**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

---

# Producción de biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus*, utilizando diferentes residuos agroindustriales.

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Ronald Hendry Palacios Duchicela

**Tutor:** Ph.D. David Andrés Terán Mera

**AMBATO – ECUADOR**

**Mayo – 2019**

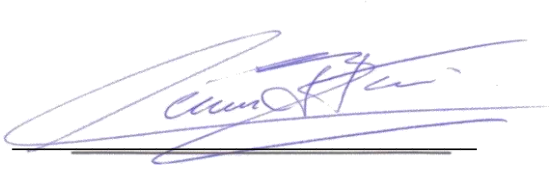
## APROBACIÓN DEL TUTOR

**Ph.D. David Andrés Terán Mera**

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 15 de abril de 2019



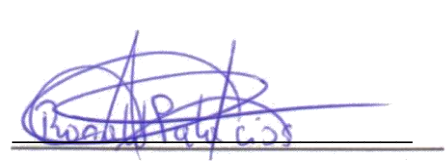
Lic. David Andrés Terán Mera Ph.D.

C.I. 171656972-6

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Ronald Hendry Palacios Duchicela, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Ronald Hendry Palacios Duchicela

C.I. 050356068-2

**AUTOR**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del tribunal

Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía, Ph.D.

C.I. 180414808-6

Ing. Verónica Alejandra García Ibarra, PhD.

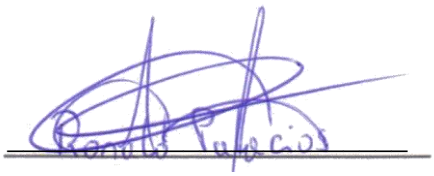
C.I. 171472560-1

Ambato, 14 de mayo de 2019

## DERECHOS DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Ronald Hendry Palacios Duchicela

C.I. 050356068-2

**AUTOR**

## DEDICATORIA

*El presente trabajo de investigación está dedicado primeramente a Dios, por bendecirme y guiarme cada día, cada paso de mi vida, dándome la suficiente fortaleza, sabiduría e inteligencia para alcanzar mis metas y anhelos.*

*A mis queridos y amados padres, Oswaldo y Flora, que me han brindado su apoyo y amor incondicional en cada una de mis etapas, enseñándome que los obstáculos y golpes que nos da la vida no son lo suficientes para dejarse vencer y que, con el trabajo duro, honesto podemos cumplir con nuestros sueños y metas, nunca dejando la humildad que les caracteriza.*

*A mis hermanos Marlon y Edwin por apoyarme de una u otra manera en cada una de las etapas que he cumplido en mi vida.*

*A mi familia que me han apoyado y aconsejado que siga siempre adelante para ser una persona de bien y especialmente a mis abuelitos Bernardo y Luz, aunque no estén presentes físicamente pero siempre los llevare en mi corazón, me han dejado el mejor legado que es el trabajo honrado y esfuerzo para conseguir lo que queremos. Y a mis abuelitos Marco y Consuelo que me han enseñado a sonreírle a la vida, aunque sea difícil.*

*Ronald Palacios Duchicela*

## AGRADECIMIENTO

*A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, que me han permitido llegar a ser un profesional.*

*A todos los docentes que formaron parte de mi educación académica, por brindarme los conocimientos necesarios para cumplir con éxitos mi vida profesional.*

*Al doctor David Terán, por brindarme la confianza de poder realizar mi trabajo de titulación junto a él, ya que con su apoyo, conocimientos y dedicación he podido cumplir exitosamente con esta meta. Y no me queda más que agradecerle infinitamente, decirle que es una excelente persona y profesional, y estoy seguro que siempre contare con su apoyo y amistad.*

*A la doctora Liliana Cerda, ya que con su apoyo, dedicación y conocimientos ha sido posible llevar a cabo este trabajo de investigación ya que es excelente con persona y profesional. A la doctora Verónica García, por su dedicación y tiempo entregado para la revisión de mi trabajo de titulación.*

*Al doctor Alexis Debut que fue un pilar fundamental para realizar este trabajo de investigación, gracias por su colaboración.*

*A Jessica que me ha brindado su apoyo incondicional y ha estado presente en las etapas más difíciles de mi vida y siempre ha creído en mí.*

*A mis compañeros de aula y laboratorio que fueron mi compañía durante esta etapa importante de mi vida.*

*Ronald Palacios Duchicela*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR ..... ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD ..... iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ..... iv
DERECHOS DEL AUTOR ..... v
DEDICATORIA ..... vi
AGRADECIMIENTO ..... vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO ..... viii
ÍNDICE DE TABLAS ..... xi
ÍNDICE DE FIGURAS ..... xii
ÍNDICE DE ANEXOS ..... xiv
RESUMEN ..... xv
ABSTRACT ..... xvi

**CAPÍTULO I**

**MARCO TEÓRICO**

1.1 Antecedentes investigativos ..... 1
1.2 Objetivos ..... 4
1.2.1 Objetivo General ..... 4
1.2.2 Objetivos Específicos ..... 4
1.3 Hipótesis ..... 5
1.3.1 Hipótesis nula ..... 5
1.3.2 Hipótesis alternativa ..... 5
1.4 Señalamiento de variables de la hipótesis ..... 5
1.4.1 Variable Independiente ..... 5
1.4.2 Variable dependiente ..... 5

## CAPÍTULO II

## METODOLOGÍA

2.1 Materiales ..... 6

2.1.1 Residuos agroindustriales ..... 6

2.1.2 Cepa bacteriana ..... 6

2.2 Métodos ..... 6

2.2.1 Tratamiento de las muestras de residuos agroindustriales ..... 6

2.2.2 Reproducción de cepas en medio solido ..... 7

2.2.3 Composición de medios H-S modificados con residuos agroindustriales ..... 7

2.2.4 Identificación de un medio mínimo (MM) para la producción de biofilm a partir de residuos agroindustriales ..... 8

2.2.5 Producción de biofilm en medio líquido estático y medio líquido con agitación con cepas comerciales ..... 8

2.2.6 Obtención de los biofilms en medio líquido H-S y Medio Mínimo modificados en cultivo estático y agitación ..... 8

2.3 Determinación del rendimiento y cuantificación de azúcares reductores en la producción de biofilm bacteriano ..... 9

2.4 Impregnación con nanopartículas de zinc y plata ..... 9

2.5 Análisis de difracción de rayos x (XRD), Perfilometría de contacto, Microscopia electrónica de barrido de biofilms ..... 10

2.5.1 Análisis de difracción de rayos x (XRD) ..... 10

2.5.2 Perfilometría de contacto ..... 10

2.5.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM) ..... 10

2.6 Diseño experimental ..... 11

2.7 Análisis de resultados ..... 11

## CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados ..... 12

3.1.1 Obtención de biofilms en medio líquido H-S en cultivo estático y agitación ..... 12

3.1.2 Obtención de biofilms en medio mínimo líquido en cultivo estático y agitación ..... 14

3.1.3 Determinación del rendimiento y cuantificación de azúcares reductores en la producción de biofilm ..... 17

3.1.4 Impregnación con partículas de plata y zinc al mejor tratamiento..... 19

3.1.5 Difracción de rayos x (XRD) de los biofilms bacterianos obtenidos..... 21

3.1.6 Estudio de perfilometría de contacto en las diferentes muestras de biofilms bacterianos..... 26

3.1.7 Identificación de la estructura de los biofilms bacterianos mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) ..... 27

3.2 Verificación de hipótesis..... 36

## CAPÍTULO IV

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones ..... 37

4.2 Recomendaciones..... 39

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 40

ANEXOS ..... 47

# ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Composición del medio de cultivo H-S estándar..... 7
**Tabla 2:** Composición de los medios de cultivos H-S modificados. ..... 7
**Tabla 3:** Composición de cultivos con medio mínimo modificados para producción de biofilms..... 8
**Tabla 4:** Factores y niveles del diseño experimental ..... 11
**Tabla 5:** Peso del biofilm húmedo obtenido en el medio H-S ..... 17
**Tabla 6:** Peso del biofilm húmedo obtenido en el medio mínimo ..... 18
**Tabla 7:** Rendimiento obtenido en la producción de biofilm en medio H-S y medio mínimo ..... 18
**Tabla 8:** Cuantificación de azúcares reductores en el medio H-S y medio mínimo . 19
**Tabla 9:** Datos de rugosidad de las muestras de biofilms. ..... 26

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Biofilms en medio H-S en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 13
**Figura 2:** Biofilms en medio H-S en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 14
**Figura 3:** Biofilms en medio mínimo en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 15
**Figura 4:** Biofilms en medio mínimo en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 16
**Figura 5:** Prueba de medias del tipo de residuo agroindustrial (factor A - medio H-S) ..... 20
**Figura 6:** Prueba de medias del tipo de residuo agroindustrial (factor A - medio mínimo) ..... 20
**Figura 7:** Prueba de medias de la condición del cultivo líquido (factor B - medio mínimo). ..... 21
**Figura 8:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio H-S líquido en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 22
**Figura 9:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio H-S líquido en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 23
**Figura 10:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio mínimo líquido en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 23
**Figura 11:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio mínimo líquido en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 24
**Figura 12:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos de cáscara de cacao en medio H-S líquido con impregnación: (a) Estático - Ag, (b) Estático - Zn, (c) Agitación - Ag y (d) Agitación - Zn. ..... 25

**Figura 13:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos de cáscara de cacao en medio mínimo líquido con impregnación: (a) Estático - Ag, (b) Estático - Zn, (c) Agitación - Ag y (d) Agitación - Zn..... 25
**Figura 14:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 28
**Figura 15:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao..... 29
**Figura 16:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao..... 30
**Figura 17:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 31
**Figura 18:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo estático con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping..... 33
**Figura 19:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo agitado con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping..... 33
**Figura 20:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo estático con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping..... 35
**Figura 21:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo agitado con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping..... 35

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo 1:** Producción de biofilm bacteriano ..... 47
**Anexo 2:** Biofilms secos del medio H-S en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 47
**Anexo 3:** Biofilms secos del medio H-S en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 48
**Anexo 4:** Biofilms secos del medio mínimo en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 48
**Anexo 5:** Biofilms secos del medio mínimo en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao. ..... 49
**Anexo 6:** Curva de calibración (glucosa) para azúcares reductores ..... 49

## RESUMEN

Los biofilms bacterianos están siendo un área de estudio importante, debido a su amplia utilización en diferentes campos. Sin embargo, debido a sus elevados costos de producción su utilización está siendo limitada. Por esta razón este trabajo tuvo como objetivo obtener biofilms empleando diferentes residuos agroindustriales (bagazo de caña, salvado de arroz y cáscara de cacao), utilizando un medio H-S y medio mínimo en cultivo estático y agitado. Demostrando que los residuos agroindustriales aportan al medio la fuente de carbono y nitrógeno necesario, para que la bacteria *Komagataeibacter xylinus* pueda desarrollarse y generar los biofilms. Los biofilms obtenidos a partir de la cáscara de cacao presentaron el mejor rendimiento en el medio H-S con 17,8338 y 22,8312 % para el cultivo estático y agitación respectivamente, mientras que en el medio mínimo se obtuvo un rendimiento de 23,3169 y 16,1095 % para el cultivo estático y agitación correspondientemente; incluso demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa con el estándar (glucosa). También, se realizó una impregnación con partículas de plata y zinc a los biofilms producidos a partir de la cáscara de cacao.

Además, mediante un análisis de difracción de rayos x (XRD), se pudo determinar que los biofilms obtenidos correspondían a Celulosa I, estando presente en mayor proporción la celulosa $I_{\alpha}$. La microscopia electrónica de barrido (SEM) ayudó a observar la estructura de los biofilms y mediante un Mapping se verificó la presencia de las nanopartículas de Ag y Zn impregnadas en la estructura del biofilm.



**Palabras claves:** Biofilms, residuos agroindustriales, medio H-S, medio mínimo, cultivo estático y agitación, nanopartículas de plata y zinc.

## ABSTRACT

Bacterial biofilms are being an important field of study, due to their wide use in different fields. However, due to its high production costs, its use is limited. For this reason, this work aimed to obtain biofilms using different agroindustrial wastes (sugarcane bagasse, rice bran and cocoa husk), using an H-S medium and minimum medium in static and agitated culture. Demonstrating that agroindustrial wastes contributes to the medium the necessary carbon and nitrogen source, so that the bacterium *Komagataeibacter xylinus* can develop and generate the biofilms. The biofilms obtained from the cocoa husk showed the best yield in the H-S medium with 17,8338 and 22,8312 % for the static and agitation culture respectively, while in the minimum medium a yield of 23,3169 and 16,1095 % was obtained for the static and agitation culture correspondingly; it even showed that there is no statistically significant difference with the standard (glucose). Also, an impregnation with silver and zinc particles was made to the biofilms produced from the cocoa husk.

Furthermore, by X-ray diffraction analysis (XRD), it was possible to determine that the biofilms obtained corresponded to Cellulose I, cellulose $I_{\alpha}$ being present in a higher proportion. The scanning electron microscopy (SEM) helped to observe the structure of the biofilms and by means of a Mapping the presence of the Ag and Zn nanoparticles impregnated in the structure of the biofilm was verified.



**Key words:** Biofilms, agroindustrial wastes, H-S medium, minimum medium, static and agitation culture, silver and zinc nanoparticles.

# CAPÍTULO I

# MARCO TEÓRICO

## 1.1 Antecedentes investigativos

El Biofilm bacteriano (celulosa bacteriana) es una comunidad sésil bacteriana inmersa en un medio líquido, unidas irreversiblemente a un substrato o superficie, y/o unas a otras. Encontrándose de esta manera embebidas en una matriz extracelular polimérica producida por ellas mismas **(Trujillo, 2017)**.

Por lo tanto el *Komagataeibacter xylinus* (*Gluconacetobacter xylinus*) es el organismo modelo para el estudio de la producción de celulosa bacteriana, debido a su capacidad de producir niveles relativamente altos del homopolisacárido a partir de una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno **(Jaramillo et al., 2013)**.

La industria alimentaria durante sus procesos de trasformación para la obtención de productos conlleva el generar una serie de residuos de toda índole, siendo mayoritariamente orgánicos, aumentando el nivel de contaminación ambiental. Los residuos agroindustriales son derivados de frutas, cereales, verduras, entre otros; produciendo de esta manera cáscaras y semillas de diferentes formas y tamaños que regularmente no tienen un uso adicional y son comúnmente desechados **(Ayala-Zavala et al., 2010)**. Los residuos poseen valiosas sustancias como azúcares, ácidos orgánicos, proteínas, fibra dietaría, vitaminas y minerales, que pueden ser de utilidad en las industrias alimentaria, farmacéutica, química, entre otras **(Vélez et al., 2009)**.

En el Ecuador existen cuatro variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo: Criollo, Forastero, Trinitario y Nacional; siendo este cuarto conocido a nivel mundial como "fino de aroma" y representando alrededor del 75 % de la producción **(Tapia, 2015)**.

La cáscara de cacao corresponde el 90 % del fruto, teniendo en el Ecuador como residuo de la producción absoluta anual del cacao una cantidad de 1.726.611,42 TM **(Camacho, 2016)**. La cáscara de cacao posee más de 40 % de fibra dietaría, celulosa, hemicelulosa y ácido galacturónico, también posee proteína, lignina, minerales, lípidos, hidratos de carbono **(Jiménez, 2018)**.

La cáscara de cacao constituye un gran problema para los agricultores, ya que al utilizarse como abono sin compostar, se convierte en una fuente considerable de

enfermedades ocasionadas por varias especies del género *Phytophthora* como la mazorca negra. Por otra parte, la cascara de cacao por poseer un alto contenido de alcaloides restringe su utilización para la alimentación de animales, debido a que sus sistemas digestivos se ven impedidos de metabolizar dichos alcaloides **(Baena & García, 2012)**.

El salvado de arroz es la parte externa que envuelve al cereal, que suele desperdiciarse y eliminarse durante el proceso de refinamiento **(Tabuenca, 2018).** En Ecuador el salvado de arroz posee un rendimiento del 8 - 11 % con respecto al arroz en cáscara, siendo aproximadamente 100.000 TM, con un precio de 220 $ / TM **(Silva & Vidal, 2012)**.

El salvado de arroz posee excelentes cantidades de minerales, fibra dietética, proteína y ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, si se almacena el salvado de arroz sin inactivar la lipasa, la grasa del salvado se hidroliza precipitadamente y se oxida, enranciando el salvado de arroz y haciéndose desagradable al gusto por lo que se debe inactivar las lipasas por calor **(Pacheco & Peña, 2006)**.

El bagazo de caña está constituido por cuatro fracciones: Fibra o bagazo (45 %), sólidos no solubles (2 - 3 %), sólidos solubles (2 - 3 %) y agua (49 - 51 %); además posee un contenido residual de sacarosa de alrededor del 4 % de su base seca **(Aguilar, 2011)**. En Ecuador el bagazo es uno de los residuos agrícolas más abundantes con una producción anual estimada de 158.000 toneladas **(Mármol & Liviapoma, 2014)**.

Los pequeños agricultores que se dedican a la producción de etanol o panela, utilizan el bagazo de caña como su principal fuente de combustible para el fogón; sin embargo, por su alto contenido de humedad, debe ser secado antes de utilizar **(Vanegas, 2016)**.

Por lo mencionado anteriormente se pretende utilizar estos desechos que dejan las industrias alimentarias como una fuente de carbono para que el *Komagataeibacter xylinus*, pueda producir Biofilms, que podría tener diversos usos.

A continuación, se presenta algunas investigaciones que fueron realizadas utilizando diferentes fuentes de carbono y bacterias para la producción de celulosa bacteriana:

**Castro et al., (2011)** realizó un estudio sobre "Caracterización estructural de la celulosa bacteriana producida por *Gluconacetobacter swingsii* sp. de residuos

agroindustriales colombianos", utilizando como residuos el jugo de cáscara de piña y jugo de caña de azúcar, donde concluyó que los recursos de carbono y nitrógeno presentes en la cáscara de piña y el jugo de caña de azúcar fueron suficientes para el desarrollo del microorganismo. También al realizar la comparación con su referencia (medio Hestrin y Schramm) noto qué la celulosa bacteriana producida a partir de jugo de cáscara de piña fue mayor. Además, mencionó que los residuos agroindustriales pueden emplearse como medio de cultivo para producir celulosa bacteriana con bajo costo para la producción industrial a gran escala.

**Mohammadkazemi, Azin, & Ashori (2015)** estudiaron la "Producción de celulosa bacteriana utilizando diferentes fuentes de carbono y medios de cultivo" en lo cual utilizaron como fuente de carbono, jarabe de dátiles, glucosa, manitol, sacarosa y sacarosa de grado alimentario; utilizando como medios Hestrin-Schramm, Yamanaka y Zhou. Para la producción de celulosa bacteriana (CB) utilizaron cepas de *Gluconacetobacter xylinus*; donde obtuvieron la mayor eficiencia de producción, cristalinidad y estabilidad térmica en el medio Hestrin-Schramm, usando como fuente de carbono el manitol. Además, realizaron Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) donde observaron que los medios con manitol y sacarosa proporcionaron evidencia de la fuerte adhesión interfacial entre las fibras de CB sin agregados perceptibles.

**Soriano & Barreto (2018)** evaluaron la síntesis y estudio de propiedades de celulosa bacteriana obtenida de piña y banano, inoculados con Kombucha, donde utilizaron cuatro medios de cultivos con diferentes fuentes de carbono (pulpa de piña, cascara de piña, pulpa de banana y cascara de banana) en medio de cultivo estático; donde controlaron el pH, °Brix a una temperatura de 28 - 26 °C durante un periodo de 14 días. Obteniendo como resultado que todas las películas de celulosa bacteriana producidas con los cuatro medios de cultivos tenían una estructura estable; sin embargo, determinaron que la pulpa de piña poseía un mejor rendimiento en la producción de CB.

**Hernández (2018)** realizó la determinación del rendimiento y caracterización de la producción de celulosa bacteriana de Kombucha, utilizando fuentes de carbono como, sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y manitol con diferentes concentraciones. Teniendo como resultado que el mejor tratamiento donde obtuvo un mayor

rendimiento en la producción de celulosa bacteriana fue con la glucosa con la menor concentración. Además, concluyó que la celulosa bacteriana es de alta pureza, cristalina (posee regiones con un alto ordenamiento de fibrillas) y no amorfa (desordenadas).

Por otra parte, es necesario mencionar que en las investigaciones presentadas obtienen los biofilms a partir de alimentos de consumo humano por lo que no fue factible utilizar estas metodologías, ya que en este trabajo se utilizó los residuos que dejan las industrias después de las transformaciones.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo General

Producir biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus*, utilizando diferentes residuos agroindustriales.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Obtener biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus*, sustituyendo con cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña la fuente de carbono.
- Determinar el rendimiento en la producción de biofilm con los diferentes residuos agroindustriales.
- Identificar un medio mínimo para la producción de biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus* con los residuos agroindustriales.
- Realizar una impregnación con partículas de plata y zinc al mejor tratamiento.
- Identificar la estructura de los biofilms producidos mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

## 1.3 Hipótesis

### 1.3.1 Hipótesis nula

Ho: La utilización de residuos agroindustriales, cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña, no tienen efecto significativo en la producción de biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus*.

### 1.3.2 Hipótesis alternativa

Ha: La utilización de residuos agroindustriales, cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña, tienen efecto significativo en la producción de biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus*.

## 1.4 Señalamiento de variables de la hipótesis

### 1.4.1 Variable Independiente

Residuos agroindustriales, cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña.

### 1.4.2 Variable dependiente

Producción de biofilm a partir de *Komagataeibacter xylinus*.

# CAPÍTULO II

# METODOLOGÍA

## 2.1 Materiales

### 2.1.1 Residuos agroindustriales

Se obtuvo 4 kilos de salvado de arroz de una piladora y 4 kilos de cáscara de cacao de una finca aleatoriamente, ubicadas en la ciudad de Santo Domingo de los colorados; mientras que se obtuvo 3 kilos de bagazo de caña del sector Totoras Km 5 1/2 vía a Baños (Tungurahua). Estas muestras fueron recolectadas en fundas plásticas y transportadas al laboratorio de Canje de deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato, donde se realizó la correspondiente investigación.

### 2.1.2 Cepa bacteriana

Para la producción de biofilm con los residuos agroindustriales (cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña) se utilizó la cepa *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756, la cual es una cepa comercial adquirida en la colección DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Tratamiento de las muestras de residuos agroindustriales

Las muestras de cáscara de cacao y bagazo de caña fueron previamente secadas es una estufa a 60 °C durante un periodo de tiempo de 24 horas, esto se realizó con la finalidad de eliminar el agua presente de estas muestras. Posteriormente se procedió a moler la cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña en un molino manual (Corona, Colombia) y esterilizadas a 121 °C durante 15 min en el auto clave (Hirayama, Japón). El secado de un producto es primordial, para reducir la humedad por debajo del 15 %, para facilitar su molienda; ya que la humedad hace al material más pegajoso, y los discos del molino se atoran rápidamente; además el secado es un método de conservación del producto **(Christiansen, 2018)**.

### 2.2.2 Reproducción de cepas en medio solido

Para la reproducción de las cepas de *Komagataeibacter xylinus*, se trabajó a una temperatura de crecimiento de 30 °C, en incubación por 48 horas, en el medio H-S líquido adicionando bacto agar para su solidificación, dónde los inóculos se obtuvieron a partir de re-suspensiones de crecimiento bacteriano en medio H-S sólido.

### 2.2.3 Composición de medios H-S modificados con residuos agroindustriales

La investigación se dirigió a utilizar residuos agroindustriales para la producción de biofilm a partir *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756, sustituyendo las fuentes de carbono y nitrógeno del medio, con la finalidad de obtener biofilm de características semejantes a la producción estándar del biofilm.

Para la obtención de biofilm se aplicó la metodología H-S, el cual es un medio estándar para la producción de celulosa bacteriana propuesta por **(Hestrin & Schramm, 1954)**; pero para este medio se sustituyó la "glucosa" por "residuos agroindustriales". La composición del medio de cultivo estándar se observa en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2** se muestra los medios de cultivos modificados:

**Tabla 1:** Composición del medio de cultivo H-S estándar.

| Medio de cultivo | Componentes | g / L | pH |
|---|---|---|---|
| H-S | Glucosa | 20 | 6 |
| | Peptona | 5 | |
| | Extracto de levadura | 5 | |
| | Fosfato disódico | 2,7 | |
| | Ácido cítrico | 1,15 | |

Fuente: **(Hestrin & Schramm, 1954)**

**Tabla 2:** Composición de los medios de cultivos H-S modificados.

| Componentes de los medios modificados | | | g/L | pH |
|---|---|---|---|---|
| Salvado de arroz | Cáscara de cacao | Bagazo de caña | 20 | 6 |
| Peptona | Peptona | Peptona | 5 | |
| Extracto de levadura | Extracto de levadura | Extracto de levadura | 5 | |
| Fosfato disódico | Fosfato disódico | Fosfato disódico | 2,7 | |
| Ácido cítrico | Ácido cítrico | Ácido cítrico | 1,15 | |

### 2.2.4 Identificación de un medio mínimo (MM) para la producción de biofilm a partir de residuos agroindustriales

Para optimizar la producción de biofilm se utilizó un medio mínimo compuesto por minerales **(Crawford, 1978)**, incorporando a esta formulación los residuos agroindustriales (cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña), donde se obtuvo tres medios respectivamente y adecuando el pH óptimo, como se muestra en la **Tabla 3**:

**Tabla 3:** Composición de cultivos con medio mínimo modificados para producción de biofilms

| **Componentes del Medio Mínimo modificado** | | | **g / L** | **pH** |
|---|---|---|---|---|
| Salvado de arroz | Cáscara de cacao | Bagazo de caña | 20 | 6 |
| $KH_2PO_4$ | $KH_2PO_4$ | $KH_2PO_4$ | 0,1 | |
| $Na_2HPO_4$ | $Na_2HPO_4$ | $Na_2HPO_4$ | 0,4 | |
| NaCl | NaCl | NaCl | 0,02 | |
| $MgSO_4\ 7H_2O$ | $MgSO_4\ 7H_2O$ | $MgSO_4\ 7H_2O$ | 0,02 | |
| $CaCl_2\ 2H_2O$ | $CaCl_2\ 2H_2O$ | $CaCl_2\ 2H_2O$ | 0,005 | |

Además, para el estándar se utilizó la formulación del medio mínimo adicionando 20 gramos por cada litro de glucosa.

### 2.2.5 Producción de biofilm en medio líquido estático y medio líquido con agitación con cepas comerciales

Para la producción de biofilm con los residuos agroindustriales (cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña), tanto en medio de cultivo líquido estático, como en medio de cultivo líquido con agitación se utilizó la cepa de colección, *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756 **(Gullo et al., 2017)**.

### 2.2.6 Obtención de los biofilms en medio líquido H-S y Medio Mínimo modificados en cultivo estático y agitación

La incubación en medio líquido H-S y Medio Mínimo en cultivo estático se lo realizó a una temperatura óptima de crecimiento y producción de la membrana de 30 °C, para formar una película en la superficie **(Römling & Galperin, 2015)**. Durante un tiempo establecido para su formación de 15 días **(Gullo, La China, Massimiliano, &**

**Giudici, 2018)**, empleando como envase para la producción cajas Petri plásticas, colocando 20 ml de medio y dejándolas en la incubadora (Isotherm).

Para el caso del medio líquido H-S y Medio Mínimo en cultivo con agitación, se colocó 50 ml de medio en Matraces Erlenmeyer a una temperatura óptima de crecimiento y producción de 30 °C y una velocidad de 50 rpm en una incubadora Shaker (Benchmark), durante un tiempo de producción de 11 días.

### 2.3 Determinación del rendimiento y cuantificación de azúcares reductores en la producción de biofilm bacteriano

Para determinar el rendimiento en la producción de biofilm se basó en el peso final húmedo de los biofilms producidos con los diferentes residuos agroindustriales para el medio H-S y mínimo en el cultivo estático y agitación correspondientemente. Posteriormente se procedió a realizar el secado en la estufa, colocando los biofilms en papel manteca a 60 °C durante 4 y 6 horas para cultivo estático y agitación respectivamente.

Además, se realizó la cuantificación de azúcar inicial y final para determinar la cantidad de azúcar que el microorganismo consume en el periodo de tiempo propuesto para la formación del biofilm. Esto se realizó con la cuantificación de azúcares reductores tanto para el medio H-S y MM en estático y agitación, para lo cual se aplicó el método de **Miller (1959)**. Los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él y se desarrolla un cambio de color (con variaciones de amarillo hasta marrón). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.

### 2.4 Impregnación con nanopartículas de zinc y plata

Para la impregnación con sulfato de zinc y nitrato de plata se utilizó biofilms producidos a partir de la cáscara de cacao modificando la metodología propuesta por **(Ali, Ambreen, et al., 2016)**. La misma que consistía en sumergir los biofilms en sulfato de zinc y nitrato de plata respectivamente a una concentración de 1 mM durante

1 hora a 200 rpm, posteriormente se sonicó la mezcla durante 20 minutos a 30 ºC. Seguido de un tratamiento con NaOH 10 mM para reducir el tamaño de partícula del zinc y plata. Finalmente se lavó la mezcla con etanol absoluto y agua desionizada para eliminar las partículas metálicas que no se impregnaron.

## 2.5 Análisis de difracción de rayos x (XRD), Perfilometría de contacto, Microscopia electrónica de barrido de biofilms

Para la difracción de rayos x (XRD), Perfilometría de contacto, Microscopia electrónica de barrido se realizó por medio de una colaboración entre el Dr. David Terán y el Dr. Alexis Debut de la Escuela Politécnica del Ejercito (ESPE).

### 2.5.1 Análisis de difracción de rayos x (XRD)

Para el XRD se utilizó todas las muestras producidas a partir de los residuos agroindustriales con y sin impregnación de nanopartículas de Ag y Zn secas, utilizando un difractómetro marca PANalytical modelo EMPYREAN en las siguientes condiciones de operación. Configuración θ-2θ (geometría Bragg-Brentano). Tubo de rayos X de cobre (Kα - λ = a Å) a 45kV y 40Ma. El análisis del difractograma se realizó sobre el promedio de cuatro mediciones entre los ángulos 5° a 90° (θ-2θ) utilizando el software High Score Plus.

### 2.5.2 Perfilometría de contacto

Para la perfilometría de contacto se utilizó todas las muestras producidas a partir de los residuos agroindustriales con y sin impregnación de nanopartículas de Ag y Zn secas, cada muestra fue seccionada y fijada al perfilómetro usando cinta doble faz. Para lo cual se utilizó un perfilómetro de contacto marca BRUKER modelo DEKTAK XT, en las siguientes condiciones de operación. Longitud: variable, depende de la muestra. Duración: 400 sec. Resolución: depende de la longitud. Tipo de punta: Radio 25 um. Fuerza de la punta: 3 mg. Tipo de scan: Standard Scan. Rango: 6.5 um. Perfil: Hills & Valleys.

### 2.5.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para identificar la morfología de los biofilms, se evaluó pequeños trozos de biofilm secos con un microscopio electrónico de barrido marca TESCAN modelo Mira 3.

Cada muestra fue fijada en un Stub utilizando dos capas de cinta de carbono doble faz conductora y luego cubierta por 30 segundos con una capa de aproximadamente 20nm de oro conductor (pureza de 99.99%) utilizando un evaporador (sputtering evaporator) Quorum Q150R ES previo al análisis.

Además, se realizó un Mapping para los biofilms impregnados con nanopartículas de Ag y Zn, usando un detector Bruker X- Flash 6|30 con una resolución de 123 eV a MnKα durante 600 segundos tomando en cuenta solo los elementos de interés.

Realizando observaciones en el detector de Electrones Secundarios (SE) y el de Electrones Retrodispersados (BSE), usando un voltaje entre 5 a 10 kV.

## 2.6 Diseño experimental

Para el trabajo de investigación se aplicó un diseño factorial AxB, donde los factores fueron el tipo de residuo agroindustrial y la condición del cultivo líquido; tanto para el medio H-S y medio mínimo, como se detalla en la **Tabla 4**:

**Tabla 4:** Factores y niveles del diseño experimental

| Factores | Niveles |
|---|---|
| A: Tipo de residuo agroindustrial | a1: Estándar |
| | a2: Bagazo de caña |
| | a3: Salvado de arroz |
| | a4: Cáscara de cacao |
| B: Condición del cultivo líquido | b1: Estático |
| | b2: Agitación |

### 2.7 Análisis de resultados

Para el análisis de resultados los datos fueron analizados en el programa Statgraphics, utilizando un ANOVA multifactorial con un 95% de confianza.

# CAPÍTULO III

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1. Análisis y discusión de resultados

La cáscara de cacao, salvado de arroz y bagazo de caña son los residuos que dejan unas de las tantas industrias alimentarias y que no tienen uso, siendo desechadas comúnmente y dejando una problemática ambiental. Por esta razón al poseer una fuente de carbono y nitrógeno ayudaron al crecimiento de la bacteria *Komagataeibacter xylinus,* dando como resultado la producción de biofilm de diferentes características, dependiendo del medio y residuo que fue utilizado.

Una vez obtenido los biofilms en el medio H-S, se procedió a producir biofilms en el medio mínimo; y se determinó el rendimiento, para lo cual se pesó cada biofilm y además se determinó el azúcar en el medio al inicio y final del tratamiento.

Donde al mejor tratamiento obtenido en la producción de biofilm con los residuos agroindustriales, se realizó la impregnación con nanopartículas plata y nanopartículas de zinc.

A continuación, se procedió a realizar un análisis de la estructura de cada una de los biofilms obtenidos en el microscopio electrónico de barrido (SEM), XRD y perfilometría.

### 3.1.1 Obtención de biofilms en medio líquido H-S en cultivo estático y agitación

En la **Figura 1**, se puede visualizar los biofilms obtenidos con los diferentes residuos agroindustriales en cultivo estático, pudiéndose notar que el biofilm adquiere el color del medio ya que los residuos se adhieren al mismo. Las fuentes de carbono poseen diferentes pesos moleculares, estructura química y biodisponibilidad, dando lugar a tasas de producción y características estructurales variadas de celulosa bacteriana **(Singhsa, Narain, & Manuspiya, 2018)**.

El biofilm producido por salvado de arroz y bagazo de caña presentaron una capa fina (grosor) y poco resistente; mientras que se obtuvo un biofilm de superiores características con la cáscara de cacao, formándose una monocapa con mejor resistencia elástica y peso, ya que poseía un mayor espesor, debido a la mayor cantidad

de azúcar en el medio. La composición de harina de cáscara de cacao presenta un alto aporte nutricional con una cantidad de 22,66 % de carbohidratos **(Carrasco, 2015)**.

Un estudio expuesto por **Panchana & Soto (2017)** menciona que el lixiviado de mucílago de cacao presenta los requisitos nutritivos al medio para producir celulosa bacteriana siempre y cuando el medio cuente con una fuente de nitrógeno.

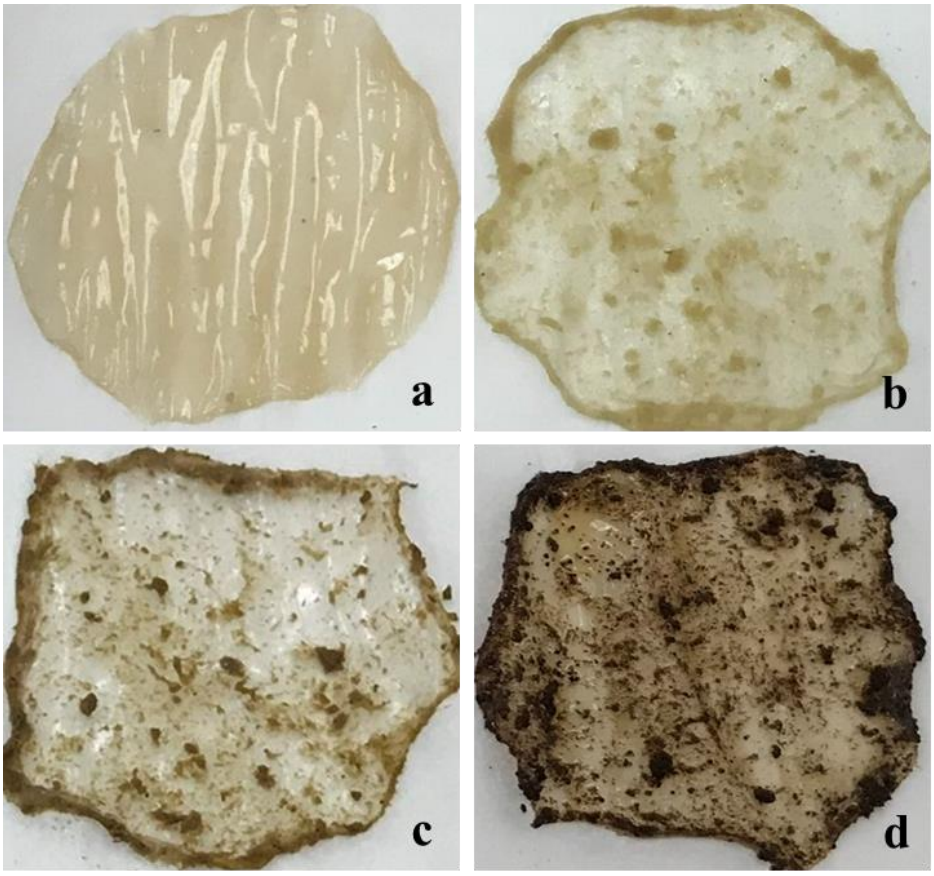



**Figura 1:** Biofilms en medio H-S en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

En la **Figura 2**, se puede observar los biofilm obtenidos con los diferentes residuos agroindustriales en cultivo con agitación, notándose una formación en multicapas y quedándose atrapados los residuos dentro de estas y adheridas en el biofilm; esto pudo deberse al envase (Matraz de Erlenmeyer) en el cual se dio el proceso de producción. En las fermentaciones en cultivo agitado se obtienen pellets de celulosa o aglomeraciones amorfas de las fibras, dependiendo del tipo de reactor y condiciones de operación empleados **(Carreño, Caicedo, & Martínez, 2012)**.

Además, cabe mencionar que el tiempo de obtención del biofilm era menor (11 días), acorde a los resultados obtenidos previamente en este laboratorio en cultivo estático **(Toscano, 2019)** y **(Acosta, 2019)**. En cultivo con agitación, se logra un mayor enriquecimiento de oxigeno obteniéndose celulosa en menor tiempo **(Santos, 2015)**; notándose un mayor espesor en el biofilm obtenido con la cascara de cacao con la coloración del medio (café claro).

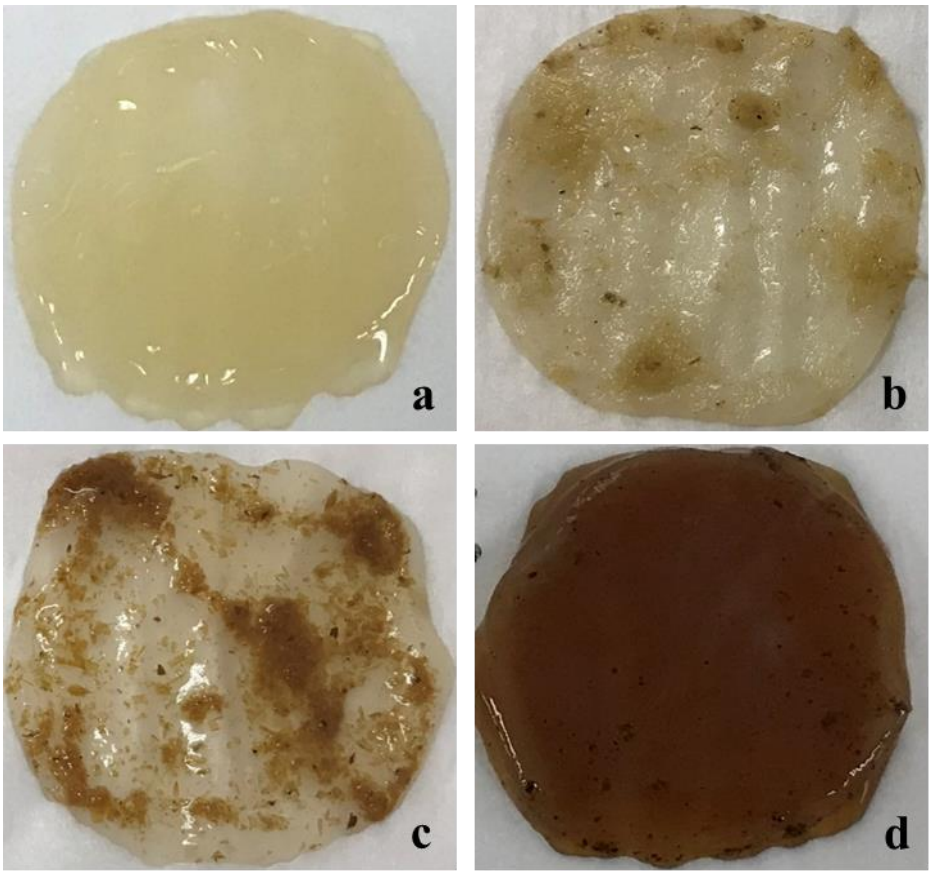



**Figura 2:** Biofilms en medio H-S en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

### 3.1.2 Obtención de biofilms en medio mínimo líquido en cultivo estático y agitación

En la **Figura 3**, se visualiza los biofilms obtenidos con los residuos agroindustriales en cultivo estático, donde se notó que el biofilm estándar no presentaba una adecuada formación pese a tener la fuente de carbono (glucosa), presentando una capa delgada y frágil; de la misma manera el biofilm obtenido con bagazo de caña presentó una estructura delicada y rompiéndose en el momento de manipularlo, similar a papel

mojado, ya que no poseían la fuente necesaria tanto de carbono como nitrógeno. Un medio de cultivo para la producción de celulosa bacteria no solo depende de una fuente de carbono, si no que requieren de otros nutrientes como el extracto de levadura, triptona, peptona, etc **(Erbas, Kiziltas, & Gardner, 2015)**.

El biofilm de salvado de arroz presentaba una correcta estructura, pero con una capa delgada y frágil. Por otra parte, el biofilm de cáscara de cacao presentó una mejor estructura, con una capa más gruesa y firme, esto puede deberse a que la cáscara de cacao posee altas cantidades de nutrientes **(Barén, 2013)**, que agregan la fuente de carbono y nitrógeno al medio.

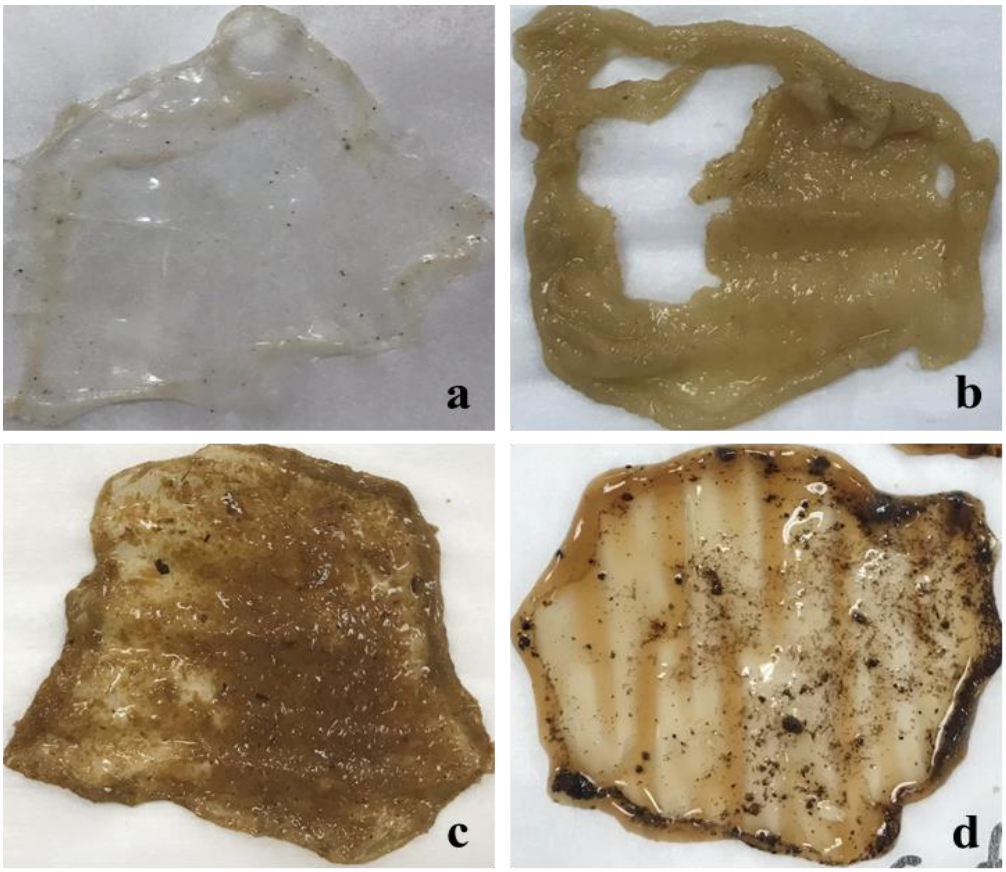



**Figura 3:** Biofilms en medio mínimo en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

La **Figura 4** presenta los biofilms obtenidos con los residuos agroindustriales en cultivo en agitación; teniendo en el estándar una estructura frágil y con una capa delgada (traslucida); de manera simular con el bagazo de caña no hubo una formación adecuada de biofilm, solo se observó una aglomeración del residuo en el fondo del

matraz, esto puede deberse a que no hay una fuente considerable de carbono y nitrógeno como menciona **Erbas et al., (2015)**.

Por otra parte, el salvado de arroz produjo un biofilm delgado y poco resistente con impregnación del residuo. Mientras que el biofilm de cáscara de cacao presentó un mayor grosor con una estructura firme y difícil de romper, esto se debe a que este residuo es rico en nutrientes y cubrió la fuente de carbono y nitrógeno necesarios para la producción del biofilm.

La morfología de celulosa bacteriana y las propiedades características se ven muy afectadas por diferentes métodos de cultivo, estáticos y agitados **(Singhsa et al., 2018)**.

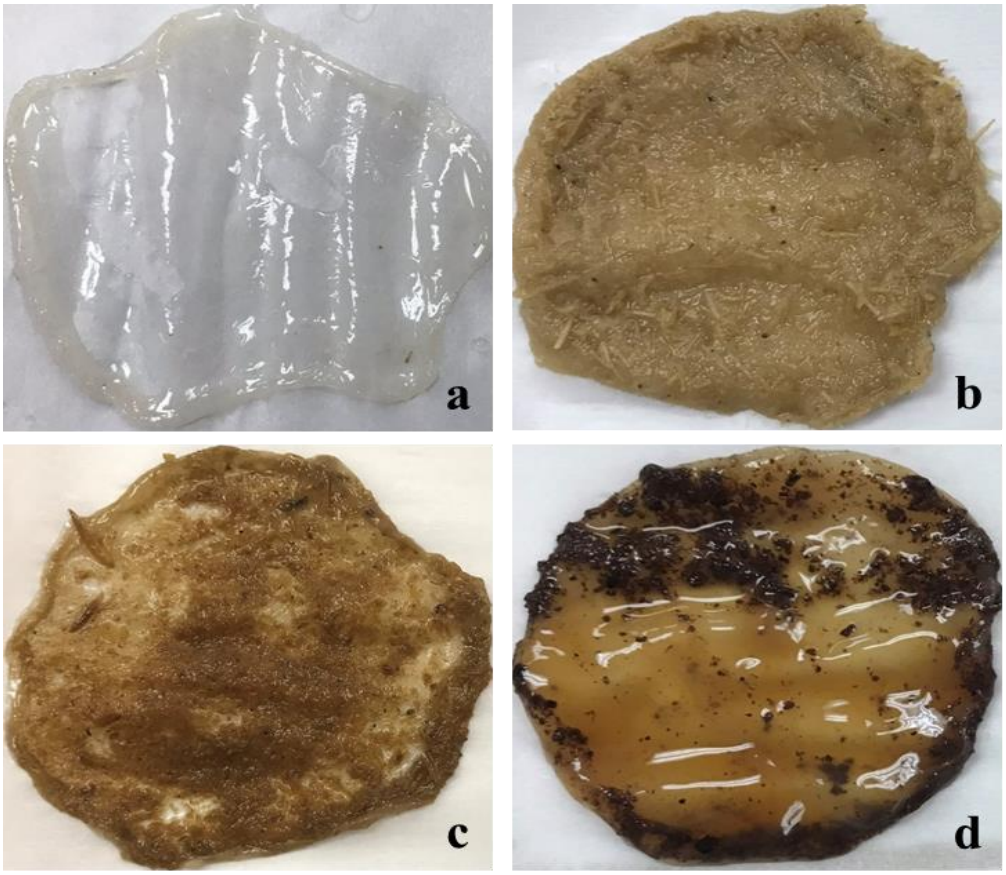



**Figura 4:** Biofilms en medio mínimo en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

### 3.1.3 Determinación del rendimiento y cuantificación de azúcares reductores en la producción de biofilm

En la **Tabla 5** se presenta el peso de los biofilms en los diferentes residuos agroindustriales, notándose una mayor producción en el cultivo en estático para el estándar, bagazo de caña y salvado de arroz. El cultivo estático se ha empleado en gran medida, debido a su alta productividad, pero algunos problemas asociados, como el gran tiempo de cultivo y el espacio requerido **(Campano et al., 2016)**.

Sin embargo, se obtuvo una mayor cantidad de biofilm con la cáscara de cacao en medio con agitación, contrastando con lo anteriormente mencionado. Esto puede deberse a que hubo una buena sinergia entre el medio H-S con cáscara de cacao y el oxígeno presente en el envase; la producción de celulosa bacteriana depende directamente del crecimiento de las bacterias, un aporte adecuado de oxigeno puede incrementar la producción **(Yamanaka et al., 1989)**; de la misma manera **Arteaga (2014)**, menciona que la interface aire-líquido es más amplia en cultivos con agitación por lo que resulta exitoso para aumentar la producción de celulosa bacteriana.

**Tabla 5:** Peso del biofilm húmedo obtenido en el medio H-S

| Residuo agroindustrial | Cultivo (g) * | |
|---|---|---|
| | Estático | Agitación |
| **Estándar** | 4,9270 | 3,4755 |
| **Bagazo de caña** | 2,9402 | 2,8591 |
| **Salvado de arroz** | 2,6729 | 2,1733 |
| **Cáscara de cacao** | 3,6875 | 4,7208 |

* Promedio de tres replicas con dos repeticiones

En la **Tabla 6**, se visualiza que, con todos los residuos, bagazo de caña, salvado de arroz y cáscara de cacao se obtuvieron una mayor producción de biofilm en el cultivo estático corroborando con lo que mencionan la mayoría de autores. **Hernández (2018),** menciona que la producción de celulosa en cultivo estático es mayor que en cultivo agitado. Por otra parte la producción de biofilm en el estándar fue mayor en cultivo con agitación, esto puede deberse al adecuado crecimiento de las bacterias como menciona **Yamanaka et al. (1989)**.

**Tabla 6:** Peso del biofilm húmedo obtenido en el medio mínimo

| Residuo agroindustrial | Cultivo (g) * | |
|---|---|---|
| | Estático | Agitación |
| **Estándar** | 0,1377 | 0,4915 |
| **Bagazo de caña** | 3,4818 | 2,7139 |
| **Salvado de arroz** | 2,8539 | 2,0675 |
| **Cáscara de cacao** | 4,7592 | 3,2881 |

* Promedio de tres replicas con dos repeticiones

**Cálculo demostrativo del rendimiento en la producción de biofilm en base húmeda en medio H-S y medio mínimo.**

$$\boldsymbol{Rendimiento} = \frac{\boldsymbol{Peso\ del\ biofilm\ humedo}}{\boldsymbol{Peso\ del\ medio\ líquido\ empleado}} * \mathbf{100}\ \%$$

$$\boldsymbol{Rendimiento}\ (\boldsymbol{H-S}) = \frac{4{,}9270\ g}{20{,}677\ g} * 100\ \%$$

$$\boldsymbol{Rendimiento}\ (\boldsymbol{H-S}) = \mathbf{23{,}8284}\ \%$$

$$\boldsymbol{Rendimiento}\ (\boldsymbol{MM}) = \frac{0{,}1377\ g}{20{,}4109\ g} * 100\ \%$$

$$\boldsymbol{Rendimiento}\ (\boldsymbol{MM}) = \mathbf{0{,}6746}\ \%$$

En la **Tabla 7**, se observa que el residuo que presentó mayor rendimiento en el medio H-S es la cascara de cacao en cultivo con agitación con un valor de 22,8312 % casi igualando al estándar en cultivo estático (23,8284 %); por otra parte, el bagazo de caña y salvado de arroz presentaron mejores rendimientos en cultivo estático.

Mientras que, en el medio mínimo, el rendimiento del residuo de cáscara de cacao en cultivo estático (23,3169 %) supero considerablemente al estándar.

**Tabla 7:** Rendimiento obtenido en la producción de biofilm en medio H-S y medio mínimo

| Residuo agroindustrial | Medio H-S | | Medio mínimo | |
|---|---|---|---|---|
| | Cultivo (%) | | Cultivo (%) | |
| | Estático | Agitación | Estático | Agitación |
| **Estándar** | 23,8284 | 16,8085 | 0.6746 | 2,4080 |
| **Bagazo de caña** | 14,2197 | 13,8274 | 17,0585 | 13,2963 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Salvado de arroz** | 12,9269 | 10,5107 | 13,9822 | 10,1294 |
| **Cáscara de cacao** | 17,8338 | 22,8312 | 23,3169 | 16,1095 |

La **Tabla 8** muestra la cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS, en lo que se puede corroborar que los resultados son positivos ya que la concentración del estándar coincide con la metodología empleada, siendo la cantidad de glucosa 20 g / L **(Hestrin & Schramm, 1954)**. Además, se puede evidenciar que la cantidad de azúcar del medio al final del tratamiento disminuye; sin embargo, quedan cantidades de azúcares en el medio que la bacteria *Komagataeibacter xylinus* no puedo consumir.

Cabe mencionar que la cantidad de azúcar del salvado de arroz no pudo ser cuantificado debido a que los valores de estas fueron demasiado bajos.

**Tabla 8:** Cuantificación de azúcares reductores en el medio H-S y medio mínimo

| Estudio | Residuo | Medio H-S * | Medio mínimo * |
|---|---|---|---|
| **Inicial** | **Estándar** | 20,1959 | 19,9427 |
| | **Bagazo de caña** | 2,1547 | 1,9313 |
| | **Salvado de arroz** | NL | NL |
| | **Cáscara de cacao** | 2,7591 | 2,8021 |
| **Final Agitación** | **Estándar** | 4,6239 | 1,4844 |
| | **Bagazo de caña** | 0,6508 | 0,4217 |
| | **Salvado de arroz** | NL | NL |
| | **Cáscara de cacao** | 0,9745 | 1,1779 |
| **Final Estático** | **Estándar** | C | 4,9934 |
| | **Bagazo de caña** | C | 0,3071 |
| | **Salvado de arroz** | NL | NL |
| | **Cáscara de cacao** | 1,2724 | 2,0143 |

*Promedio de tres repeticiones. NL= No leído, C= Consumido

### 3.1.4 Impregnación con partículas de plata y zinc al mejor tratamiento

Después de un análisis en el programa Statgraphics se determinó que en el medio H-S, solo el factor A (tipo de residuo agroindustrial) presentó diferencia significativa (valores-P < 0,05). Teniendo que el mejor tratamiento fue el medio con cáscara de cacao ya que al compararlo con el estándar no presento efecto estadísticamente significativo sobre el peso del biofilm con un 95,0 % de nivel de confianza (**Figura 5**).

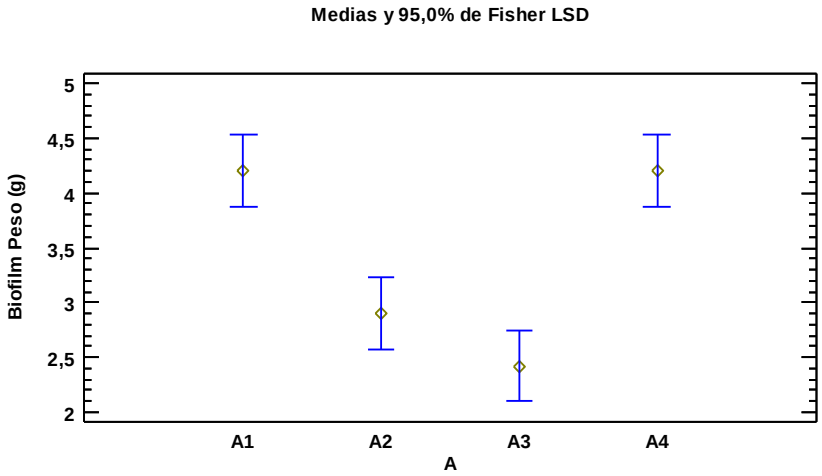



**Figura 5:** Prueba de medias del tipo de residuo agroindustrial (factor A - medio H-S)

Por otra parte, en el medio mínimo se determinó que el Factor A (tipo de residuo agroindustrial) y Factor B (condición del cultivo líquido), tienen diferencia estadísticamente significativa (valores-P < 0,05). Donde se puede evidenciar que el mejor tratamiento fue el medio con la cascara de cacao en el factor A (**Figura 6**). Mientras que en el factor B, el mejor tratamiento fue en el cultivo estático (**Figura 7**).

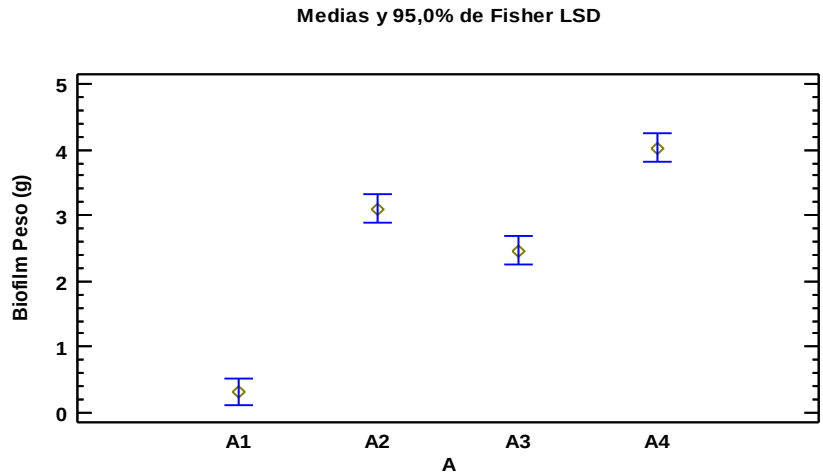



**Figura 6:** Prueba de medias del tipo de residuo agroindustrial (factor A - medio mínimo)

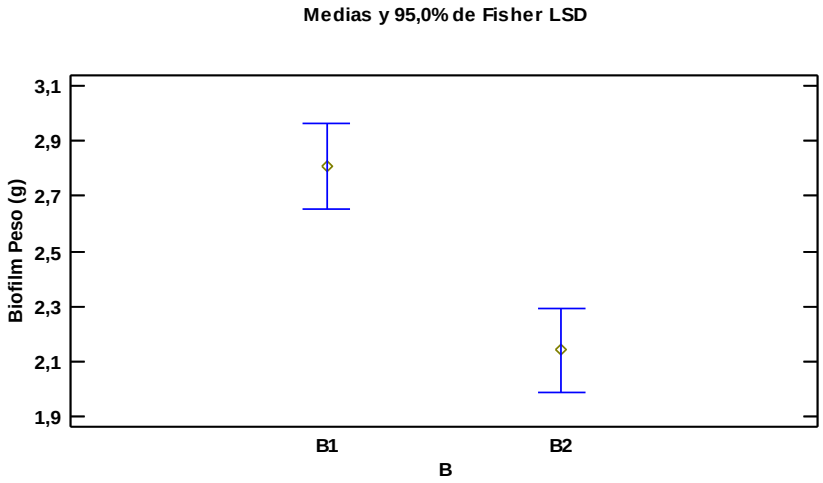



**Figura 7:** Prueba de medias de la condición del cultivo líquido (factor B - medio mínimo).

Luego del análisis estadístico y determinando cual fue el mejor tratamiento se realizó la impregnación con nanopartículas de plata y zinc, a los biofilms obtenidos con la cascara de cacao en medio H-S y medio mínimo, en cultivo estático y agitación, siguiendo la metodología descrita anteriormente **(Ali, Ambreen, et al., 2016)**.

### 3.1.5 Difracción de rayos x (XRD) de los biofilms bacterianos obtenidos

En el estudio de difracción de rayos x (XRD), se observaron que la mayoría de las muestras son amorfas y con impurezas, esto se debe a que los biofilms se secaron con todos los residuos agroindustriales que se quedaban impregnados; por otra parte, solo cuatro muestras eran amorfas (**Figura 9 a y b**, **Figura 10 b** y **Figura 11 b**).

En las **Figuras 8, 9, 10, y 11** de XRD, se puede visualizar tres picos correspondientes a los producidos por la celulosa, encontrándose en un rango de 14,2 - 14,9°; 16,3 - 17,9° y 22,2 - 22,9° el pico uno, dos y tres respectivamente, lo que indica la estructura típica de celulosa I. Estos valores son semejantes a los encontrado por **Castro et al., (2011)** en medios H-S, jugo de cascara de piña y jugo de caña de azúcar, con ángulos de difracción de 14,4°; 16,7° y 22,7°; asignando a los tres picos visibles en los planos cristalográficos (100), (010) y (110), correspondientes. **Wang et al., (2018)**, reporto datos similares con diferentes fuentes de carbono mencionando que la mayor intensidad del pico 14,5° que del pico 16,6° dejó en claro que el contenido de $I_\alpha$ era mayor que $I_\beta$ y la forma de los cristalitos de celulosa eran rectangulares. Las celulosas

nativas son compuestos de alomorfos $I_\alpha$ y $I_\beta$, existiendo diferencia en su estructura cristalina, en el caso de la celulosa $I_\alpha$ es en forma triclínica, mientras que la $I_\beta$ es monoclínica **(Santos, 2015)**.

Sin embargo, para el biofilm obtenido en el medio mínimo con bagazo de caña en el cultivo estático (**Figura 10 b**) y agitación (**Figura 11 b**), se observa picos con ángulos de alrededor de 34° lo que corresponde a la estructura de celulosa I, esto es corroborado por **(López et al., 2016),** quien en su estudio encontró un pico de 34,6° en el bagazo de caña.

Por otra parte, los picos de poca intensidad que se encuentra por encima del rango del ángulo de difracción de la celulosa (**Figura 8, 9, 10 y 11**) corresponden a los residuos agroindustriales, debido al diferente tamaño de partículas de cada residuo, mostrando picos más definidos los biofilms obtenidos a partir de salvado de arroz.

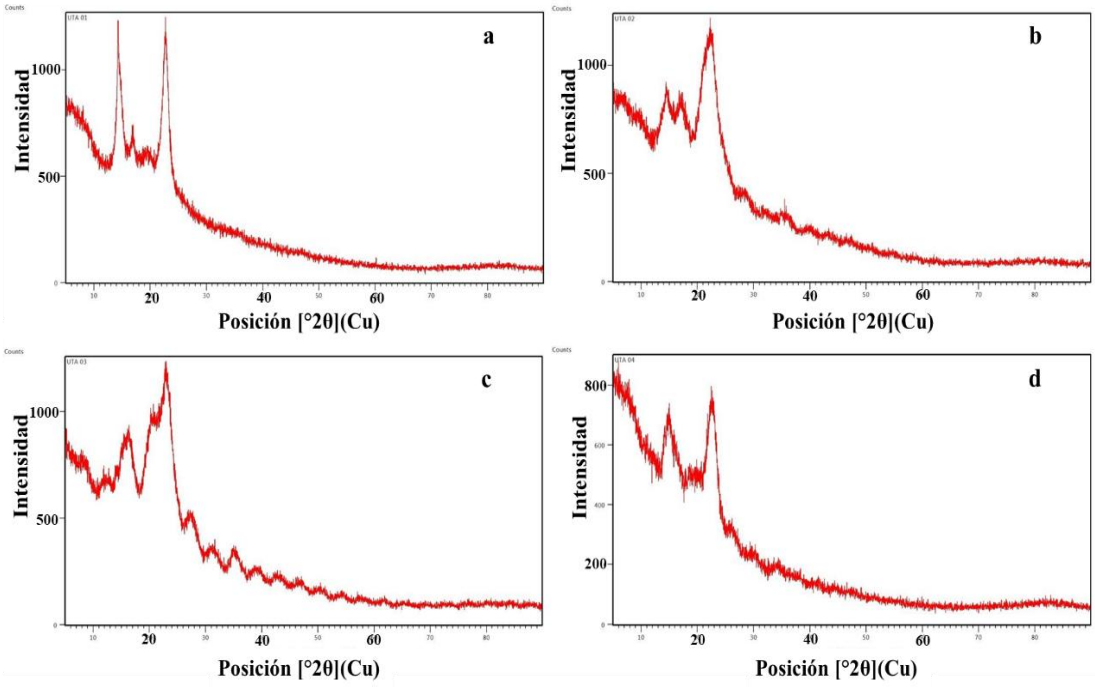



**Figura 8:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio H-S líquido en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

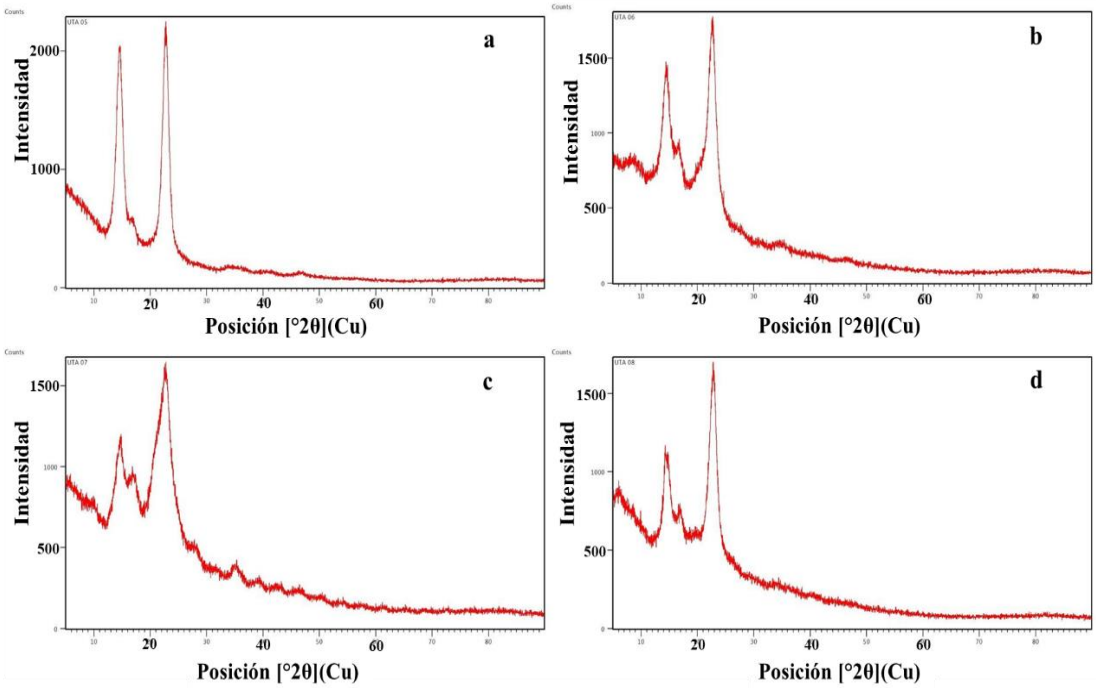



**Figura 9:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio H-S líquido en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

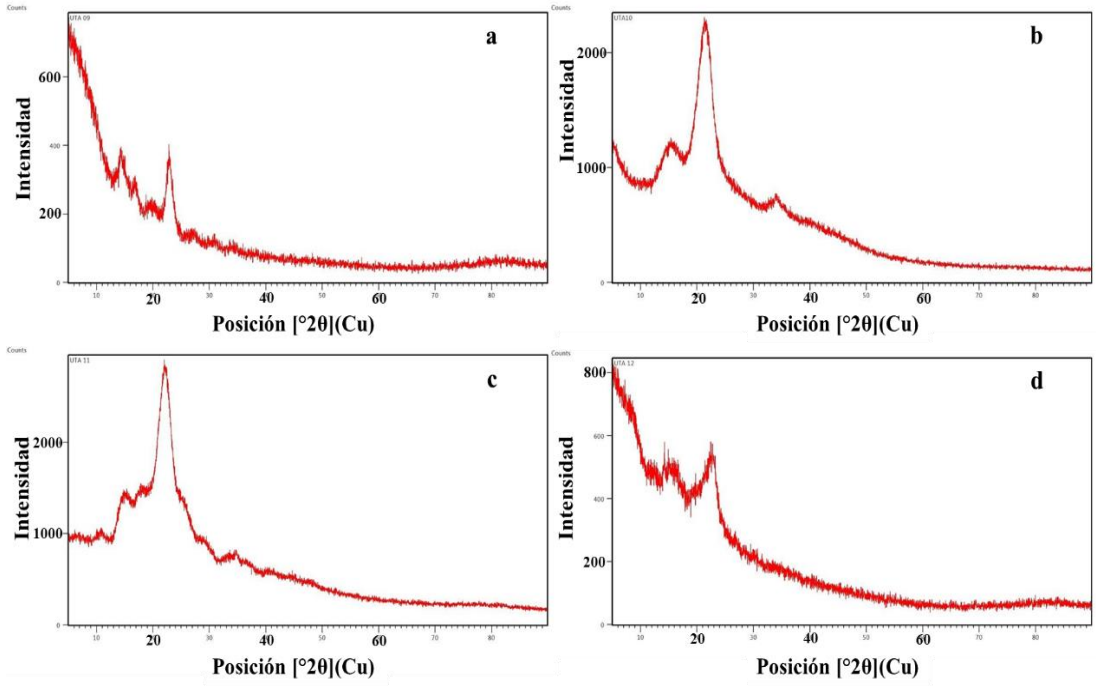



**Figura 10:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio mínimo líquido en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

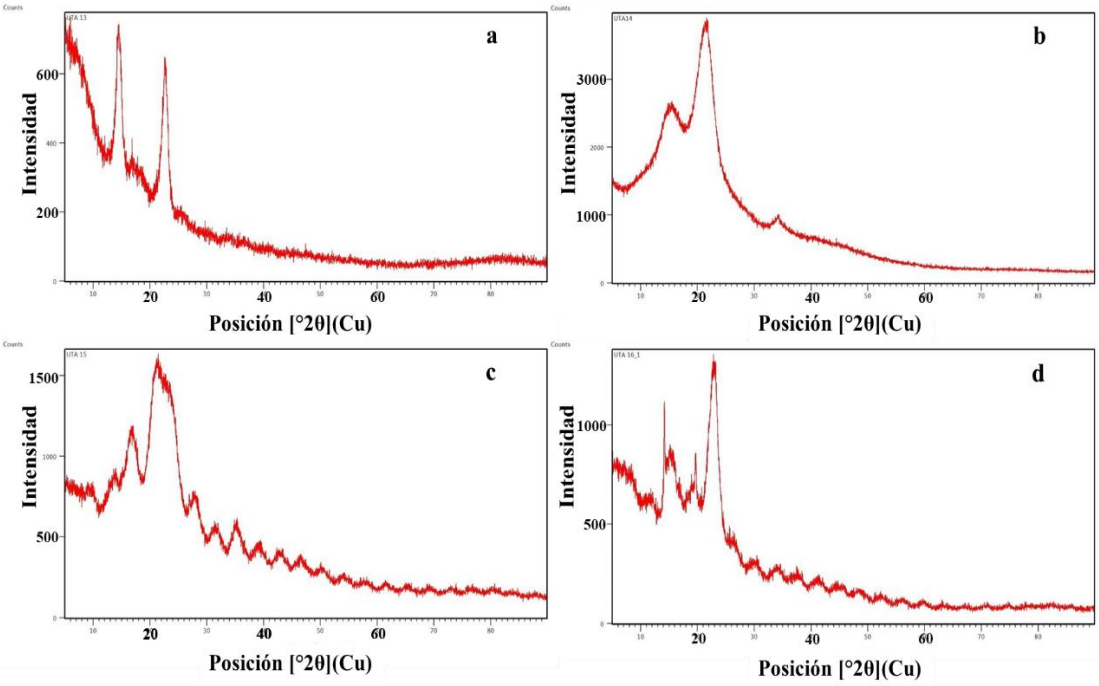



**Figura 11:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos en el medio mínimo líquido en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

En las **Figura 12** y **13**, se pudo determinar que existe una gran distorsión (interferencia) debido a las impurezas (residuos agroindustriales), después de los tres picos típicos de la celulosa, lo que representan esos picos no muy definidos a las nanopartículas de plata y zinc, por lo que no se pudo determinar los ángulos de difracción. En un estudio presentado por **Ali et al., (2018)**, encontró picos bien definidos de partículas de Zinc a partir de ángulos de difracción de 32,12° y picos a partir de 39,01° de partículas de plata en muestras de algodón impregnados con estas nanopartículas. Datos similares fueron mencionados por **Maria et al., (2010)**, con picos de difracción de 38.1°, 44.3°, 64.4° para la estructura de la plata; mientras que **Ali, Ambreen, et al., (2016)**, encontró varios picos de difracción agudos desde el ángulo de 31,7° para nanopartículas de Zn impregnadas en celulosa.

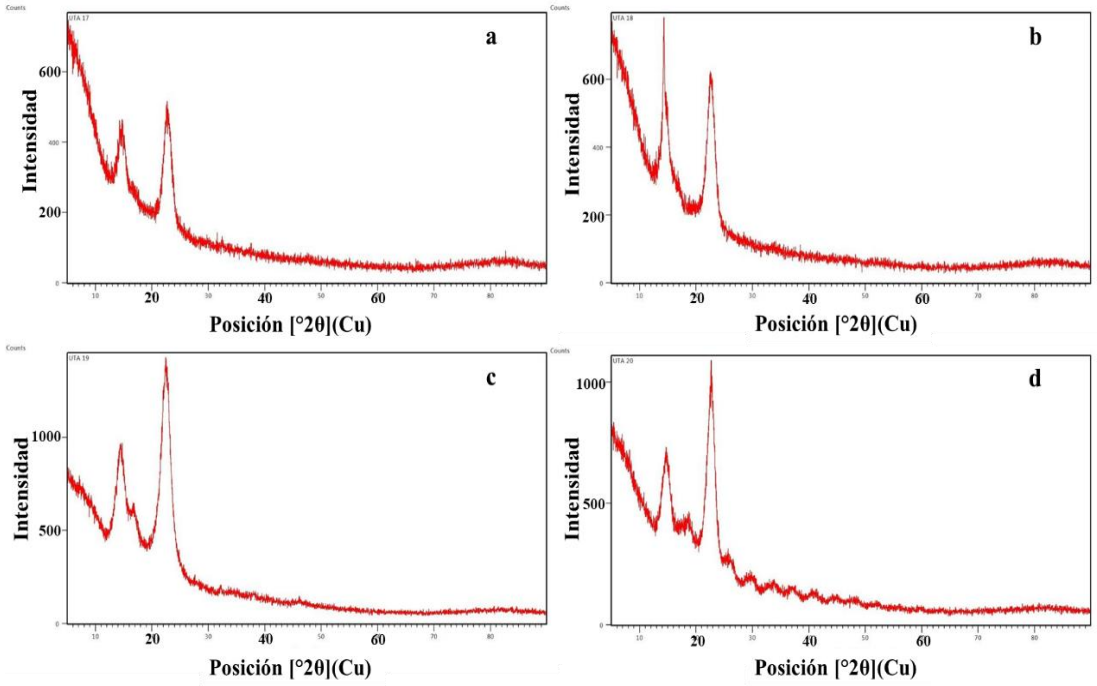



**Figura 12:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos de cáscara de cacao en medio H-S líquido con impregnación: (a) Estático - Ag, (b) Estático - Zn, (c) Agitación - Ag y (d) Agitación - Zn.

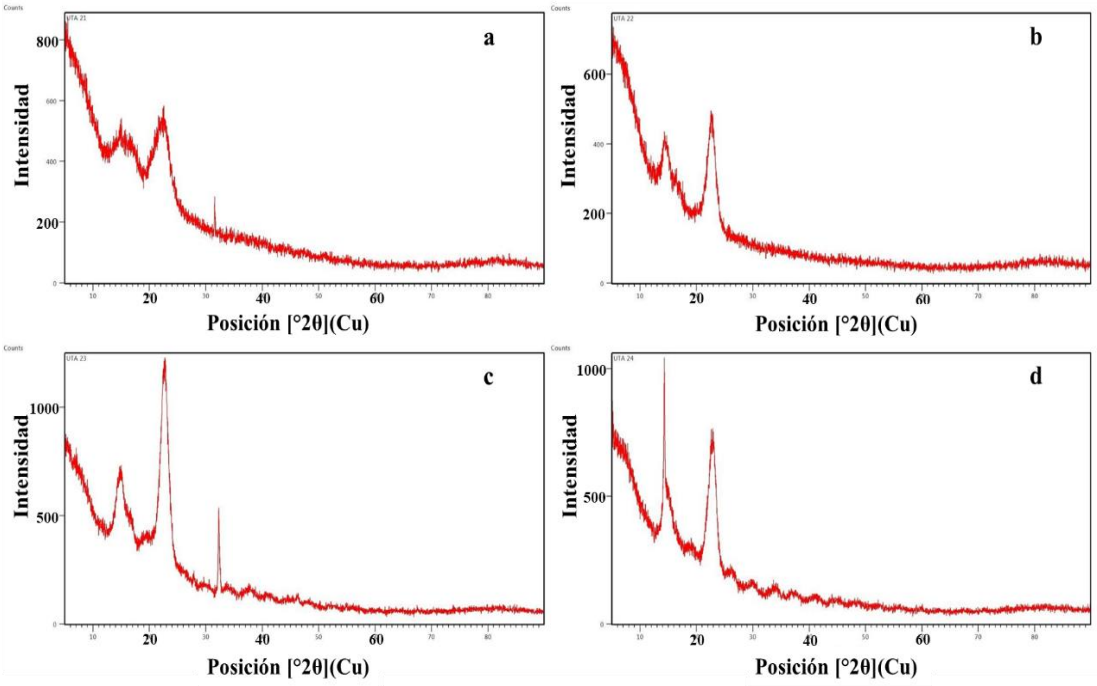



**Figura 13:** XRD de los biofilms bacteriano obtenidos de cáscara de cacao en medio mínimo líquido con impregnación: (a) Estático - Ag, (b) Estático - Zn, (c) Agitación - Ag y (d) Agitación - Zn.

### 3.1.6 Estudio de perfilometría de contacto en las diferentes muestras de biofilms bacterianos

En la **Tabla 9**, se puede observar los resultados de la rugosidad de los biofilms bacterianos producidos con los diferentes residuos agroindustriales, notándose que los biofilms producidos en medio mínimo en cultivo estático, agitación con bagazo de caña y medio H-S en cultivo en agitación con cáscara de cacao impregnado con partículas de Zn, presentan mayores valores de rugosidad con 78552,91; 85650,16 y 75349,18 nm respectivamente.

La rugosidad es descrita como desviaciones mínimas (irregularidades), distanciadas finamente, en la superficie nominal y definidas por las particularidades del material y el proceso que formó la superficie **(Torrejón, 2013)**.

También la rugosidad superficial es transcendental para el desarrollo de la colonización microbiana **(Miller et al., 2012)**. La colonización microbiana aumenta cuando la rugosidad de la superficie crece y el área de superficie es mayor **(Zambrano & Suárez, 2006)**.

**Tabla 9:** Datos de rugosidad de las muestras de biofilms.

| Medio | Tipo de Cultivo | Residuo agroindustrial | Rugosidad (nm) |
|---|---|---|---|
| H-S | Estático | Estándar | 3885,27 |
| H-S | Estático | Bagazo de caña | 32646,53 |
| H-S | Estático | Salvado de arroz | 33796,01 |
| H-S | Estático | Cáscara de cacao | 22644,82 |
| H-S | Agitación | Estándar | 15865,76 |
| H-S | Agitación | Bagazo de caña | 15728,71 |
| H-S | Agitación | Salvado de arroz | 23740,56 |
| H-S | Agitación | Cáscara de cacao | 7866,36 |
| M-M | Estático | Estándar | 5537,74 |
| M-M | Estático | Bagazo de caña | **78552,91** |
| M-M | Estático | Salvado de arroz | 30952,41 |
| M-M | Estático | Cáscara de cacao | 50668,72 |
| M-M | Agitación | Estándar | 12955,63 |
| M-M | Agitación | Bagazo de caña | **85650,16** |
| M-M | Agitación | Salvado de arroz | 72663,63 |
| M-M | Agitación | Cáscara de cacao | 28435,53 |
| H-S | Estático | Cáscara de cacao-Ag | 30682,43 |
| H-S | Estático | Cáscara de cacao-Zn | 30577,24 |
| H-S | Agitación | Cáscara de cacao-Ag | 33004,56 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| H-S | Agitación | Cáscara de cacao-Zn | **75349,18** |
| M-M | Estático | Cáscara de cacao-Ag | 25675,92 |
| M-M | Estático | Cáscara de cacao-Zn | 28386,51 |
| M-M | Agitación | Cáscara de cacao-Ag | 35755,03 |
| M-M | Agitación | Cáscara de cacao-Zn | 8151,16 |

### 3.1.7 Identificación de la estructura de los biofilms bacterianos mediante microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la estructura morfológica de los biofilms (**Figura 14**), obtenidos del medio H-S en cultivo estático, se observa que las microfibrillas se encuentran entrelazadas formando una red, notándose que los residuos agroindustriales con diferentes tamaños de partículas se adhieren a la estructura de la celulosa. Es necesario mencionar que cada biofilm obtenido con los residuos presentan una estructura diferente y única debido a la fuente de carbono utilizado. Sin embargó, el biofilm de salvado de arroz (**Figura 14 c**) muestra fibras ultrafinas fáciles de identificar. Según **Klemm et al., (2001)**, mencionan que las características de textura y color provienen del medio de cultivo, y que pueden ser eliminados con el blanqueado con NaOH para obtener un biofilm cristalino.

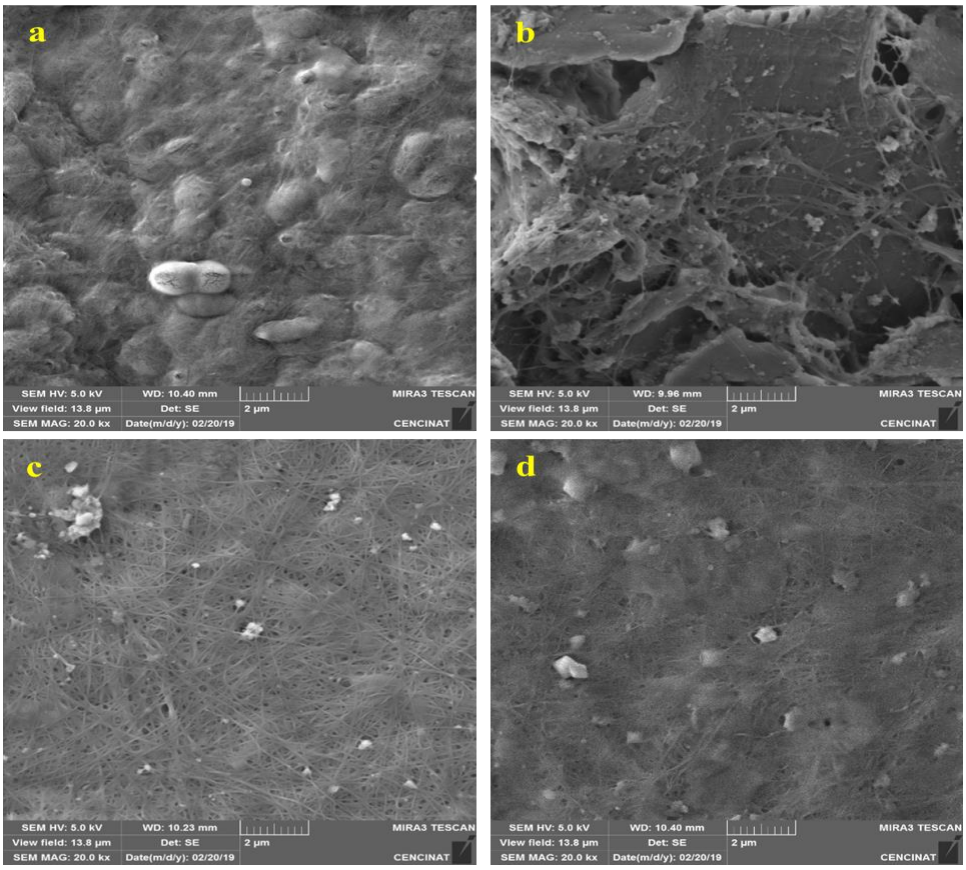



**Figura 14:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

Por otra parte, en la **Figura 15**, se observa una aglomeración de microfibrillas en el biofilm obtenido del estándar (**Figura 15 a**) en medio H-S con cultivo agitado, formando una red poco porosa, que puede ser comparada con el biofilm de bagazo de caña (**Figura 15 b**) pero adherido los residuos. Según **Heo & Son (2002)**, menciona que en cultivo agitado los biofilm se obtienen como suspensiones fibrosas con una alta viscosidad.

Mientras que en los biofilms de salvado de arroz y cáscara de cacao (**Figura 15 c** y **d**) las microfibrillas se encuentran más separadas formando una red porosa y adheridos a estas estructuras los residuos.

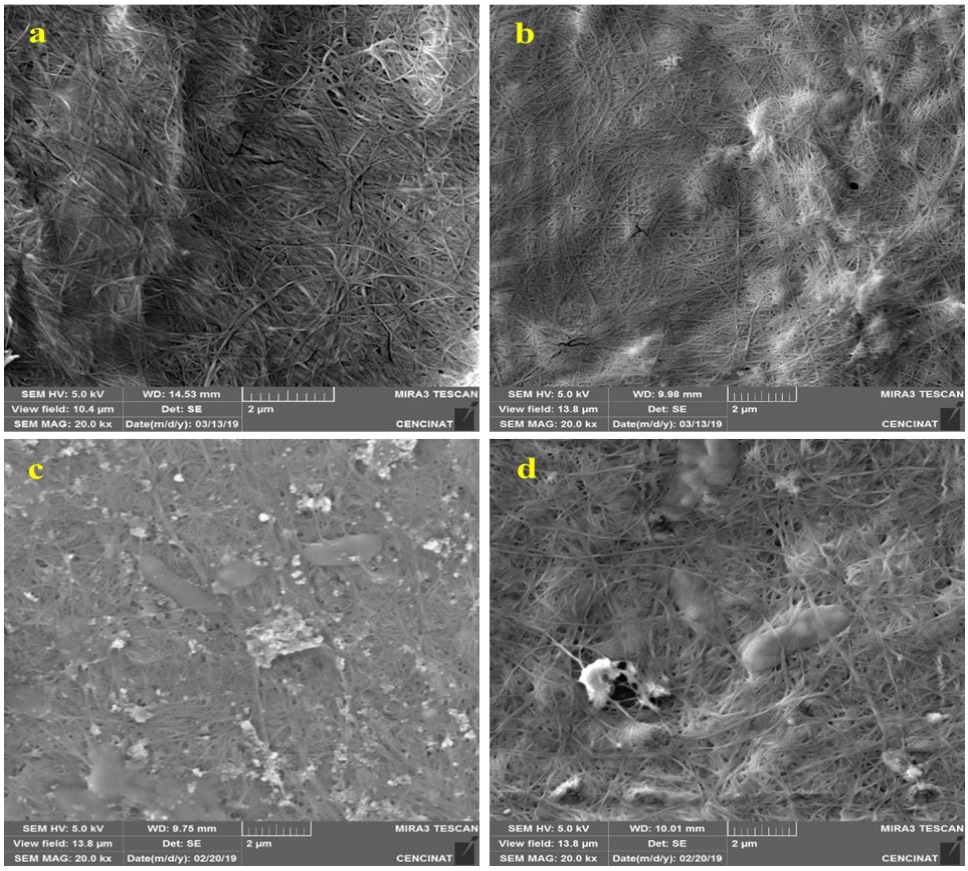



**Figura 15:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

En la estructura morfológica de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo estático (**Figura 16**), se observa que existe una formación de las microfibrillas finas entrelazadas formando una red fácil de identificar (**Figura 16 a** y **d**). Según **Chávez et al., (2004)**, señala que las microfibrillas se cristalizan en cintas que se sobreponen creando planos paralelos en cultivo estático.

En la **Figura 16 b** y **c**, se observa que los residuos agroindustriales se encuentran adheridos a las microfibrillas del biofilm, además de presentar poros más gruesos.

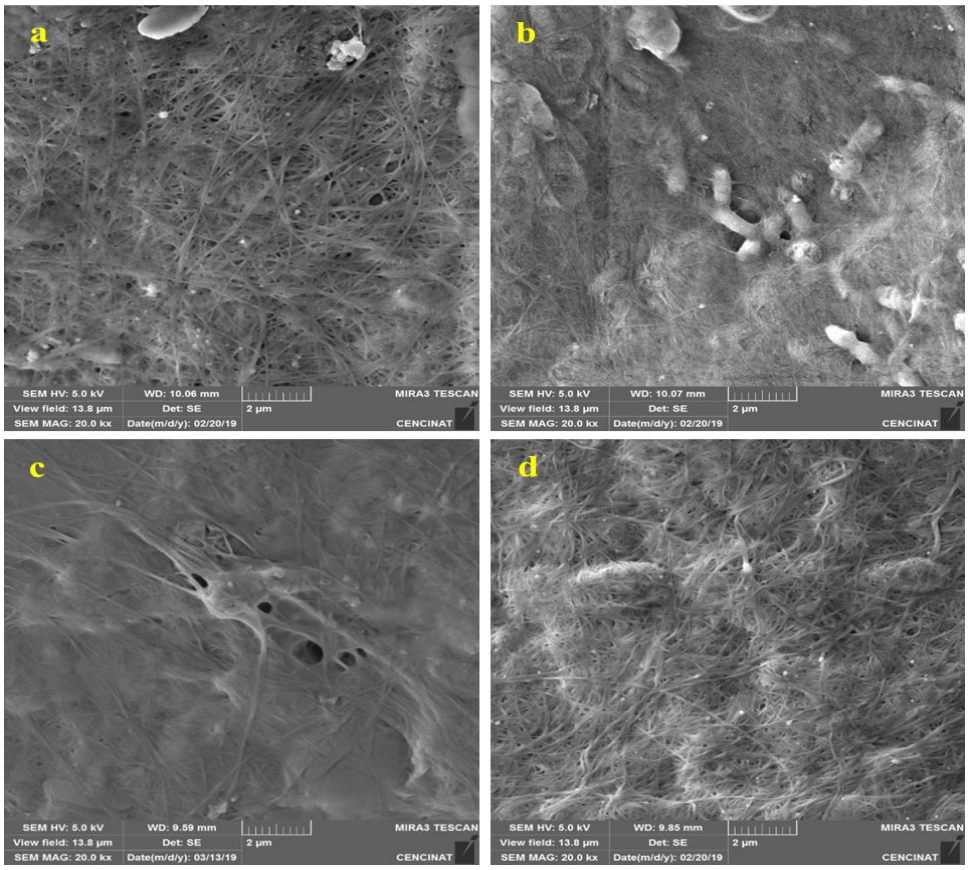



**Figura 16:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

Mientras que en la **Figura 17 a**, **c** y **d** se observa microfibrillas finas en la estructura de los biofilms. Por otra parte, en la estructura del biofilm de bagazo de caña (**Figura 17 b**) no se observa fibras ya que no hubo una adecuada formación del biofilm. Cabe mencionar que los residuos agroindustriales con diferentes tamaños de partículas se encuentran adheridas a la estructura del biofilm.

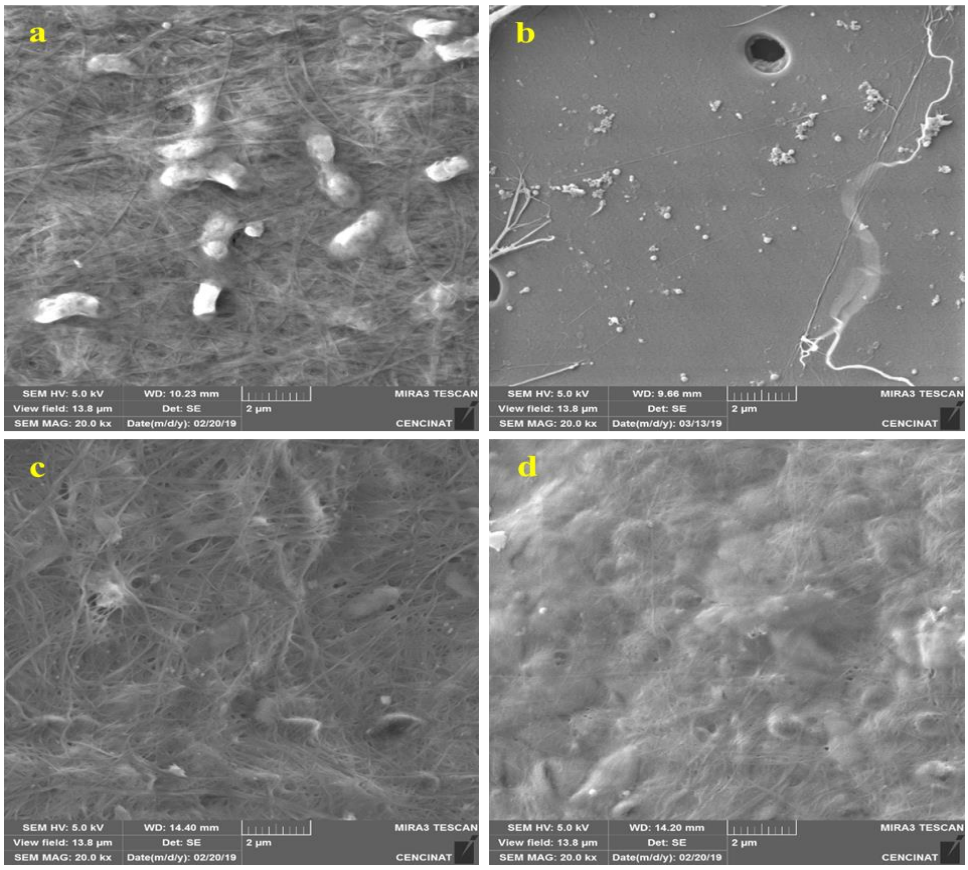



**Figura 17:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.

Es necesario indicar que en las **Figura 14, 15, 16 y 17** se visualiza claramente la presencia de bacterias (*Komagataeibacter xylinus*) en forma ovalada-alargadas en la superficie de los biofilms, ya que no se realizó el respectivo lavado; mientras que en los biofilms impregnadas con Ag y Zn **Figuras 18, 19, 20 y 21** no se observa la presencia de las bacterias ya que pudieron ser eliminadas por los procesos químico realizados durante la impregnación o por la presencia de las nanopartículas de Ag y Zn que no dejaron que las bacterias se adhieran a la celulosa.

En las figuras **Figura 18** y **19**, se puede observar los biofilms obtenidos a partir del medio H-S en cultivo estático y agitación respectivamente con cáscara de cacao que corresponde al mejor tratamiento, notándose en la estructura de los biofilms la presencia de elementos con diferentes números atómicos distribuidos en las muestras (**Figura 18 a y d, Figura 19 a y d**). Mediante el análisis de Mapping se pudo verificar

la presencia de nanopartículas de Ag (**Figura 18-19, b y c**) y de Zn (**Figura 18-19, e y f**) impregnadas en la estructura de los biofilms.

La nanofibrilla de celulosa bacteriana con carga negativa atrae a los iones Ag a través de interacciones electrostáticas, manteniendo a los iones Ag estables y uniformemente distribuidos en la superficie de las nanofibrillas de celulosa bacteriana. Las interacciones electrostáticas (dipolo iónico) tiene lugar entre los iones Ag y los átomos de oxígeno altos en electrones de la matriz de celulosa, que resultan del hidroxilo y el éter **(Maria et al., 2010)**.

Mostrándose una morfología más definida de las microfibrillas de los biofilms obtenidos en cultivo agitado (**Figura 19**); además se pudo identificar mejor las nanopartículas de Ag y Zn. La alta densidad de oxígeno de las fibras de celulosa actúa como material de soporte y de unión para las nanopartículas metálicas **(Ali, Haq, et al., 2016)**. Además, la adsorción se puede atribuir a la interacción entre los iones metálicos y los sitios de unión de la celulosa (los grupos funcionales de la superficie, la multicapa y el área porosa dentro de las fibras) **(Abbar et al., 2017)**.

**Ali, Ambreen, et al., (2016)**, menciona que los iones de Zn interactúan electrostáticamente con los grupos laterales de celulosa. También la celulosa al poseer una gran cantidad de poros **(Maneerung, Tokura, & Rujiravanit, 2008)**, facilita la adsorción de los iones de Zn y el hidroxilo de la celulosa interactúa con los iones metálicos electro-positivos.

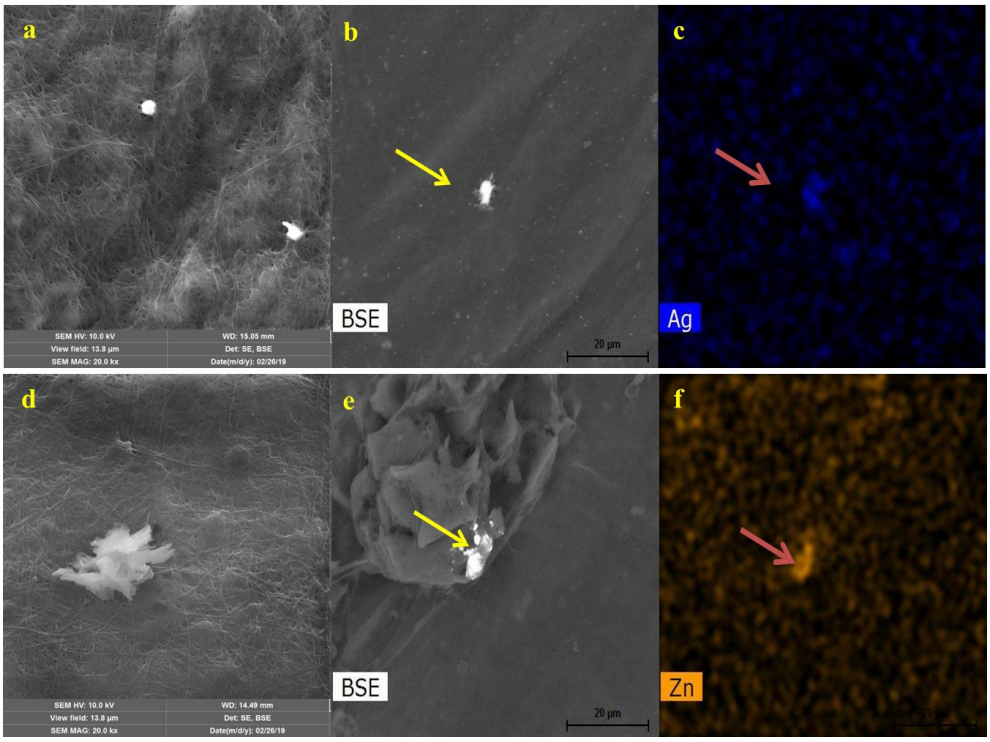



**Figura 18:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo estático con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping.

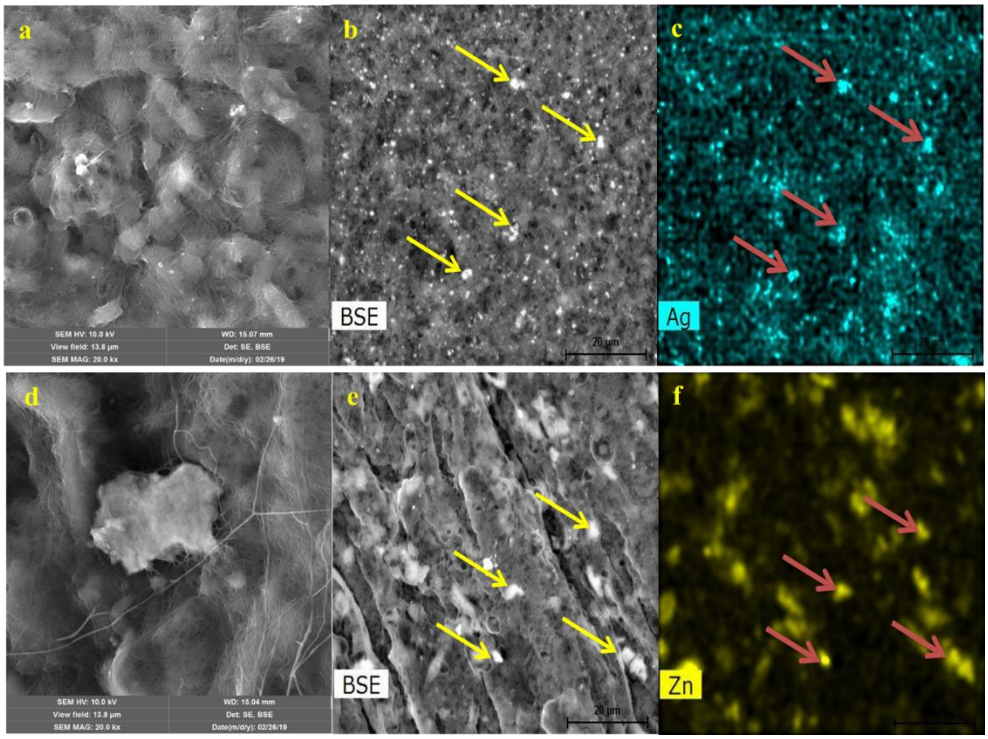



**Figura 19:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio H-S en cultivo agitado con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping.

En la **Figura 20** y **21**, se visualiza los biofilms obtenidos en el medio mínimo en cultivo estático y agitación respectivamente con cáscara de cacao, notándose en la estructura de los biofilms la presencia de elementos con diferentes números atómicos distribuidos en las muestras (**Figura 20 a y d, Figura 21 a y d**). Además, el análisis de Mapping verificó la presencia de nanopartículas de Ag (**Figura 20-21 b y c**) y Zn (**Figura 20-21 e y f**) impregnadas en la estructura de los biofilms.

En estudios realizados por **He, Kunitake, & Nakao (2003)**, indicó que las interacciones electrostáticas, se da entre los átomos de oxígeno repletos en electrones de los grupos hidroxilos polares en la superficie e interior de la celulosa bacteriana interactuando con los cationes de metales de transición electro-positivos.

Además, en las **Figuras 20 y 21**, se puede visualizar que las microfibrillas de los biofilms se encuentran agrupadas formando una estructura más compleja.

Los biofilms con impregnación de nanopartículas de Ag y Zn, pueden ser utilizados en diferentes áreas comerciales como, salud, cosmetología, industrias alimentarias, entre otras; ya que estas partículas no son consideradas nocivas para el ser humano.

La celulosa impregnada con nanopartículas de Ag se puede utilizar de manera segura en el vendaje de heridas para prevenir el ataque bacteriano y la eliminación de radicales libres en la herida; también como filtros para la biorremediación y la purificación de aguas residuales **(Ali, Haq, et al., 2016)**.

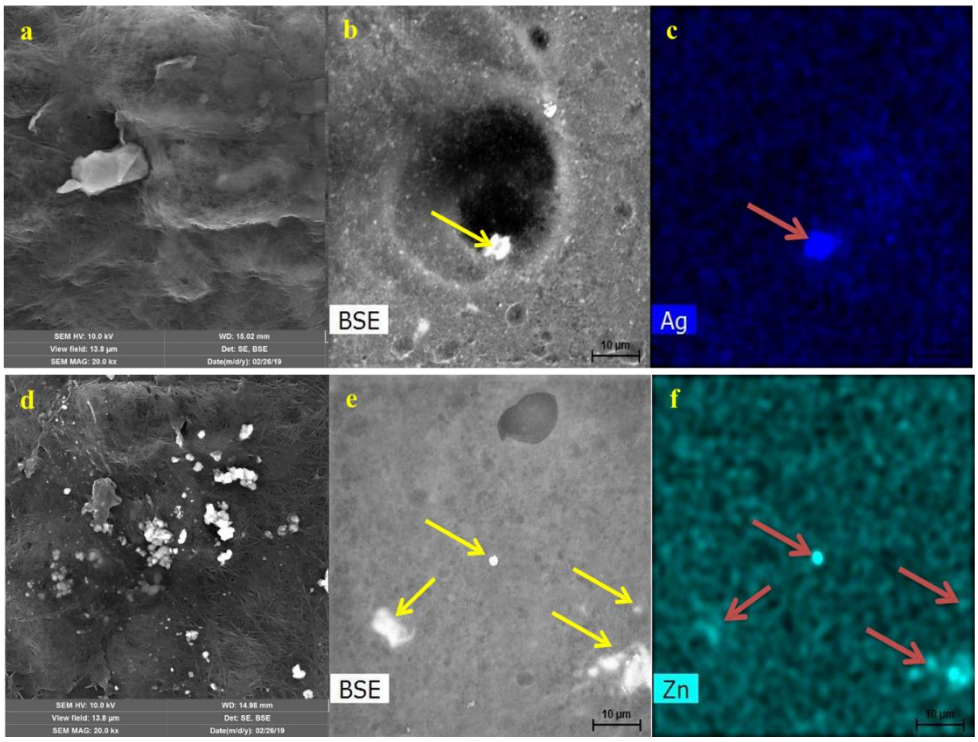



**Figura 20:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo estático con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping.

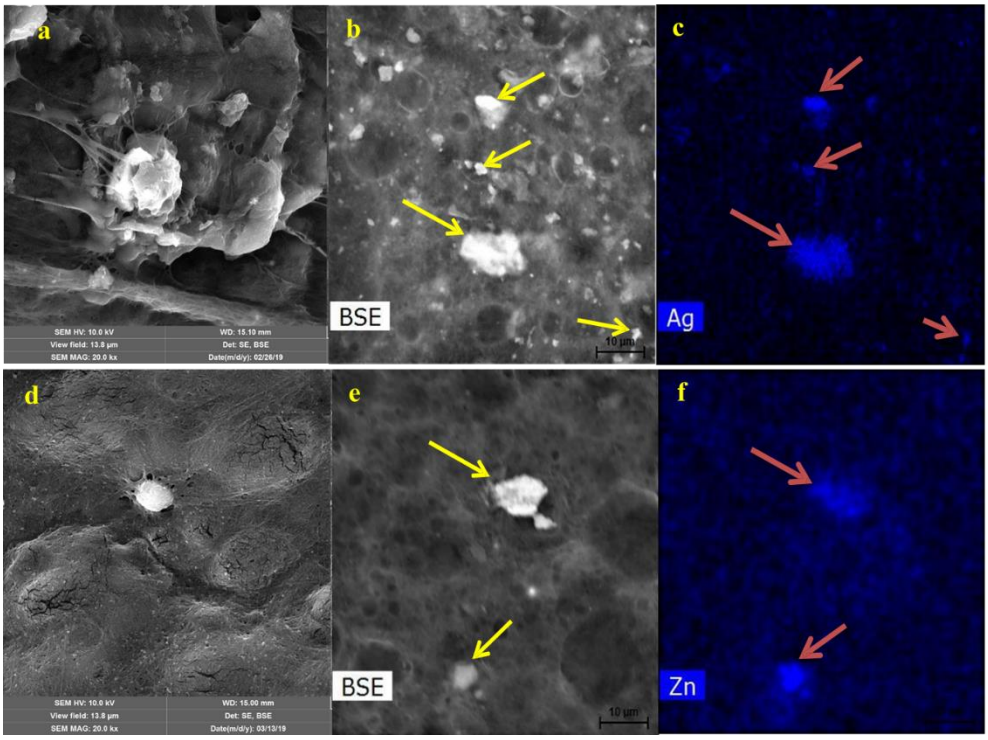



**Figura 21:** Microfotografías SEM de los biofilms obtenidos del medio mínimo en cultivo agitado con cáscara de cacao e impregnación. Nanopartículas de Ag: (a) SE, (b) BSE y (c) Mapping. Nanopartículas de Zn: (d) SE, (e) BSE y (f) Mapping.

### 3.2 Verificación de hipótesis

Mediante el análisis e interpretación de datos en ANOVA multifactorial de los ensayos planteados, con un 95 % de confianza; se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, debido a que la utilización de diferentes residuos agroindustriales, bagazo de caña, salvado de arroz y cáscara de cacao, para la producción de biofilms a partir de *Komagataeibacter xylinus* tiene efecto estadísticamente significativo tanto para el medio H-S y medio mínimo, demostrando que el mejor tratamiento para los dos medios fue los biofilms obtenidos a partir de la cáscara de cacao.

# CAPÍTULO IV

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1 Conclusiones

- Los residuos agroindustriales como el salvado de arroz, bagazo de caña y cáscara de cacao, presentaron resultados viables para la producción de biofilms a partir de *Komagataeibacter xylinus*, ya que poseen un alto contenido de nutrientes.

- Se obtuvo biofilms de buenas características morfológicas en el medio H-S, con sustitución de la fuente de carbono (Glucosa) con los diferentes residuos agroindustriales, teniendo que estos residuos aportaron al medio una cantidad adecuada de carbono para que la bacteria *Komagataeibacter xylinus* se desarrollara y forme las películas de celulosa bacteriana; pese a poseer una menor cantidad de azúcares en comparación con el estándar.

- Se identificó un medio mínimo que poseía solo fuentes minerales y se adiciono los residuos agroindustriales, obteniéndose tres medios diferentes; demostrando que estos residuos incorporan al medio la fuente de carbono y nitrógeno necesario, para que la bacteria *Komagataeibacter xylinus* se desarrollara y forme los biofilms bacterianos de diferentes características.

- En la determinación del rendimiento en la producción de biofilms bacterianos, se obtuvo que la cáscara de cacao presentó superiores características, ya que los biofilms poseían mejores estructuras morfológicas y peso; teniendo que en medio H-S el mejor rendimiento fue en cultivo con agitación dando un valor de 22,8312 %; mientras que en el medio mínimo fue en cultivo estático con 23,3169 %.

- Se realizó una impregnación con partículas de plata y zinc a los biofilms obtenidos en el medio H-S y medio mínimo con la cáscara de cacao ya que presento el mejor rendimiento y características morfológicas; e incluso

demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa con el medio estándar (glucosa); y mediante un Mapping de las micrografías del SEM se pudo verificar la presencia de nanopartículas de Ag y Zn impregnadas en las estructuras de los biofilms.

- Se identificó que los biofilms bacterianos obtenidos con salvado de arroz, bagazo de caña y cáscara de cacao poseen una estructura típica de la celulosa I ya que los picos se encontraban dentro de los rangos de los ángulos de difracción. Además, se observó mediante análisis de SEM que los biofilms poseía fibras gruesas formando una estructura compleja (rígida).

## 4.2 Recomendaciones

- Es recomendable que se estudie la utilización de otras fuentes de carbono para la producción de biofilm, ya que las industrias desechas los residuos comúnmente al ambiente causando graves contaminaciones.

- Es necesario que el biofilm que se obtenga a partir de residuos agroindustriales sean adecuadamente lavados con agua destilada y blanqueados con hidróxido de sodio 0,01 %, en el caso de ser utilizados como envolturas para alimentos.

- Es necesario realizar el lavado y blanqueado de los biofilms obtenidos a partir de residuos agroindustriales antes de realizar la impregnación de metales, ya que facilitaría la verificación de las nanopartículas metálicas en la estructura.

- El biofilm obtenido a partir de cáscara de cacao al poseer una alta cantidad de retención de agua, dándole el respectivo tratamiento puede ser considerado como un biopolímero que utilizan para regar plantaciones en lugares secos o en momentos de sequía.

- Es necesario realizar estudios a profundidad para determinar con que otras moléculas pueden ser incorporadas o compatibles con los biofilms bacterianos obtenidos a partir de residuos agroindustriales para hacerlas más resistentes y poder ser utilizados en la fabricación de materiales biodegradables como botellas, fundas, cucharas, etc.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Abbar, B., Alem, A., Marcotte, S., Pantet, A., Ahfir, N.-D., Bizet, L., & Duriatti, D. (2017). Experimental investigation on removal of heavy metals (Cu2+, Pb2+, and Zn2+) from aqueous solution by flax fibres. *Process Safety and Environmental Protection*, *109*, 639–647. https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.05.012

Acosta, J. (2019). *Estimación y efecto sobre la vida útil de Fresa (Fragaria x ananassa) con el uso de biofilm producido por Komagataeibacter xylinus*. Universidad Técnica de Ambato.

Aguilar, N. (2011). Efecto del almacenamiento de bagazo de caña en las propiedades físicas de celulosa grado papel. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, *12*(2), 189–197. https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2011.12n2.019

Ali, A., Ambreen, S., Maqbool, Q., Naz, S., Shams, M., Ahmad, M., … Zia, M. (2016). Zinc impregnated cellulose nanocomposites: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, *98*, 174–182. https://doi.org/10.1016/J.JPCS.2016.07.007

Ali, A., Gul, A., Mannan, A., & Zia, M. (2018). Efficient metal adsorption and microbial reduction from Rawal Lake wastewater using metal nanoparticle coated cotton. *Science of The Total Environment*, *639*, 26–39. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.05.133

Ali, A., Haq, I. U., Akhtar, J., Sher, M., Ahmed, N., & Zia, M. (2016). Synthesis of Ag-NPs impregnated cellulose composite material: its possible role in wound healing and photocatalysis. *IET Nanobiotechnology*, *11*(4), 477–484. https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0086

Arteaga, L. J. (2014). *Evaluación de residuos agroindustriales como sustrato para la producción de celulosa bacteriana empleando Gluconacetobacter medellinensis*. Universidad Pontificia Bolivariana (Medellín). Retrieved from https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3448/Evaluación de residuos agroindustriales para la producción de medio de cultivo para

Gluconacetobacter medellinensis.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, *75*(8), R175-81. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x

Baena, L., & García, N. (2012). *Obtención y caracterización de fibra dietaría a partir de cascarilla de las semillas tostadas de Theobroma cacao L. de una industria chocolatera colombiana*. Universidad Tecnológica de Pereira. Retrieved from http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesisd/textoyanexos/66392B139.pdf

Barén, C. (2013). *Utilización del mucílago de cacao (Theobroma cacao L.), tipo nacional y CCN-51 en la obtención de dos jaleas a partir de tres formulaciones, Quevedo, Ecuador, 2013*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Retrieved from http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/240/1/T-UTEQ-0005.pdf

Camacho, G. (2016). *Elaboración de un tablero de partículas a partir de la cascara de cacao y su aplicación para cielos rasos y paredes*. Universidad Técnica Particular de Loja. Retrieved from http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/16058/1/CAMACHO ABAD GUISEL KRUZKAYA.pdf

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose*, *23*(1), 57–91. https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0

Carrasco, O. (2015). *Obtención de harina baja en gluten a partir de la cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y nacional*. Universidad Técnica de Machala. Retrieved from http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3647/1/CD000020-TRABAJO COMPLETO-pdf

Carreño, L., Caicedo, L., & Martínez, C. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Scielo. Ing. Cienc*, *8*(16), 307–335. Retrieved from http://www.eafit.edu.co/ingciencia

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.-L., Caro, G., Mondragon, I., & Gañán, P. (2011).

Structural characterization of bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter swingsii sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 96–102. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072

Chávez, J., Martínez, S., Contreras, M., & Escamilla, E. (2004). Celulosa Bacteriana en Gluconacetobacter Xylinum: Biosíntesis y Aplicaciones. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *7*(1). Retrieved from https://www.redalyc.org/html/432/43270103/

Christiansen, K. (2018). *Manual para la Molienda de Sorgo o Maicillo, Usando Molinos CTI de Discos*. Nebraska-Lincoln. Retrieved from http://digitalcommons.unl.edu/intsormilpubshttp://digitalcommons.unl.edu/intsormilpubs/16

Crawford, D. L. (1978). Lignocellulose decomposition by selected Streptomyces strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *35*(6), 1041–1045.

Erbas, E., Kiziltas, A., & Gardner, D. J. (2015). Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. *Carbohydrate Polymers*, *124*, 131–138. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.01.036

Gullo, M., Sola, A., Zanichelli, G., Montorsi, M., Messori, M., & Giudici, P. (2017). Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(22), 8115–8127. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8539-3

He, J., Kunitake, T., & Nakao, A. (2003). Facile In Situ Synthesis of Noble Metal Nanoparticles in Porous Cellulose Fibers. https://doi.org/10.1021/CM034720R

Heo, M.-S., & Son, H.-J. (2002). Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by Acetobacter sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *36*(1), 41. https://doi.org/10.1042/BA20020018

Hernández, L. (2018). *Determinación del rendimiento y caracterización de la producción de celulosa bacteriana de Kombucha*. Universidad Rafael Landívar. Retrieved from http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/02/02/Hernandez-Lisbeth.pdf

Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. *The Biochemical Journal*, *58*(2), 345–352.

Jaramillo, R., Perna, O., Revollo, A., Arrieta, C., & Escamilla, E. (2013). Efecto de diferentes concentraciones de fructosa sobre la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático. *Revista Colombiana de Ciencia Animal – RECIA*, *5*(1), 116–130.

Jiménez, H. (2018). *Desarrollo de una barra de cereal tipo energética mediante el uso de cascarilla de cacao (Theobroma cacao).* Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, *26*(9), 1561–1603. https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1

López, A., Bolio, G., Solórzano, M., Acosta, G., Hernández, M., Salgado, S., & Córdova, S. (2016). Obtención de Celulosa a Partir de Bagazo de Caña de Azúcar (Saccharum spp.). *Agroproductividad*, *9*(7), 43. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/306031507

Maneerung, T., Tokura, S., & Rujiravanit, R. (2008). Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, *72*(1), 43–51. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2007.07.025

Maria, L., Santos, A., Oliveira, P., Valle, A., Barud, H., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. (2010). Preparation and antibacterial activity of silver nanoparticles impregnated in bacterial cellulose. *Polímeros*, *20*(1), 72–77. https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000001

Mármol, J., & Liviapoma, R. (2014). *Proyecto asociativo para la creación de una empresa dedicada a la fabricación de papel bond en base del bagazo de la caña de azúcar, ubicada en el valle del chota, parroquia Ambuqui, provincia de Imbabura y su distribución en la ciudad de Quito.* Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Retrieved from https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6249/1/UPS-QT04741.pdf

Miller, A., Rogerio-Candelera, M., Dionísio, A., Macedo, M., & Saiz-Jiménez, C. (2012). Evaluación de la influencia de la rugosidad superficial sobre la colonización epilítica de calizas mediante técnicas sin contacto. *Construcc*, *62*, 411–424. https://doi.org/10.3989/mc.2012.64410

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

Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 518–523. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.008

Pacheco, E., & Peña, J. (2006). Efecto del salvado de arroz sobre parámetros químicos, físicos y sensoriales de arepas precocidas y congeladas. *Revista de La Facultad de Agronomía*, *23*(2), 234–245. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-78182006000200010&script=sci_arttext&tlng=pt

Panchana, A., & Soto, G. (2017). *Diseño de mezcla simplex-centroide para la optimización de un cultivo productor de celulosa bacteriana*. Universidad de Guayaquil. Retrieved from http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/28033/1/TESIS APGS FINAL.pdf

Santos, S. (2015). *Aplicación de la celulosa bacteriana a la restauración del patrimonio bibliográfico y documental en papel*. Universidad Politécnica de Madrid. Retrieved from http://oa.upm.es/39035/1/07_2015_SARA_MARIA_SANTOS_DE_DIOS.pdf

Silva, M., & Vidal, S. (2012). *Influencia del Método de Estabilización en el Grado de Deterioro del Salvado de Arroz Ecuatoriano Bajo Dos Condiciones de Almacenamiento, Cosecha Invierno*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Retrieved from https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/90199/D-79727.pdf

Singhsa, P., Narain, R., & Manuspiya, H. (2018). Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different Komagataeibacter xylinus strains and carbon sources in static and agitated conditions. *Cellulose*, *25*(3), 1571–1581.

https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1

Soriano, J., & Barreto, M. (2018). *Síntesis y estudio de propiedades de celulosa bacteriana obtenida en piña y banano, inoculados con Kombucha*. Universidad de Guayaquil. Retrieved from http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/27913/1/Tesis-Celulosa-Bacteriana-Piña-Banano.pdf

Tabuenca, E. (2018). Salvado de arroz y para qué sirve - Nutritelia. Retrieved January 15, 2019, from https://www.nutritelia.com/salvado-arroz-sirve/

Tapia, C. (2015). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) variedad arriba y CCN51 para la elaboración de una infusión*. Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11981/1/AL 574.pdf

Torrejón, D. (2013). *Estudio de la Adhesión en la Rugosidad del Aluminio*. Universidad Carlos III de Madrid. Retrieved from https://core.ac.uk/download/pdf/29404933.pdf

Toscano, J. (2019). *Estimación de vida útil de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por Komagataeibacter xylinus*. Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/29409

Trujillo, M. (2017). *Microbial Biofilms*. Retrieved from https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5023/BIOFILMS MICROBIANOS.pdf?sequence=1

Vanegas, C. M. (2016). *Manejo del bagazo en la agroindustria de la caña panelera en el nordeste antioqueño a partir de la gestión integral de residuos: estudio de caso municipio de Yolombo*. Universidad de Manizales. Retrieved from http://ridum.umanizales.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/6789/2880/Tesis Con correcciones 14 nov de 2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Vélez, L. M., Gañan, P., Severiche, J. D., Hincapié, G., & Restrepo, M. C. (2009). Aprovechamiento de la fibra dietaria de frutas y/o residuos de su transformación en la elaboración de productos de panificación y de maíz. *SCIELO*, *7*(2), 102.

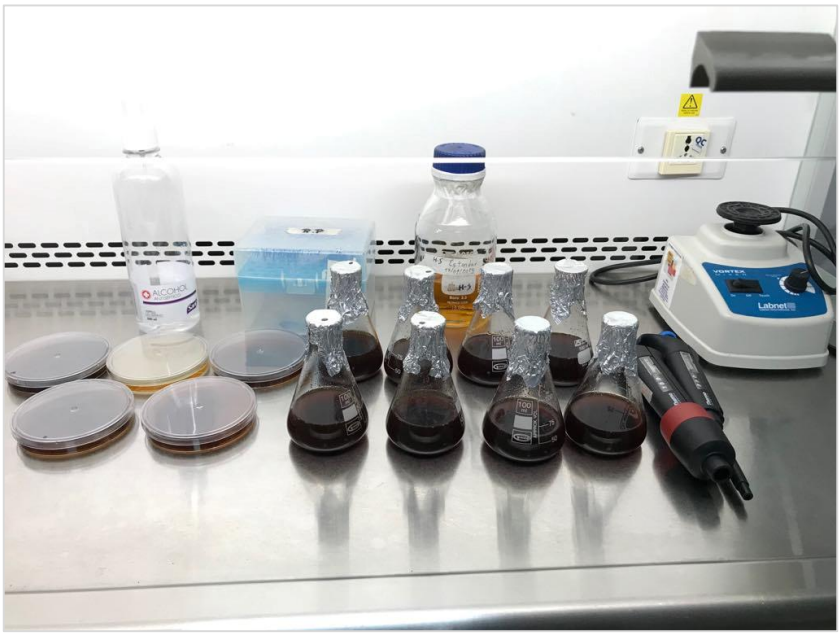
Retrieved from http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n2/v7n2a14.pdf

Wang, S., Han, Y., Chen, J., Zhang, D., Shi, X., Ye, Y., … Li, M. (2018). Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in Komagataeibacter sp. W1. *Polymers*, *10*(9), 963. https://doi.org/10.3390/polym10090963

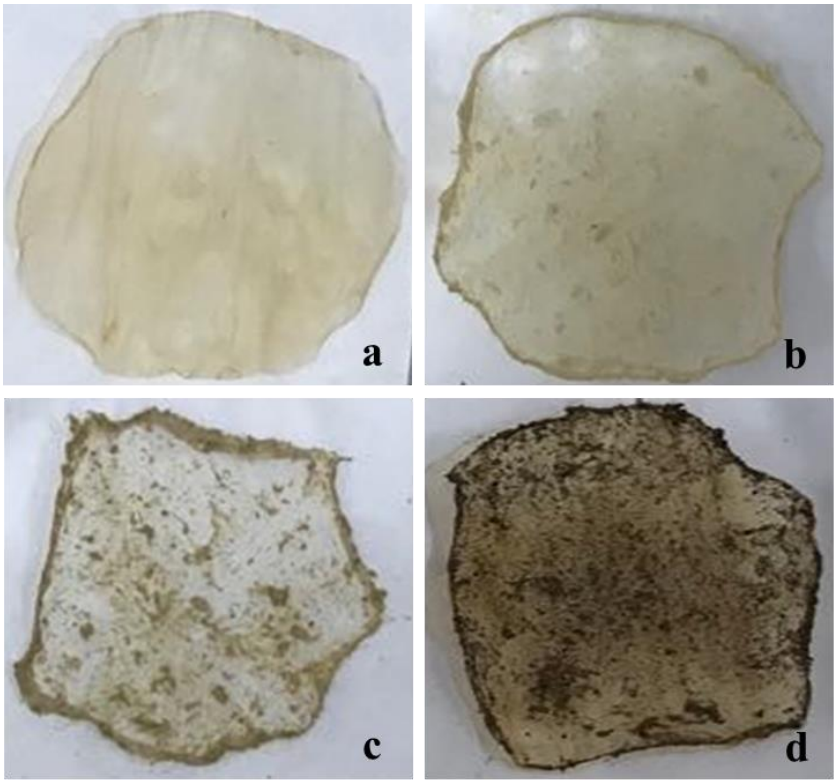
Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., & Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, *24*(9), 3141–3145. https://doi.org/10.1007/BF01139032

Zambrano, M., & Suárez, L. (2006). Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. *Universitas Odontológica*, *25*(57), 19–25. Retrieved from https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231220955004

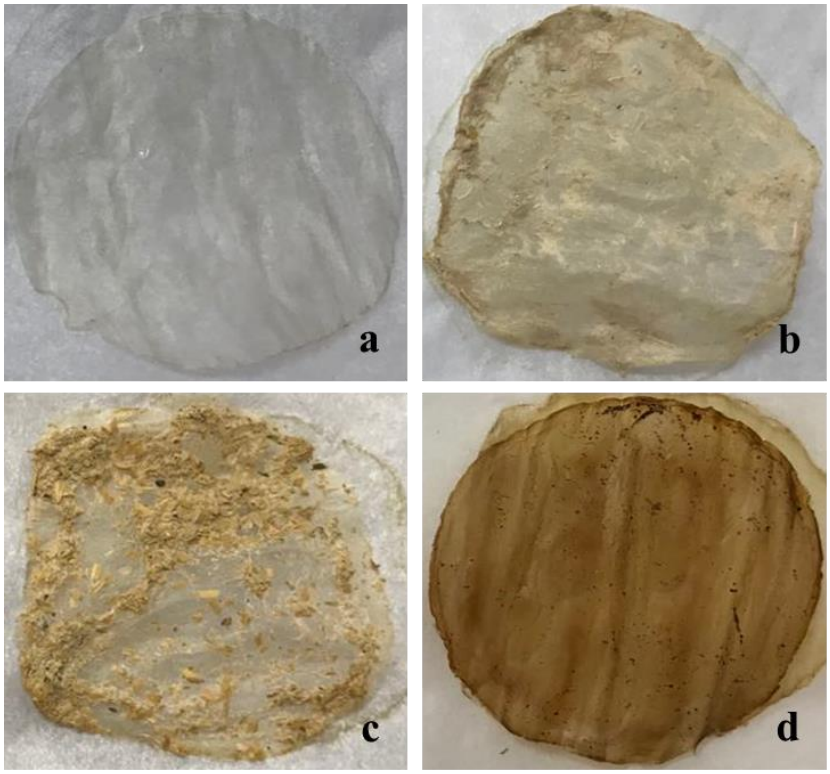
## ANEXOS



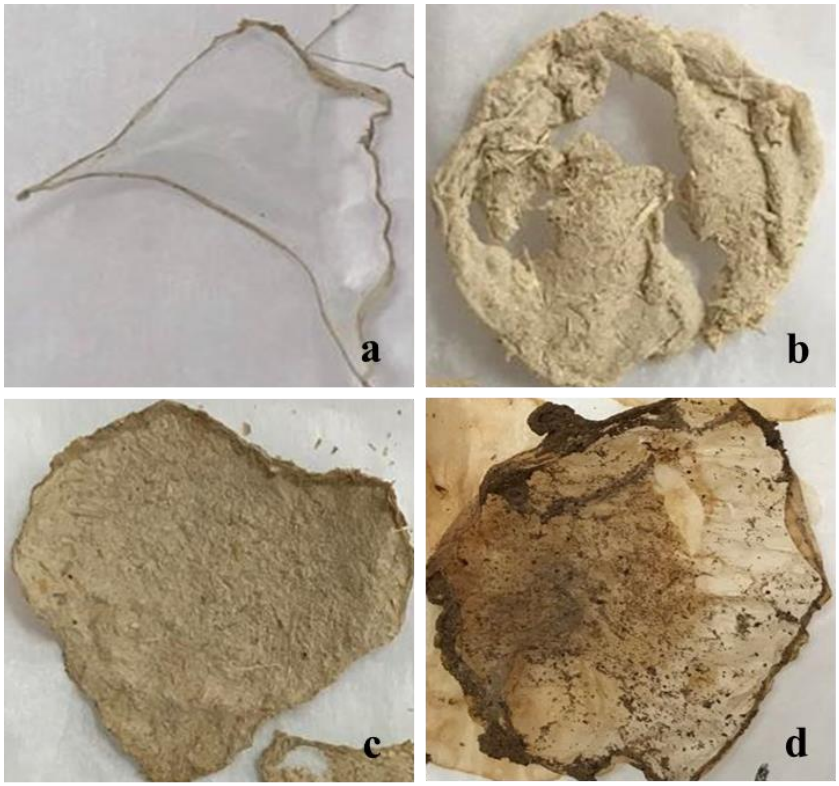
**Anexo 1:** Producción de biofilm bacteriano



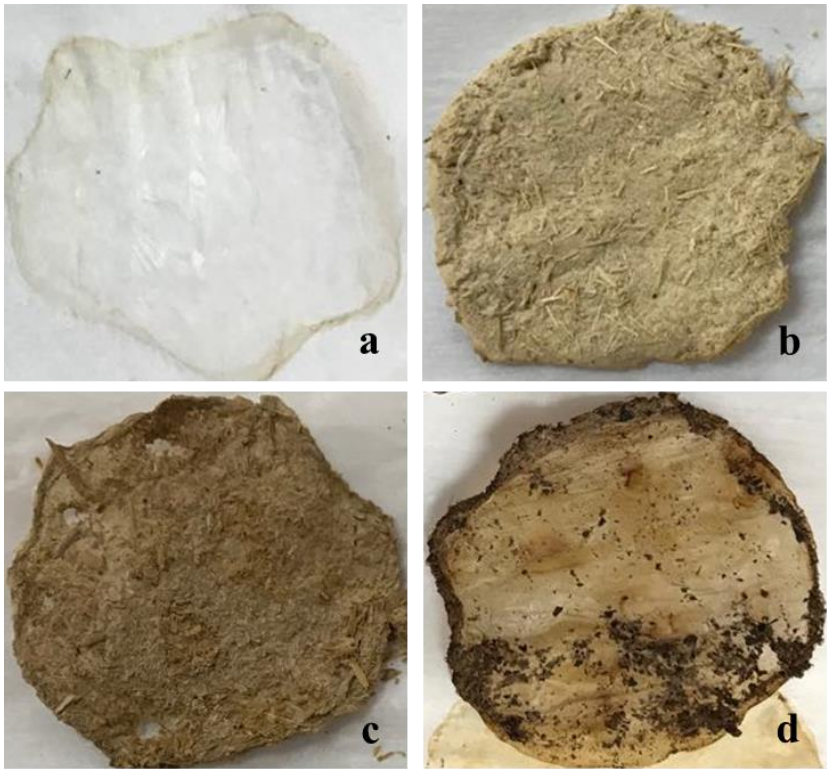

**Anexo 2:** Biofilms secos del medio H-S en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.



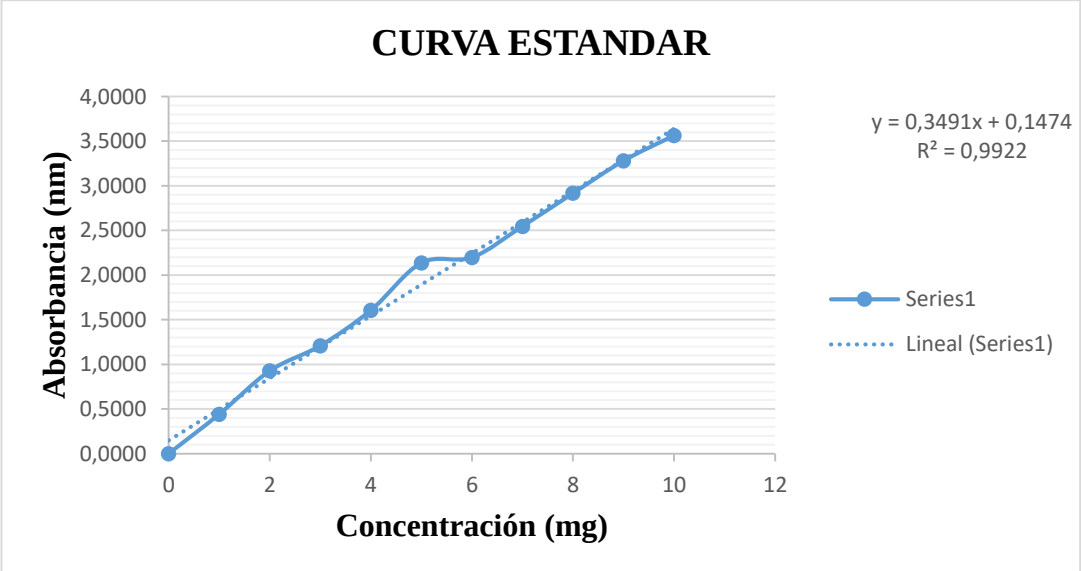

**Anexo 3:** Biofilms secos del medio H-S en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.




**Anexo 4:** Biofilms secos del medio mínimo en cultivo estático: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.




**Anexo 5:** Biofilms secos del medio mínimo en cultivo con agitación: (a) estándar, (b) bagazo de caña, (c) salvado de arroz y (d) cáscara de cacao.




**Anexo 6:** Curva de calibración (glucosa) para azúcares reductores