración.	75

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Enzimas presentes en los suelos.	10
Tabla N° 2. Factores y niveles aplicados al diseño de experimento.	39
Tabla N° 3. Identificación de las muestras según las condiciones de pH y temperatura.	39
Tabla N° 4. Actividad Enzimática obtenida por el método colorimétrico de DNS.	41
Tabla N° 5. Propiedades fisicoquímicas de los suelos estudiados.	43
Tabla N° 6. Porcentaje de degradación de microdiscos de papel de filtro obtenido por el análisis de imágenes.	44
Tabla N° 7. Análisis de varianza para la degradación como variable respuesta.	45
Tabla N° 8. Actividad enzimática de celulasa y cantidad de celulosa degradada.	52
Tabla N° 9. Porcentaje de degradación, actividad enzimática y cantidad degradada por días de la muestra N° 7.	60
Tabla N° 10. Porcentaje de degradación, actividad enzimática y cantidad degradada por días de la muestra N° 8.	60
Tabla N° 11. Cantidad degradada de la muestra N° 7 y muestra N° 8 por ambos métodos de estudio.	64
Tabla N° 12. Concentración de glucosa y absorbancia correspondiente a cada patrón.	75

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un recurso natural que necesita ser preservado y así mejorar su calidad y capacidad productiva. Los indicadores de calidad son un conjunto de parámetros (propiedades físicas, químicas y biológicas) que buscan establecer estándares de calidad para el recurso suelo; dentro de este conjunto se consideran las actividades enzimáticas por estar muy relacionadas con las demás propiedades y por ser sensibles a los cambios generados por el uso del suelo (González *et al.* 2008).

La actividad metabólica de todos los seres vivos del suelo, ya sean microorganismos, animales o raíces de plantas, depende de la acción catalítica de numerosas enzimas. Por esta razón es posible considerar a la actividad enzimática del suelo como resultante de todos los sistemas enzimáticos de la biomasa edáfica (Wild, 1992). La catálisis enzimática en el suelo proporciona información, para el entendimiento del por qué los procesos responsables de mantener funciones como la producción de biomasa, la remediación de contaminantes y el ciclaje de nutrientes, sufren cambios, y si estos son positivos, negativos o iterativos (Cerón & Melgarejo, 2005).

La celulosa es la molécula orgánica más abundante y disponible en la naturaleza para ser sintetizada y degradada por una variedad de microorganismos (Martínez *et al.*, 2008). Los organismos capaces de degradar la celulosa son principalmente hongos y bacterias, ellos son reconocidos por la habilidad de producir enzimas no sólo celulasas sino también amilasas, proteasas y peptidasas entre otras; que permite el reciclado de material orgánico de nuevo al suelo. La hidrólisis de la celulosa se realiza mediante un complejo enzimático llamado celulasas, constituido básicamente por tres enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Sin embargo, no todas las especies pueden producir elevados niveles de enzimas extracelulares que, a su vez, no sean afectadas por factores físicos

y químicos durante el proceso de hidrólisis (Gutiérrez *et al.*, 2008; Izquierdo *et al.*, 2010; Oviedo *et al.*, 2012)

Entre los beneficios de la degradación de materiales celulósicos están el aumento en las fuentes de energía y de carbono, promoviendo la actividad microbiana y mejoras en la estabilidad de los agregados del suelo.

Cuantificar la actividad celulolítica representa un reto, debido a la complejidad del sistema enzimático implicado y a la heterogeneidad de las técnicas y unidades empleadas para reportarla por diferentes laboratorios. Con el fin de estandarizar los métodos de medición de la actividad celulolítica la IUPAC en 1984 publico un listado de técnicas de referencia, sin embargo no todas tuvieron gran acogida entre los biotecnólogos, ya que eran restrictivas en el uso de sustratos, dispendiosas o poco replicables (IUPAC, 1984; Wood *et al.*, 1988; AOAC, 2000).

Debido a la importancia que tiene la actividad enzimática de celulasas en los procesos biológicos del suelo, además que es una medida de calidad de este recurso, se plantea como objetivo de este proyecto realizar un estudio comparativo entre el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), muy usado en la actualidad para la cuantificación y determinación de la actividad celulolítica, y un método propuesto, fundamentado en la capacidad del suelo de degradar la celulosa contenida en el papel de filtro y la cuantificación mediante el procesamiento de imágenes microscópicas con la ayuda de un software libre. De esta manera, se propone un método más ecológico, que disminuirá los costos de reactivos, disposición de desechos, además de obtener una sensibilidad y reproducibilidad adecuada.

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las celulasas desempeñan un papel importante en el ciclo del carbono en el suelo, degradando desechos vegetales que están compuestos en su mayoría de celulosa (Nielsen y Winding, 2002). Esta actividad cobra gran importancia en agroindustrias debido a que la degradación de este polímero se relaciona directamente con la fertilidad y calidad del suelo (Cerón y Melgarejo, 2005). El estudio de la degradación de la celulosa en los suelos se ha generado gracias a la gran importancia que tiene ésta al ser uno de los carbohidratos más abundantes que se incorporan anualmente a los suelos. Actualmente existen varios métodos para determinar la actividad de celulasas en distintos tipos de suelo. Entre los cuales se encuentran el método de DNS, actividad de endogluconasas, ensayo de exogluconasas, actividad de β -glucosidasas, balanza de cristal de cuarzo, entre otros (Dashtban *et al*, 2010). En general, estos métodos requieren de reactivos y equipos adecuados para la determinación de la actividad, los cuales muchas veces no se tiene acceso a ellos.

Además, algunos métodos presentan complicaciones metodológicas. Por ejemplo, el método de DNS puede incluir distintas complicaciones en la preparación de reactivos, es una tarea tediosa que requiere proporciones de mezcla óptimas de los diferentes componentes, ya que algunos de los azúcares reductores se pueden degradan mientras que el análisis se realiza, también la solución alcalina recomendada por el método IUPAC, provoca un aumento desmedido en la actividad enzimática con respecto a los valores reales (Gilman, 1943). Además, el reactivo DNS requiere control de temperatura adecuada para permitir el desarrollo de color y estabilidad del mismo, haciéndose un método que requiere excesivo control a la hora de implementarlo. Además de la falta de un método estandarizado que incluya la cuantificación de la actividad enzimática utilizando el papel de filtro como sustrato.

Tomando en cuenta la importancia de la actividad enzimática de la celulasa para que se desarrollen adecuadamente algunas funciones importantes en el suelo, se pretendió implementar un método alternativo para su determinación.

El objetivo fundamental de este trabajo fue realizar un estudio comparativo entre un método ya existente y un método alternativo a fin de proponer si este puede implementarse como opción del método convencional.

El suelo tiene la facilidad para degradar el papel de filtro, que está constituido básicamente de celulosa, ya que en él se encuentran microorganismos como bacterias y hongos aerobios y anaerobios que producen enzimas celulolíticas. En base a esta capacidad degradadora del suelo, se planteó un método empleando papel de filtro como sustrato, y adicionalmente poder medir el porcentaje de degradación mediante un análisis de imágenes.

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Estudiar comparativamente dos métodos analíticos para la determinación de la actividad enzimática de celulasas en suelos.

3.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la actividad celulasas mediante el método colorimétrico de DNS.
- Cuantificar la degradación del papel de filtro por acción de las celulasas del suelo, mediante un análisis de imágenes.
- Estimar la actividad de celulasas en suelos por el método del papel de filtro.
- Estudiar el efecto del pH, la temperatura y tiempo de incubación sobre la determinación de la actividad de celulasa.
- Comparar estadísticamente los resultados de determinación de la actividad enzimática entre el método colorimétrico de DNS y papel de filtro.

4.- JUSTIFICACION

El suelo no solo es la base para la agricultura y para los diferentes ecosistemas, sino que además de él depende toda la vida del planeta, por ello resulta de gran importa el estudio de la calidad de este, uno de estos indicadores es el objeto en estudio, la actividad enzimática de la celulasa. Este tipo de determinación permite obtener mayor aprovechamiento de este recurso no renovable y dinámico, ya que es clave para la producción de alimentos y para el mantenimiento de la calidad ambiental a distintas escalas. Por medio de esta propiedad se puede determinar la sostenibilidad de la agricultura, la calidad ambiental y como consecuencia la salud de plantas, animales y del hombre (Gil Sotres *et al*, 1998).

Los materiales celulósicos son los principales componentes de la biomasa producida por las plantas. Son degradados por hongos, bacterias y actinomicetos en condiciones mesotérmicas con mayor eficiencia. De su descomposición aumentan las fuentes de energía y carbono, actividad microbiana y mejora la estabilidad y a su vez la calidad del suelo. (Gómez *et al*, 2011).

Actualmente el mundo está enfocado en el desarrollo de nuevas tecnologías que tiendan a optimizar la conservación, gestión y uso sustentable de los recursos naturales, en función de contribuir a mejorar la calidad de vida de las generaciones presentes y futuras. En este trabajo se planteó la determinación de la actividad enzimática de la celulasa por medio de un método alternativo empleando papel de filtro, esto debido a que los numerosos métodos que existen para la determinación de dicha actividad, hoy día tienden a ser realmente costosos, además de que para ello se debe utilizar gran cantidad de reactivos que en sus efectos deben ser desechados luego de ser utilizados generando de algún modo cierto grado de contaminación.

La importancia que tiene el método planteado se resume en la reducción de costos con respecto a reactivos, ya que la determinación se realizó mediante el procesamiento de imágenes con la ayuda de un software libre, se obtiene una sensibilidad y reproducibilidad adecuada al determinar la actividad de las enzimas que se están estudiando. Además que permite a los investigadores el ensayo de un gran número de muestras de manera simultánea y también disminuirá los desechos originados.

5.- BASES TEORICAS

5.1.- EL SUELO

El suelo es un cuerpo natural, tridimensional, no consolidado, producto de la interacción de los llamados factores formadores del suelo (clima, rocas, organismos, relieve, tiempo). Está compuesto por sólidos (material mineral y orgánico), líquidos y gases, que se mezclan para formar los horizontes o capas diferenciales, resultado de las adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia a través del tiempo, y cuyo espesor puede ir desde la superficie terrestre hasta varios metros de profundidad (Volke y Velasco, 2005).

Según Fassbender y Bornemisza (1987), se acostumbra definir como suelo a la capa superficial no consolidada de la superficie terrestre, la cual está formada predominantemente por compuestos inorgánicos, hasta más del 99%, con un porcentaje variable de sustancias orgánicas. La fase solida de la mayoría de los suelos está constituida principalmente por substancias inorgánicas de diferente composición química. Algunas de ellas son mezclas de compuestos a las que se le denominan rocas, cuya meteorización conduce a los minerales primarios y secundarios formadores del suelo. (Fassbender & Bornemisza, 1987).

El suelo desempeña funciones de gran importancia para el sustento de la vida en este planeta, es fuente de alimentos para la producción de biomasa, actúa como medio filtrante, amortiguador y transformador, es hábitat de miles de organismos, y el escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos. En el suelo se llevan a cabo la mayoría de las actividades humanas, sirviendo de soporte físico y de infraestructura para la agricultura, actividades forestales, recreativas, y agropecuarias, además la socioeconómica como vivienda, industria y carreteras (Volke *et al.*, 2005).

5.1.1.- PROPIEDADES DEL SUELO

Una propiedad física, química o biológica del suelo es aquella que caracteriza al suelo; por ejemplo, la composición química y la estructura física del suelo están determinadas por el tipo de material geológico del que se origina, por la cubierta vegetal, por el tiempo en que ha actuado el interperismo (desintegración por agentes atmosféricos), por la topografía y por los cambios artificiales resultantes de las actividades humanas a través del tiempo (Volke *et al.*, 2005).

Entre las propiedades físicas se encuentran:

➤ PH O REACCIÓN DEL SUELO:

El pH o reacción del suelo es una de sus propiedades más importantes ya que establece el grado de acidez o de alcalinidad que éste presenta y tiene una gran influencia en muchas de sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Jaramillo, 2002).

➤ CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA:

La conductividad eléctrica es una medida que se utiliza para indicar la concentración total de componentes ionizados en las soluciones y cuyos valores están relacionados con los sólidos totales disueltos (Soriano, 2004), así como también son indicadores de la cantidad de nutrientes disponibles en el suelo para ser adsorbidos por el sistema de raíces de la planta.

5.1.1.1- PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO

La determinación de parámetros bioquímicos en el estudio de los suelos, día a día es considerada de gran importancia ya que son esenciales para que este recurso realice sus funciones de manera correcta (Dick y Tabatabai, 1993), su medida da idea de la

actividad metabólica del suelo y sirve de ayuda para entender la funcionalidad del mismo. Entre las propiedades biológicas se encuentran: materia orgánica, respiración basal, carbono de la biomasa microbiana y la actividad enzimática.

5.2. MATERIA ORGANICA

La importancia de la materia orgánica radica en que, en todas sus diferentes formas, tiene efectos marcados en casi todas las propiedades del suelo (humedad, nutrientes, biota, etc.), así como poseer beneficios sobre la nutrición vegetal ya que está demostrado que la aplicación de abonos orgánicos incrementa la producción de los cultivos, inclusive cuando son aplicados en suelos que presentan altos contenidos de materia orgánica nativa (Jaramillo, 2002).

5.2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas, han surgido como potenciales indicadores de calidad y sostenibilidad del suelo, ya que presentan un acercamiento al estudio de procesos mediados por microorganismos del suelo, y materia orgánica presente, por lo que son interpretadas como una medida indirecta de la biomasa microbiana, efectos de la rizósfera, productividad del suelo y potencial de mineralización de sustratos naturales o xenobióticos (Miller *et al*, 1998; Cerón & Melgarejo, 2005).

La actividad enzimática del suelo posee ciertas características que hace de ella un buen indicador: a) está estrechamente relacionada con la materia orgánica, las características físicas, la actividad microbiana y la biomasa presente en el suelo, b) provee información temprana acerca de cambios en la calidad, pues cambia con mayor rapidez que otros indicadores y c) puede ser cuantificada mediante el uso de técnicas relativamente sencillas (Nielsen & Winding, 2002; Dick, 1996).

Debido al gran número de enzimas conocidas en la actualidad se ha hecho necesario su ordenamiento en grupos siguiendo diferentes criterios. Una clasificación muy utilizada es aquella que hace uso del tipo de reacción que cataliza. De acuerdo a este criterio se las puede ubicar en 6 grupos principales (Skujins, 1976). En la tabla N° 1 (Skujins, 1976) se indica cuáles son esos grupos, las reacciones en las que intervienen y el nombre de la enzima involucrada.

Tabla N° 1. Enzimas presentes en los suelos.

Clases de Enzimas	Reacción Química Catalizada	Ejemplo de la Enzima
Óxido - Reductasas	Reacción de óxido - reducción	Glucosa oxidasa
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales	Glucoquinasa
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Celulasa, Ureasa
Liasas	Adición de dobles enlaces	Descaboxilasa
Isomerasa	Reacción de isomerización	Fosfoglucosa Isomerasa
Ligasas	Formación de enlaces	Piruvato Carboxilasa

5.3.- COMPOSICION DE LA CELULOSA

La celulosa es el principal componente de la pared celular de los vegetales y de algunos protoctistas. Se trata de uno de los polisacáridos más abundantes existentes en la tierra, estimándose que cada año, 10^{15} kg de celulosa son sintetizados y degradados.

Desde el punto de vista químico se trata de un carbohidrato complejo e insoluble formado por micro fibrillas de moléculas de glucosa unidas cola con cola. Tanto los papeles como el algodón están formados principalmente por celulosa (Malajovich, 2014).

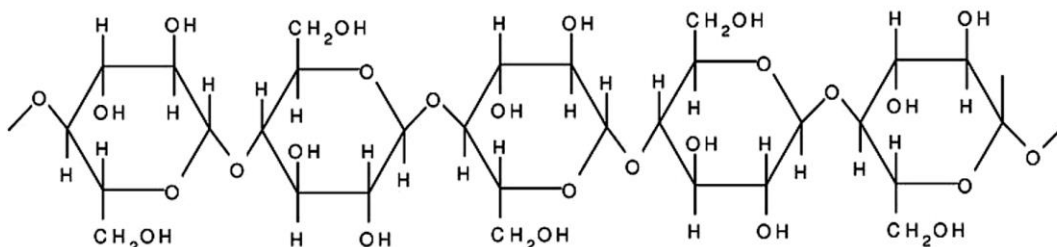


Figura N° 1. Estructura de la Celulosa

La celulosa es un polímero cuya molécula tiene más de dos mil unidades de D-(+)- glucosa, unidas por un enlace glucosídico (1,4) de tipo beta. Las moléculas de celulosa se unen mediante puentes de hidrógeno, dando lugar a una estructura polimórfica. De su hidrólisis se obtienen celodextrinas, celobiosa y finalmente, glucosa (Ibañez, 2006).

Los restos de glucosa presentan una conformación en silla, que es la más estable en la naturaleza. Su peso molecular es muy elevado, oscilando entre 50.000 y 2.500.000 dalton según su procedencia, ello equivale de 300 a 15.000 restos de glucosa por molécula. Es esta composición química la que confiere a la fibra de celulosa su resistencia tanto a los ataques físicos, químicos y enzimáticos. Las moléculas de celulosa se encuentran unidas entre sí a través de puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals. Estas zonas de unión se corresponden con las zonas de mayor refringencia a los rayos X, debido a la orientación en paralelo de las cadenas de celulosa (microfibrillas), dando lugar así a la formación de mallas cristalinas denominadas micelas. Estas micelas de unos 3,5 nm. de diámetro poseen una gran estabilidad química y están formados por término medio por unos 100 restos de glucosa. Es esta disposición paracristalina la que ofrece un impedimento estérico al ataque enzimático. (Marquina, 1991)

5.3.1.- DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

Se distinguen tres fases en la degradación de la celulosa (Charpentier, 1968):

1. Transformación de la celulosa insoluble (cristalina) en celulosa soluble (amorfa).
2. Transformación de celulosa soluble en oligosacáridos y celobiosa (dímero de la glucosa).
3. Transformación de la celobiosa en glucosa.

En las dos primeras fases intervienen diversas enzimas que se pueden incluir dentro del grupo de las celulasas, mientras que en la tercera está presente una enzima que cataliza la ruptura del enlace beta del disacárido, denominada β - glucosidasa.

Según Malajovich (2014), las celulasas son enzimas extracelulares, producidas por hongos, bacterias y protozoarios, que hidrolizan la celulosa. La asociación con microorganismos productores de celulosa permite a las termitas y a los rumiantes la digestión de la celulosa.

Las celulasas tienen numerosas aplicaciones: en el procesamiento del café, en la industria textil, en la preparación de detergentes y en la producción de papel y celulosa. Su utilización permite el uso de biomasa de celulosa como materia prima para la producción de etanol.

Las celulasas del suelo tienen su origen en los microorganismos celulíticos (Álvarez, 2003) y son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. Se trata de un complejo enzimático (mezcla de enzimas) el que actúa en la degradación de la celulosa. Este complejo está formado por tres tipos de enzimas:

- 1) Endoglucanasas o endocelulasas.
- 2) Celobiohidrolasas o exocelulasas.
- 3) β -glucosidasa o celobiasa.

La hidrólisis completa de la celulosa transcurre en diferentes pasos en los que intervienen el complejo enzimático mencionado anteriormente. Las tres fases en la degradación y las enzimas responsables en cada paso, en resumen, son (Charpentier, 1968):

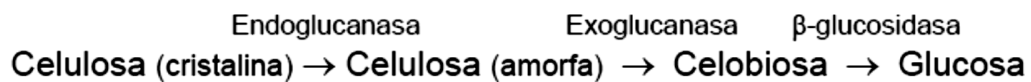


Figura Nº 2. Enzimas responsables de la degradación de la Celulosa

5.3.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA CELULASA

Para realizar la determinación de la actividad de las enzimas en el suelo, entre ellas la celulasa, se debe trabajar bajo condiciones controladas de pH, temperatura y concentración de sustrato. La actividad se la cuantifica en función de la cantidad de producto surgido de la reacción enzima - sustrato y se indica como moles o μg del metabolito por gramo de material por hora de incubación. En el caso de la determinación de celulasas por el método del DNS, se usa como sustrato carboximetilcelulosa y se obtiene como producto de la interacción enzima - sustrato la glucosa, la actividad enzimática será indicada como:

$$\text{Actividad Celulosa} = \frac{\text{cantidad liberada de azúcar reductor}}{m_s \times t} \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde:

Azúcar reductor: Micro Gramos de glucosa.

m_s : masa de suelo pesada en gramos.

t: Tiempo de incubación en horas.

La determinación de la glucosa liberada por la actividad celulasa se realiza por distintos métodos siendo los más frecuentes los espectrofotométricos y los cromatográficos. De ellos el más usado es el espectrofotométrico (Álvarez, 2003).

5.3.2.1.- FACTORES DEL MEDIO QUE INFLUYEN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Entre los principales factores que influyen en la actividad enzimática se encuentran la temperatura y el pH.

- **pH:** Los estudios del efecto del pH en reacciones catalizadas por enzimas, son debido a que la concentración del ión hidrógeno en el sistema de reacción afecta los grupos disociables de la proteína, influyendo el estado de ionización del sustrato. Para la interacción eficaz entre el sustrato y la enzima, los grupos ionizables, tanto del sustrato como del centro activo de la enzima, deben estar en estados apropiados para mantener su conformación (Deng, 1994).
- **Temperatura:** Las reacciones catalizadas por enzimas aumentan con el incremento de la temperatura de incubación hasta cierto valor luego del cual comienza su disminución por la desnaturalización de la proteína. Para la celulasa la máxima actividad es próxima a los 60 °C. Las condiciones generales del ensayo y la concentración del sustrato deben permitir su libre difusión para facilitar su interacción con la enzima (Deng, 1994).

5.4.- METODOS PARA DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN SUELOS

Para determinar la actividad enzimática de celulasas en suelos existen distintas metodologías ya estandarizadas como se detallan a continuación:

5.4.1.- METODO DE DNS

Ghose (1987) y posteriormente Wood y Bhat (1988) han desarrollado un procedimiento para el análisis de azúcares reductores en suelo que hace uso de ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS. La reacción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa conduce a la formación del ácido 3-amino-5-nitro salicílico, mientras que el grupo aldehído del azúcar se oxida a carboxílico. La relación entre el azúcar reaccionante y el DNS consumido indica que la reacción es algo más compleja que la que se postula. El procedimiento de análisis es simple ya que para la calibración 3,0 mL de la solución del reactivo se adicionan a 3,0 mL solución glucosa en solución pH 5,0 de ácido acético – acetato y CMC 0,2% calentándose por 15 minutos en baño de agua hirviendo.

Desarrollado el color adicionar 1 mL de solución 20 % de Sal de Rochelle (tartrato de Sodio y Potasio), se deja enfriar y mide absorbancia a 540 nm. La solución del reactivo contiene: 1% de Acido 3,5-dinitrosalicílico, 0,2 % de fenol, 0,05 % de Na_2SO_3 , y 1 % de NaOH. La intensidad del color alcanza un máximo para una concentración de DNS del 1 %. La concentración de fenol debe estar entre 0,2 y 0,5 %. En ese rango la presencia de fenol incrementa en 5 veces la intensidad de color respecto a la solución libre de él. El sulfito tiene como finalidad eliminar el oxígeno disuelto para prevenir la oxidación de la glucosa, favorecida por el medio alcalino. El intervalo óptimo se encuentra entre 0,025 y 0,1%. Con concentraciones menores hay pérdida de linealidad y de intensidad de color, concentraciones mayores disminuyen la coloración. Si se utiliza la sal de Rochelle, para estabilizar el color, ésta debe ser incorporada separadamente antes de mezclar la glucosa con el reactivo. Esto previene la pérdida de glucosa hasta en un 70 % El NaOH incrementa la coloración pero produce una pérdida de glucosa. El efecto es favorable hasta un máximo del 1 % a partir del cual la decoloración por pérdida de glucosa comienza a superar el incremento de coloración debido al aumento de la alcalinidad. La carboximetilcelulosa al 0,2 %, utilizada como

sustrato en la medida de la actividad celulasa, incrementa la coloración mientras que la solución buffer de pH 5,0, conteniendo citrato 0,05 M como recomiendan por algunos autores, disminuye el color. En las concentraciones señaladas ambos efectos se compensan. El efecto negativo del citrato puede eliminarse usando en su lugar buffer de acético – acetato.

5.4.2.- METODO DE PAPEL DE FILTRO O FPA (FILTER PAPER ASSAY)

La FPA (por sus siglas en inglés, Filter Paper Assay) es el método clave para el análisis de la actividad total de celulasa. En 1976, el FPA fue desarrollado por Mandels y colaboradores. El FPA es utilizado desde 1984, cuando la IUPAC propuso una serie de procedimientos estándar para la determinación de la actividad de celulasa. La unidad internacional (UI) de actividad de papel de filtro (FPasa) (FPU) se define como un micromol de equivalentes de glucosa liberada por minuto de filtrado de cultivo bajo distintas condiciones de ensayo, como pH y temperatura (Dashtban *et al*, 2010).

5.4.3.- ACTIVIDAD INDIVIDUAL DE CELULASA. ENDOGLUCANASAS: MÉTODO CMC

Las endoglucanasas actúan al azar sobre los enlaces β - 1,4 glucosídicos y su actividad es con frecuencia medida sobre celulosa soluble con alto grado de polimerización, como es el caso de la carboximetilcelulosa CMC. La acción de las endoglucanasas sobre este sustrato celulósico se caracteriza por la disminución de la viscosidad realizando rompimientos intramoleculares (Zhang *et al*, 2006).

5.4.4.- ACTIVIDAD INDIVIDUAL DE CELULASA. EXOGLUCANASAS: MÉTODO AVICEL

Las exoglucanasas rompen los extremos accesibles de la molécula de celulosa para liberar glucosa y celobiosa. La celulosa microcristalina (Avicel) es un sustrato adecuado para la medición de la actividad por tener un bajo grado de polimerización y una baja accesibilidad (Zhang *et al*, 2006).

5.4.5.- ACTIVIDAD INDIVIDUAL DE CELULASA. β -GLUCOSIDASAS: MÉTODO pNPG

Se basa en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol obtenido por la acción de la β -glucosidasas, después de incubar el suelo en presencia de p-nitrofenol- β -D-glucopiranosido (PNG). El método colorimétrico para medir el p-nitrofenol liberado se basa en que las disoluciones básicas de este compuesto poseen color amarillo. Se mide absorbancia a 400nm con su respectiva curva de calibración (Dashtban *et al*, 2010).

5.4.6.- METODO DE MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO

La propiedad piezoeléctrica del cristal de cuarzo permite la producción de un ultrasensible balance de masa. Los cambios en la frecuencia de un cristal de cuarzo pueden ser utilizado para medir la viscosidad y densidad, cambios en una solución utilizada para incubar un sustrato de celulosa dado, después de que ocurre la hidrólisis enzimática. Los resultados se pueden utilizar para cuantificar la actividad de la enzima (Dashtban *et al*, 2010).

5.4.7.- AUTOMATIZADO DEL MÉTODO FPA O PAPEL DE FILTRO

Se basa en un robot cubierto, llamado Cyberlabs C400 equipado con incubación a medida y donde se almacena el reactivo, consta de una placa de lectura de capacidades que permiten la evaluación rápida de celulasas que actúan sobre la celulosa y tiene un

rendimiento máximo de 84 muestras de enzimas por día cuando se realiza la automatización (Dashtban *et al*, 2010).

5.4.8.- MÉTODO DE MICROFIBRILLAS FLUORESCENTES

Este se desarrolló usando microfibrillas fluorescentes de celulosa bacteriana preparando 5- (4,6-diclorotriazinilo) aminofluoresceína (DTAF) como un agente de injerto. La digestión de la celulosa da como resultado la liberación de celodextrinas fluorescente y azúcares reductores. Este método permite una comparación entre la cantidad de fluorescencia liberada y la de azúcar reductor liberado a partir del cual se podría diferenciar entre las actividades de exocelulasa y endocelulasa (Dashtban *et al.*, 2010).

Se realizó un estudio de procesamiento digital de imágenes para obtener la cuantificación de la degradación del papel de filtro, para ello se den conocer algunos conceptos.

5.5.- ANALISIS DE IMÁGENES

En su acepción más amplia, el término hace referencia a un conjunto de técnicas destinadas a obtener datos relativos a un sistema objeto de estudio a partir de imágenes de dicho sistema. Los datos de interés suelen ser casi siempre numéricos. Lo normal es que las imágenes necesarias para el análisis se tomen mediante un microscopio (López-Poveda, 2010).

Es necesario diferenciar entre los procesos de captura y análisis de una imagen digital. Cada uno de ellos se realiza con un software diferente. En general, el software de captura se proporciona junto con la cámara, mientras que el de análisis se adquiere aparte. Dicho esto, existen programas que permiten capturar y analizar imágenes. Por ejemplo, ImageJ (para Windows o Linux) o su equivalente NIH-Image (para Macintosh) controlan el proceso de captura de imágenes mediante tarjetas de video y

cámaras, además, permiten realizar prácticamente cualquier tipo de análisis morfométrico y densitométrico de las imágenes capturadas. Otros ejemplos de software científico para análisis de imágenes son Visilog, MetaMorph, o Neurolucida (López-Poveda, 2010).

Las imágenes observadas al microscopio deben adquirirse mediante una cámara fotográfica o de vídeo. La técnica de adquisición de imágenes al microscopio mediante cámaras fotográficas recibe el nombre de fotomicroscopía. Las cámaras fotográficas empleadas pueden ser ópticas o digitales. Cada vez está adquiriendo más auge la fotomicroscopía digital debido a sus ventajas (López-Poveda, 2010).

5.5.1- FOTOMICROSCOPÍA DIGITAL

Para tomar imágenes de microscopía en formato digital es necesario disponer de un microscopio, una cámara fotográfica (o de vídeo) digital, un computador y el software necesario para capturar y analizar las imágenes. La cámara digital para tomar las imágenes contiene un circuito integrado sensible a la luz que captura una imagen transformando cada uno de los elementos de la misma (denominados píxel) en una corriente eléctrica cuya intensidad es proporcional al color del píxel. (López-Poveda, 2010).

5.5.2.- DENSITOMETRÍA ÓPTICA

Es una técnica que permite medir la cantidad de luz que absorbe un material. Se basa en medir la densidad óptica en cada región de una preparación histológica observada al microscopio. Se mide mediante un densitómetro. Existen dos tipos de densitómetros: de transmisión y de reflexión. Los de reflexión se utilizan para medir la densidad óptica de una imagen impresa (por ejemplo, una fotografía convencional). Los de transmisión, en cambio, se utilizan para medir la densidad óptica de una película fotográfica en positivo

(una radiografía, por ejemplo). Los densitómetros funcionan haciendo incidir un haz de luz con una intensidad conocida sobre la imagen o la película fotográfica y midiendo la cantidad de luz reflejada o transmitida por la imagen. La medición es rápida y directa. (López-Poveda, 2010).

Debido a las condiciones de trabajo se propuso trabajar con el Software ImageJ para el análisis de imágenes, ya que presenta numerosas ventajas, una de ellas es que es un software gratuito.

5.6.- SOFTWARE PARA EL ANALISIS DE IMAGENES

5.6.1.- IMAGEJ

El Software ImageJ es una programa de dominio público, multiplataforma (existen versiones para Linux, Windows y MacOS), muy útil y de gran versatilidad para el procesado de imágenes, siendo utilizado incluso en distintos proyectos de investigación. Con el paso de los años el programa se ha visto complementado por un creciente número de plugins y macros, desarrolladas por un gran número de colaboradores. Estos plugins se pueden añadir a conveniencia al programa original. Los plugins son módulos de software adicional que sirven para realizar tareas más específicas, extendiendo la utilidad del programa. Por otro lado los macros son líneas de comando que pueden programarse para realizar acciones repetitivas (por ejemplo, medir en la misma posición para una serie de imágenes, etc.), automatizando diversas tareas (Caravallo, 2006).

Según la bibliografía consultada se tienen los siguientes antecedentes que dieron origen a este trabajo.

6.- ANTECEDENTES

6.1.- EVALUACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD EN RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE LODOS PAPELEROS COMO

ENMIENDA ORGÁNICA EN SUELOS AGRÍCOLAS (Luyando, 2014).

Se estudió la aplicación de lodos papeleros como enmienda orgánica en suelos agrícolas ubicados en las adyacencias del Lago de Valencia, Estado Carabobo en La Agropecuaria La Concepción, este se realizó en el Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (Ambioquim). Para ello, se midieron indicadores de calidad del suelo: físico (contenido de humedad), químicos (pH, Conductividad Eléctrica, CIC y Bases Intercambiables) y biológicos (Contenido de Materia Orgánica, Respiración Basal, Carbono de la Biomasa microbiana y actividades enzimáticas: Ureasa y Celulasa) bajo un diseño de experimento de 2 factores y 3 niveles, el cual permitió comparar resultados entre días de incubación (10, 20 y 30) y porcentaje de lodo paplero aplicado al suelo 0 % (LP0), 1 % (LP1) y 10 % (LP10). De acuerdo a estos resultados se consiguió que el lodo paplero aplicado produce cambios positivos sobre los indicadores de la calidad del suelo en estudio, siendo el sistema: días de incubación igual a 20 y con 10% de concentración de lodo (LP10) quien generó un mayor aumento en los valores del suelo. El parámetro que reflejó mayor sensibilidad resultó ser la respiración basal del suelo con un coeficiente de variación de 108,11 %.

6.2.- DEGRADACIÓN DE CELULOSA EN LOTES AGRÍCOLAS BAJO SIEMBRA DIRECTA (Gómez et. al, 2011).

El objetivo fue evaluar la degradación de celulosa y caracterizar el consorcio microbiano involucrado, en suelos agrícolas con diferentes situaciones de manejo bajo siembra directa, teniendo en cuenta la funcionalidad y diversidad presente. Se tomaron muestras de suelos en Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale, en tres tratamientos de uso del suelo: 1) Buenas Prácticas con rotación de cultivos; 2) Malas Prácticas, tendencia y 3) Ambiente Natural, monte o pastizal. La actividad celulolítica se evaluó utilizando placas de suelo con microdiscos de papel. Cada 7 días se realizó el

recuento de los microdiscos degradados y los morfotipos de colonias que se desarrollaron. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA, con prueba de Tukey ($P < 0.05$). El porcentaje de degradación y la velocidad mostraron diferencias temporales entre ambientes y tratamientos. Se desarrollaron 26 morfotipos, algunos en la mayoría de los ambientes y, otros en un determinado ambiente. En conclusión, con el uso de técnicas tradicionales e integrales hemos podido evaluar de manera sistémica la actividad celulolítica de suelos agrícolas bajo siembra directa con diferentes manejos, y cuantificar preliminarmente los morfotipos de microorganismos asociados a la descomposición de los residuos orgánicos.

6.3.- AJUSTE Y VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULASA EN SUELOS A PARTIR DE LA VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AZÚCARES REDUCTORES (Albarrán, 2008).

El objetivo principal del trabajo fue desarrollar, ajustar y validar un procedimiento espectrofotométrico que, respecto a los existentes, incrementa la precisión en la medida de la actividad de celulasa a fin de hacerlo lo más útil posible a la medida del seguimiento de procesos como compostaje, variación de la calidad del suelo, etc. Los estudios se concentraron en los análisis de la influencia del pH y temperatura de digestión y el tamaño de las partículas de la muestra sobre la exactitud, sensibilidad y precisión del procedimiento. Los resultados obtenidos mostraron que, dentro de los rangos estudiados, (pH 5 a 8, temperaturas entre 20 y 60 °C y tamaño de partículas ≤ 2 mm ó $\leq 0,2$ mm), haciendo la digestión a 40 °C y a pH 5,0 con un tamaño de partícula $\leq 0,2$ mm se logra el máximo de precisión mientras que si las determinaciones se efectúan a pH 5,3 la sensibilidad se incrementa en un 6 % mientras

que la precisión disminuye a la mitad respecto a la obtenida a pH 5,0.

6.4.- CAPACIDAD DE DEGRADAR CELULOSA A DIFERENTES PROFUNDIDADES DE MUESTREO (Romero *et al*, 2009)

El objetivo fue evaluar la capacidad de degradación de celulosa en tres profundidades de muestreo. Para ello se trabajó con 90 muestras de suelos provenientes de tres profundidades diferentes para cada sitio, (0-5 cm), (5-10 cm) y (10-20 cm). Se utilizaron placas de Petri con 30 gramos de suelo, los cuales fueron humedecidos, para luego colocar los microdiscos de papel de filtro como fuente de celulosa. Se llevaron a incubación, efectuándose los controles a los 14 días y 28 días. Se registró el porcentaje de Masa Remanente determinando el porcentaje de degradación. Con los resultados se realizaron los análisis estadísticos correspondientes. De lo obtenido se pudo comprobar que la mayor actividad celulolítica, se encuentra en los primeros 5 centímetros, presentando un 18,57% más de degradación que la profundidad de 5 a 10 centímetros y un 29,24% más que la de 10 a 20 centímetros, y la profundidad de 5 a 10 centímetros se diferencia en un 10,67% más con respecto a la profundidad de 10 a 20 centímetros, por lo que existe una diferencia significativa entre 0-5 centímetros y 10-20 centímetros. Los resultados que presentaron mayor coeficiente de variación fueron los obtenidos con los muestreos de 10 a 20 cm. A partir de la información obtenida, se puede decir que la profundidad entre 0 y 10 cm presenta la mayor actividad celulolítica y menor variabilidad en sus resultados, pudiéndose ajustar en posteriores análisis a un muestreo entre 0-10 cm de profundidades.

7.- MARCO METODOLOGICO

7.1.- Selección de muestras de suelo a estudiar

Inicialmente se analizaron 8 suelos de diferente procedencia. Los suelos que se analizaron fueron

Muestra	Ubicación	Características	Referencia
#1	Mini Finca Bajos de Guataparo. Tocuyito. Edo. Carabobo.	Suelo agrícola pH ($6,87 \pm 0,05$) CE (254 ± 22) $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ MO ($1,5 \pm 0,1$) %	Devis, 2016
#2	Sector Araguaita (Boca del Río), en las adyacencias del Lago de Valencia en La Agropecuaria "LA CONCEPCIÓN".	Suelo agrícola pH ($6,5 \pm 0,1$) CE (759 ± 29) $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ MO ($1,5 \pm 0,1$) %	Martínez, 2015
#3	Empresa acerera ACERVEN en Tinaquillo, Edo. Cojedes (Zona 1B).	Suelo contaminado pH ($10,41 \pm 0,04$) CE ($12,23 \pm 0,01$) $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ MO ($0,57 \pm 0,03$) %	Salamanca, 2015
#4	Empresa acerera ACERVEN en Tinaquillo, Edo. Cojedes (Zona 2B).	Suelo contaminado pH ($6,88 \pm 0,10$) CE ($84,77 \pm 0,11$) $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ MO ($0,8 \pm 0,3$) %	Salamanca, 2015
#5	Empresa acerera ACERVEN en Tinaquillo, Edo. Cojedes (Control).	Suelo contaminado pH ($6,94 \pm 0,07$) CE (290 ± 66) $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ MO ($2,6 \pm 0,1$) %	Márquez, 2016

#6	Mini Finca el Encanto. Tocuyito. Edo. Carabobo.	Suelo agrícola pH (7,03 ± 0,1) CE (482 ± 10) $\mu\text{S cm}^{-1}$ MO (3,3 ± 0,1) %	Cordero, 2016
#7	Cerro El Casupo. Valencia. Edo. Carabobo.	Suelo forestal pH (5,74 ± 0,02) CE (42,7 ± 0,5) $\mu\text{S cm}^{-1}$ MO (4,2 ± 0,9) %	Coordenadas 10 13' 7" N 68 1' 50" O
#8	Cerro El Casupo. Valencia. Edo. Carabobo.	Suelo forestal pH (5,4 ± 0,1) CE (23,0 ± 0,6) $\mu\text{S cm}^{-1}$ MO(3,0 ± 0,2) %	Coordenadas 10 12' 57" N 68 1' 49" O

Se realizó un análisis de Actividad de Celulosas totales mediante el método colorimétrico de DNS que se describe en la sección 7.2, luego se tomaron las dos muestras que tuvieron mayor cantidad de actividad celulolítica con el fin de realizar el análisis de cuantificación de la degradación mediante el método de papel de filtro.

A las muestras seleccionadas se les determino pH, conductividad eléctrica y materia orgánica mediante los procedimientos explicados a continuación.

7.1.1. pH y conductividad eléctrica (Olarte, 1979 modificado)

Para la obtención de los valores de pH y conductividad eléctrica (relación 1:2) se pesaron 3 g de suelo y se mezclaron con 6 mL de agua destilada en un tubo tipo Falcon, sometiéndolo a agitación por 30 minutos en un agitador orbital, luego se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm. Al sobrenadante se le determino pH, con un

pH-metro, y la conductividad eléctrica con el conductímetro, cada medida se realizó por triplicado.

7.1.2. Materia orgánica (%MO)

Se empleó el método por calcinación descrito por Jaramillo (2002). Se pesaron 5 g de suelo seco al aire y se tamizó a 2 mm en crisoles de porcelana, se llevaron a la estufa a 105°C durante 24h; transcurrido este tiempo se colocaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y pesar nuevamente. Posteriormente, se calcinaron las muestras en una mufla a 400°C durante 24 horas, se colocaron en un desecador hasta enfriar y se pesaron nuevamente. Se calculó la diferencia de peso entre las medidas antes y después de calcinar; esta diferencia de peso equivale a la cantidad de materia orgánica que se perdió de la muestra por efecto de la calcinación. Se expresa la diferencia de peso en porcentaje, con respecto al peso inicial de la muestra (seca a 105°C), cada medida se realizó por triplicado.

7.2.- Determinación de la actividad celulasas mediante el método colorimétrico de DNS. (Ghose, 1987; Wood y Bhat, 1988).

Para cuantificar la actividad total de celulasas en las muestras de suelo por el método colorimétrico de DNS se siguió el procedimiento descrito a continuación:

1. Preparación de soluciones:

a. Solución de 250mL de DNS: se pesaron 2,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y se disolvió en 50mL de NaOH 2M. Se agregó 75 g de tartrato de sodio/potasio y se agito en calor hasta completa dilución. Se aforo a 250mL con agua destilada.

b. Buffer acetato pH 5,0: se disolvieron 16,4 g de acetato de sodio en aproximadamente 500mL de agua destilada. Se añadió 11,4 mL de ácido acético concentrado y se ajustó el pH a 5,0 con NaOH 2M. Se llevó a un volumen final de 1000 mL.

c. Solución madre de glucosa 0,003M: se disolvió aproximadamente 0,1350 g de glucosa en buffer acetato pH 5,0. Se aforo hasta un volumen final de 250 mL.

d. Soluciones de glucosa a diferentes concentraciones (curva de calibración): se tomaron 4 balones aforados de 25 mL. Se añadió alícuotas de 4, 8, 12 y 16 mL de solución concentrada de glucosa 0,003M en cada uno respectivamente. Se llevó al aforo con buffer acetato pH 5,0.

2. Incubación del suelo:

Se pesó aproximadamente 2,0 g de suelo seco y tamizado en tubos plásticos de tipo falcon, se le agregó 10mL de buffer al blanco y una tira de papel de filtro de 1x6 cm previamente picada a las muestras. Posteriormente se dejó incubando por 7 días (168 horas) a 37°C en un baño termostatado. Pasado este tiempo se centrifugo a 3000 rpm por 10 minutos. Se tomó una alícuota de 2,0 mL del sobrenadante al cual se le añadió 2mL de DNS y 2,0 mL de agua, se esperó el desarrollo del color en un baño de maría a 80°C y se midió la absorbancia a 540nm en el espectrofotómetro (Spectronic 20), cada medida se realizó por triplicado.

3. La curva de calibración

Se midió tomando 3,0 mL de cada solución de referencia de glucosa y añadiendo 3,0 mL de DNS, se desarrolló el color en baño de agua a 80°C y se midió la absorbancia a 540nm en el espectrofotómetro (Spectronic 20), cada medida se realizó por triplicado. Finalmente la actividad celulasa se determinó utilizando la Ec. 1.

7.3.- Cuantificación de la degradación del papel de filtro: Método del Papel de Filtro

Para cuantificar el porcentaje de degradación de la celulosa presente en el papel de filtro se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

Se pesó aproximadamente 10,0 g de suelo seco y tamizado. Se prepararon sistemas en capsulas de Petri, una por cada muestra de las repeticiones de los tratamientos (3 réplicas para cada tipo de suelo). Sobre las mismas se colocaron 10 microdiscos de papel de filtro como fuente de celulosa, y se incubaron a las condiciones que se describen en el diseño del experimento, controlando y manteniendo periódicamente, por gravimetría, el nivel de humedad entre 40 y 60% de su capacidad de retención de agua. La incubación del sistema se realizó por un tiempo de 45 días continuos. Al cumplirse este periodo se llevaron los sistemas para registrar el porcentaje de degradación por medio de una foto microscópica. Para ello se tomó cada una de las capsula, con la ayuda de una pinza se tomó cada microdisco, los cuales fueron lavados primeros con agua destilada, una solución jabonosa al 10 % y por último con una solución de Nonilfenol 0,1M, luego fueron puestos a secar en la estufa. Después se colocaron los discos en un microscopio digital marca Winmax con cámara integrada de 5 MP para realizar la captura de imágenes de cada uno de los microdiscos, en total fueron 20 fotos para cada capsula. Luego se realizó el análisis de imágenes por medio del programa ImageJ, donde se determinó el porcentaje de degradación en cada uno.



Figura N° 3. Microscopio digital utilizado

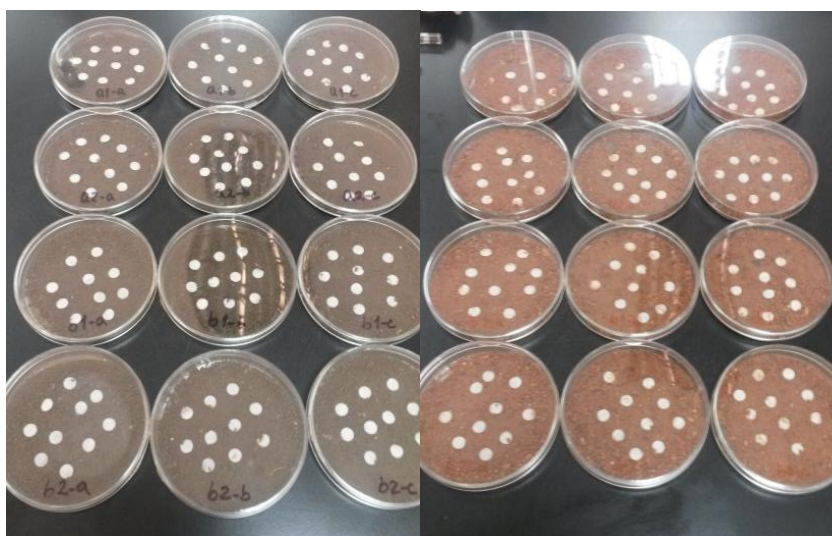


Figura N° 4. Montaje del sistema

7.4.- Cuantificación de la degradación del papel de filtro: Análisis de Imágenes.

Para determinar la degradación del papel de filtro mediante el análisis de imágenes se utilizó el Software ImageJ.

- Se abrió el programa ImageJ.

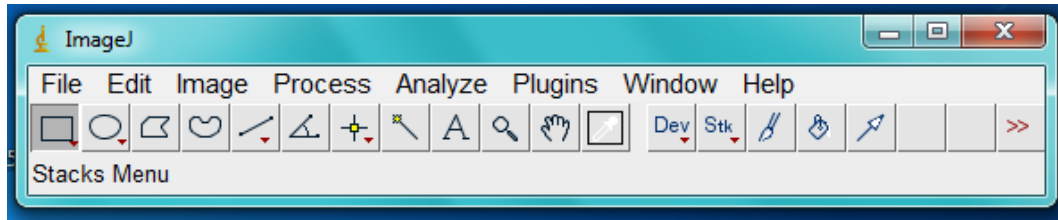


Figura N° 5. Entorno del programa ImageJ.

- Desde el menú File seleccionamos Open y en el cuadro de diálogo elegimos la imagen que deseamos abrir.

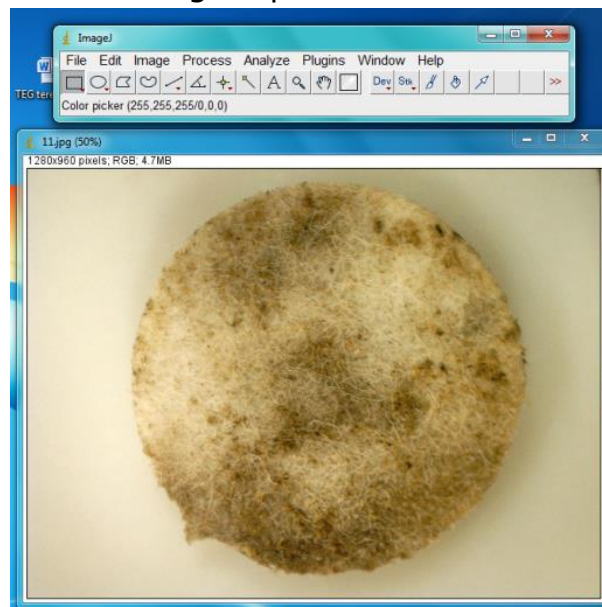


Figura N° 6. Abrir la imagen digital en el programa ImageJ.

- Se seleccionó el diámetro del microdisco con la herramienta "Straight".

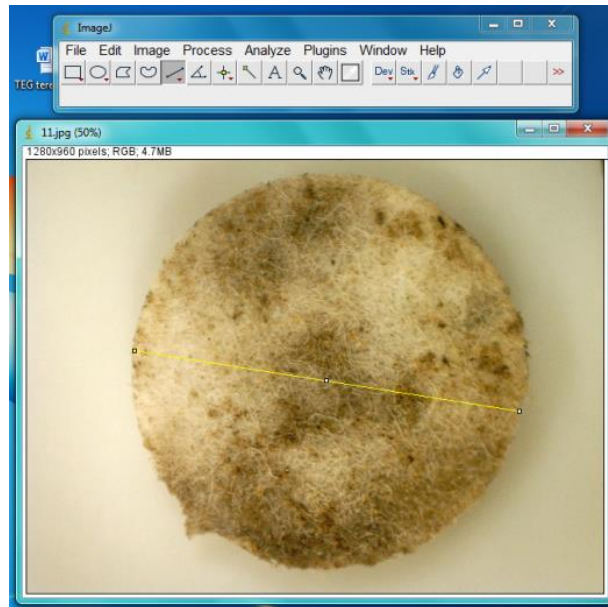


Figura N° 7. Selección del diámetro del disco.

- Para realizar mediciones o colocar una barra de escala, se requiere que ImageJ sea "calibrado". Para esto se tiene que tener la relación de micras / pixeles presente en nuestra imagen a analizar. Para calibrar a ImageJ, ir a "Analyze" | "Set Scale"
-

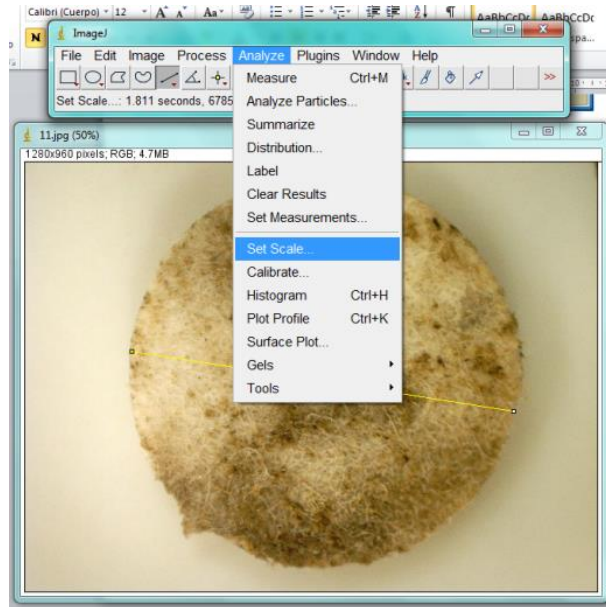


Figura N° 8. Calibrado de ImageJ.

- Se coloca el valor en milímetros conocido del diámetro del disco, en este caso se midió con un Vernier, teniendo una medida de aproximadamente de 7mm. Si es el caso de que se tienen varias imágenes que se desean analizar y están todas capturadas al mismo aumento, se selecciona "Global" para que los ajustes permanezcan durante el análisis de todas las imágenes.

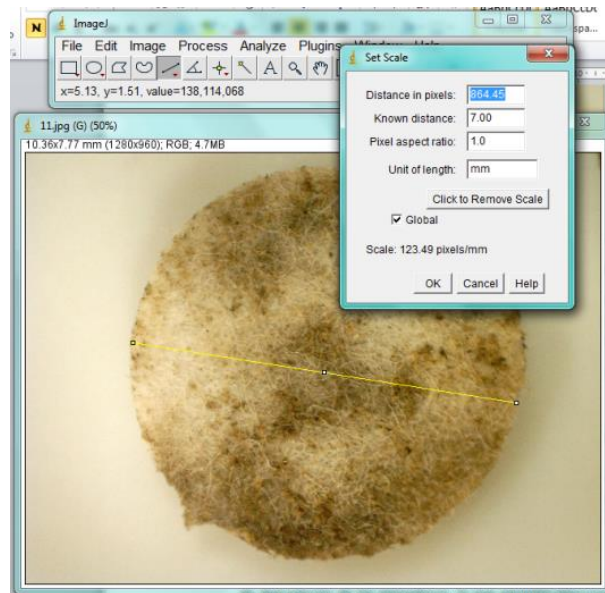


Figura Nº 9. Cuadro de dialogo de calibrado.

- Se realiza el cambio a 8 bits utilizando "Image" | "Type" | "8-bit". Al dar click sobre "8-bit" la imagen automáticamente se cambiará a dicha profundidad de color.

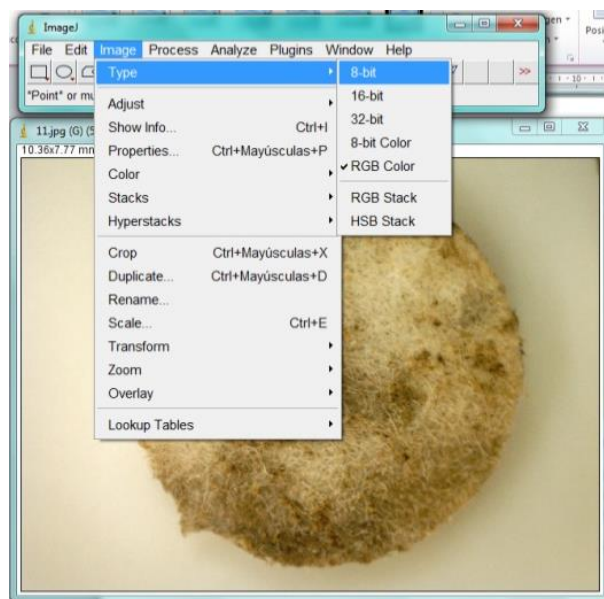


Figura Nº 10. Cambio de profundidad de color a 8 Bit

- En la barra de herramientas seleccionamos "Oval" y seleccionamos el disco completamente, observando detenidamente la parte posterior de la barra donde tendremos el diámetro del mismo para verificar que se esté tomando la medida adecuada.

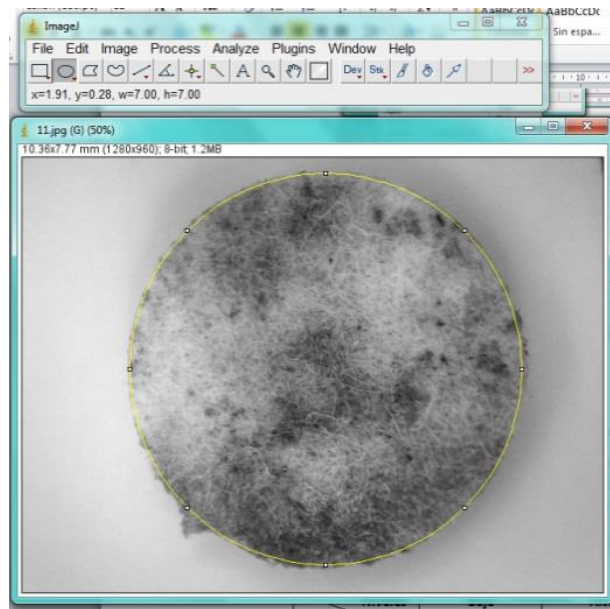


Figura N° 11. Selección del disco con la herramienta "Oval".

- Ir a "Image" | "Adjust" | "Threshold". E inmediatamente la imagen se colocara en blanco y negro. Threshold convierte la imagen de 8 bits en una imagen pseudo-binaria. En la ventana de Threshold, la barra superior selecciona el valor umbral de pixel, allí se lleva al pico máximo del histograma.

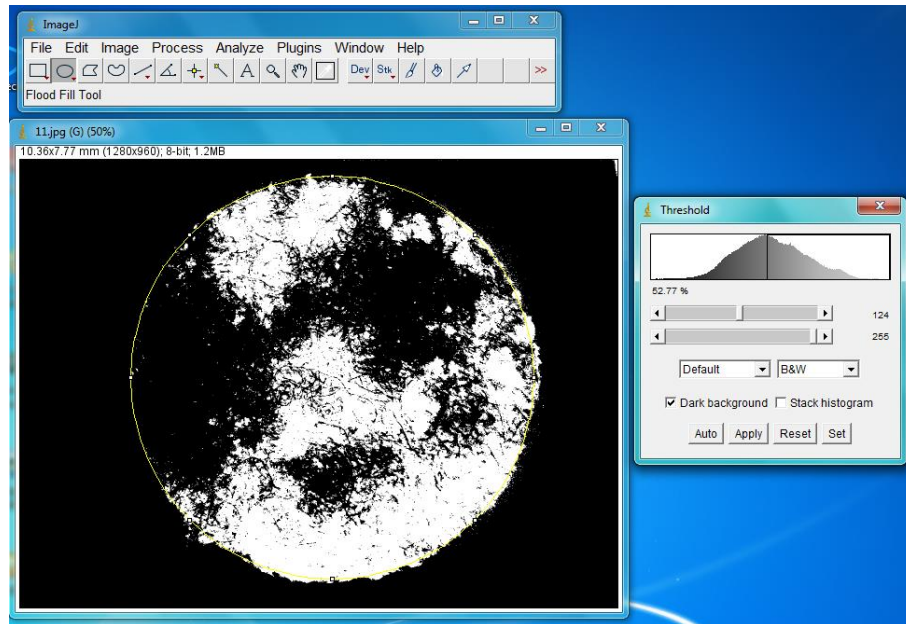


Figura N° 12. Ventana de la Herramienta "Threhold".

- Para realizar el conteo, primero se le tiene que indicar a ImageJ los parámetros que se requieren medir. Esto se realiza solamente durante la primera medición, posteriormente los ajustes quedarán guardados para futuras sesiones. Para realizar esto, ir a "Analyze" | "Set Measurements...". Seleccionando Área como la más importante.

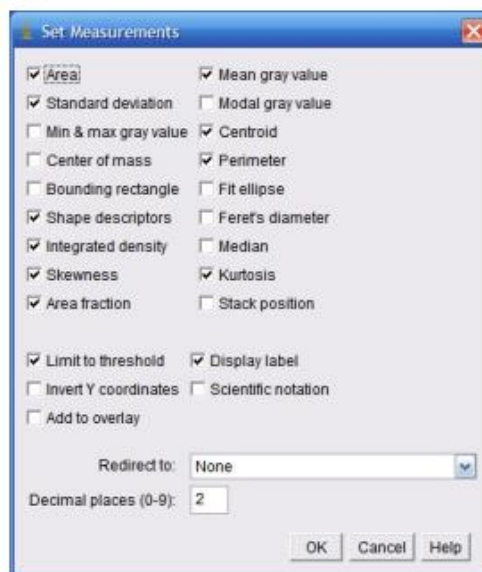


Figura N° 13. Ventana para seleccionar los parámetros a medir

- Una vez que se seleccionaron los parámetros, dar click en "OK". Para comenzar a realizar las mediciones, ir a "Analyze" | "Analyze Particles...":

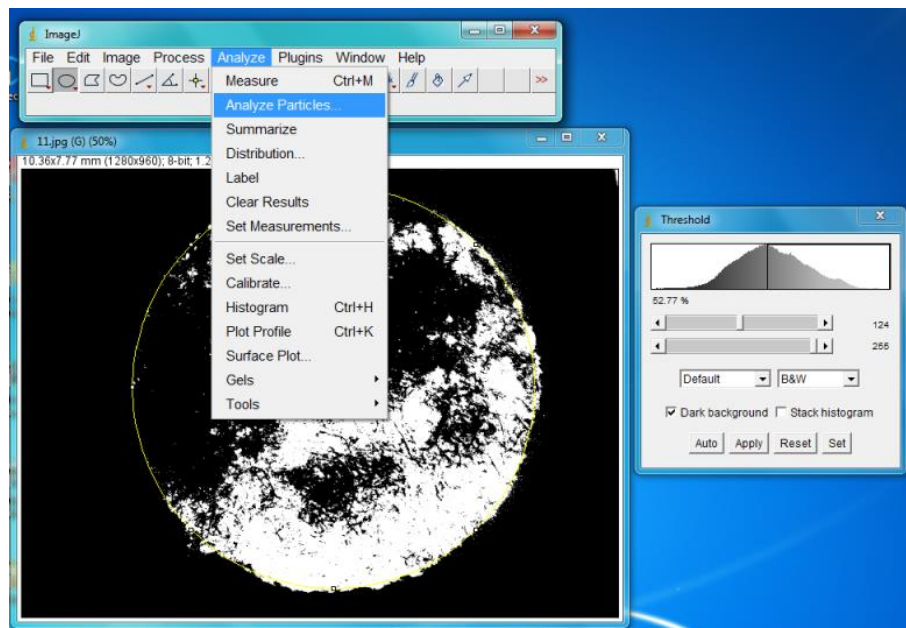


Figura N° 14. Comando para acceder al Análisis de imágenes

- En "Size" se coloca el rango de tamaño de las estructuras a analizar; en "Circularity" que tan circulares deben ser las estructuras a considerar; en "Show" seleccionar "Outlines" para que nos muestre los contornos de las estructuras presentes en la imagen que se tomarán en cuenta para las mediciones. Seleccionar "Display results" y "Summarize". Una vez seleccionados estos parámetros. Inmediatamente se comienza la cuantificación con los parámetros seleccionados. Una vez terminado el proceso, ImageJ abrirá tres nuevas ventanas, Outlines, Summary y Results.



Figura N° 15. Ventana para el Análisis de imágenes

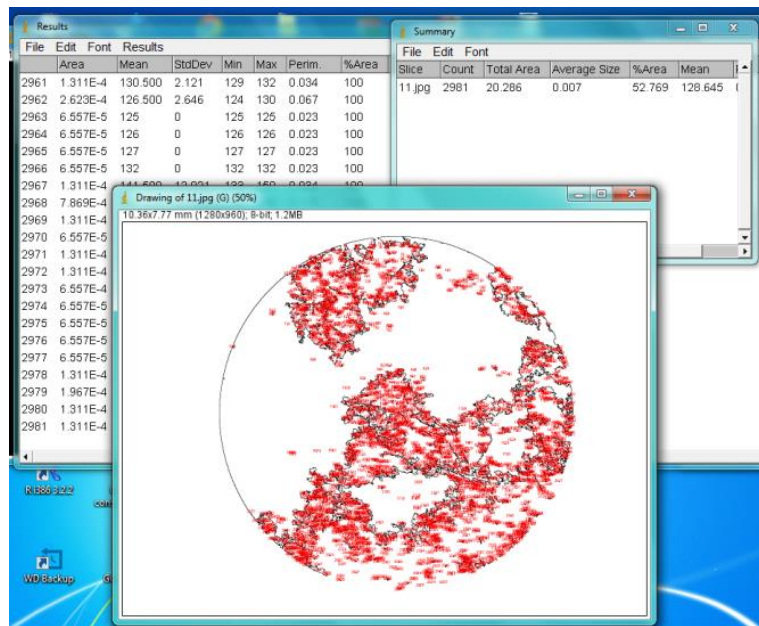


Figura N° 16. Ventanas de resultados obtenidos para cada imagen.

7.4.1.- Estimación de la actividad enzimática mediante la degradación de papel de filtro

Para expresar el porcentaje de degradación en unidades de Actividad enzimática, se partió del porcentaje de degradación obtenido, se pesaron los microdiscos de papel de filtro (10 mediciones) para obtener los microgramos de celulosa en cada uno, sabiendo que hay un 98% de celulosa en cada papel de filtro, se calcularon los microgramos totales de celulosa en cada uno. Haciendo uso de una relación en función de la cantidad liberada de glucosa se obtiene la Actividad Enzimática con ayuda de la Ec. 1.

7.5.- Estudio del efecto de la Temperatura, pH y tiempo de incubación

Para determinar el efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática de la celulasa, se aplicó un diseño de experimento tomándose estos dos factores como variables, dejando inicialmente el tiempo fijo en 45 días.

El modelo de diseño aplicado se muestra en la tabla N° 2.

Tabla N° 2. Factores y niveles aplicados al diseño de experimento

Niveles	Bajo	Alto
Factores		
pH	5	8
Temperatura	Ambiente	45

Se prepararon los sistemas según la metodología descrita anteriormente (sección 7.3), por triplicado. Las muestras se identificaron con las letras A o B seguidas del número 1 o 2 dependiendo de la condición de temperatura y pH a la cual fueron incubados como se muestra en la tabla N° 3.

Tabla N° 3. Identificación de las muestras según las condiciones de pH y temperatura

A1	T ambiente	pH 5
A2	T: 45 °C	pH 5
B1	T ambiente	pH 8
B2	T: 45 °C	pH 8

Al cumplirse el tiempo de incubación (45 días) se cuantifico el porcentaje de degradación de los microdiscos, lo que permitió seleccionar las condiciones de mayor degradación los cuales fueron pH 5 y Temperatura ambiente.

Posteriormente se prepararon sistemas con las condiciones de pH y temperatura obtenidas con la misma metodología de la sección 7.3, para así analizar el efecto del tiempo de incubación, realizando las determinaciones de la degradación por medio del análisis de imágenes cada 7 días, hasta los 45 días de incubación.

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El programa Statgraphics Centurión (30 días de prueba otorgados por el fabricante) se empleó para realizar los siguientes estudios estadísticos:

La tabla ANOVA y el Contraste de Múltiple Rango. Estos se emplearon para evaluar si existe diferencia significativa o no entre los promedios de cada uno de los sistemas suelo-enmienda evaluados con respecto al control.

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo y se emplea el factor F-ratio, para establecer si existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las variables a un nivel de confianza del 95,0%.

El Contraste de Múltiple Rango aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher. Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

8.- DISCUSION DE RESULTADOS

8.1. Determinación de Actividad de celulasas mediante el método colorimétrico de DNS

Se determinó la actividad enzimática por el método colorimétrico de DNS, a 8 muestras de suelo con características distintas, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla N°4.

Tabla N° 4. Actividad Enzimática obtenida por el método colorimétrico de DNS.

Muestra	Actividad Celulasa (μg glucosa/g*h)*
1	(0,27 \pm 0,02)
2	(0,34 \pm 0,08)
3	(0,03 \pm 0,01)
4	(0,09 \pm 0,01)
5	(0,351 \pm 0,008)
6	(0,19 \pm 0,02)
7	(2,1 \pm 0,2)
8	(0,80 \pm 0,02)

*Promedio de 3 réplicas.

Para realizar el estudio de la determinación de la actividad enzimática de celulasas por medio de la degradación de papel de filtro mediante el análisis de imágenes, se seleccionaron las dos muestras de suelo donde se obtuvo la mayor actividad celulolítica, las cuales resultaron ser las muestras 7 y 8, dando valores de (2,1 \pm 0,2) y (0,80 \pm 0,02) μg glucosa/g*h respectivamente.

Los distintos resultados de actividad enzimática total se deben a que cada tipo de suelo presenta diferentes características y condiciones en el ambiente donde se encontraba. Los resultados más bajos (muestra 3 y 4) se obtuvieron en suelos contaminados, donde es normal que presenten una disminución de la actividad enzimática debido a la contaminación. Las muestras 1, 2 y 6 se tratan de suelos agrícolas, donde la actividad enzimática se puede

inhibir debido a la presencia de fertilizantes inorgánicos, utilizados ampliamente en sistemas agrícolas convencionales, así mismo los microorganismos pueden reducir la tasa de producción de enzimas (González-Prieto y Carballas, 1995), por lo que se reduce proporcionalmente la actividad enzimática dependiendo del uso de dichos productos.

La actividad enzimática del suelo es importante porque refleja el estado en el que se encuentran sus poblaciones microbianas y su relación con la biología del suelo, la producción de biomasa, la degradación de contaminantes y la conservación de ecosistemas (Doran, 2002; Gianfreda y Ruggiero, 2006). La liberación de enzimas es un proceso constante y, aunque las plantas y animales intervienen, son los microorganismos los que contribuyen en mayor medida a este proceso, debido a su gran biomasa, su alta actividad metabólica y su corto ciclo de vida (Cerón y Melgarejo, 2005). Los dos suelos seleccionados fueron suelos forestales, en un sentido muy general, inferimos que presentaron mayor actividad celulolítica, ya que estos suelos exhiben características peculiares debido al efecto marcado de las raíces profundas de los árboles y la asociación de organismos específicos de la vegetación forestal y la capa de hojarasca, promovido por productos de su descomposición (De las Salas, 1987), que por lo general, no han sido tratados con ningún tipo de químicos que pueda interferir en el hábitat de los microorganismos presentes en él.

Esta actividad enzimática se obtuvo por el método colorimétrico de DNS, la cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm.

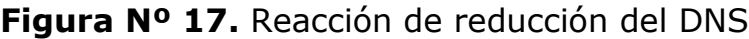


Tabla N° 5. Propiedades fisicoquímicas de los suelos estudiados.

*Promedio de 3 replicas

Los valores de conductividad eléctrica obtenidos fueron $(42,7 \pm 0,5)$ y $(23,0 \pm 0,6)$ mS*cm⁻¹ para las muestras 7 y 8 respectivamente, resultando en un suelo moderadamente salino (muestra 7) y ligeramente salino (muestra 8) (Soriano, 2004).

En cuanto al contenido de materia orgánica obtenido, se obtuvo para la muestra N° 7 ($4,2 \pm 0,9$) % y para la muestra N° 8 ($3,0 \pm 0,2$) %. Como era de esperar, contrastando con los demás suelos estudiados, los suelos forestales fueron los que tuvieron el mayor porcentaje de materia orgánica, esto puede ser como

consecuencia de la caída de hojarasca y las raíces de los árboles, las cuales comparadas con las de la hierba, son fuentes de materia orgánica, debido a que permanecen vivas durante muchos años (Thompson y Troeh, 2002).

8.2. Determinación de la degradación del papel de filtro mediante el análisis de imágenes.

Se estableció un diseño de experimento con distintas condiciones de pH y temperatura, para determinar la degradación de papel de filtro como metodología para estimar la actividad enzimática de celulasas. La determinación de los porcentajes de degradación se realizó utilizando el método de análisis de imágenes por el software ImageJ. Se tomaron las áreas degradadas y con ello se realizó el cálculo del porcentaje de degradación en base al área total de un disco. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 6.

Tabla N°6. Porcentaje de degradación de microdiscos de papel de filtro obtenido por el análisis de imágenes.

Muestras	Porcentaje de degradación (%)[*]
M8-A1	(64 ± 5)
M7-A1	(57 ± 1)
M8-A2	(38 ± 2)
M7-A2	(39 ± 1)
M8-B1	(41 ± 1)
M7-B1	(40 ± 3)
M8-B2	(48 ± 3)
M7-B2	(38 ± 1)

^{*}Cada replica es el promedio de 20 mediciones, y cada valor reportado es el promedio de las réplicas. (3 réplicas)

Estos resultados indican que las condiciones más favorables de degradación fueron pH 5 y temperatura ambiente. Esto concuerda con el análisis estadístico en el cual se obtiene una superficie de

respuesta (figura N° 18) en base al porcentaje de degradación, que muestra un máximo de la variable respuesta a estas condiciones. El modelo obtenido del análisis de superficie de respuesta indica el comportamiento de las variables en el proceso.

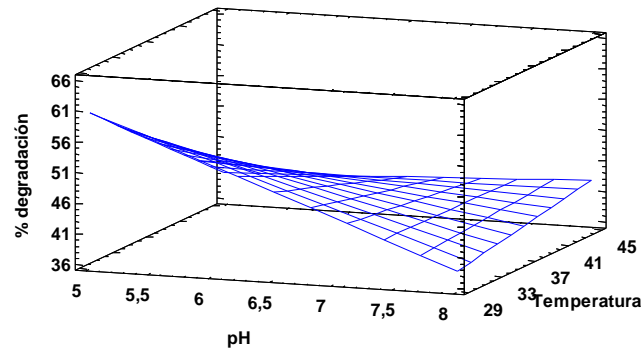


Figura N° 18. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de degradación

En la tabla N° 7 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) que particiona la variabilidad de la respuesta en valores para cada uno de los efectos, en este caso dos efectos tienen un valor-P menor que 0,05 indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0 %. El pH muestra un efecto significativo sobre la respuesta, además de la interacción de ambos factores.

Tabla N° 7. Análisis de varianza para la degradación como variable respuesta.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	190,13	1	190,13	14,49	0,03
B:Temperatura	120,13	1	120,13	9,15	0,06
AB	300,13	1	300,13	22,87	0,02
bloques	36,13	1	36,13	2,75	0,20
Error total	39,38	3	13,13		
Total (corr.)	685,88	7			

Adicionalmente, la figura N° 19 muestra las interacciones de los factores con respecto a la variable respuesta, en el cual se representan los efectos divididos entre su error estándar, en el eje de las abscisas se coloca la magnitud de cada efecto estimado, ordenado en sentido decreciente, de este modo los efectos cuyas barras superen la línea vertical (que indica el valor crítico) serán significativos (Gutiérrez y De la vara, 2008). En ese caso los valores significativos fueron la interacción pH - temperatura y el pH solo, ratificando lo obtenido por la tabla ANOVA.

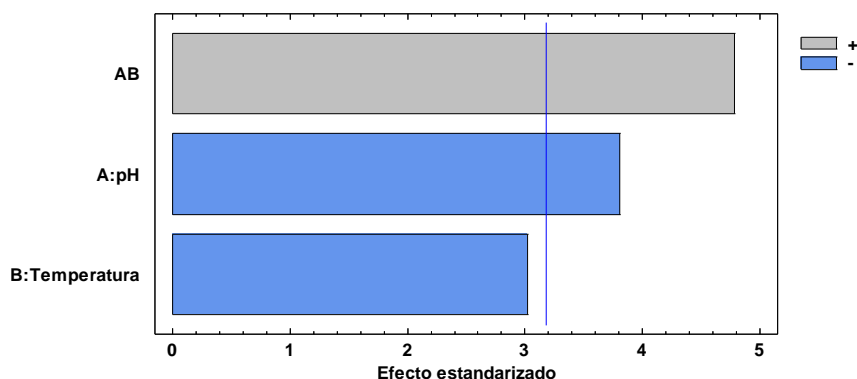


Figura N° 19. Diagrama de Pareto estandarizado, obtenido para el análisis de degradación.

Cabe destacar que cada enzima presenta condiciones diferentes y que los pH óptimos serán distintos para cada una de ellas. En este caso, según el estudio realizado, bajo condiciones de pH 5, aumentó el porcentaje de degradación, lo que implica una mayor actividad enzimática.

En general, es bien sabido que el pH y la temperatura son los factores que más influyen en la actividad de una enzima. La relación entre el pH y la actividad depende del comportamiento ácido-base del enzima y del propio sustrato. Sustrato y enzima (centro activo) pueden contener grupos funcionales ácidos y básicos, siendo su grado de disociación dependiente del pH. Los

cambios de pH en el medio conducen a la alteración en la forma de la enzima, pero no sólo en las enzimas, el pH puede afectar también las propiedades de carga y forma del sustrato. Dentro de un intervalo estrecho de pH, los cambios en las formas estructurales de las enzimas y los sustratos pueden ser reversibles. Sin embargo, para un cambio significativo en los niveles de pH, la enzima y el sustrato pueden someterse a la desnaturalización, lo que implica un cambio irreversible, y por lo tanto no habrá reacción (Montoya, 2008).

Con respecto a la temperatura sabemos que todas las enzimas necesitan una temperatura favorable, para que funcionen correctamente. La temperatura óptima donde muchas enzimas llevan a cabo sus funciones es en un intervalo de entre 30 a 40 ° C, en este caso, se obtuvo mejores resultados a temperatura ambiente (29 – 30 °C) comparada con la temperatura de 45 °C.

La velocidad de una reacción bioquímica, aumenta con la elevación de la temperatura. Esto se debe, a que el calor incrementa la energía cinética de las moléculas participantes, lo que produce una mayor cantidad de colisiones entre ellas. Por otra parte, se encuentra que sobre todo, en las condiciones de baja temperatura la reacción se vuelve lenta, ya que hay menos contacto entre el sustrato y la enzima. Sin embargo, las temperaturas extremas no son buenas para las enzimas. A temperaturas muy altas, la molécula enzimática pierde su estructura terciaria por lo tanto velocidad de reacción disminuye (Montoya, 2008). En otras palabras, una enzima desnaturalizada no lleva a cabo sus funciones normales.

8.3. Actividad de celulasas en suelos por el método del papel de filtro

En las figuras N° 20 a la N° 23 se presentan imágenes utilizadas para la determinación del porcentaje de degradación, a las diferentes condiciones de pH y temperatura manteniendo el tiempo de incubación fijo de 45 días para ambas muestras en estudio.

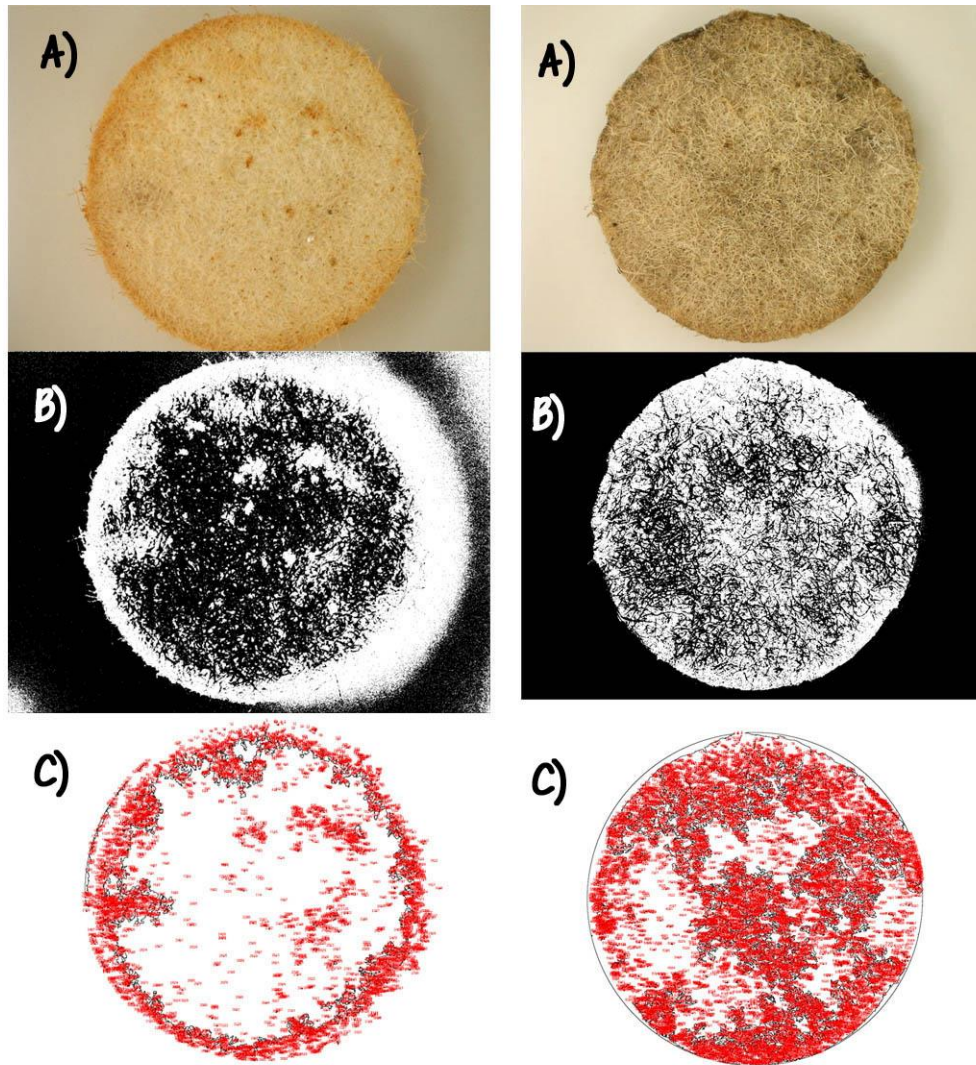


Figura N° 20. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-A1 (Izquierda) y M8-A1 (Derecha) (Condición pH 5 y Temperatura ambiente). A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threshold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

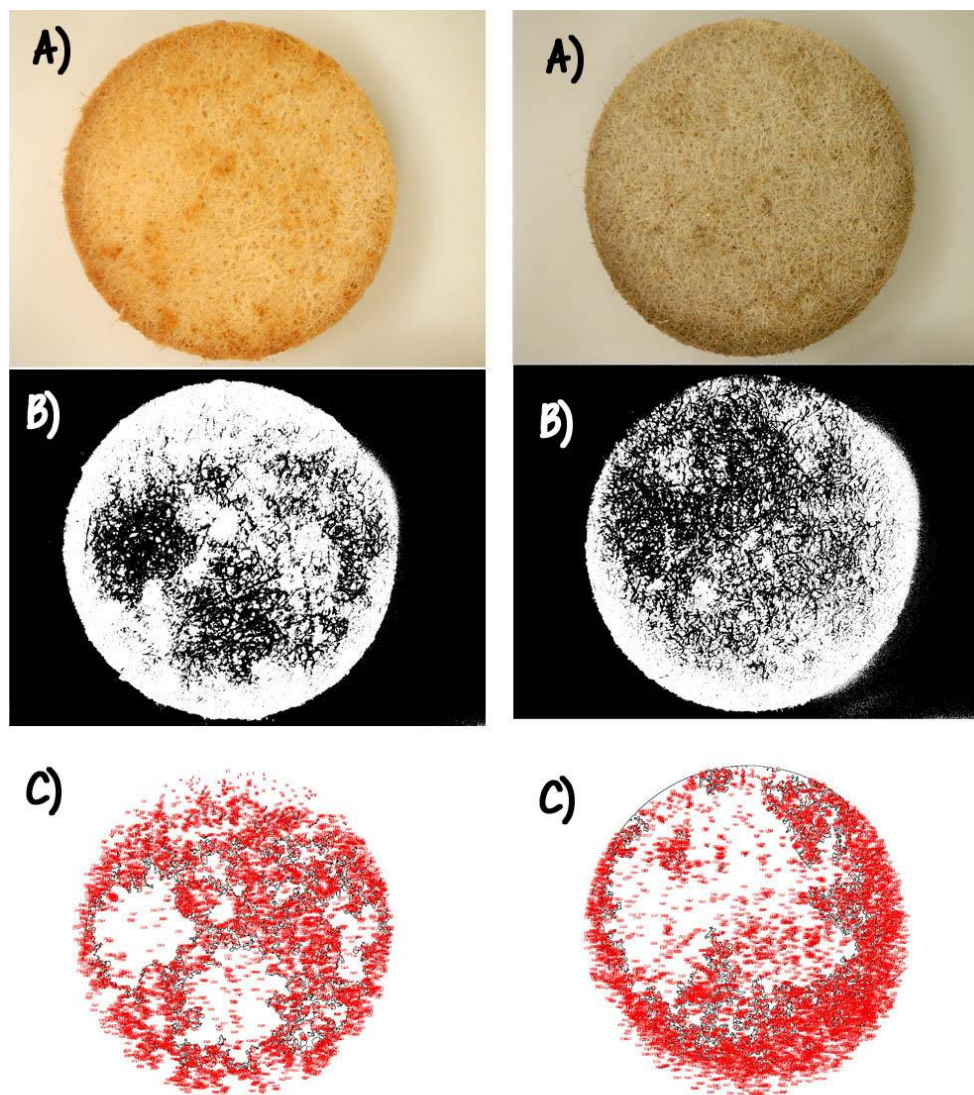


Figura Nº 21. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-A2 (Izquierda) y M8-A2 (Derecha) (Condición pH 5 y Temperatura 45°C). A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threshold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

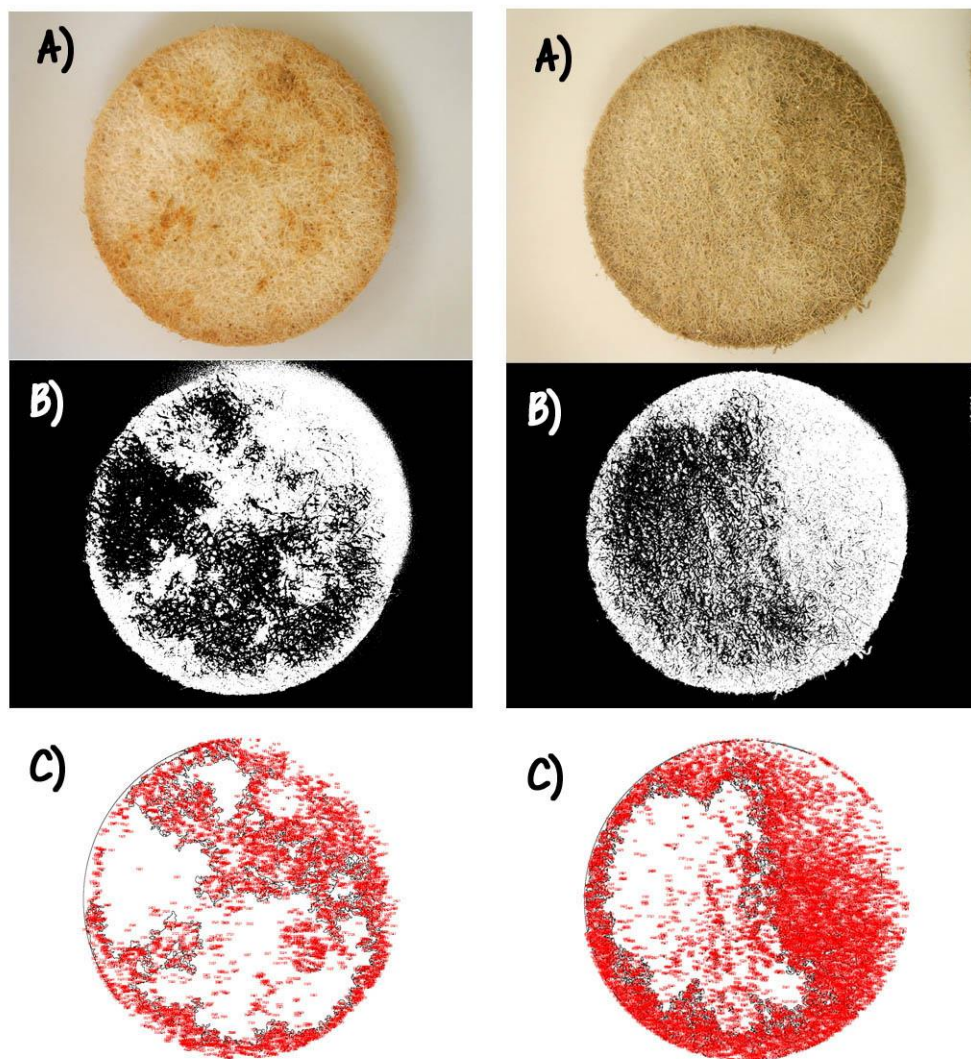


Figura N° 22. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-B1 (Izquierda) y M8-B1 (Derecha) (Condición pH 8 y Temperatura ambiente). A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threshold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

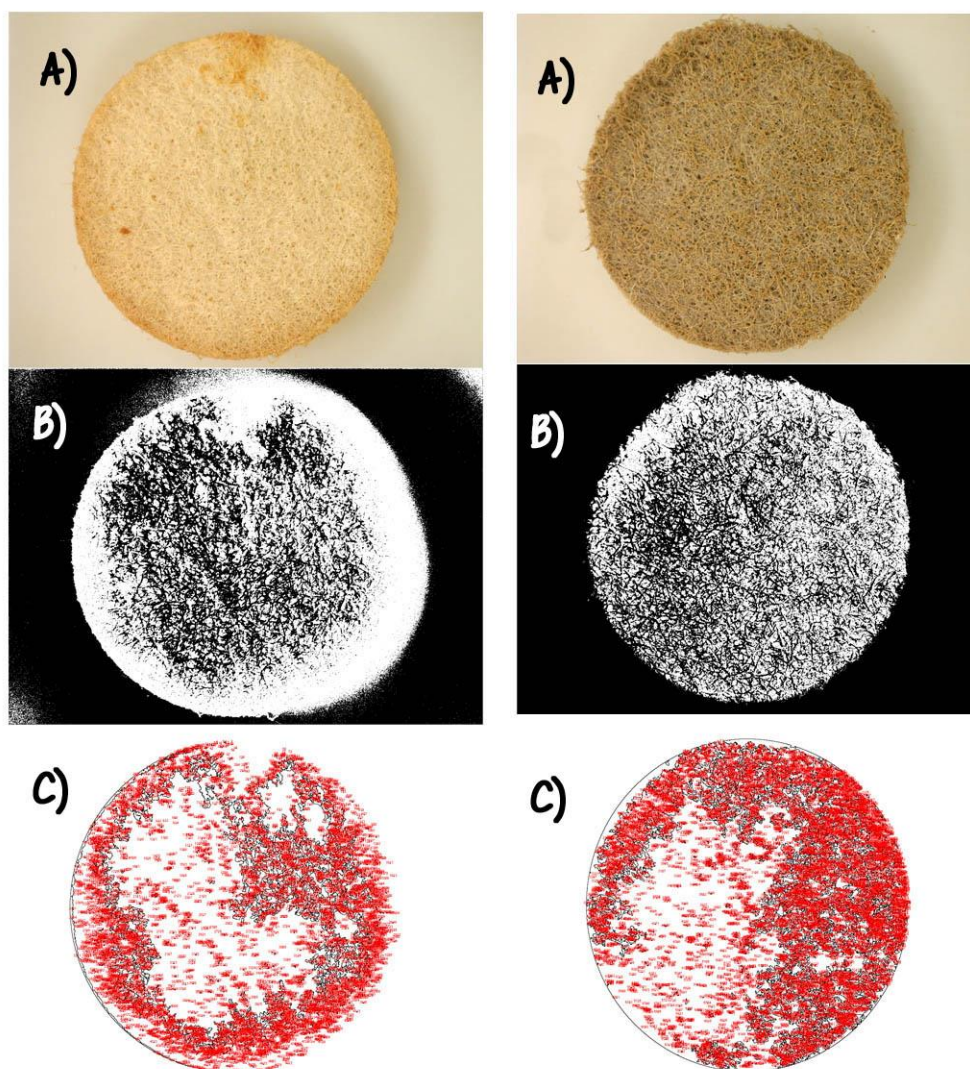


Figura N° 23. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7-B2 (Izquierda) y M8-B2 (Derecha) (Condición pH 8 y Temperatura 45°C). A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threshold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

Observando las figuras podemos ver la variabilidad de degradación de varios de los microdiscos a las diferentes condiciones de

degradación. En la figura N° 20 se observa la mayor cantidad de degradación y por ende mayor cantidad de actividad enzimática registrada. Los demás presentan distintas áreas de degradación. Cabe destacar que los porcentajes de degradación registrados para cada sistema fueron muy variables, a causa de la heterogeneidad del suelo y de lo selectivos que tienden a ser los microorganismos presentes en cada tipo de suelo. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico para obtener los valores totales de degradación y actividad enzimática.

La actividad enzimática de celulasa se estimó a partir de la cantidad de celulosa degradada calculada con los diferentes porcentajes de degradación, obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla N° 8.

Tabla N° 8. Actividad enzimática de celulasa y cantidad de celulosa degradada.

Muestras	Cantidad degradada (μg) *	Actividad Celulasa (μg glucosa/$\text{g}\cdot\text{h}$) *
M8-A1	(2887 \pm 122)	(0,27 \pm 0,02)
M7-A1	(2626 \pm 58)	(0,24 \pm 0,01)
M8-A2	(1736 \pm 63)	(0,16 \pm 0,01)
M7-A2	(1771 \pm 44)	(0,164 \pm 0,008)
M8-B1	(1842 \pm 48)	(0,17 \pm 0,009)
M7-B1	(1662 \pm 67)	(0,15 \pm 0,01)
M8-B2	(2177 \pm 75)	(0,20 \pm 0,01)
M7-B2	(1857 \pm 82)	(0,17 \pm 0,02)

*Cada replica es el promedio de 20 mediciones, y cada valor reportado es el promedio de las réplicas. (3 réplicas).

Para analizar la degradación que presentó cada sistema debemos considerar que existen dos tipos de celulosa: la nativa o cristalina, caracterizada por un alto grado de cristalinidad u ordenamiento y de polimerización, resultando así insoluble (ej.: avicel, fibras de algodón, papel de filtro, etc.); y la celulosa modificada, la cual resulta soluble (celulosa amorfa, carboximetilcelulosa,

celooligosacáridos), en las cuales el grado de cristalinidad y el grado de polimerización es menor (Levin, 1998). En el caso de los microdiscos se trata de celulosa insoluble, bastante compleja de degradar. La actividad fue cuantificada en función de la degradación por medio del análisis de imágenes. Principalmente la diferencia entre las actividades en cada caso puede deberse a que la liberación de enzimas es un proceso constante y, aunque las plantas y animales intervienen, son los microorganismos los que contribuyen en mayor medida a este proceso, debido a su gran biomasa, su alta actividad metabólica y su corto ciclo de vida (Ceron y Melgarejo, 2005).

En general, las enzimas degradadoras de polisacáridos están sujetas a mecanismos de regulación de su síntesis. Es decir no se producen de modo constante, constitutivo, sino que su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables, en particular glucosa. El inductor más eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán sintetizadas, sin embargo debido a su alto peso molecular, no son compuestos que puedan penetrar en las células y ejercer su efecto (Montoya, 2008).

Las enzimas del complejo celulasa han sido agrupadas en tres componentes mayores, que son las endoglucanasas, exoglucanas y las glucosidasas. El resultado de la acción de estas tres actividades enzimáticas es la degradación sinérgica de la celulosa, como las enzimas actúan en conjunto puede que en estas fases haya más o menos degradación por parte de alguna de ellas (Montoya, 2008). Al ser un conjunto de enzimas es más difícil para los microorganismos presentes en el suelo realizar una degradación completa del sustrato.

Cada microdisco de papel de filtro presentó distintas condiciones de degradación, lo cual pudo deberse a la complejidad de acción de la enzima, cantidad del sustrato, humedad,

temperatura de incubación o de las condiciones de pH en que se sometieron.

8.4. Efecto de tiempo de incubación sobre la determinación de la actividad de celulasas

En las figuras de la N° 24 a la N° 29, se presentan imágenes utilizadas para la determinación del porcentaje de degradación con los distintos tiempos de incubación (7, 15, 21, 28, 35 y 45 días).

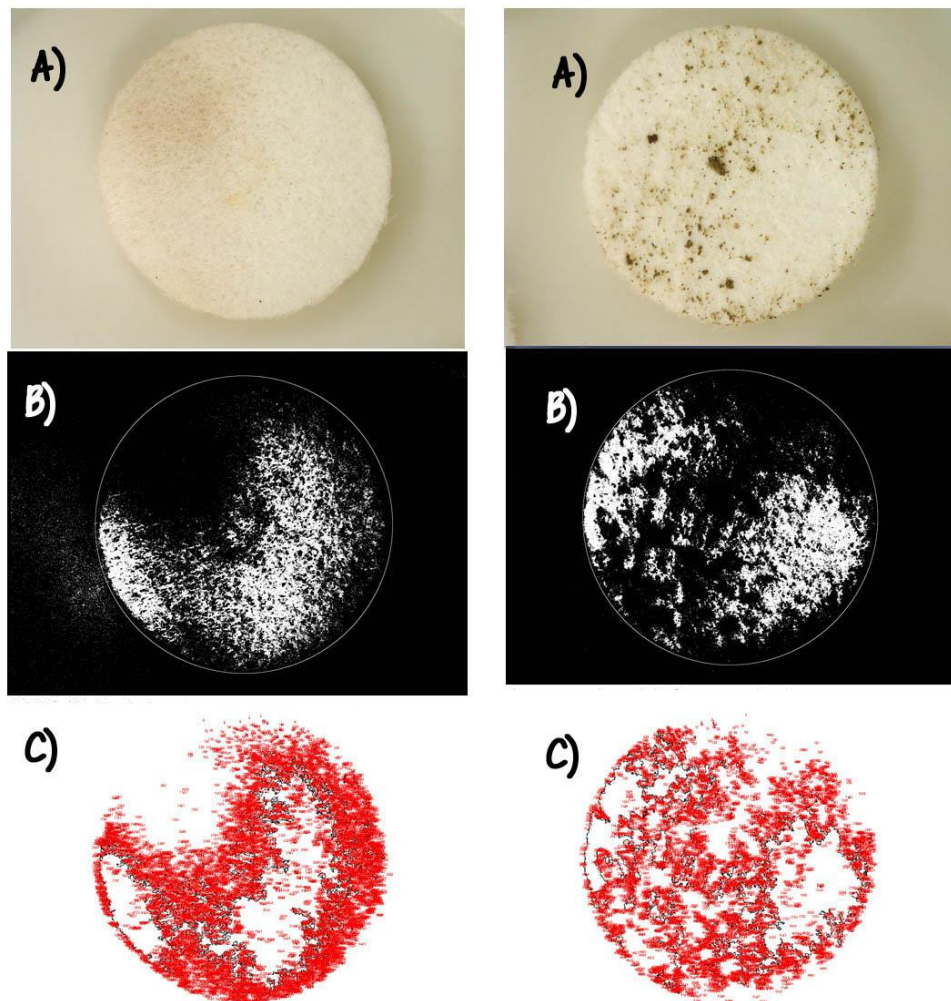


Figura N° 24. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 7 días de incubación. A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la

Herramienta "Threhold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

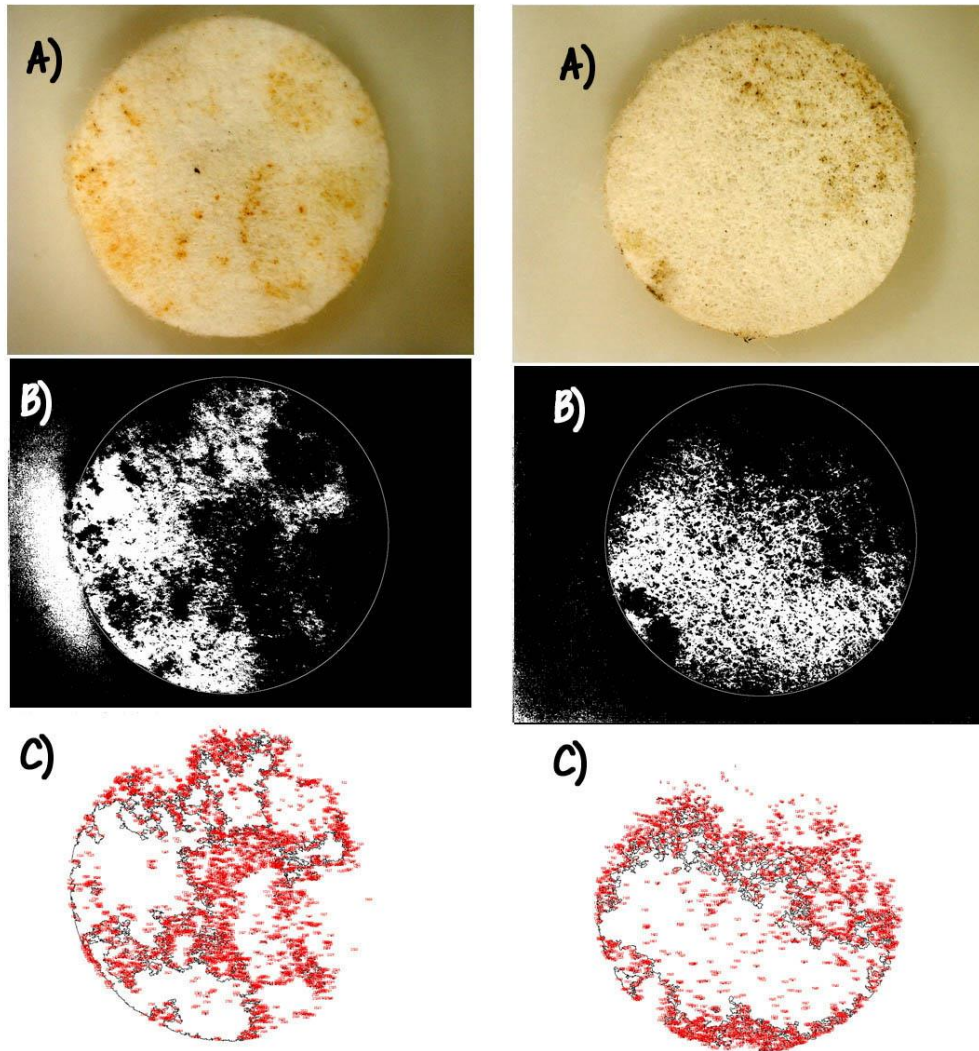


Figura Nº 25. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 15 días de incubación. A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threhold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

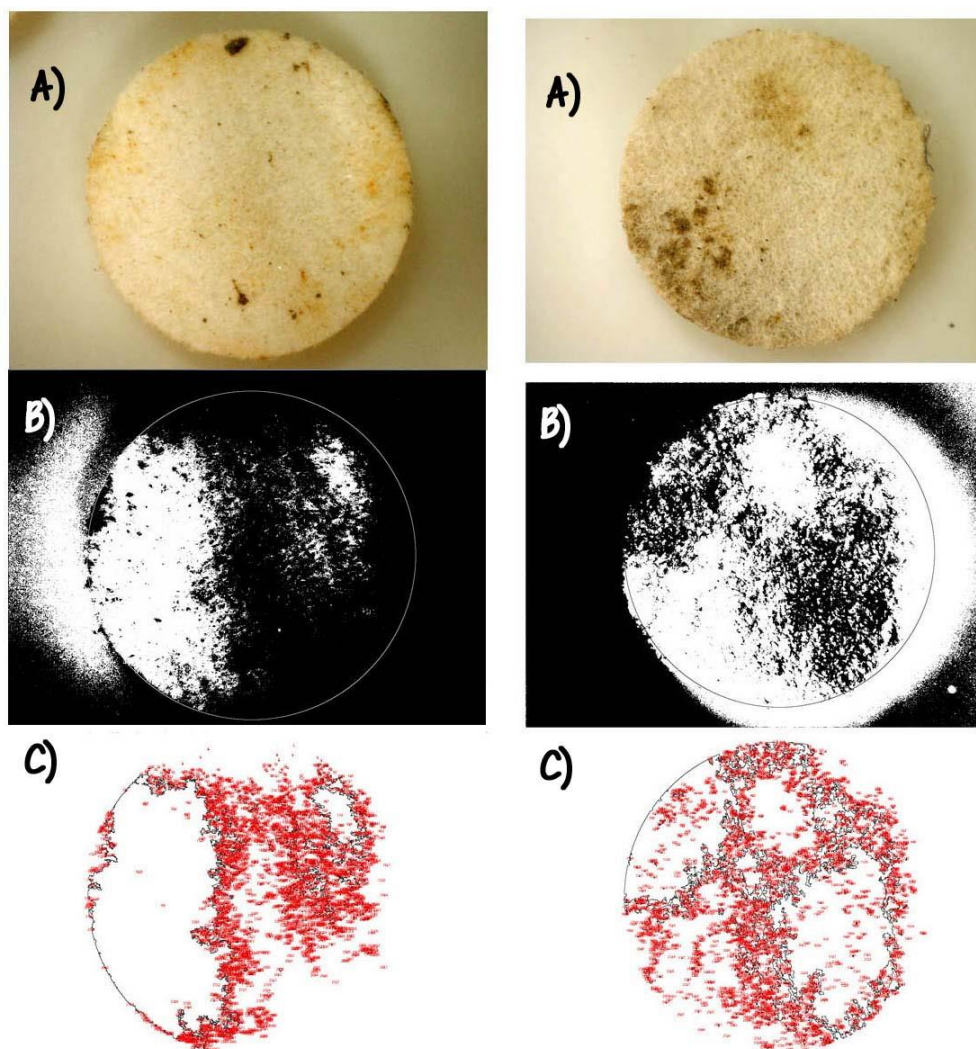


Figura N° 26. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 21 días de incubación. A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threhold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

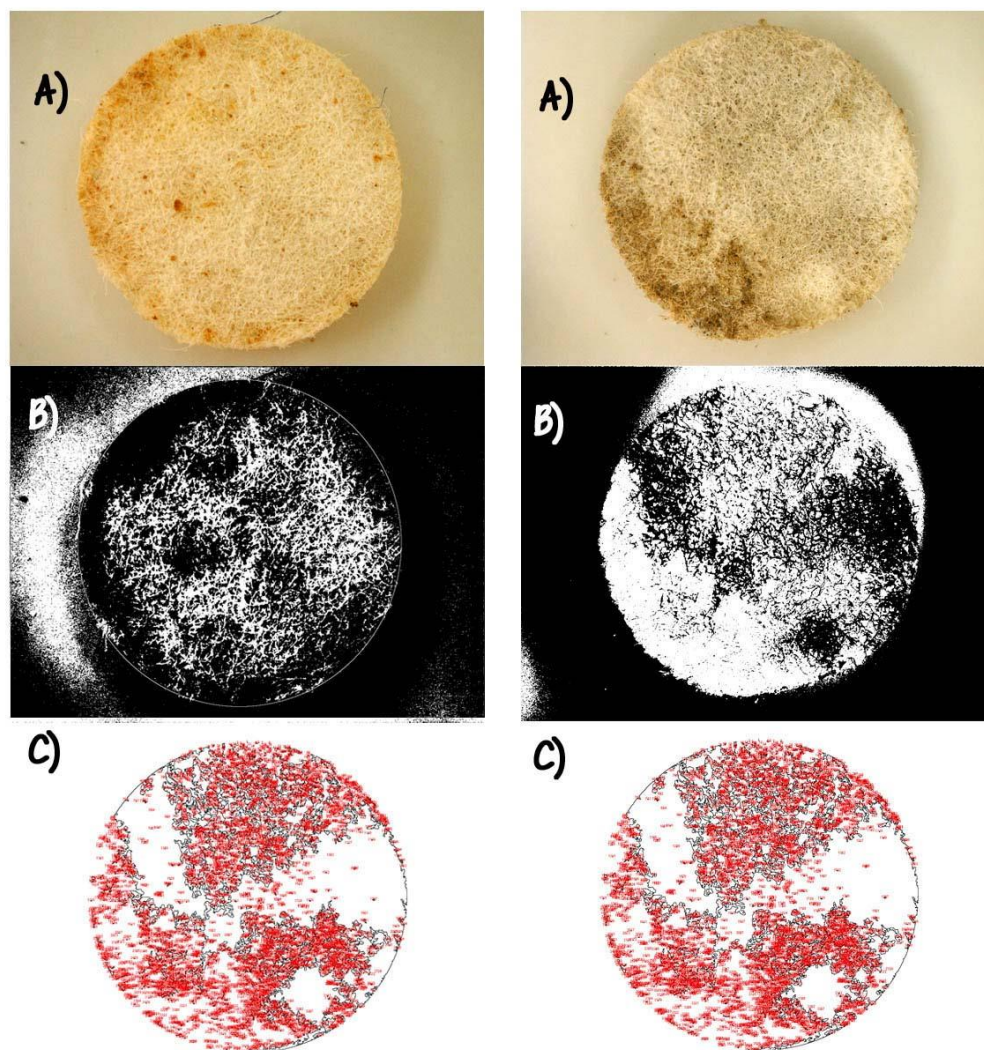


Figura N° 27. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 28 días de incubación. A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threhold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

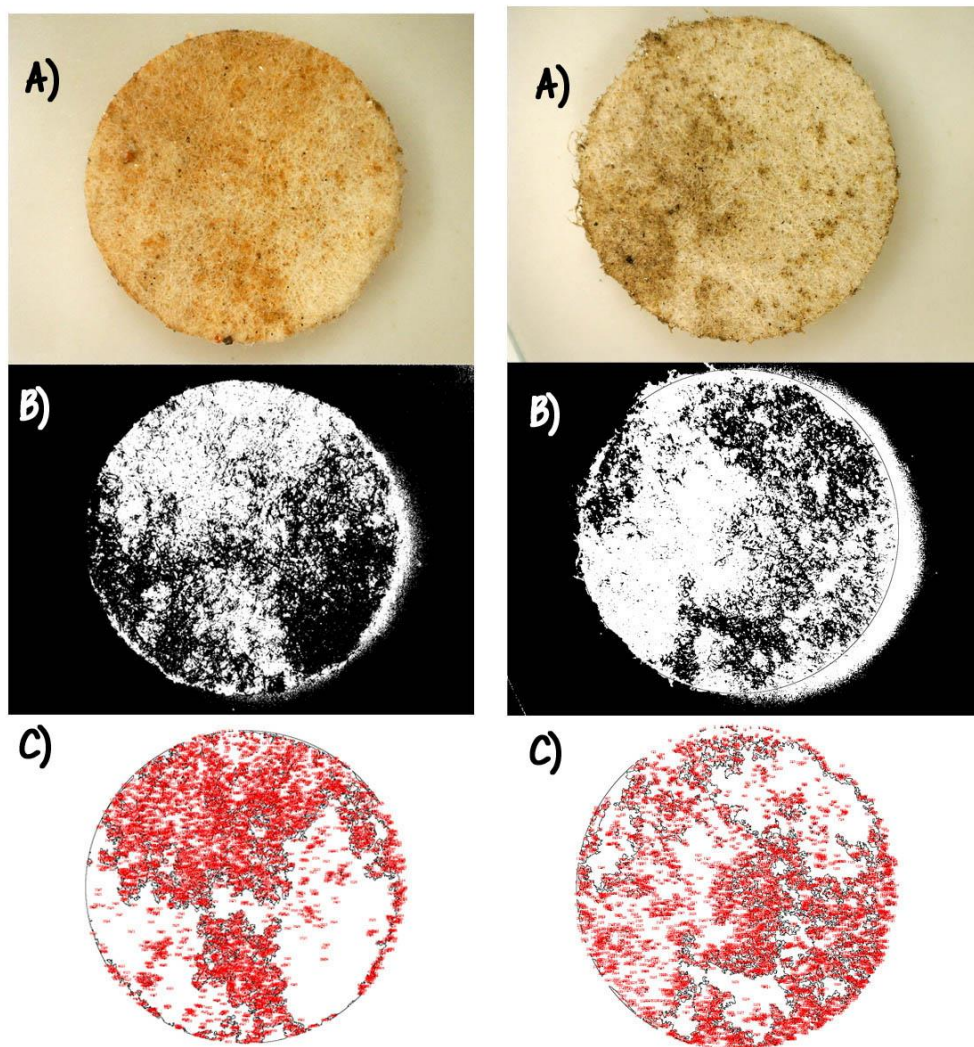


Figura N° 28. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 35 días de incubación. A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threhold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

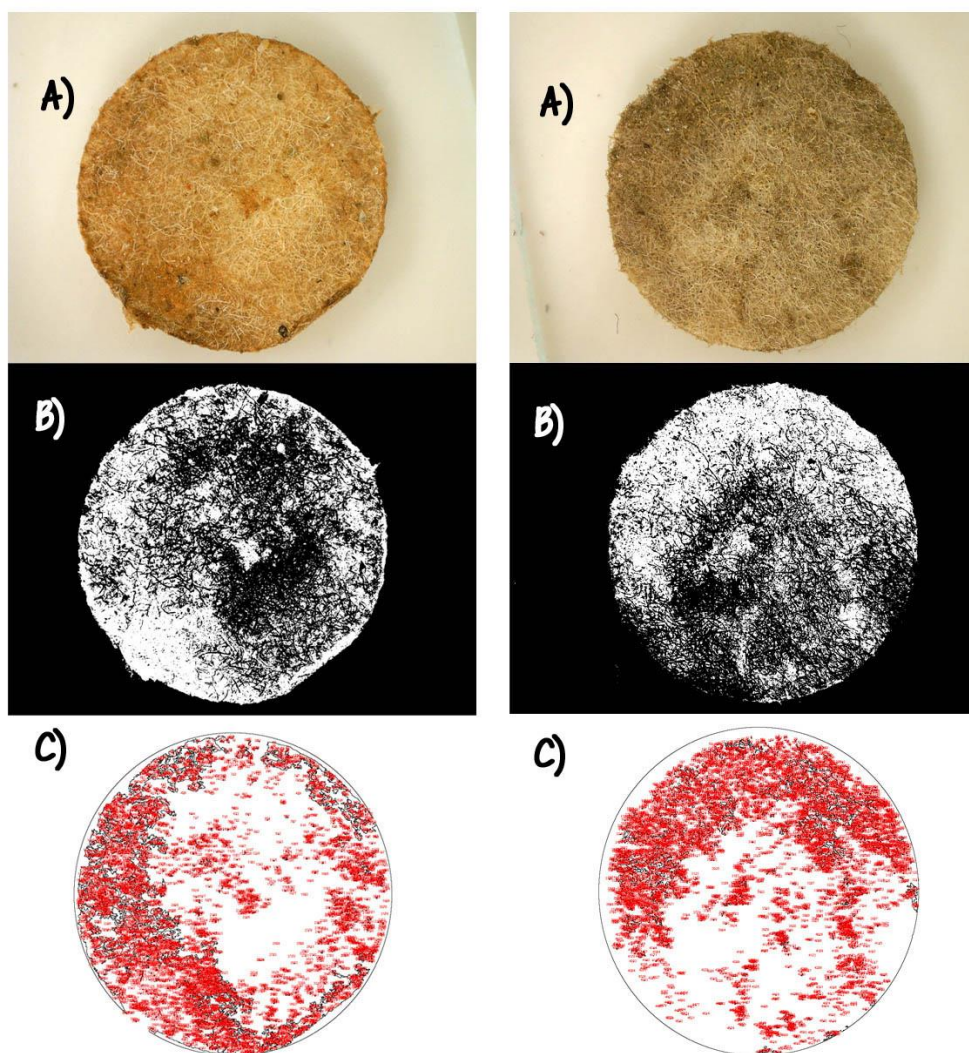


Figura N° 29. Resultado del Análisis de imágenes de la Muestra M7 (Izquierda) y M8 (Derecha) a los 45 días de incubación. A) Imagen Inicial del microdisco tomada con el microscopio. B) Imagen obtenida al aplicar la Herramienta "Threhold". C) Imagen del resultado del área de degradación seleccionada por el software.

Para evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre la determinación de la actividad de celulasas, se efectuaron una serie de sistemas incubados a diferentes tiempos los cuales se estudiaron

por medio del análisis de imágenes, los resultados obtenidos para las distintas muestras se observan en las tablas N° 9 y N° 10.

Tabla N° 9. Porcentaje de degradación, actividad enzimática de celulasa y cantidad degradada por días de la muestra N° 7.

Muestra	Porcentaje degradación (%)*	Cantidad degradada (μg) *	Actividad Enzimática de Celulasa (μg glucosa/g*h) *
M7-7	(30,1 \pm 0,4)	(1358 \pm 17)	(0,533 \pm 0,007)
M7-15	(38,0 \pm 0,8)	(1719 \pm 38)	(0,315 \pm 0,007)
M7-21	(39,4 \pm 0,7)	(1779 \pm 33)	(0,234 \pm 0,004)
M7-28	(37 \pm 3)	(1649 \pm 139)	(0,16 \pm 0,01)
M7-35	(41 \pm 3)	(1872 \pm 147)	(0,14 \pm 0,01)
M7-45	(55 \pm 2)	(2496 \pm 90)	(0,153 \pm 0,006)

*Cada replica es el promedio de 30 mediciones, y cada valor reportado es el promedio de las réplicas. (2 réplicas).

Tabla N° 10. Porcentaje de degradación, actividad enzimática de celulasa y cantidad degradada por días de la muestra N° 8.

Muestra	Porcentaje degradación (%)*	Cantidad degradada (μg) *	Actividad Enzimática de Celulasa (μg glucosa/g*h) *
M8-7	(29 \pm 1)	(1315 \pm 47)	0,52 \pm 0,02
M8-15	(39,6 \pm 0,7)	(1790 \pm 32)	0,329 \pm 0,006
M8-21	(38,54 \pm 0,04)	(1741 \pm 2)	0,2288 \pm 0,0003
M8-28	(39 \pm 2)	(1780 \pm 103)	0,18 \pm 0,01
M8-35	(49 \pm 11)	(2209 \pm 490)	0,17 \pm 0,04
M8-45	(60 \pm 1)	(2720 \pm 57)	0,166 \pm 0,004

*Cada replica es el promedio de 30 mediciones, y cada valor reportado es el promedio de las réplicas. (2 réplicas).

En ambos casos se observa que los primeros 7 días ocurre aproximadamente el 50% de la degradación total que se lleva a cabo en el tiempo de incubación al que se estudió, luego entre el intervalo de los 7 a 15 días ocurre un aumento aproximado de 10%, manteniéndose prácticamente constante hasta el día 28,

donde nuevamente se observa un incremento en el porcentaje de degradación.

La cantidad de celulosa degradada aumenta a medida que va pasando el tiempo de estudio. Sin embargo, la actividad enzimática para ambas muestras disminuye al aumentar los días de incubación, debido a que esta variable se determina como una relación entre la cantidad degradada entre el tiempo de incubación (Ec. 1), siendo directamente proporcional la cantidad degradada de sustrato e inversamente proporcional al tiempo de incubación. Al disminuir la actividad enzimática, indica que la velocidad de degradación disminuye en función al tiempo.

En las figuras N° 30 y N° 31 podemos verificar gráficamente el efecto del tiempo de incubación en función a la cantidad degradada para cada una de las muestras.

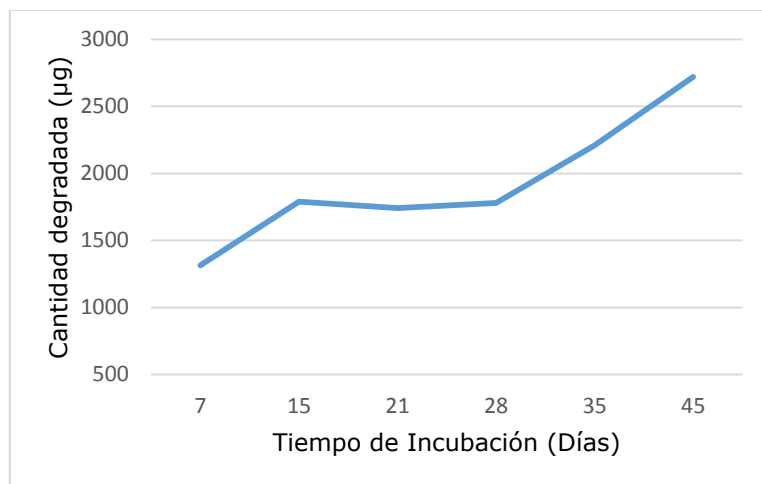


Figura N° 30. Efecto del tiempo de incubación sobre la degradación de celulosa en la Muestra N° 7.

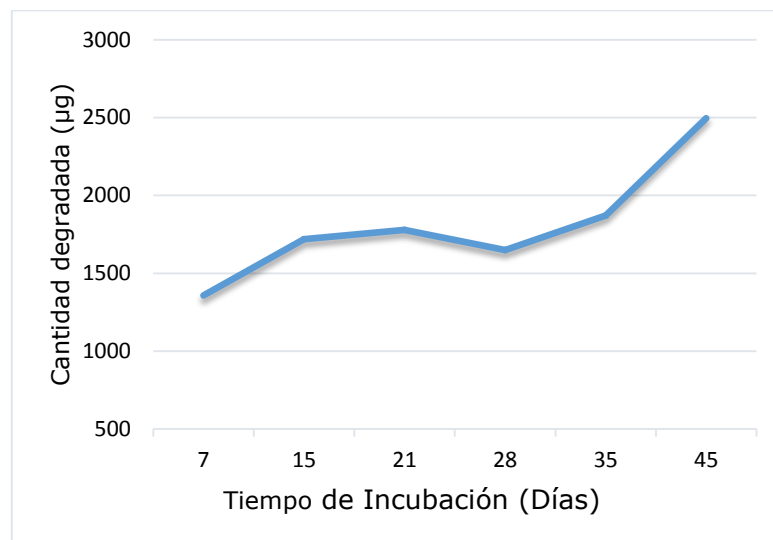


Figura N° 31. Efecto del tiempo de incubación sobre la degradación de celulosa en la Muestra N° 8.

En el suelo encontramos gran cantidad de microorganismos, que dependerán de los materiales que lo componen, de su textura, humedad, profundidad y otras propiedades (Toro, 2005). El papel bioquímico más conocido e importante de los microorganismos es la transformación de materia orgánica, entre esta se encuentran materias carbonadas (azúcares, almidón, celulosa) las cuales son la fuente principal de energía de los microorganismos. Básicamente se observa una degradación por influencia de las enzimas presentes en los microorganismos, ya que las células deben tener un equipo enzimático completo que permita la síntesis de los metabolitos esenciales ausentes en el medio (Madigan *et al*, 2004), por ello se necesita tiempo para la síntesis de estas nuevas enzimas.

En la actualidad, aún no se han reportado resultados completamente coherentes sobre los procesos microbiológicos del suelo. En cualquier caso, los estudios preliminares realizados permiten efectuar predicciones simples sobre las dinámicas de las poblaciones microbianas del suelo y sobre su influencia en los procesos de descomposición de material orgánico.

La difusión del oxígeno está muy limitada por lo que se produce rápidamente una situación de, al menos, microaerofilia en el suelo. Como consecuencia de las actividades respiratorias de los microorganismos las concentraciones de CO₂ pueden ser suficientemente altas para dificultar el crecimiento de ciertas formas bacterianas aerobias al mismo tiempo que estimulan el crecimiento de ciertas especies fúngicas que crecen mejor en estas tensiones de CO₂ relativamente elevadas que en las más bajas de la atmósfera normal (Sánchez *et al*, 2007).

Es importante valorar los ritmos de crecimiento microbiano en el suelo. Los estudios más finos realizados sobre la tasa de crecimiento bacteriano en el suelo permiten suponer que, en promedio, el tiempo de generación ronda los diez días. De hecho, se considera que en la mayor parte de los casos las bacterias se encuentran en una fase de latencia permanente (que sería relativamente equivalente a la fase estacionaria o al periodo de adaptación previo al crecimiento exponencial) durante largos periodos de tiempo. Es más, en algunos casos se ha podido estimar que la absorción de nutrientes por los microorganismos del suelo no les permite crecer sino que toda la energía se dirige hacia las reacciones de mantenimiento. En este sentido, el crecimiento de los microorganismos en el suelo se produciría por fases de «estallido» que seguirían inmediatamente a los aportes de elementos nutritivos limitantes.

Los hongos son heterótrofos, usan el carbono orgánico para la síntesis celular; en suelos con pH ácido degradan los constituyentes vegetales: la celulosa, las hemicelulosas, las pectinas, el almidón y la lignina. En suelos forestales, los hongos atacan los restos de las hojas con una extensa red de hifas en la mineralización foliar. Con frecuencia las transformaciones de la materia orgánica que realizan los hongos filamentosos en medio ambientes bien aireados son de mayor importancia que las reacciones que catalizan las bacterias pero se han hecho pocos intentos de calcular en forma cuantitativa

las actividades relativas de estos dos importantes grupos microbianos en la degradación de compuestos orgánicos (Atlas y Bartha, 1998).

8.5. Comparación de la actividad enzimática por el método colorimétrico de DNS y papel de filtro

Para realizar la comparación estadística se tomaron la cantidad degradada de cada una de las muestras por ambos métodos como lo refleja la tabla N° 11.

Tabla N° 11. Cantidad degradada de la muestra N° 7 y muestra N° 8 por ambos métodos de estudio.

Condición de trabajo			Cantidad de celulosa degradada ($\mu\text{g} \pm s_{\mu\text{g}}$)	
	Método	Tiempo (días)	Muestra 7	Muestra 8
1	DNS	7	$(2926 \pm 53)^e$	$(2293 \pm 9)^{d,e}$
2	Análisis de imágenes	7	$(1358 \pm 17)^a$	$(1315 \pm 47)^a$
3		15	$(1719 \pm 38)^{b,c}$	$(1790 \pm 32)^{b,c}$
4		21	$(1779 \pm 33)^{b,c}$	$(1741 \pm 2)^{a,b}$
5		28	$(1649 \pm 139)^b$	$(1780 \pm 103)^{b,c}$
6		35	$(1872 \pm 147)^c$	$(2209 \pm 490)^{c,d}$
7		45	$(2496 \pm 90)^d$	$(2720 \pm 57)^{e,f}$
8		45*	$(2626 \pm 58)^d$	$(2887 \pm 122)^f$

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas.

45*= Replica

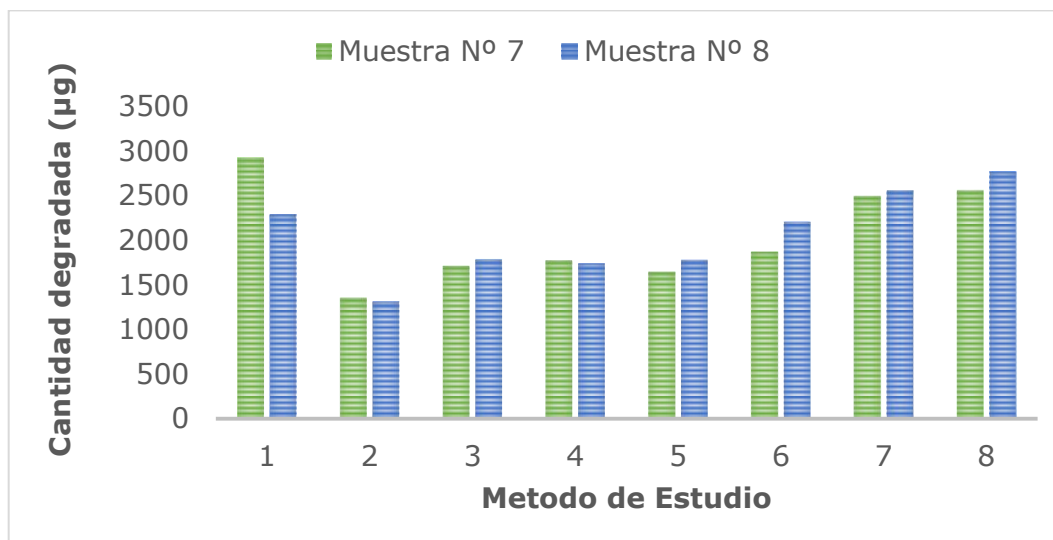


Figura N° 32. Gráfico de barras de la cantidad de celulosa degradada por cada método para las muestras N° 7 y N° 8.

En la figura N° 32 podemos observar y comparar la cantidad de celulosa degradada por cada técnica, bajo las distintas condiciones de estudio, pudiendo observar que entre el método por DNS y el método propuesto existe cierta similitud en los resultados en el tiempo final de incubación de cada muestra.

Se realizó un análisis estadístico por comparación múltiples rangos para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, con la herramienta Statgraphics. Se efectuó una comparación entre cada uno de los sistemas analizados, tanto con DNS, como a los diferentes días y distintas características de análisis, todo esto por separado para las distintas muestras.

Analizando la tabla ANOVA para la muestra N° 7, puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 variables con un nivel del 95,0% de confianza. Por el procedimiento de comparación múltiples rangos fueron comparadas las medias,

observando los resultados de la tabla N° 11, donde las letras igual nos indican que no existe diferencia significativa entre los resultados de la incubación a los 45 días y la réplica, por lo que podemos decir que es un método reproducible. Sin embargo, existe diferencia entre ambos métodos, el DNS y el propuesto de análisis de imagen (ambas réplicas).

En el caso de la muestra N° 8, la tabla ANOVA nos indicó nuevamente que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 variables con un nivel del 95,0% de confianza. Y por el análisis de comparación múltiple y verificando la tabla N° 11, indica que en esta muestra no existe diferencia significativa entre ambos métodos de estudio, indicándonos la efectividad del método propuesto en esta muestra. Nuevamente observamos que no existe diferencia significativa entre la medición de degradación a los 45 días y de su réplica. Basándonos en estos resultados podemos indicar que a pesar de que el resultado en ambas muestras fue diferente, el método propuesto puede usarse de manera adecuada para realizar el cálculo de la cantidad de celulosa degradada y por ende de la actividad enzimática de la celulasa por medio del análisis de imágenes.

9.- CONCLUSIONES

Al evaluar los distintos tipos de suelo por el método colorimétrico de DNS, se obtuvo que los suelos forestales presentaron mayor actividad enzimática.

Las mejores condiciones para la degradación de celulosa obtenidas mediante el análisis de imágenes por el software ImageJ, fueron pH 5 y temperatura ambiente (29-30°C), adicionalmente se observaron valores de degradación considerables, desde los primeros 7 días de incubación (30%) hasta 45 días (70%).

El método planteado para determinar la cantidad de celulosa degradada en papel de filtro como sustrato, mediante el análisis de imágenes por el software ImageJ, se obtuvo que es un método reproducible y además puede usarse para la determinación de la actividad enzimática.

10.- RECOMENDACIONES

En vista a los resultados obtenidos con respecto al análisis de estadístico podemos recomendar que el método propuesto pueda validarse con una mayor cantidad de réplicas y distintas cantidades de muestra. También realizar más análisis por el método colorimétrico de DNS, y a su vez por el método de papel de filtro para poder obtener una correlación estadística entre ambos métodos, además puede se recomienda realizar un estudio donde se evalué el efecto de la cantidad de sustrato utilizado, variando los tamaños de los discos de papel de filtro, para observar el efecto en la cuantificación de la actividad enzimática.

Evaluar otros productos que se puedan utilizar para realizar el lavado de los microdiscos después de la incubación, que permitan eliminar mayor cantidad de suelo presente en ellos para minimizar la posible interferencia en la medición por medio del análisis de imágenes.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **ÁLVAREZ, G. A. (2003).** Determinación de las actividades celulasa e invertasa del suelo. En: García. I. C, Gil S. F, Hernández. F. T, Trasar, C., Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos: Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana Mundi-Prensa Madrid Barcelona México, 153 – 160.
- **CARVALLO, ROLANDO. (2006).** Introducción al programa ImageJ. Universidad de Buenos Aires.
- **CERÓN, L.E & MELGAREJO, L.M., (2005).** Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. Soil Enzymes: Health and Quality Indicators. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Acta Biológica Colombiana, Vol. 10 No. 1.
- **CHAPLIN, MF. (1986).** Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. (Oxford, England) pp. 1-36.
- **CHARPENTIER, M. (1968)** Degradation de la Cellulose dans le sol. Mecanismes Enzymatiques. Rapport General. Annales de I'Institut Pasteur 115.
- **CORDERO, Y. (2016).** Efecto de la adición de enmiendas orgánicas, sobre la respiración y biomasa microbiana en un suelo agrícola. Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo.
- **DASHTBAN, M., MAKI, M., LEUNG, K., MAO, C., Y QIN, W. (2010)** Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. Critical Reviews in Biotechnology. Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada.

- **DE LAS SALAS, G (1987).** Suelos y ecosistemas forestales: con énfasis en América tropical. Primera edición. Costa Rica
- **DENG, P. S. Y TABATABAI, A. M. (1994).** Cellulase Activity of Soils. *Soil Biol. Biochem*, 26, (10), 1347 - 1354.
- **DEVIS, S. (2016).** Evaluación del efecto de un lodo industrial sobre la respiración y biomasa microbiana cuando se aplica a un suelo como enmienda orgánica. Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo.
- **DICK, W. y TABATABAI, M. (1993).** Significance y potential uses of soil enzymes. In: Meeting Jr., F.B (Ed). *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, New York, 95-127 p.
- **DORAN, J.W. (2002).** Soil health and global sustainability, translating science into practice. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 88, 119-127.
- **DORAN, J.W. Y PARKIN, B.T. (1994).** Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. Soil Science Society of America, Inc. Special Publication. Number 35. Madison, Wisconsin, USA.
- **FASSBENDER, H. Y BORNEMISZA, E. (1987).** Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. San José. Costa Rica.
- **GIANFREDA, L., RUGGIERO, P. (2006).** Enzyme activities in soil. En: Nannipieri, P., Smalla., K. (editores). *Nucleic acids and proteins in soil*. Capítulo 12. Springer Publishing Company. Alemania.
- **GIL-SOTRES, F., LEIRÓS, M., CAMIÑA, F. (1998).** Measurement of deshydrogenase activity in acids soil rich in organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 30.

- **GILMAN, H. (1943).** "Organic Chemistry-Advanced Treatise. 2nd ed." Wiley: New York.

- **GÓMEZ, E., ROMERO, A., WALL L. E IGLESIAS, M. (2011)** Degradación de Celulosa en lotes agrícolas bajo siembra directa. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

- **GONZÁLEZ-PRIETO Y CARBALLAS (1995).** Soil Biolog. Biochem. Nº 27. Pag 205- 210.

- **GONZÁLEZ, M. G., GALLARDO, J. F., CECANNTI, B., MORENO, G. Y COMESE, R. (2008).** Degradación del suelo: Uso de indicadores enzimáticos. En: XXI Congreso Argentino de Ciencia del Suelo, San Luis, Argentina. Mayo 2008.p 227.

- **GHOSE K.T. (1987).** Measurement of Cellulase Activities. Pure & Appl. Chem.

- **GUTIÉRREZ, V.; PINZÓN, A.; CASAS, J.; MARTÍNEZ, M. (2008).** Determinación de la actividad celulolítica del suelo proveniente de cultivos de Steviare baudiana Bertoni. Agronomía colombiana. 497-504.

- **INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY-IUPAC (1984).** Commision on Biotechnology, in "Measurement of cellulase activities" (T.K. Ghose, ed.). Biochemical Engineering Research Centre, Indian institute of Technology. New Delhi.

- **IZQUIERDO, J.; SIZOVA, A; LEE, R. (2010).** Diversity of Bacteria and Glycosyl Hydrolase Family 48 Genes in Cellulolytic Consortia Enriched from Thermophilic Biocompost. Applied and Environmental Microbiology.

- **JARAMILLO, D. (2002).** Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. pp. 202-205.

- **LARSON, W.E., PIERCE, F.J. (1991).** Conservation and Enhancement of Soil Quality. In Evaluation for sustainable land management in the developing world. En Proc. of the Int. Workshop on Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World, Chiang Rai. Int. Board of Soil Res. and Manage, Bangkok, Thailand.

- **LEVIN, L. (1998).** Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (Aphylllophorales, Basidiomycetes). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires Argentina.

- **LOPEZ-POVEDA, E. (2010).** Master en Neurociencias. Universidad de Salamanca.

- **LUYANDO, L. (2014).** Evaluación de indicadores de calidad en respuesta a la aplicación de lodos papeleros como enmienda orgánica en suelos agrícolas. Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo.

- **MALAJOVICH, M. A.** Guías de actividades. Biotecnología: enseñanza y divulgación, Disponible en <http://www.bteduc.bio.br>. Visitado el 07 de Abril de 2015.

- **MARQUINA, D. (1991).** Producción de Biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos. Universidad Complutense de Madrid. España.

- **MARTINEZ, G. (2015).** Efecto del tratamiento de suelos agrícolas con diferentes enmiendas orgánicas sobre parámetros

fisicoquímicos y actividades enzimáticas. Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo.

- **MARTÍNEZ, H.; FUENTES, E.; ACEVEDO, H. (2008).** Carbono orgánico y propiedades del suelo. J. Soil Sc. Plant Nutr. 8(1): 68-96.
- **MILLER, G. L. (1959).** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Pioneering Research Division, Quarfermasfer Research and Engineering Center, Natick, Mass.
- **MONTOYA, S. (2008).** Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos Orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto Grifola frondosa. Tesis de grado maestría en ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia.
- **NIELSEN, M.N. A. WINDING. (2002).** Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute, Denmark. Technical Report No. 388.
- **OLARTE, L. (1979).** Métodos Analíticos del laboratorio de suelos. Instituto Geográfico "Agustín Codazzi" 4ª Ed. Olarte, L. I. Editor. Bogotá, Colombia.
- **OVIEDO, O. R.; MARMOLEJO, R. L.; TORRES, L. P. (2012).** Perspectivas de aplicación del compostaje de bioresiduos provenientes de residuos sólidos municipales. Un enfoque desde lo global a lo local. Revista Ingenierías. Universidad de Medellin.
- **PORTA, J., LÓPEZ-ACEVEDO M. Y ROQUERO C., (2003).** Edafología para la agricultura y el medio ambiente, Tercera edición; Impreso en España, Ediciones Mundi-prensa, pp.929.
- **ROMERO, AMALIA, IGLESIAS, MARÍA C., CARBAJAL MARIA L. (2009).** Capacidad de degradar celulosa a diferentes

profundidades de muestreo. Facultad de Ciencias Agraria. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

➤ **SALAMANCA, L. (2015).** Evaluación del efecto de lignitos como enmienda orgánica sobre indicadores bioquímicos en suelos impactados por escoria metálica. Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo.

➤ **SÁNCHEZ, J, MARQUEZ, L Y FERNANDEZ, S. (2007).** Los hongos fundamentales en la fertilidad y productividad del suelo. Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales e Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales. Universidad Microbiana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México.

➤ **SKUJINS, J. (1976).** Extracellular Enzymes in Soil. Crit. Rev. Microbiol, 4, 383 -421.

➤ **SMITH, J., J. DORAN. (1996).** Measurement and use of pH and electrical conductivity for soil quality analysis. SSSA Special Publication. Madison.

➤ **SORIANO SOTO, M. (2004).** Prácticas de diagnóstico y fertilidad de suelos. Universitat Politècnica de Valencia, Serv. de Publicaciones. España. pp 91-98.

➤ **THOMPSON, L. Y TROEH F. (2002).** Los suelos y su fertilidad. Editorial Reverte. Cuarta edición. España.

➤ **TORO, D. (2005).** Manual para la introducción al laboratorio de microbiología. Primera edición. Universidad de Caldas. Colombia.

➤ **VOLKE, T., VELASCO, J.A. (2005).** Suelos Contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación,

Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Ediciones Mundi-Prensa.

- **WILD, A. (1992).** Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Versión Española de P. Urbano Terrón y C. Rojo Fernández. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- **WOOD T.M y BATH K.T. (1988).** Methods for Measuring Cellulase Activities. In "Methods in Enzymology" (W. Wood y S.T. Kellogg).
- **ZHANG Y-HP, HIMMEL ME, MIELENZ JR. (2006).** Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnol Adv 24: 452-481.

APENDICE

Curva de Calibración de glucosa

Tabla N° 12. Concentración de glucosa y absorbancia correspondiente a cada patrón.

Concentración glucosa (µg)	Abs. (540nm)
2230,07	0,148
4460,14	0,514
6690,21	0,874
8920,27	1,246
11150,34	1,561

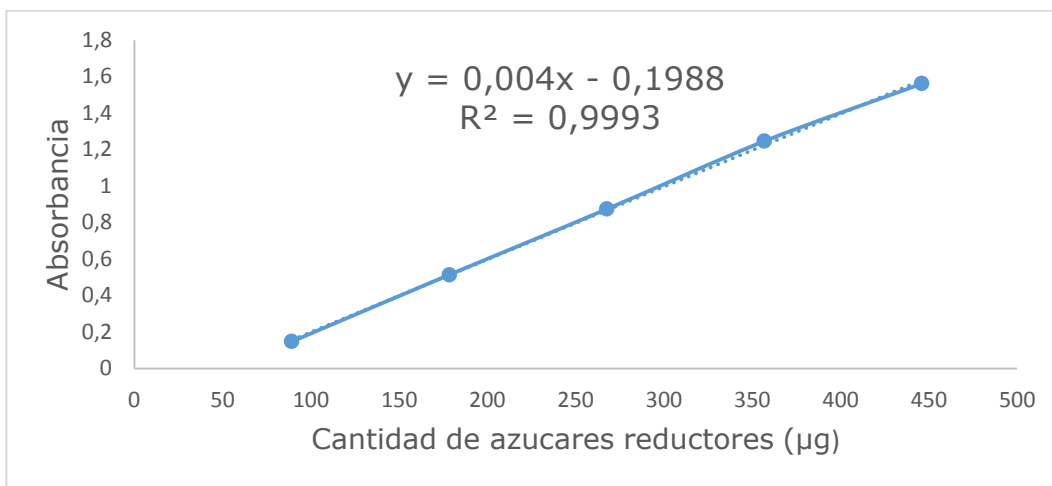


Figura N° 33. Curva de calibración.

B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la muestra N° 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4,16E6	7	594886,	85,02	0,00
Intra grupos	55977,6	8	6997,19		
Total (Corr.)	4,22E6	15			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 85,0178, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 variables con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7 días	2	1357,78	X
28 días	2	1649,01	X
15 días	2	1718,6	XX
21 días	2	1778,81	XX
35 días	2	1871,8	X
45 días	2	2496,35	X
45 días*	2	2560,87	X

DNS	2	2925,79	X
-----	---	---------	---

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
15 días - 21 días		-60,20	192,90
15 días - 28 días		69,60	192,90
15 días - 35 días		-153,19	192,90
15 días - 45 días	*	-777,75	192,90
15 días - 45 días*	*	-842,26	192,90
15 días - 7 días	*	360,82	192,90
15 días - DNS	*	-1207,19	192,90
21 días - 28 días		129,80	192,90
21 días - 35 días		-92,99	192,90
21 días - 45 días	*	-717,54	192,90
21 días - 45 días*	*	-782,06	192,90
21 días - 7 días	*	421,03	192,90
21 días - DNS	*	-1146,98	192,90
28 días - 35 días	*	-222,79	192,90
28 días - 45 días	*	-847,34	192,90
28 días - 45 días*	*	-911,86	192,90
28 días - 7 días	*	291,23	192,90
28 días - DNS	*	-1276,78	192,90
35 días - 45 días	*	-624,55	192,90
35 días - 45 días*	*	-689,07	192,90
35 días - 7 días	*	514,02	192,90
35 días - DNS	*	-1053,99	192,90
45 días - 45 días*		-64,52	192,90
45 días - 7 días	*	1138,57	192,90
45 días - DNS	*	-429,44	192,90
45 días* - 7 días	*	1203,09	192,90
45 días* - DNS	*	-364,93	192,90
7 días - DNS	*	-1568,01	192,90

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación multiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra

al lado de los 22 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,2988E29	0

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
15 días / 21 días	37,52	32,71	1,32	0,91
15 días / 28 días	37,52	139,40	0,07	0,33
15 días / 35 días	37,52	146,67	0,07	0,32
15 días / 45 días	37,52	89,51	0,18	0,51
15 días / 45 días*	37,52	37,66	0,99	0,99
15 días / 7 días	37,52	17,26	4,72	0,55
15 días / DNS	37,52	53,18	0,50	0,78
21 días / 28 días	32,71	139,40	0,06	0,29
21 días / 35 días	32,71	146,67	0,05	0,28
21 días / 45 días	32,71	89,51	0,13	0,45
21 días / 45 días*	32,71	37,66	0,75	0,91
21 días / 7 días	32,71	17,26	3,59	0,62
21 días / DNS	32,71	53,18	0,38	0,70
28 días / 35 días	139,40	146,67	0,90	0,97
28 días / 45 días	139,40	89,51	2,43	0,73
28 días / 45 días*	139,40	37,66	13,70	0,34
28 días / 7 días	139,40	17,26	65,22	0,16
28 días / DNS	139,40	53,18	6,87	0,46
35 días / 45 días	146,67	89,51	2,68	0,70
35 días / 45 días*	146,67	37,66	15,17	0,32

35 días / 7 días	146,67	17,26	72,20	0,15
35 días / DNS	146,67	53,18	7,61	0,44
45 días / 45 días*	89,51	37,66	5,65	0,51
45 días / 7 días	89,51	17,26	26,89	0,24
45 días / DNS	89,51	53,18	2,83	0,68
45 días* / 7 días	37,66	17,26	4,76	0,55
45 días* / DNS	37,66	53,18	0,50	0,78
7 días / DNS	17,26	53,18	0,11	0,40

El StatAdvisor

Los estadísticos mostrados en esta tabla evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar dentro de cada una de las 8 columnas son iguales. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 0, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

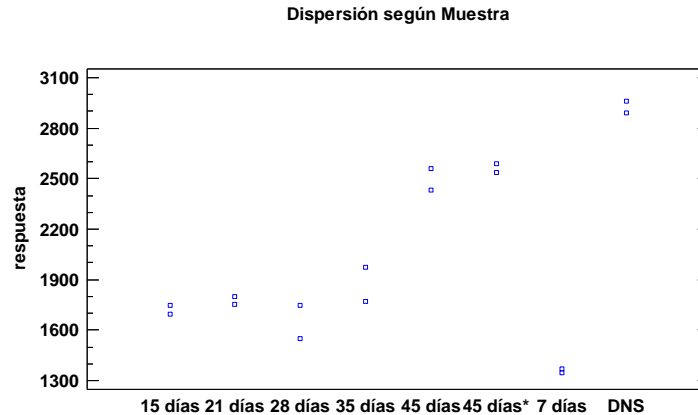
Prueba de Kruskal-Wallis

	<i>Tamaño de Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
15 días	2	4,5
21 días	2	8,0
28 días	2	4,5
35 días	2	9,0
45 días	2	12,0
45 días*	2	13,0
7 días	2	1,5
DNS	2	15,5

Estadístico = 14,3824 Valor-P = 0,0447842

El StatAdvisor

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis nula de que las medianas dentro de cada una de las 8 columnas es la misma. Primero se combinan los datos de todas las columnas y se ordenan de menor a mayor. Después, se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada columna. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes, de la lista de Opciones Gráficas, y seleccione la opción de muesca de mediana.



Para la muestra N° 8.

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3,64E6	7	520481,	14,64	0,0006
Intra grupos	284357,	8	35544,7		
Total (Corr.)	3,93E6	15			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 14,643, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 variables con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7 días	2	1315,25	X
21 días	2	1741,37	XX
28 días	2	1780,28	XX
15 días	2	1790,31	XX
35 días	2	2209,38	XX
DNS	2	2292,75	XX
45 días	2	2720,2	XX
45 días *	2	2770,37	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
15 días - 21 días		48,94	434,76
15 días - 28 días		10,03	434,76
15 días - 35 días		-419,07	434,76
15 días - 45 días	*	-929,89	434,76
15 días - 45 días *	*	-980,06	434,76
15 días - 7 días	*	475,06	434,76
15 días - DNS	*	-502,44	434,76
21 días - 28 días		-38,92	434,76
21 días - 35 días	*	-468,02	434,76
21 días - 45 días	*	-978,83	434,76

21 días - 45 días *	*	-1029,0	434,76
21 días - 7 días		426,12	434,76
21 días - DNS	*	-551,38	434,76
28 días - 35 días		-429,10	434,76
28 días - 45 días	*	-939,91	434,76
28 días - 45 días *	*	-990,09	434,76
28 días - 7 días	*	465,04	434,76
28 días - DNS	*	-512,46	434,76
35 días - 45 días	*	-510,82	434,76
35 días - 45 días *	*	-560,99	434,76
35 días - 7 días	*	894,14	434,76
35 días - DNS		-83,36	434,76
45 días - 45 días *		-50,17	434,76
45 días - 7 días	*	1404,95	434,76
45 días - DNS		427,45	434,76
45 días * - 7 días	*	1455,12	434,76
45 días * - DNS	*	477,62	434,76
7 días - DNS	*	-977,50	434,76

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 19 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,34031E30	0

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
15 días / 21 días	32,08	1,94	272,66	0,08
15 días / 28 días	32,08	103,22	0,10	0,38
15 días / 35 días	32,08	489,88	0,004	0,08
15 días / 45 días	32,08	57,47	0,31	0,65
15 días / 45 días *	32,08	164,49	0,04	0,25
15 días / 7 días	32,08	47,44	0,46	0,76
15 días / DNS	32,08	8,86	13,10	0,34
21 días / 28 días	1,94	103,22	0,0004	0,02
21 días / 35 días	1,94	489,88	0,00002	0,01
21 días / 45 días	1,94	57,47	0,001	0,04
21 días / 45 días *	1,94	164,49	0,0001	0,02
21 días / 7 días	1,94	47,44	0,002	0,05
21 días / DNS	1,94	8,86	0,05	0,27
28 días / 35 días	103,22	489,88	0,04	0,26
28 días / 45 días	103,22	57,47	3,23	0,65
28 días / 45 días *	103,22	164,49	0,39	0,71
28 días / 7 días	103,22	47,44	4,73	0,55
28 días / DNS	103,22	8,86	135,59	0,11
35 días / 45 días	489,88	57,47	72,66	0,15
35 días / 45 días *	489,88	164,49	8,87	0,41
35 días / 7 días	489,88	47,44	106,62	0,12
35 días / DNS	489,88	8,86	3054,33	0,02
45 días / 45 días *	57,4696	164,494	0,122061	0,4280
45 días / 7 días	57,4696	47,4421	1,4674	0,8787
45 días / DNS	57,4696	8,86401	42,0355	0,1948
45 días * / 7 días	164,494	47,4421	12,0218	0,3575
45 días * / DNS	164,494	8,86401	344,38	0,0685
7 días / DNS	47,4421	8,86401	28,6463	0,2352

El StatAdvisor

Los estadísticos mostrados en esta tabla evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar dentro de cada una de las 8

columnas son iguales. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 5, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Prueba de Kruskal-Wallis

	<i>Tamaño de Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
15 días	2	6,5
21 días	2	4,5
28 días	2	5,5
35 días	2	10,5
45 días	2	14,5
45 días *	2	14,5
7 días	2	1,5
DNS	2	10,5

Estadístico = 13,9412 Valor-P = 0,0522376

El StatAdvisor

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis nula de que las medianas dentro de cada una de las 8 columnas es la misma. Primero se combinan los datos de todas las columnas y se ordenan de menor a mayor. Después, se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada columna. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

Dispersión según Muestra

