

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN BACTERIAS ASOCIADAS A LA
CORROSIÓN EN LA INDUSTRIA PETROLERA**

LINA MARCELA ANGULO VILLAMIZAR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2010

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN BACTERIAS ASOCIADAS A LA
CORROSIÓN EN LA INDUSTRIA PETROLERA**

LINA MARCELA ANGULO VILLAMIZAR

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga

DIRECTOR:

JORGE LUIS FUENTES, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph.D.

CO-DIRECTOR:

JORGE HERNÁNDEZ TORRES, BIÓLOGO, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2010

Este trabajo de grado se lo dedico a mis padres
Yolanda y Jairo, a mi hermano Jayo, a mi Abue y
a mi hermosa familia, quienes me han brindado su apoyo
incondicional en todos los momentos y etapas de mi vida.
Gracias por estar siempre a mi lado, tolerándome y
enseñándome a ser una mejor persona,
por apoyarme y ayudarme a cumplir mis metas.
A mis amigos; en especial a Guille y Nathalia Quintero,
por compartir momentos inolvidables a lo largo
de todos estos años.
A Dios por darme la fortaleza y
valentía para lograr mis sueños.

Linis

AGRADECIMIENTOS

Al Banco de la Republica de Colombia por la financiación de esta investigación

A la Corporación para la Investigación de la Corrosión, CIC por facilitarme los materiales necesarios para la ejecución de éste trabajo

Al Laboratorio de Microbiología y Mutagenesis ambiental y a todos sus integrantes, en especial a Gloria Vicuña, Molkary López, y Laura Valencia por su compañerismo sin importar las diferencias, por su compañía en las largas jornadas de trabajo y por todas las experiencias vividas

A los docentes de la escuela de biología por sus enseñanzas, a los técnicos de laboratorio y en especial a Yamile por su calidad como persona, por ser una excelente profesional y por toda su colaboración

A mi profe Jorge Luis, por creer en mis capacidades para el desarrollo de esta investigación, por formarme como profesional, por sus exigencias y mano firme, por ser una persona invaluable, porque admiro sus conocimientos y su integridad, por su tolerancia, dedicación y por ser como un segundo padre, gracias profe por aguantar mis pataletas

Al profesor Jorge Hernández, por depositar en nosotros la confianza necesaria para realizar este proyecto

A mi Familia, que siempre ha estado a mi lado incondicionalmente, dándome todo su amor, me enseñaron que con perseverancia se pueden lograr los sueños, me formaron como una persona: responsable, transparente, humilde y con mucha

entereza, a dar todo de mi sin esperar nunca retribuciones, estoy muy feliz y orgullosa de mi familia, gracias porque me enseñaron a caer y levantarme con la cabeza siempre en alto y a reconocer mis errores

A mis amigos: Natucha, Susy, Adri, Nathy O, la mona, el pizco, peluza, chalito, cris y juanchis porque me brindaron su amistad y su amor, porque con ustedes mi vida universitaria fue una chimba, por todos los momentos vividos, los llevo en mi corazón

A Guille que siempre ha estado a mi lado sin importar las circunstancias, gracias por comprenderme todos estos años, por ser un buen compañero y amigo, por las alegrías y por darme todo su amor incondicional

A Sergio Martínez por su apoyo y colaboración en la realización del proyecto y por su compañía en el Laboratorio durante su pasantía

A todas las personas que contribuyeron de una u otra forma a la realización de esta investigación, mil gracias

TABLA DE CONTENIDO

	PÁG.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEORICO	18
1.1 LA CORROSIÓN Y LOS BIOFILMS MICROBIANOS	18
1.2 CONTROL QUIMICO (BIOCIDAS)	20
1.3 CONTROL BIOLÓGICO	21
1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS BACTERIÓFAGOS	23
2. METODOLOGÍA	25
2.1 MEDIOS DE CULTIVO	25
2.2 CEPAS BACTERIANAS DE REFERENCIA	25
2.3 MUESTREO Y AISLAMIENTO BACTERIANO	26
2.4 ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	27
2.5 CRITERIOS USADOS DURANTE LA IDENTIFICACIÓN	28
2.6 IDENTIFICACIÓN DE FAGOS EN MUESTRAS DE AGUA	29
2.7 INDUCCIÓN DE PROFAGOS EN LAS CEPAS ESTUDIADAS	31
2.8 AMPLIFICACIÓN Y TITULACIÓN DE BACTERIÓFAGOS	31
2.9 RANGO HOSPEDERO DE LOS BACTERIÓFAGOS	32
3. RESULTADOS	33
3.1 FORMAS BACTERIANAS AISLADAS DE LA MUESTRA	33
3.2 IDENTIFICACIÓN DE GÉNEROS BACTERIANOS	35
3.2.1 Identificación de aislados Gram positivos	39
3.2.2 Identificación de aislados Gram negativos	40
3.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS	41
3.4 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS	52

3.5 RANGO HOSPEDERO DE LOS BACTERIÓFAGOS	55
4. DISCUSION GENERAL	58
5. CONCLUSIONES	62
6. RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFIA	64
ANEXOS	76

LISTA DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1. Formas celulares características entre los aislados identificados. A. Cocos Gram positivos, B. Bacilos Gram negativos, C. Bacilos Gram positivos y D. Vibrios Gram negativos.	34
Figura 2. Placas líticas identificadas sobre placas de agar para cada bacteriófago aislado. A. P19LLU, B. P29LCSS, C. P311DCI y D. P411DCSS.	53

LISTA DE TABLAS

	PÁG.
Tabla 1. Morfotipos y Propiedades básicas de las diferentes familias de bacteriófagos (Ackermann 2001).	24
Tabla 2. Información sobre el origen de las muestras de agua estudiadas en la identificación de bacteriófagos.	29
Tabla 3. Identificación de bacterias basado en la morfología, metabolismo y descriptores bioquímicos.	35
Tabla 4. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género <i>Bacillus</i> .	42
Tabla 5. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género <i>Staphylococcus</i> .	44
Tabla 6. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género <i>Enterobacter</i> .	48
Tabla 7. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género <i>Erwinia</i> .	50
Tabla 8. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género <i>Escherichia</i> .	51
Tabla 9. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género <i>Proteus</i> .	51
Tabla 10. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género <i>Providencia</i> .	52
Tabla 11. Identificación de bacteriófagos líticos a partir de diferentes muestras de agua.	54

LISTA DE ANEXOS

	PÁG.
Anexo 1. Composición y forma de preparación de los medios de cultivo	76
Anexo 2. Metodologías de pruebas tintoriales, fisiológicas y bioquímicas	99
Anexo 3. Clave de identificación para bacterias con respuesta positiva a la tinción de Gram.	125
Anexo 4. Clave de identificación para bacterias con respuesta negativa a la tinción de Gram.	126
Anexo 5. Morfología celular de todos los aislados bacterianos estudiados.	127
Anexo 6. Fotos de las colonias del aislado bacteriano <i>Desulfovibrio</i> sp.	137
Anexo 7. Crecimiento en cajas de Agar sangre de los aislados OWW-2011008-2 y OWW-2030193-3.	138

RESUMEN

TITULO: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIOFAGOS EN BACTERIAS ASOCIADAS A LA CORROSIÓN EN LA INDUSTRIA PETROLERA*

AUTOR: LINA MARCELA ANGULO VILLAMIZAR**

PALABRAS CLAVE: Corrosión microbiana, bacteriófagos, biopelículas, rango hospedero

En el presente trabajo se pudo constatar que los principales géneros bacterianos cultivables presentes en el pozo petrolero (campo CIRA-INFANTAS), fueron: *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia* y *Staphylococcus*; y se presenta una caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de los aislados bacterianos identificados. Adicionalmente, se logró identificar 4 bacteriófagos líticos designados como: P19LLU, P29LCSS, P311DCI y P411DCSS. Los bacteriófagos P19LLU y P29LCSS fueron aislados a partir de muestras de agua del Lago UIS y Ciénaga San Silvestre, respectivamente, y su cepa hospedera fue el aislado bacteriano perteneciente al género *Enterobacter*. Los fagos P311DCI y P411DCSS fueron aislados del campo petrolero Cira-Infantas y Ciénaga San Silvestre, respectivamente, y su cepa hospedera fue un aislado bacteriano perteneciente al género *Erwinia*. No se encontraron bacteriófagos atemperados para ninguno de los ensayos de inducción de profagos (Mitomicina C; 1µg/ml) desarrollados para cada uno de los aislados bacterianos. Comparando con P19LLU y P29LCSS, los bacteriófagos P311DCI y P411DCSS muestran un espectro de virulencia más amplio, lisando al menos dos géneros bacterianos (*Enterobacter* y *Providencia*) diferentes a su cepa hospedera original (*Erwinia psidii*). Esta tecnología de alta especificidad se vislumbra como una alternativa interesante para el control de la corrosión microbiana en la Industria petrolera.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.) y Co-Director: Jorge Hernández Torres (Ph.D.)

ABSTRACT

TITLE: IDENTIFICATION OF BACTERIOPHAGES FOR BACTERIAS RELATED TO CORROSION IN OIL INDUSTRY*

AUTHOR: LINA MARCELA ANGULO VILLAMIZAR**

KEYWORDS: Microbiologically influenced corrosion, biofilms, bacteriophages, host range

In the present work it was possible to confirm that the principal cultivables bacterial genus in the petroleum oil well "CIRA – INFANTAS" field were: *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia*, and *Staphylococcus*; and a morphologic, physiological and biochemical characterization of the identified bacterial isolated is presented. Additionally, it was achieved the identification of 4 designated lytic bacteriophages, like: P19LLU, P29LCSS, P311DCI and P411DCSS. The bacteriophages P19LLU and P29LCSS were isolated from water samples of the UIS lake and San Silvestre swamp, respectively; their host strain went isolated belonging to the genus *Enterobacter*. The phages P311DCI and P411DCSS were bacterial isolated from the oil field Cira-Infantas and San Silvestre swamp, respectively; and their host strain went isolated bacterial belonging to the genus *Erwinia*. They were not found adjusted bacteriophages for none of the prophage induction essays (Mitomycin C; 1µg/ml) developed for each one of the bacterial isolated. Compared with P19LLU and P29LCSS, the bacteriophages P311DCI and P411DCSS show a more wide spectrum of virulence, lysated at least two bacterial genus (*Enterobacter* and *Providencia*), different from the original host strain (*Erwinia psidii*). This highly specific technology is emerging as an interesting alternative for the control of microbial corrosion in the oil industry.

* Basic Science thesis.

** Faculty of Science, Biology School, Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.) and Co-Director: Jorge Hernández Torres (Ph.D.)

INTRODUCCIÓN

La corrosión metálica, y en particular la corrosión microbiana, es un problema que afecta económicamente diferentes industrias en especial la Industria del petróleo y gas natural con incidencia en diferentes etapas del proceso productivo como son: sistemas de extracción, transporte, almacenamiento, refinación y distribución del hidrocarburo (Zhu *et al.* 2003, Neria-González *et al.* 2006, Torrado-Rincón *et al.* 2008).

Al nivel mundial, la Industria petrolera gasta millones de dólares al año por concepto de medidas de control o mitigación de la corrosión microbiana (Gaylarde *et al.* 1999). Aunque cuantificar los costos asociados con la corrosión es un tema controversial (Zhu *et al.* 2003), se cuenta actualmente con algunos datos estimados. Por ejemplo, en los Estados Unidos la Industria del petróleo y gas natural tiene pérdidas anuales entre 100 y 276 millones de dólares por este concepto (Beech y Sunner 2007, Little y Lee 2007). En Colombia, solo en el año 1997, los costos asociados a los problemas de corrosión se estimaron en 1300 millones de dólares al año; lo cual equivale al 1.2 % del producto interno bruto del país (Torrado-Rincón *et al.* 2008). No existen cifras oficiales sobre la contribución de la corrosión microbiana, pero se estima que esta oscila entre el 20-50% del costo total por concepto de corrosión metálica (Beech y Gaylarde 1999).

El uso de biocidas químicos como principal medida de control de la corrosión microbiana tiene un costo ambiental alto (Guiamet y Gómez de Saravia 2005). Estos biocidas químicos son compuestos altamente tóxicos que terminan afectando no solo a los microorganismos asociados con el proceso de corrosión sino a todo el ecosistema, situación que se agrava con la aparición de resistencia microbiana al producto (Gaylarde *et al.* 1999, McBain *et al.* 2002). Lo

anteriormente expresado evidencia la necesidad de desarrollar alternativas a los biocidas químicos que permitan un control de la corrosión microbiana más efectivo y con un menor costo ambiental.

El uso de bacteriófagos aparece recientemente como una interesante alternativa a los biocidas químicos para el control de la corrosión microbiana (Muñoz-Berbel *et al.* 2008). Los bacteriófagos son virus bacterianos que controlan las poblaciones microbianas y se están estudiando como una alternativa para el control de patógenos resistentes a antibióticos en medicina (Thiel 2004, Skurnik y Strauch 2006, Mann 2008, Viscardi *et al.* 2008), como biocidas en acuicultura (Nakai y Park 2002, Karunasagar *et al.* 2007), tratamiento de aguas residuales (Withey *et al.* 2005, Mclaughlin *et al.* 2006, Verthé y Verstraete 2006, Lammertyn *et al.* 2008) e industria de alimentos (Loessner *et al.* 1993, García *et al.* 2007, Hagens y Loessner 2007, Kim *et al.* 2007, Sillankorva *et al.* 2007, Strauch *et al.* 2007, Martinez *et al.* 2008, Robeson *et al.* 2008). La alta especificidad de los bacteriófagos por su célula hospedera (específicos de especies bacterianas), permite que su aplicación sea inocua para los demás organismos presentes en el ambiente. En este contexto, los estudios dirigidos a conocer la utilidad de los bacteriófagos como una alternativa biológica a los biocidas químicos para el control de las comunidades microbianas asociadas a la corrosión, resulta de gran importancia práctica y novedad científica.

Dado que existen reportes de bacteriófagos (Kamimura y Araki 1989, Illson 2002, Kim *et al.* 2007) para especies de géneros bacterianos asociados al proceso de corrosión en la Industria petrolera como son: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Halanaerobium* y *Desulfovibrio* (Neria-González *et al.* 2006), que estos son géneros bacterianos con hábitat diversos, y que los bacteriófagos co-habitan en los ambientes de sus bacterias hospederas (Hendrix 2002a); la presente tesis tiene como hipótesis que se pueden identificar bacteriófagos líticos para los mencionados géneros bacterianos en diferentes ambientes.

El objetivo general de la presente tesis fue identificar bacteriófagos líticos en bacterias asociadas al proceso de corrosión microbiana que afecta la Industria del petróleo. Son objetivos específicos los siguientes:

- Identificar los principales géneros bacterianos cultivables presentes en aguas de un pozo petrolero (campo CIRA-INFANTAS) ubicado en el Magdalena Medio, Santander, Colombia
- Aislar bacteriófagos líticos para los géneros bacterianos identificados en el mencionado pozo petrolero

En el trabajo se pudo constatar que los principales géneros bacterianos presentes en el pozo petrolero (campo CIRA-INFANTAS) fueron: *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia* y *Staphylococcus*; y se presenta una caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de los aislados bacterianos. Adicionalmente, se logró aislar bacteriófagos líticos para los géneros *Enterobacter* y *Erwinia*, por medio del método de doble capa de agar.

1. MARCO TEORICO

1.1 LA CORROSIÓN Y LOS BIOFILMS MICROBIANOS

La corrosión es un proceso electroquímico donde una serie de reacciones de reducción/oxidación (Redox) sobre la superficie metálica conducen a cambios químicos del metal, especialmente ionizaciones (Beech y Gaylarde 1999, Beech y Sunner 2004). Estas reacciones Redox pueden ser catalizadas por la actividad metabólica de ciertos microorganismos proceso que se conoce como corrosión microbiana (Beech y Gaylarde 1999, Miranda *et al.* 2006).

Los microorganismos asociados con la corrosión metálica forman organizaciones microbianas (biopelículas) sobre la superficie metálica que modifican la interface solución-metal (Videla y Herrera 2005), promoviendo reacciones fisicoquímicas que normalmente no son favorecidas bajo condiciones abióticas (Beech y Gaylarde 1999, Little y Ray 2002, Beech y Sunner 2004). Las biopelículas son consorcios o asociaciones bacterianas sésiles (sin movimiento) embebidas en una matriz hidratada de polisacáridos extracelulares producidos por algunos de los microorganismos que la conforman, estos polisacaridos facilitan la adherencia de las células a la superficie metálica y crean microambientes idóneos para su desarrollo y protección (Sutherland 2001, Betancourth *et al.* 2004, Nazar 2007). El análisis estructural de las biopelículas generalmente revela la existencia de microcolonias parecida a setas; encontrándose la mayoría de las células en la “corona” de las setas y muy pocas en el “tallo” de estas (Costerton 1999, Nazar 2007). Sin embargo, la estructura de las setas puede variar dependiendo de la especie bacteriana presente en la biopelícula, su estatus fisiológico, los nutrientes disponibles y la prevalencia de las condiciones físicas (Sutherland 2001).

La composición de especies microbianas en las biopelículas asociadas a la corrosión es muy variable (Costerton 1999). En ellas se han identificado grupos microbianos fisiológicamente diversos como son: bacterias sulfato reductoras, bacterias oxidantes de azufre, bacterias reductoras/oxidantes de hierro, bacterias oxidantes de manganeso y bacterias secretoras de ácidos orgánicos (Beech y Gaylarde 1999, Beech y Sunner 2004).

Uno de los grupos microbianos presentes en la mayoría de estos consorcios son las bacterias productoras de ácido (BPA). Este grupo está compuesto por bacterias generalmente heterótrofas (tanto aeróbicas como anaeróbicas facultativas) que comparten la capacidad de producir ácidos orgánicos y/o inorgánicos de bajo peso molecular, alcoholes y aldehídos, como subproductos de su metabolismo. Estos ácidos orgánicos de bajo peso molecular crean condiciones de pH ácidos (entre 3.5 y 5.5) favorables para que se inicien reacciones Redox en la interface solución-metal y sirvan de nutrientes para las bacterias sulfato reductoras (Wolfram *et al.* 1996, Little y Lee 2007).

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son el grupo principal de microorganismos implicados en el proceso de corrosión microbiana (Little y Lee 2007). Estos son microorganismos anaeróbicos obligados que utilizan el ión sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor final de electrones en su metabolismo energético (Beech y Sunner 2007) y lo bio-transforman en sulfuro de hidrógeno (H_2S), un gas altamente corrosivo por su solubilidad en agua donde se comporta como un ácido fuerte. El H_2S al combinarse con metales pesados, en especial con el hierro, precipita y forma una película negra de sulfuro de hierro (FeS), que puede producir taponamientos y pérdidas localizadas del metal (Torrado-Rincón *et al.* 2008). El H_2S es tóxico para la salud humana y ambiental, y es la causa fundamental de las pérdidas económicas por concepto de corrosión en equipamientos empleados para la extracción, transporte, almacenamiento, refinación y distribución del crudo (Beech y Gaylarde 1999, Torrado-Rincón *et al.* 2008).

1.2 CONTROL QUIMICO (BIOCIDAS)

Para controlar el desarrollo de las biopelículas sobre las superficies metálicas de los tanques de almacenamiento se utilizan diferentes métodos que van desde el drenaje frecuente del agua, limpieza y revestimientos internos, hasta el uso de biocidas que limitan el crecimiento microbiano, siendo esta última la práctica más común (Gaylarde *et al.* 1999). Entre los biocidas usados se encuentran compuestos de tipo oxidantes (Ej: Cloro, Ozono, Bromo, etc.) y compuestos no oxidantes (Ej: isotiazolonas, glutaraldehído y acroleína); siendo estos últimos más efectivos debido a su persistencia y su acción independiente del pH del ambiente (Videla 2002). Independientemente del tipo de biocida, se ha comprobado que el uso de estos compuestos tiene un costo ambiental alto dado que su naturaleza tóxica termina afectando no solo a los microorganismos de las biopelículas sino a todo el ecosistema (Gaylarde *et al.* 1999, Rodin *et al.* 2000, Guimet y Gómez de Saravia 2005).

Adicionalmente, la efectividad de los biocidas depende en gran forma de la permeabilidad de las biopelículas al compuesto y de la capacidad de la comunidad microbiana para degradarlos (Little y Lee 2007). En general, estas biopelículas son poco permeables a los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados para controlar el crecimiento de estos microorganismos (Brown y Gilbert 1993). Esto conlleva a menudo, a que se apliquen dosis superiores del producto a las recomendadas, para lograr un control adecuado con el correspondiente incremento en los costos del proceso (von Rége y Sand 1998).

A este complejo panorama, se une el hecho de que muchas de las especies de microorganismos que componen las biopelículas pueden desarrollar resistencia genética al biocida (Stewart 2001, Stewart y Costerton 2001, Mah y O'Toole 2001, Czechowski y Stoodley 2002, Goldberg 2002, Russell 2003, McBain *et al.* 2002, Little y Lee 2007). Todo lo anteriormente planteado, deja claro la necesidad de

desarrollar nuevos métodos de control de la corrosión microbiana más efectivos y menos tóxicos al ambiente.

1.3 CONTROL BIOLÓGICO

Una alternativa a los biocidas químicos para el control de las bacterias implicadas en la corrosión microbiana es el uso de procedimientos basados en la competencia microbiana. Los microorganismos con metabolismo aerobio que cohabitan en estos ambientes, pueden inhibir el proceso corrosivo por remoción del oxígeno molecular durante su respiración aeróbica. Algunas especies del género *Bacillus* (*Bacillus brevis*) pueden controlar el crecimiento de las BSR por medio de las toxinas (biocidas) que ellos producen naturalmente. Otras especies de este mismo género (*Bacillus licheniformis*) forman biopelículas de γ -poliglutamato que sirven como barreras que previenen la penetración de agentes corrosivos (tales como oxígeno, cloro, etc), disminuyendo así su contacto con la superficie de metal (Zuo 2007).

Otra posible alternativa a los biocidas químicos para el control de la corrosión microbiana es el uso de bacteriófagos. Estos son virus bacterianos que infectan una bacteria y utilizan su maquinaria biosintética para reproducirse, proceso que conduce a la lisis de la célula hospedera (Clark y March 2006). Dependiendo del curso que tome la infección, los bacteriófagos pueden dividirse en dos grandes grupos: bacteriófagos virulentos y temperados. Los bacteriófagos virulentos se replican en la célula hospedera y conducen inevitablemente a la lisis celular (ciclo lítico). Por el contrario, los bacteriófagos temperados integran su genoma al cromosoma bacteriano y se replican junto con el genoma del huésped (ciclo lisogénico) pero no producen partículas víricas enteras bajo estas condiciones (Hendrix 2002b). Aunque el estado lisogénico es muy estable, factores ambientales que conllevan a alteraciones en la fisiología celular o la exposición a

agentes que dañan el genoma celular (Ej: mitomicina C y radiación UV), pueden interrumpir el estado lisogénico y dar paso a la producción de partículas virales y por ende a la lisis celular (Froshauer *et al.* 1996, Weinbauer y Suttle 1996, Jiang y Paul 1998, Weinbauer y Suttle 1999, Quinones *et al.* 2005, Campoy *et al.* 2006). Dado que los bacteriófagos han coevolucionado con su bacteria hospedera durante millones de años (Hendrix 2002a), estos pueden ser fácilmente aislados de los ambientes acuáticos donde estas habitan.

Una de las características que hace de los bacteriófagos una alternativa interesante para un control microbiano ecológicamente viable, es su alta especificidad. Estos pueden infestar una única especie bacteriana, y en algunos casos, una sola cepa bacteriana. De esta manera, los restantes organismos que habitan estos ecosistemas no son afectados (Hanlon 2007). Adicionalmente, hay algunos estudios que evidencian que ciertas biopelículas microbianas son permeables a los bacteriófagos. El mecanismo de penetración del bacteriófago a través de las biopelículas no está muy claro, pero se ha observado que algunas biopelículas poseen canales de agua que permiten el acceso del bacteriófago a su interior (Sutherland *et al.* 2004, Lacroix-Gueu *et al.* 2005, Sillankorva *et al.* 2007, Muñoz-Berbel *et al.* 2008). Se conoce además, que los bacteriófagos contienen enzimas que permiten la degradación de los exopolímeros bacterianos (líasas polisacáridas, endolisinas o hidrolasas de peptidoglucano) permitiendo el reconocimiento o unión del bacteriófago a los receptores primarios en las bacterias blanco (Hughes *et al.* 1998, Sutherland 1999, Tait *et al.* 2002, Kimura e Itoh 2003, Sutherland *et al.* 2004, Sillankorva *et al.* 2007, Celia *et al.* 2008).

Aunque son muchas las preguntas sin respuestas en relación con la interacción bacteriófagos-biopelículas, todas las evidencias experimentales anteriormente mencionadas soportan el uso potencial de los bacteriófagos como un agente antimicrobiano para el control del crecimiento de especies bacterianas que forman biopelículas asociadas a procesos de corrosión en la Industria petrolera. La

utilidad de los bacteriófagos como agentes antimicrobianos está siendo evaluada actualmente en diferentes ramas como son: salud humana y animal (Biswas *et al.* 2002, Thiel 2004, Ramírez *et al.* 2006, Skurnik y Strauch 2006, Hanlon 2007, Mann 2008, Viscardi *et al.* 2008), protección de plantas (McNeil *et al.* 2001), acuicultura (Nakai y Park 2002, Karunasagar *et al.* 2007), industria de los alimentos (Loessner *et al.* 1993, Hibma *et al.* 1997, García *et al.* 2007, Hagens y Loessner 2007, Kim *et al.* 2007, Sillankorva *et al.* 2007, Strauch *et al.* 2007, Binetti *et al.* 2008, Martinez *et al.* 2008, Robeson *et al.* 2008) y tratamiento de aguas residuales (Withey *et al.* 2005, Mclaughlin *et al.* 2006, Verthé y Verstraete 2006, Lammertyn *et al.* 2008).

1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS BACTERIÓFAGOS

El Comité Internacional para Taxonomía de Virus (ICTV de sus siglas en inglés), ha desarrollado un sistema taxonómico para los “virus bacterianos” o bacteriófagos; entiéndase virus que infectan Bacteria y Arquea (Maniloff y Ackermann 1998). Actualmente, el ICTV ha clasificado a los virus dentro de 3 grandes órdenes, que comprenden 61 familias y 241 géneros. Los bacteriófagos constituyen el primer orden el cual contiene 13 familias. Estas son: *Corticoviridae*, *Cystoviridae*, *Fuselloviridae*, *Inoviridae*, *Leviviridae*, *Lipothrixviridae*, *Microviridae*, *Myoviridae*, *Plasmaviridae*, *Podoviridae*, *Rudiviridae*, *Siphoviridae* y *Tectiviridae* (Ackermann 2003).

Los bacteriófagos son agrupados en base a su forma y el tipo de ácido nucleico que contienen (Ackermann 2001, Ackermann 2003). Se conocen al menos 21 morfotipos distribuidos dentro de las 13 familias mencionadas (**Tabla 1**). La gran mayoría de estos bacteriófagos, contienen una molécula de ADN de doble cadena (dsDNA), pero existe un número pequeño de grupos que contienen ADN de simple cadena (ssDNA), ARN de simple cadena (ssRNA) y ARN de doble cadena

(dsRNA). Tres familias filogenéticamente relacionadas (*Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae*) representadas por 4950 bacteriófagos, tienen cola. Las 10 familias restantes, no tienen cola y comprenden alrededor de 190 bacteriófagos.

Tabla 1. Morfotipos y Propiedades básicas de las diferentes familias de bacteriófagos (Ackermann 2001).

Morfotipo	Forma	Ac. nucleico	Familia	Partículas
A1 a A3	Cola	DNA, 2, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
B1 a B3			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1	Poliédrico	DNA, 1, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros conspicuos
D3		2,C,S	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja, lípidos
D4		2, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula de lípidos, pseudocola
E1		RNA, 1, L	<i>Leviviridae</i>	
E2		2, L, seg	<i>Cystoviridae</i>	Envoltura, lípidos
F1	Filamentoso	DNA, 1, C	<i>Inoviridae</i>	Filamentos largos
F2				Bacilos cortos
F3		2, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Envoltura, lípidos
F4		2, L	<i>Rudiviridae</i>	Como TMV
G1	Pleomorfico	DNA, 2, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Envoltura, lípidos, no capsida
G2		2, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Misma forma limón

C: circular; L: linear; S: superhelicoidal; seg: segmentado; 1: cadena sencilla; 2: cadena doble

2. METODOLOGÍA

2.1 MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo usados para el aislamiento y la identificación microbiana fueron obtenidos de las casas comerciales OXOID LTD (Basingstoke, Inglaterra) y MERCK S.A. (Darmstadt, Alemania) o preparados en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis ambiental, Escuela de Biología, UIS, siguiendo las indicaciones descritas en las correspondientes fuentes. Para el aislamiento de los microorganismos estudiados se usaron los siguientes medios: Columbia Base Agar suplementado con Azida Sódica (OXOID), Dextrosa Rojo Fenol Agar (NACE 1994), Lactato-Sulfato Reducción Agar (APHA 1998), MacConkey Agar (MERCK) y Nutriente Agar (MERCK). Los medios usados durante las pruebas de identificación taxonómica de los aislados bacterianos fueron los siguientes: Citrato Simmons Agar (MERCK), DNasa Agar (MERCK), Gelatina Agar (MERCK), Lactosa Caldo (OXOID), Levine Eosina Azul de Metileno Agar (MERCK), MacConkey Agar (MERCK), Manitol Salado Agar (OXOID), Nutriente Agar (MERCK), Nutriente Caldo (MERCK), Rojo de Metilo-Voges Proskauer Caldo (OXOID), SIM Agar (MERCK), Triptona Soja Sangre Agar (MERCK), Urea Base Caldo (OXOID). La composición y forma de preparación de todos los medios de cultivo mencionados puede ser encontrada en el **Anexo 1**.

2.2 CEPAS BACTERIANAS DE REFERENCIA

Diferentes estirpes bacterianos certificados por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, de sus siglas en inglés) fueron obtenidos de la casa

comercial OXOID LTD (Basingstoke, Inglaterra) para ser usados como cepas de referencia durante la identificación de los aislados bacterianos. Estos son los siguientes: *Bacillus cereus* ATCC® 10876™, *Bacillus megaterium* ATCC® 9885™, *Citrobacter braakii* ATCC® 43162™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 35029™, *Escherichia coli* (JM101) ATCC® 33876™, *Proteus vulgaris* ATCC® 33420™, *Providencia alcalifaciens* ATCC® 51902™, *Salmonella enterica* (subsp. entérica serovar *Typhimurium*) ATCC® 13331™ y *Staphylococcus aureus* (subsp. *Aureus*) ATCC® 33592™. Todas las estirpes fueron propagados en los medios de cultivo y bajo las condiciones indicadas por el fabricante.

2.3 MUESTREO Y AISLAMIENTO BACTERIANO

Todas las muestras de agua usadas para el aislamiento de bacterias, fueron obtenidas en el campo petrolero CIRA-INFANTAS ubicado al oriente del río Magdalena y sur del río Sogamoso, Barrancabermeja, Santander, Colombia. Las muestras fueron colectadas en los cabezales del pozo empleando el protocolo de recolección y transporte de muestras líquidas para análisis microbiológico de sistemas industriales (Parra y Hernández 2008, Gómez y Hernández 2009). Para tales fines, se dejó drenar el líquido de los cabezales para garantizar la toma de una muestra representativa del interior del pozo. Posteriormente, se colectaron 50 ml de agua en frascos plásticos estériles (Schott) de cierre hermético. Las muestras fueron transportadas hasta el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander; lugar donde fueron procesadas.

Para el aislamiento de los microorganismos presentes en el agua se usaron diferentes medios de cultivo (ver acápite 2.1) con el fin de aislar un amplio rango de géneros bacterianos cultivables. Las muestras de agua fueron objeto de diluciones seriadas en Buffer Fosfato (0.1M) suplementado con 1% de TRITON X-

100. Las diluciones (0.1 ml) fueron sembradas en los diferentes medios para obtención de colonias aisladas. Las colonias seleccionadas fueron propagadas por estrías de agotamiento en el mismo medio de aislamiento y su pureza comprobada por medio de una tinción de Gram. Finalmente, los aislados bacterianos fueron conservados en medio Caldo Nutritivo semisólido (preparado para una concentración final de 7.0 g/L de Agar bacteriológico) mezclando 2 ml del cultivo microbiano puro y 2 ml del medio estéril fundido.

Los microorganismos fueron cultivados bajo condiciones que permitieran el aislamiento de bacterias con metabolismo tanto aerobio como anaerobio. Los microorganismos con metabolismo aerobio (o anaerobio facultativo) crecieron en alguno de los medios de cultivo mencionados anteriormente, en una incubadora microbiológica convencional a una temperatura de 37°C durante 18-24 horas. Los microorganismos con metabolismo anaerobio obligado fueron crecidos siempre en medio Lactato-Sulfato Reducción Agar (APHA 1998) con las modificaciones propuestas por Torrado-Rincón *et al.* (2008), usando jarras de anaerobiosis (OXOID) bajo condiciones anoxigénicas a una temperatura de 30°C durante 72-96 horas.

2.4 ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La identificación taxonómica de los aislados bacterianos se llevo a cabo mediante los ensayos descritos a tales fines en el Manual Bergey de Sistemática Bacteriana. Los ensayos desarrollados fueron los siguientes: 1) Respuesta a la tinción de Gram, 2) Forma bacteriana, 3) Motilidad, 4) Relación con el oxígeno, 4) Actividad catalasa, 5) Utilización de diferentes fuentes de carbono vía fermentativa (producción de ácidos orgánicos y gas) como: Glucosa, Citrato, Glicerol, Lactosa, Maltosa, Manitol y Sacarosa, 6) Utilización de urea como fuente de carbono, 7) Fermentación ácido-mixta a partir de glucosa (prueba Rojo de Metilo), 8)

Producción de 2,3-butanediol a partir de glucosa (prueba Voges - Proskauer), 9) Producción de indol a partir de triptófano, 10) Hidrólisis enzimática de ADN (actividad DNasa), gelatina y hemoglobina, 11) Reducción de sulfatos a sulfuro de hidrógeno, 12) Tolerancia a sales biliares y al cloruro de sodio, 13) Tolerancia al cianuro de potasio (KCN), 14) Prueba de la β -galactosidasa (ONPG), 15) Hidrólisis de almidón y 16) Crecimiento a diferentes temperaturas (50 y 65°C). Los procedimientos experimentales correspondientes para cada ensayo son descritos en el **Anexo 2**.

2.5 CRITERIOS USADOS DURANTE LA IDENTIFICACIÓN

La identificación de los aislados bacterianos se desarrolló separadamente para aislados Gram positivos y Gram negativos. Los aislados que respondieron positivamente a la tinción de Gram fueron asignados al género bacteriano correspondiente usando el identificador presentado en el **Anexo 3**, el cual fue desarrollado en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental con base en la información previamente descrita por Benson (2001) y Hay (2007).

Por su parte, la identificación taxonómica al nivel de género de los aislados que respondieron negativamente a la tinción de Gram, se llevó a cabo usando el identificador presentado en el **Anexo 4**, también desarrollado en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental con base en la información previamente descrita por Benson (2001) y Madigan *et al.* 2009.

Para avanzar con la identificación de los aislados al nivel de especie, se estimó la similitud genética con base en los descriptores relacionados en el acápite 2.4. A tales fines, se construyó una matriz de datos binarios combinada con base en: i) la información publicada en el Manual Bergey de Sistemática Bacteriana y/o en la

publicación seriada Procariotas para las especies de los géneros identificados, ii) los resultados obtenidos en el presente estudio.

La matriz de datos binarios se generó considerando los resultados positivos como uno (1) y los resultados negativos como cero (0). En el caso particular de la información publicada en el Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, un descriptor se consideró positivo cuando el valor de porcentajes de reacciones positivas es igual o mayor al 50% y negativa cuando es menor al 50%. Las matrices de datos binarios fueron usadas para construir matrices de similitud entre todas las unidades taxonómicas con base en el índice de Dice (Dice 1945) mediante el programa PAST (Hammer *et al.* 2001). Los aislados fueron asignados a las diferentes especies bacterianas considerando la unidad taxonómica de referencia con mayor proximidad genética (Similitud de Dice).

2.6 IDENTIFICACIÓN DE FAGOS EN MUESTRAS DE AGUA

Muestras de agua de diferentes orígenes (**Tabla 2**) fueron procesadas antes de llevar a cabo lo ensayos de identificación de bacteriófagos en los diferentes aislados bacterianos obtenidos en el presente estudio. Estas muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 20 minutos y luego filtradas usando filtros millipore de 0.22 μ m para eliminar bacterias de la muestra.

Tabla 2. Información sobre el origen de las muestras de agua estudiadas en la identificación de bacteriófagos.

Sitio	Coordenadas	Ciudad	Departamento
Lago UIS	7°08'28.13"N 73°07'14.12"O	Bucaramanga	Santander
Campo Cira-Infantas	7°02'33.38"N 73°46'38.20"O	Barrancabermeja	Santander
Campo Casabe (Zona Industrial)	7°00'11.60"N 73°54'41.61"O	Yondo	Antioquia

Sitio	Coordenadas	Ciudad	Departamento
Rio Magdalena (Puente Yondo)	7°04'53.82"N 73°53'34.89"O	Barrancabermeja	Santander
Ciénaga San Silvestre (Club Náutico)	7°05'43.79"N 73°49'52.17"O	Barrancabermeja	Santander
Ciénaga Miramar (Cristo Petrolero)	7°03'45.25"N 73°52'04.79"O	Barrancabermeja	Santander

La presencia de bacteriófagos en el agua se determinó por medio del método de inducción de placas líticas en doble capa de Agar (Maniatis *et al.* 1989). En el ensayo, se mezclan 25 μ L de la muestra de agua con 100 μ L de célula hospedera y 100 μ L de solución de $MgSO_4$ (10 mM) y posteriormente la mezcla se incuba durante 40 minutos a 37°C. Dependiendo si la cepa hospedera tiene metabolismo aerobio o anaerobio, la mezcla se agrega a 4 ml de medio Dextrosa Rojo Fenol-Top Agar o a 4 ml de medio Lactato Sulfato Reducción-Top Agar respectivamente; los cuales fueron previamente licuados en baño termostático a 60°C. El medio es homogenizado mediante vortex y dispensado uniformemente sobre la superficie de una caja Petri que contiene 20 ml del mismo medio pero preparado con 15 g/L de Agar.

Las cajas se dejan endurecer a temperatura ambiente y luego son incubadas invertidas bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas. Las placas líticas aparecen a las 24 horas como interrupciones circulares sobre el césped de crecimiento confluyente de la bacteria hospedera. Cada muestra de agua fue ensayada al menos tres veces en cada aislado bacteriano para la identificación de bacteriófagos.

2.7 INDUCCIÓN DE PROFAGOS EN LAS CEPAS ESTUDIADAS

Para la inducción de los profagos en los aislados bacterianos en estudio, se utilizó básicamente la misma metodología descrita en el acápite 2.6 con pequeñas modificaciones. En este caso, 100 µl del lisógeno en fase exponencial de crecimiento fue mezclado con 100 µl de Mitomicina C (preparada a 2 µg/ml) para una concentración final del mutágeno en la mezcla de 1 µg/ml; y luego esta se incubó durante 30 minutos a una temperatura entre 4-8°C. Las células fueron colectadas por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos y posteriormente resuspendidas en 100 µL de solución MgSO₄ (10 mM). Los ensayos para la identificación de bacteriófagos, medios de cultivo y las condiciones de cultivo fueron idénticos a los descritos en el acápite 2.6. De igual manera, cada lisógeno fue ensayado al menos tres veces para la identificación de profagos bacterianos.

2.8 AMPLIFICACIÓN Y TITULACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Con el objetivo de incrementar el número de partículas virales en la muestra, se desarrolló un procedimiento de amplificación en cajas Petri con doble capa de agar según lo indicado por Maniatis *et al.* (1989). Discos de agar conteniendo placas de lisis individuales fueron recuperados en tubos de microcentrifuga estériles y lavados con Buffer SM (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄). Células hospederas crecidas hasta fase exponencial de crecimiento en el correspondiente medio de cultivo suplementado con 10 mM de MgSO₄, fueron co-incubadas con su bacteriófago en cajas Petri con doble capa de agar durante toda la noche hasta la lisis celular. Al día siguiente, la caja Petri fue lavada con Buffer SM, los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante fue filtrado usando filtro de millipore de 0.22 µm. El título de las partículas víricas, se determinó desarrollando diluciones en base a 10 en Buffer MgSO₄; las cuales fueron sembradas a razón de 0.1 ml en cajas Petri

con doble capa de agar. La concentración viral de las muestras se expresó en unidades formadoras de placas líticas (UFP)/ μ L.

2.9 RANGO HOSPEDERO DE LOS BACTERIÓFAGOS

Cada bacteriófago recuperado fue ensayado para conocer su rango hospedero entre todos los aislados bacterianos identificados pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae. El procedimiento usado para tal fin, fue el descrito en el acápite 2.6.

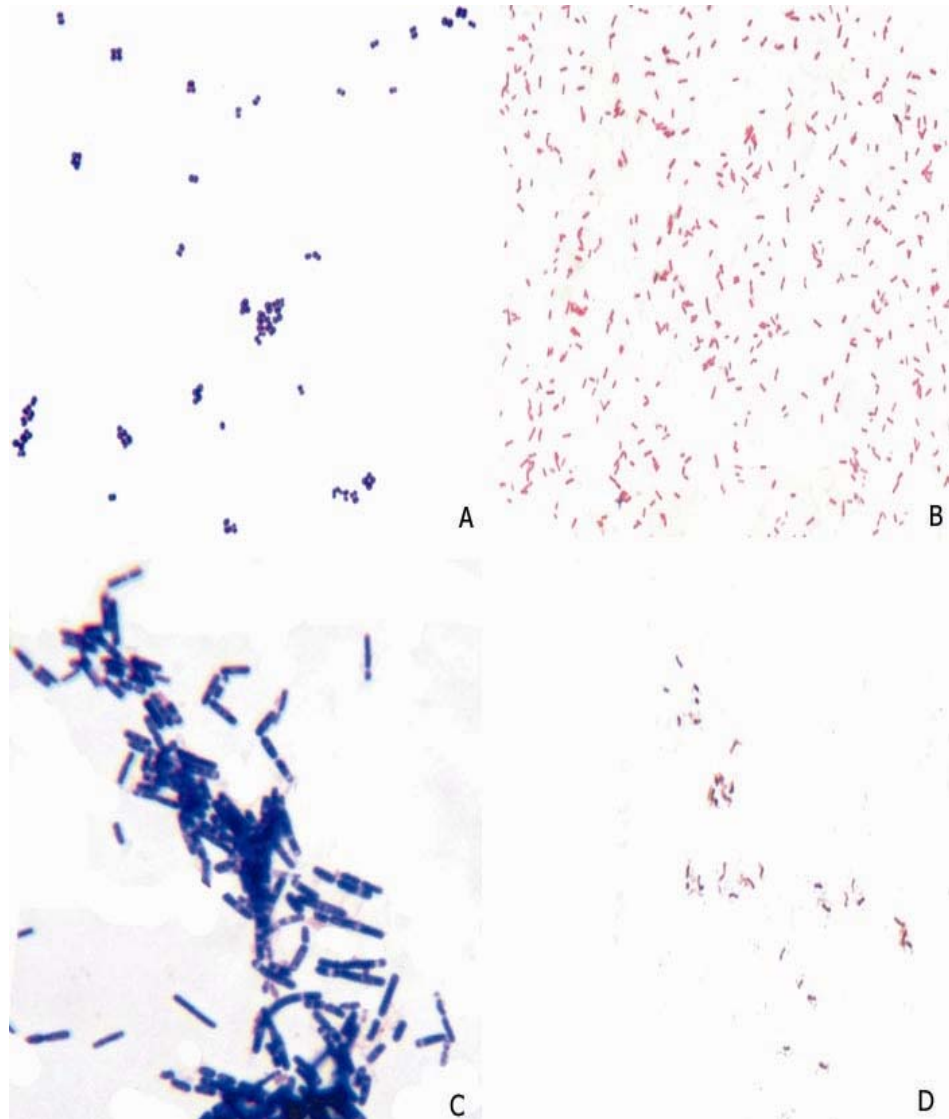
3. RESULTADOS

3.1 FORMAS BACTERIANAS AISLADAS DE LA MUESTRA

Un total de 28 aislados bacterianos fueron obtenidos a partir de las muestras de agua provenientes del pozo petrolero (campo CIRA-INFANTAS) del Magdalena Medio, Santander, Colombia. La caracterización microscópica de los aislados usando la técnica de tinción de Gram indicó que 24 de los aislados responden negativamente a la tinción de Gram y los 4 restantes resultaron Gram positivos. Como se puede observar en la **Figura 1**, las formas celulares que caracterizaron a los aislados bacterianos fueron: cocos (2), bacilos (2 Gram positivos, 23 Gram negativos) y vibrios (1). La morfología celular de todos los aislados bacterianos estudiados puede encontrarse en el **Anexo 5**.

Figura 1. Formas celulares características entre los aislados identificados.

A. Cocos Gram positivos, B. Bacilos Gram negativos, C. Bacilos Gram positivos y D. Vibrios Gram negativos.



3.2 IDENTIFICACIÓN DE GÉNEROS BACTERIANOS

Con fines de identificación, se desarrollaron un grupo de pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los resultados obtenidos con tales pruebas son resumidos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Identificación de bacterias basado en la morfología, metabolismo y descriptores bioquímicos.

Código aislado	CD	MI	Morfología celular				Pruebas Metabolismo y Bioquímicas									
			GS	SFS	BF	Mo	OxR	Cat	Cit	Lac	ONPG	Glyc gas	Glyc Ac	Mal gas	Mal Ac	
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	01/12/2009	AN	+	-	C	-	FAn	+	-	-	-	-	+	-	+	
<i>B. cereus</i> ATCC® 10876™	01/12/2009	AN	+	+	B	+	FAn	+	+	+	-	-	+	-	+	
<i>B. megaterium</i> ATCC® 9885™	01/12/2009	AN	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	+	-	+	
<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029™	01/12/2009	AN	-	-	B	+	FAn	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	01/12/2009	AN	-	-	B	+	FAn	+	-	-	-	-	+	-	+	
<i>C. braakii</i> ATCC® 43162™	01/12/2009	AN	-	-	B	+	FAn	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>S. typhimurium</i> ATCC® 13311™	01/12/2009	AN	-	-	B	+	FAn	+	+	+	-	+	+	+	+	
<i>P. vulgaris</i> ATCC® 33420™	13/04/2010	AN	-	-	B	+	FAn	+	-	-	-	-	+	-	+	
<i>P. alcalifaciens</i> ATCC® 51902™	13/04/2010	AN	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	-	+	-	+	
OWW-2011008-1	11/03/2009	DRF	+	-	C	-	FAn	+	-	-	-	-	+	-	+	
OWW-2011008-2	11/03/2009	DRF	+	+	B	+	FAn	+	-	-	-	-	+	-	+	
OWW-2011008-3	22/07/2009	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	+	+	+	+	
OWW-2011008-4	24/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	+	+	+	+	
OWW-2011008-5	22/07/2009	DRF	-	-	B	+	FAn	+	-	+	+	+	+	+	+	
OWW-2011008-6	27/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	+	+	+	+	
OWW-2011008-7	27/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	+	+	+	+	
OWW-2011008-8	20/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	+	+	+	+	
OWW-2011008-9	24/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	+	+	+	+	
OWW-2011008-10	20/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	+	-	+	+	+	+	
OWW-2011008-11	22/07/2009	DRF	-	-	B	+	FAn	+	-	-	-	+	+	+	+	
OWW-2011008-12	20/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	+	+	+	+	
OWW-2011008-13	20/10/2008	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	+	+	+	+	
OWW-2030193-1	23/09/2009	NA	-	-	B	+	FAn	+	+	-	+	+	+	+	+	
OWW-2030193-2	23/09/2009	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	
OWW-2030193-3	24/04/2009	DRF	+	+	B	+	FAn	+	-	-	-	-	+	-	+	
OWW-2030193-4	04/09/2009	MC	-	-	B	+	FAn	+	+	+	-	+	+	+	+	
OWW-2030193-5	24/04/2009	CA	+	-	C	-	FAn	+	-	-	-	-	+	-	+	
OWW-2030193-6	04/09/2009	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	+	+	+	+	
OWW-2030193-7	08/09/2009	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	
OWW-2030193-8	04/09/2009	NA	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	
OWW-2030193-9	04/09/2009	DRF	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	+	+	+	+	
OWW-2030193-10	23/11/2009	LEA	-	-	B	+	FAn	+	+	-	+	+	+	+	+	
OWW-2030193-11	23/11/2009	LEA	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	+	+	-	+	
OWW-2030193-12	23/11/2009	LEA	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	+	+	+	+	
OWW-2030193-13	23/11/2009	LEA	-	-	B	+	FAn	+	+	-	-	+	+	+	+	
OWW-2030193-14	23/11/2009	LEA	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	+	+	+	+	
OWW-2030193-15	08/03/2010	LEA	-	-	V	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 3. Continuación....

Código aislado	CD	Pruebas Metabolismo y Bioquímicas												
		Ure	H ₂ S (1)	H ₂ S (2)	Ind	Gel	EMB	MC1	MC2	MS1	MS2	TSBA	DNA	KCN
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592 TM	01/12/2009	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> ATCC® 10876 TM	01/12/2009	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>B. megaterium</i> ATCC® 9885 TM	01/12/2009	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029 TM	01/12/2009	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>E. coli</i> ATCC® 33876 TM	01/12/2009	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. braakii</i> ATCC® 43162 TM	01/12/2009	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>S. typhimurium</i> ATCC® 13311 TM	01/12/2009	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>P. vulgaris</i> ATCC® 33420 TM	13/04/2010	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>P. alcalifaciens</i> ATCC® 51902 TM	13/04/2010	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-1	11/03/2009	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
OWW-2011008-2	11/03/2009	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
OWW-2011008-3	22/07/2009	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-4	24/10/2008	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-5	22/07/2009	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-6	27/10/2008	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-7	27/10/2008	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-8	20/10/2008	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-9	24/10/2008	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-10	20/10/2008	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-11	22/07/2009	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-12	20/10/2008	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-13	20/10/2008	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2030193-1	23/09/2009	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
OWW-2030193-2	23/09/2009	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
OWW-2030193-3	24/04/2009	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
OWW-2030193-4	04/09/2009	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
OWW-2030193-5	24/04/2009	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
OWW-2030193-6	04/09/2009	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2030193-7	08/09/2009	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
OWW-2030193-8	04/09/2009	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
OWW-2030193-9	04/09/2009	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
OWW-2030193-10	23/11/2009	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2030193-11	23/11/2009	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2030193-12	23/11/2009	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2030193-13	23/11/2009	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2030193-14	23/11/2009	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
OWW-2030193-15	08/03/2010	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-

Tabla 3. Continuación....

Código aislado	CD	Pruebas Metabolismo y Bioquímicas									
		Suc gas	Suc Ac	MR	VP	Glu gas	Glu Ac	Alm	Temp 50°C	Temp 65°C	NaCl 7.5%
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	01/12/2009	-	+	+	+	-	+	NE	-	-	NE
<i>B. cereus</i> ATCC® 10876™	01/12/2009	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>B. megaterium</i> ATCC® 9885™	01/12/2009	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029™	01/12/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	01/12/2009	+	+	+	-	+	+	NE	-	-	NE
<i>C. braakii</i> ATCC® 43162™	01/12/2009	+	+	+	-	+	+	NE	-	-	NE
<i>S. typhimurium</i> ATCC®13311™	01/12/2009	+	+	+	-	+	+	NE	-	-	NE
<i>P. vulgaris</i> ATCC® 33420™	13/04/2010	-	+	-	-	+	+	-	-	-	NE
<i>P. alcalifaciens</i> ATCC® 51902™	13/04/2010	-	+	-	-	-	+	-	-	-	NE
OWW-2011008-1	11/03/2009	-	+	+	-	-	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-2	11/03/2009	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2011008-3	22/07/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-4	24/10/2008	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-5	22/07/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-6	27/10/2008	-	+	-	-	-	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-7	27/10/2008	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-8	20/10/2008	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-9	24/10/2008	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-10	20/10/2008	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-11	22/07/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-12	20/10/2008	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2011008-13	20/10/2008	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-1	23/09/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-2	23/09/2009	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE
OWW-2030193-3	24/04/2009	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
OWW-2030193-4	04/09/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-5	24/04/2009	-	+	+	-	-	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-6	04/09/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-7	08/09/2009	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE
OWW-2030193-8	04/09/2009	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE
OWW-2030193-9	04/09/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-10	23/11/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-11	23/11/2009	-	+	-	-	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-12	23/11/2009	-	+	-	-	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-13	23/11/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-14	23/11/2009	+	+	-	+	+	+	NE	-	-	NE
OWW-2030193-15	08/03/2010	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE

El código del aislado está relacionado con el origen del aislado (**OWW**: Agua campo petrolero), **CD**: Fecha de Conservación, **MI**: Medio usado para el aislamiento de bacterias (**NA**: Agar Nutriente MERCK, **MC**: Medio MacConkey Agar MERCK, **DRF**: Medio Dextrosa Rojo de Fenol, **CA**: Columbia base agar suplementado con Azida Sódica OXOID, **LEA**: Medio Lactato electrón aceptor), **GS**: Método Tinción Gram, **SFS**: Método tinción esporas Schaeffer-Fulton, **BF**: Formas Bacterianas (**B**: Bacilo, **C**: Coco, **S**: Espirilo, **V**: Vibrio), **Mo**: Motilidad, **OxR**: Relación Oxígeno bacteriano (**Ae**: Aerobio, **FAn**: Anaerobio Facultativo, **An**: Anaerobio), **Cat**: Presencia enzima Catalasa, **Cit**: Uso de citrato como fuente de

carbono en medio Citrato Simmons Agar MERCK, **Lac**: Fermentación de Lactosa medido por producción de gas en medio Lactosa caldo OXOID, **ONPG**: Presencia de enzima β -galactosidasa medido por Prueba ONPG en medio Lactosa caldo OXOID, **Glyc Ac**: Fermentación de Glicerol medido por producción de ácido Glicerol rojo de fenol agar, **Glyc gas**: Fermentación de Glicerol medido por producción de gas en medio Glicerol rojo de fenol agar, **Mal Ac**: Fermentación de Maltosa medido por acidificación en medio Maltosa Rojo de fenol Agar, **Mal gas**: Fermentación de Maltosa medido por producción de gas en medio Maltosa Rojo de fenol Agar, **Suc Ac**: Fermentación de Sacarosa medido por acidificación en medio Sacarosa rojo de fenol agar, **Suc gas**: Fermentación de Sacarosa medido por producción de gas en medio Sacarosa rojo de fenol agar, **MR**: Fermentación ácido-mixta medido en medio Rojo de metilo-Voges Proskauer (MR-VP) OXOID, **VP**: Producción de 2,3-butanediol a partir de glucosa medido en medio MR-VP, **Glu Ac**: Fermentación de Glucosa medido por acidificación en medio MR-VP OXOID, **Glu gas**: Fermentación de Glucosa medido por producción de gas en medio MR-VP OXOID, **Ure**: Presencia de enzima ureasa como fuente de carbono medido en medio Caldo base de Urea OXOID, **H₂S**¹: Producción de sulfuro de Hidrogeno en medio LEA, **H₂S**²: Producción de sulfuro de Hidrogeno en medio SIM MERCK, **Ind**: Producción de indol en medio SIM MERCK, **Gel**: Licuefacción de Gelatina en medio Gelatina agar MERCK, **EMB**: Fermentación de lactosa medido por el medio diferencial Levine Eosina azul de Metileno Agar MERCK, **MC1**: Tolerancia a sales biliares medido como crecimiento en medio MacConkey Agar MERCK, **MC2**: Fermentación de Lactosa medido por el medio diferencial MacConkey Agar MERCK, **MS1**: Tolerancia de sal medido como crecimiento en medio Manitol salado agar OXOID, **MS2**: Fermentación Manitol medido en medio Manitol salado agar OXOID, **TSBA**: Ensayo Hemolítico en Sangre usando medio Triptona soja agar sangre, **DNA**: Presencia de enzima hidrolítica DNA medido por el medio DNAsa agar, **KCN**: Tolerancia de Cianuro de Potasio medido como crecimiento en medio Caldo Nutriente MERCK con KCN 0.5%, **Alm**: Presencia de Almidón medido en medio Almidón agar, **Temp 50 y 65°C**: Temperaturas de

Crecimiento 50 y 65°C medido en medio Caldo Nutriente MERCK, **NaCl 7.5%**: Tolerancia de sal medido como crecimiento en medio Agar Nutriente suplementado con Cloruro de sodio al 7.5% MERCK, (+): resultados positivos, (-): resultados negativos, **NE**: No evaluado.

Como se mencionó en el acápite 2.5, la identificación de los aislados bacterianos se llevo a cabo separadamente para bacterias Gram positivas y Gram negativas. Primeramente se usaron un grupo de pruebas que son de importancia para la caracterización de cada grupo al nivel de género bacteriano y luego los aislados se ensayaron para otros descriptores complementarios que aportan información al nivel de especie y/o que son importantes para su estudio como bacterias asociadas al proceso de corrosión.

3.2.1 Identificación de aislados Gram positivos

Solo 4 aislados (OWW-2011008-1, OWW-2011008-2, OWW-2030193-3 y OWW-2030193-5) respondieron positivamente a la tinción de Gram. Con base en el identificador presentado en el **Anexo 3**, estos fueron asignados a los géneros bacterianos *Bacillus* (OWW-2011008-2, OWW-2030193-3) y *Staphylococcus* (OWW-2011008-1, OWW-2030193-5).

Los descriptores o pruebas de particular importancia taxonómica para el género *Bacillus* fueron: *i*) la respuesta a la tinción de Gram, *ii*) forma bacilar con presencia de esporangios, *iii*) la relación con el oxígeno y, *iv*) la producción de catalasa. Los aislados bacterianos pertenecientes a este género (OWW-2011008-2, OWW-2030193-3), mostraron además las siguientes características comunes: *i*) motilidad positiva, *ii*) son anaerobios facultativos, *iii*) presentan actividad hemolítica y gelatinasa, *iv*) fermentan (sin producción de gas) los sustratos glicerol, glucosa, maltosa y sacarosa, *v*) son positivos para la fermentación ácido-mixta (prueba Rojo de Metilo) y para la producción de 2,3-butanediol (prueba Voges-Proskauer)

y, vi) son tolerantes a concentraciones altas (7.5 %) de Cloruro de Sodio. Ellos solo fueron diferentes en cuanto a su tolerancia al Cianuro de Potasio durante su crecimiento (**Tabla 3**), compuesto que interfiere con la cadena de transporte de electrones durante la respiración aeróbica.

Por otra parte, los descriptores o pruebas de particular importancia taxonómica para el género *Staphylococcus* fueron: i) la respuesta a la tinción de Gram, ii) forma cocoide con ausencia de esporas, iii) la producción de catalasa y, iv) la relación con el oxígeno. Los aislados bacterianos pertenecientes a este género (OWW-2011008-1, OWW-2030193-5), mostraron las siguientes características comunes: i) motilidad negativa, ii) son anaerobios facultativos, iii) presentan actividad hemolítica, iv) fermentan el manitol y, v) son ureasa positiva.

3.2.2 Identificación de aislados Gram negativos

Una clave de identificación para bacilos Gram negativos, en especial aquellos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, es presentada en el **Anexo 4**. Con base en este identificador, 23 de los aislados fueron asignados a los géneros *Enterobacter* (OWW-2011008-3, OWW-2011008-4, OWW-2011008-7, OWW-2011008-9, OWW-2011008-10, OWW-2011008-13, OWW-2030193-4, OWW-2030193-6, OWW-2030193-14), *Erwinia* (OWW-2011008-6, OWW-2011008-8, OWW-2011008-12, OWW-2030193-1, OWW-2030193-2, OWW-2030193-7, OWW-2030193-8, OWW-2030193-9), *Escherichia* (OWW-2011008-5), *Proteus* (OWW-2011008-11) y *Providencia* (OWW-2030193-10, OWW-2030193-11, OWW-2030193-12, OWW-2030193-13).

Los diferentes géneros bacterianos fueron caracterizados por medio de los siguientes indicadores: *Enterobacter* (motilidad positiva, son anaerobios facultativos, fermentan citrato y lactosa, son negativos para la fermentación ácido-mixta (prueba Rojo de Metilo) y para la producción de indol); *Erwinia* (motilidad

positiva, son anaerobios facultativos, fermentan citrato pero no la lactosa, son negativos para la fermentación ácido-mixta y para la producción de indol, no hidrolizan ADN ni Gelatina); *Escherichia* (motilidad positiva, son anaerobios facultativos, fermentan lactosa pero no el citrato, son positivos para la fermentación ácido-mixta y generalmente para la producción de indol); *Proteus* (motilidad positiva, son anaerobios facultativos, no fermentan citrato ni lactosa, son positivos para la fermentación ácido-mixta pero no producen indol, son ureasa positivo y producen sulfuro de hidrógeno a partir de sulfatos); *Providencia* (motilidad positiva, son anaerobios facultativos, fermentan citrato y manitol pero no la lactosa, son positivos para la fermentación ácido-mixta y la producción de indol, son ureasa positivo pero no producen sulfuro de hidrógeno a partir de sulfatos).

Otro tipo bacteriano aislado de las aguas del pozo petrolero objeto de estudio fue un vibrio (OWW-2030193-15), el cual también responde negativamente a la tinción de Gram (**Figura 1D**). Este aislado se caracterizó por ser de metabolismo anaerobio estricto, por responder negativamente a la prueba de catalasa y por producir sulfuro de hidrógeno a partir de sulfatos usando como aceptor de electrones el Lactato. Tales características nos indican que dicho aislado pertenece al género *Desulfovibrio* (**Anexo 6**).

3.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS

Con base en un grupo de descriptores de importancia taxonómica para la identificación de especies dentro de los géneros bacterianos identificados en el estudio, se calcularon matrices de similitud con el fin de conocer la similitud genética de los aislados estudiados con relación a especies tipo de cada género.

Los descriptores con importancia taxonómica dentro del género *Bacillus* fueron: catalasa, Voges-Proskauer, crecimiento en anaerobiosis, crecimiento a 50°C,

crecimiento a 65°C, crecimiento en 7.5% NaCl, producción de ácido de glucosa, producción de ácido y gas de glucosa, hidrólisis del almidón y colonias cerosas sobre agar sangre (Slepecky y Hemphill 2006, Farrar y Reboli 2006). Con base en estos descriptores, los aislados estudiados (OWW-2011008-2, OWW-2030193-3) muestran una similitud del 100 % con la cepa de referencia *Bacillus cereus* ATCC® 10876™ y con la información correspondiente a la especie *B. cereus* (Tabla 4). A tal fin, fue determinante el descriptor producción de colonias cerosas sobre cajas de Agar Sangre, característica que puede observarse en el Anexo 7.

Tabla 4. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género *Bacillus*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>B. cereus</i> ATCC® 10876™	100												
2	<i>B. megaterium</i> ATCC®	72	100											
3	OWW- 2011008-2	100	72	100										
4	OWW- 2030193-3	100	72	100	100									
5	<i>B. megaterium</i>	72	100	72	72	100								
6	<i>B. cereus</i>	100	72	100	100	72	100							
7	<i>B. thuringiensis</i>	92	80	92	92	80	92	100						
8	<i>B. licheniformis</i>	85	72	85	85	72	85	92	100					
9	<i>B. subtilis</i>	76	80	76	76	80	76	83	92	100				
10	<i>B. pumilus</i>	66	66	66	66	66	66	72	83	90	100			
11	<i>B. firmus</i>	72	100	72	72	100	72	80	72	80	66	100		
12	<i>B. coagulans</i>	76	60	76	76	60	76	83	92	83	72	60	100	
13	<i>B. polymyxa</i>	76	60	76	76	60	76	83	76	66	54	60	83	100
14	<i>B. macerans</i>	61	60	61	61	60	61	66	76	66	54	60	83	83
15	<i>B. circulans</i>	76	80	76	76	80	76	83	92	83	72	80	83	66
16	<i>B. stearothermophilus</i>	50	66	50	50	66	50	54	66	72	60	66	72	54
17	<i>B. alvei</i>	83	66	83	83	66	83	90	83	72	60	66	90	90
18	<i>B. laterosporus</i>	54	50	54	54	50	54	60	72	60	66	50	80	60
19	<i>B. brevis</i>	40	57	40	40	57	40	44	60	66	75	57	66	44
20	<i>B. larvae</i>	44	33	44	44	33	44	50	44	25	28	33	50	50
21	<i>B. popilliae</i>	44	33	44	44	33	44	50	44	25	28	33	50	50
22	<i>B. lentimorbus</i>	44	33	44	44	33	44	50	44	25	28	33	50	50
23	<i>B. sphaericus</i>	44	66	44	44	66	44	50	44	50	57	66	25	25
24	<i>B. anthracis</i>	92	60	92	92	60	92	83	76	66	72	60	66	66
25	<i>B. pasteurii</i>	72	75	72	72	75	72	80	72	60	66	75	60	60
26	<i>B. pantothenicus</i>	66	66	66	66	66	66	72	83	72	80	66	72	54

Tabla 4. Continuación....

		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	<i>B. cereus</i> ATCC® 10876™													
2	<i>B. megaterium</i> ATCC®													
3	OWW- 2011008-2													
4	OWW- 2030193-3													
5	<i>B. megaterium</i>													
6	<i>B. cereus</i>													
7	<i>B. thuringiensis</i>													
8	<i>B. licheniformis</i>													
9	<i>B. subtilis</i>													
10	<i>B. pumilus</i>													
11	<i>B. firmus</i>													
12	<i>B. cuagulans</i>													
13	<i>B. polymyxa</i>													
14	<i>B. macerans</i>	100												
15	<i>B. circulans</i>	83	100											
16	<i>B. stearothermophilus</i>	72	72	100										
17	<i>B. alvei</i>	72	72	60	100									
18	<i>B. laterosporus</i>	80	80	66	66	100								
19	<i>B. brevis</i>	66	66	75	50	85	100							
20	<i>B. larvae</i>	50	50	28	57	66	40	100						
21	<i>B. popilliae</i>	50	50	28	57	66	40	100	100					
22	<i>B. lentimorbus</i>	50	50	28	57	66	40	100	100	100				
23	<i>B. sphaericus</i>	25	50	28	28	33	40	0	0	0	100			
24	<i>B. anthracis</i>	50	66	36	72	60	44	50	50	50	50	100		
25	<i>B. pasteurii</i>	60	80	44	66	75	57	66	66	66	66	80	100	
26	<i>B. pantothenicus</i>	72	90	60	60	88	75	57	57	57	57	72	88	100

De igual manera se procedió para determinar la especie correspondiente para los aislados OWW-2011008-1, OWW-2030193-5 dentro del género *Staphylococcus*. En tal caso, el análisis de similitud se basó en los siguientes descriptores: Crecimiento aeróbico y anaeróbico, producción de hemólisis, presencia de Catalasa y Ureasa, actividad β -galactosidasa, Rojo de Metilo y producción de ácido a partir de Manitol, Maltosa y Sacarosa (Götz *et al.* 2006). Dicho análisis mostró una similitud del 100 % de los mencionados aislados con la cepa de referencia *S. aureus* ATCC® 33592™ y con la información correspondiente a las especies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis subsp urealyticus*, *Staphylococcus pasteurii* y *Staphylococcus warneri* (**Tabla 5**). Aunque las mencionadas especies son altamente relacionadas (Götz *et al.* 2006), un estudio usando descriptores adicionales como la presencia de actividades enzimáticas, tales como coagulasa, glucosidasa, glucoronidasa y fosfatasa alcalina, así como la utilización de azúcares como Manosa y Trehalosa; podrían ser de utilidad para determinar la especie a la cual pertenecen los aislados bacterianos del presente estudio.

Tabla 5. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género *Staphylococcus*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>S. aureus</i> ATCC ATCC®33592™	100												
2	OWW-2011008-1	100	100											
3	OWW-2030193-5	100	100	100										
4	<i>S. arlettae</i>	66	66	66	100									
5	<i>S. auricularis</i>	66	66	66	83	100								
6	<i>S. aureus</i>	100	100	100	66	66	100							
7	<i>S. aureus</i> subsp <i>anaerobius</i>	87	87	87	61	61	87	100						
8	<i>S. capitis</i>	87	87	87	61	61	87	71	100					
9	<i>S. capitis</i> subsp <i>urealyticus</i>	100	100	100	66	66	100	87	87	100				
10	<i>S. caprae</i>	94	94	94	57	57	94	80	80	94	100			
11	<i>S. carnosus</i>	66	66	66	66	66	66	46	76	66	71	100		
12	<i>S. carnosus</i> subsp <i>utilis</i>	71	71	71	36	54	71	50	83	71	76	72	100	
13	<i>S. chromogenes</i>	87	87	87	76	76	87	85	71	87	80	61	50	100
14	<i>S. cohnii</i>	87	87	87	61	61	87	71	85	87	93	76	83	71
15	<i>S. cohnii</i> subsp <i>urealyticus</i>	88	88	88	66	66	88	75	75	88	94	80	71	75
16	<i>S. condimentii</i>	88	88	88	66	66	88	75	87	88	82	80	71	75
17	<i>S. delphini</i>	88	88	88	80	80	88	87	75	88	82	66	57	87
18	<i>S. epidermis</i>	94	94	94	57	71	94	80	80	94	87	57	76	80
19	<i>S. equorum</i>	82	82	82	85	71	82	80	66	82	75	57	46	80
20	<i>S. felis</i>	82	82	82	71	71	82	80	80	82	75	71	61	80
21	<i>S. fleurettii</i>	94	94	94	71	71	94	80	93	94	87	71	76	80
22	<i>S. gallinarum</i>	88	88	88	80	80	88	87	75	88	82	66	57	87
23	<i>S. haemolyticus</i>	94	94	94	71	71	94	80	93	94	87	71	76	80
24	<i>S. hominis</i>	87	87	87	61	76	87	71	71	87	80	61	66	85
25	<i>S. hominis</i> subsp <i>novobiensepticus</i>	80	80	80	66	66	80	61	61	80	71	50	54	76
26	<i>S. hyicus</i>	71	71	71	54	72	71	66	66	71	61	54	60	83
27	<i>S. intermedius</i>	88	88	88	80	80	88	87	75	88	82	66	57	87
28	<i>S. kloosii</i>	88	88	88	80	66	88	75	75	88	82	66	57	75
29	<i>S. lentus</i>	80	80	80	83	83	80	76	76	80	71	66	54	92
30	<i>S. lugdunensis</i>	94	94	94	57	71	94	80	80	94	87	57	76	80
31	<i>S. lutrae</i>	88	88	88	80	80	88	87	75	88	82	66	57	87
32	<i>S. muscae</i>	71	71	71	54	72	71	66	83	71	61	54	80	66
33	<i>S. pasteurii</i>	100	100	100	66	66	100	87	87	100	94	66	71	87
34	<i>S. piscifermentans</i>	87	87	87	76	76	87	85	71	87	80	61	50	100
35	<i>S. saccharolyticus</i>	57	57	57	36	54	57	50	50	57	61	72	60	50
36	<i>S. saprophyticus</i>	88	88	88	80	80	88	75	75	88	82	80	57	87
37	<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>	88	88	88	80	80	88	75	75	88	82	80	57	87
38	<i>S. schleiferi</i>	66	66	66	50	66	66	46	76	66	71	83	90	46
39	<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	88	88	88	66	66	88	75	87	88	82	80	71	75
40	<i>S. sciuri</i>	87	87	87	76	76	87	85	85	87	80	61	66	85
41	<i>S. sciuri</i> subsp <i>carnaticus</i>	87	87	87	76	76	87	85	85	87	80	61	66	85
42	<i>S. sciuri</i> subsp <i>rodentium</i>	87	87	87	76	76	87	85	85	87	80	61	66	85
43	<i>S. simulans</i>	94	94	94	75	75	94	82	82	94	88	75	66	82
44	<i>S. succinus</i>	82	82	82	85	71	82	80	80	82	75	57	46	80
45	<i>S. vitulinus</i>	61	61	61	80	60	61	54	54	61	50	60	44	72
46	<i>S. warneri</i>	100	100	100	66	66	100	87	87	100	94	66	71	87
47	<i>S. xylorus</i>	88	88	88	80	80	88	75	75	88	82	80	57	87

Tabla 5. Continuación....

		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	<i>S. aureus</i> ATCC ATCC®33592™													
2	OWW-2011008-1													
3	OWW-2030193-5													
4	<i>S. arlettae</i>													
5	<i>S. auricularis</i>													
6	<i>S. aureus</i>													
7	<i>S. aureus</i> subsp <i>anaerobius</i>													
8	<i>S. capitis</i>													
9	<i>S. capitis</i> subsp <i>urealyticus</i>													
10	<i>S. caprae</i>													
11	<i>S. carnosus</i>													
12	<i>S. carnosus</i> subsp <i>utilis</i>													
13	<i>S. chromogenes</i>													
14	<i>S. cohnii</i>	100												
15	<i>S. cohnii</i> subsp <i>urealyticus</i>	87	100											
16	<i>S. condimentii</i>	75	88	100										
17	<i>S. delphini</i>	75	88	88	100									
18	<i>S. epidermis</i>	80	82	82	82	100								
19	<i>S. equorum</i>	66	82	82	94	75	100							
20	<i>S. felis</i>	66	82	94	94	75	87	100						
21	<i>S. fleurettii</i>	93	82	82	82	87	75	75	100					
22	<i>S. gallinarum</i>	75	88	88	100	82	94	94	82	100				
23	<i>S. haemolyticus</i>	93	82	82	82	87	75	75	100	82	100			
24	<i>S. hominis</i>	71	75	75	75	93	66	66	80	75	80	100		
25	<i>S. hominis</i> subsp <i>novobiosepticus</i>	61	66	66	66	85	71	57	71	66	71	92	100	
26	<i>S. hyicus</i>	50	57	71	71	76	61	76	61	71	61	83	72	100
27	<i>S. intermedius</i>	75	88	88	100	82	94	94	82	100	82	75	66	71
28	<i>S. kloosii</i>	75	88	88	88	82	94	82	82	88	82	75	80	57
29	<i>S. lentus</i>	76	66	66	80	71	71	71	85	80	85	76	66	72
30	<i>S. lugdunensis</i>	80	82	82	82	100	75	75	87	82	87	93	85	76
31	<i>S. lutrae</i>	75	88	88	100	82	94	94	82	100	82	75	66	71
32	<i>S. muscae</i>	66	57	71	71	76	61	76	76	71	76	66	54	80
33	<i>S. pasteurii</i>	87	88	88	88	94	82	82	94	88	94	87	80	71
34	<i>S. piscifermentans</i>	71	75	75	87	80	80	80	80	87	80	85	76	83
35	<i>S. saccharolyticus</i>	50	71	71	57	61	46	61	46	57	46	66	54	60
36	<i>S. saprophyticus</i>	75	88	88	88	82	82	82	82	88	82	87	80	71
37	<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>	75	88	88	88	82	82	82	82	88	82	87	80	71
38	<i>S. schleiferi</i>	76	80	80	66	71	57	71	71	66	71	61	50	54
39	<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	75	88	100	88	82	82	94	82	88	82	75	66	71
40	<i>S. sciuri</i>	85	75	75	87	80	80	80	93	87	93	71	61	66
41	<i>S. sciuri</i> subsp <i>carnaticus</i>	85	75	75	87	80	80	80	93	87	93	71	61	66
42	<i>S. sciuri</i> subsp <i>rodentium</i>	85	75	75	87	80	80	80	93	87	93	71	61	66
43	<i>S. simulans</i>	82	94	94	94	88	88	88	88	94	88	82	75	66
44	<i>S. succinus</i>	66	82	82	94	75	100	87	75	94	75	66	71	61
45	<i>S. vitulinus</i>	54	46	61	61	50	66	66	66	61	66	54	60	66
46	<i>S. warneri</i>	87	88	88	88	94	82	82	94	88	94	87	80	71
47	<i>S. xylorus</i>	75	88	88	88	82	82	82	82	88	82	87	80	71

Tabla 5. Continuación....

		27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
1	<i>S. aureus</i> ATCC ATCC®33592™													
2	OWW-2011008-1													
3	OWW-2030193-5													
4	<i>S. arlettae</i>													
5	<i>S. auricularis</i>													
6	<i>S. aureus</i>													
7	<i>S. aureus</i> subsp <i>anaerobius</i>													
8	<i>S. capitis</i>													
9	<i>S. capitis</i> subsp <i>urealyticus</i>													
10	<i>S. caprae</i>													
11	<i>S. carnosus</i>													
12	<i>S. carnosus</i> subsp <i>utilis</i>													
13	<i>S. chromogenes</i>													
14	<i>S. cohnii</i>													
15	<i>S. cohnii</i> subsp <i>urealyticus</i>													
16	<i>S. condimenti</i>													
17	<i>S. delphini</i>													
18	<i>S. epidermis</i>													
19	<i>S. equorum</i>													
20	<i>S. felis</i>													
21	<i>S. fleurettii</i>													
22	<i>S. gallinarum</i>													
23	<i>S. haemolyticus</i>													
24	<i>S. hominis</i>													
25	<i>S. hominis</i> subsp <i>novobiosepticus</i>													
26	<i>S. hyicus</i>													
27	<i>S. intermedius</i>	100												
28	<i>S. kloosii</i>	88	100											
29	<i>S. lentus</i>	80	66	100										
30	<i>S. lugdunensis</i>	82	82	71	100									
31	<i>S. lutrae</i>	100	88	80	82	100								
32	<i>S. muscae</i>	71	57	72	76	71	100							
33	<i>S. pasteurii</i>	88	88	80	94	88	71	100						
34	<i>S. piscifermentans</i>	87	75	92	80	87	66	87	100					
35	<i>S. saccharolyticus</i>	57	57	36	61	57	40	57	50	100				
36	<i>S. saprophyticus</i>	88	88	80	82	88	57	88	87	71	100			
37	<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>	88	88	80	82	88	57	88	87	71	100	100		
38	<i>S. schleiferi</i>	66	66	50	71	66	72	66	46	72	66	66	100	
39	<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	88	88	66	82	88	71	88	75	71	88	88	80	100
40	<i>S. sciuri</i>	87	75	92	80	87	83	87	85	33	75	75	61	75
41	<i>S. sciuri</i> subsp <i>carnaticus</i>	87	75	92	80	87	83	87	85	33	75	75	61	75
42	<i>S. sciuri</i> subsp <i>rodentium</i>	87	75	92	80	87	83	87	85	33	75	75	61	75
43	<i>S. simulans</i>	94	94	75	88	94	66	94	82	66	94	94	75	94
44	<i>S. succinus</i>	94	94	71	75	94	61	82	80	46	82	82	57	82
45	<i>S. vitulinus</i>	61	61	80	50	61	66	61	72	22	61	61	40	61
46	<i>S. warneri</i>	88	88	80	94	88	71	100	87	57	88	88	66	88
47	<i>S. xylophilus</i>	88	88	80	82	88	57	88	87	71	100	100	66	88

Tabla 5. Continuación....

		40	41	42	43	44	45	46	47
1	<i>S. aureus</i> ATCC ATCC®33592™								
2	OWW-2011008-1								
3	OWW-2030193-5								
4	<i>S. arlettae</i>								
5	<i>S. auricularis</i>								
6	<i>S. aureus</i>								
7	<i>S. aureus</i> subsp <i>anaerobius</i>								
8	<i>S. capitis</i>								
9	<i>S. capitis</i> subsp <i>urealyticus</i>								
10	<i>S. caprae</i>								
11	<i>S. carnosus</i>								
12	<i>S. carnosus</i> subsp <i>utilis</i>								
13	<i>S. chromogenes</i>								
14	<i>S. cohnii</i>								
15	<i>S. cohnii</i> subsp <i>urealyticus</i>								
16	<i>S. condimentii</i>								
17	<i>S. delphini</i>								
18	<i>S. epidermis</i>								
19	<i>S. equorum</i>								
20	<i>S. felis</i>								
21	<i>S. fleurettii</i>								
22	<i>S. gallinarum</i>								
23	<i>S. haemolyticus</i>								
24	<i>S. hominis</i>								
25	<i>S. hominis</i> subsp <i>novobiosepticus</i>								
26	<i>S. hyicus</i>								
27	<i>S. intermedius</i>								
28	<i>S. kloosii</i>								
29	<i>S. lentus</i>								
30	<i>S. lugdunensis</i>								
31	<i>S. lutrae</i>								
32	<i>S. muscae</i>								
33	<i>S. pasteurii</i>								
34	<i>S. piscifermentans</i>								
35	<i>S. saccharolyticus</i>								
36	<i>S. saprophyticus</i>								
37	<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>								
38	<i>S. schleiferi</i>								
39	<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>								
40	<i>S. sciuri</i>	100							
41	<i>S. sciuri</i> subsp <i>carnaticus</i>	100	100						
42	<i>S. sciuri</i> subsp <i>rodentium</i>	100	100	100					
43	<i>S. simulans</i>	82	82	82	100				
44	<i>S. succinus</i>	80	80	80	88	100			
45	<i>S. vitulinus</i>	72	72	72	57	66	100		
46	<i>S. warneri</i>	87	87	87	94	82	61	100	
47	<i>S. xyloratus</i>	75	75	75	94	82	61	88	100

De igual forma, este procedimiento se uso con el fin de identificar las especies correspondientes a los aislados previamente asignados al género *Enterobacter* (OWW-2011008-3, OWW-2011008-4, OWW-2011008-7, OWW-2011008-9, OWW-2011008-10, OWW-2011008-13, OWW-2030193-4, OWW-2030193-6, OWW-2030193-14). En tal caso, el análisis de similitud se basó en los siguientes descriptores: Producción de indol, Voges-Proskauer, Rojo de Metilo, uso de Citrato, actividad DNasa y Gelatinasa, motilidad, producción de Ureasa, tolerancia

al cianuro de potasio, producción de ácido de Glicerol, Lactosa, Maltosa, Manitol y Sacarosa (Brenner y Farmer 2005, Grimont y Grimont 2006). En dicho análisis, los aislados OWW-2011008-3, OWW-2011008-7, OWW-2011008-9, OWW-2011008-10, OWW-2011008-13, OWW-2030193-4 y OWW-2030193-6 mostraron una similitud del 100 % con la especie *Enterobacter aerogenes* y una similitud del 94 % con la cepa de referencia *E. aerogenes* ATCC® 35029TM; mientras que los aislados OWW-2011008-4 y OWW-2030193-14 mostraron una similitud del 94 % con la especie *Enterobacter aerogenes* y del 88 % con la cepa de referencia *E. aerogenes* ATCC® 35029TM. El aislado OWW-2030193-14 fue 94 % similar a otras dos especies: *E. gergoviae* y *E. cloacae* (**Tabla 6**). Estos resultados nos indican que la gran mayoría de los aislados corresponden a la especie *Enterobacter aerogenes*. Solo el aislado OWW-2030193-14 tiene similar probabilidad de pertenecer a cualesquiera de las siguientes especies: *E. aerogenes*, *E. gergoviae* y *E. cloacae*.

Tabla 6. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género *Enterobacter*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029 TM	100												
2	OWW-2011008-3	94	100											
3	OWW-2011008-4	88	94	100										
4	OWW-2011008-7	94	100	94	100									
5	OWW-2011008-9	94	100	94	100	100								
6	OWW-2011008-10	94	100	94	100	100	100							
7	OWW-2011008-13	94	100	94	100	100	100	100						
8	OWW-2030193-4	94	100	94	100	100	100	100	100					
9	OWW-2030193-6	94	100	94	100	100	100	100	100	100				
10	OWW-2030193-14	88	94	90	94	94	94	94	94	94	100			
11	<i>E. aerogenes</i>	94	100	94	100	100	100	100	100	100	94	100		
12	<i>E. gergoviae</i>	82	88	84	88	88	88	88	88	88	94	88	100	
13	<i>E. sakazakii</i>	77	84	80	84	84	84	84	84	84	80	84	73	100
14	<i>E. intermedium</i>	88	94	90	94	94	94	94	94	94	90	94	84	80
15	<i>E. cancerogenus</i>	87	94	88	94	94	94	94	94	94	88	94	82	77
16	<i>E. amnigenus</i>	87	94	88	94	94	94	94	94	94	88	94	82	88
17	<i>E. nimipressuralis</i>	82	88	84	88	88	88	88	88	88	84	88	77	73
18	<i>E. cloacae</i>	82	88	84	88	88	88	88	88	88	94	88	88	84
19	<i>E. cowanii</i>	88	94	90	94	94	94	94	94	94	90	94	84	80
20	<i>E. kobei</i>	77	84	80	84	84	84	84	84	84	90	84	84	70
21	<i>E. pyrinus</i>	70	77	73	77	77	77	77	77	77	84	77	77	63
22	<i>E. asburiae</i>	62	70	66	70	70	70	70	70	70	77	70	70	66
23	<i>E. dissolvens</i>	66	75	70	75	75	75	75	75	75	82	75	75	70
24	<i>E. hormaechei</i>	70	77	73	77	77	77	77	77	77	84	77	77	73

Tabla 6. Continuació'n....

		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029™											
2	OWW-2011008-3											
3	OWW-2011008-4											
4	OWW-2011008-7											
5	OWW-2011008-9											
6	OWW-2011008-10											
7	OWW-2011008-13											
8	OWW-2030193-4											
9	OWW-2030193-6											
10	OWW-2030193-14											
11	<i>E. aerogenes</i>											
12	<i>E. gergoviae</i>											
13	<i>E. sakazakii</i>											
14	<i>E. intermedium</i>	100										
15	<i>E. cancerogenus</i>	88	100									
16	<i>E. amnigenus</i>	88	87	100								
17	<i>E. nimipressuralis</i>	94	94	82	100							
18	<i>E. cloacae</i>	84	82	94	77	100						
19	<i>E. cowanii</i>	100	88	88	94	84	100					
20	<i>E. kobei</i>	90	77	77	84	84	90	100				
21	<i>E. pyrinus</i>	84	70	70	77	77	84	84	100			
22	<i>E. asburiae</i>	77	62	75	70	82	77	88	70	100		
23	<i>E. dissolvens</i>	70	66	80	62	87	70	70	75	80	100	
24	<i>E. hormaechei</i>	84	70	82	77	88	84	84	88	82	87	100

El análisis de similitud para la identificación de la especie de los aislados previamente asignados al género *Erwinia* (OWW-2011008-6, OWW-2011008-8, OWW-2011008-12, OWW-2030193-1, OWW-2030193-2, OWW-2030193-7, OWW-2030193-8, OWW-2030193-9), se basó en los siguientes descriptores: Rojo de Metilo, uso de Citrato, actividad Gelatinasa, producción de Ureasa, tolerancia al Cianuro de Potasio, actividad Catalasa y β -galactosidasa, producción de gas a partir de Glucosa y Glicerol, producción de ácido a partir de Glicerol, Lactosa, Maltosa, Manitol y Sacarosa (Kado 2006). En dicho análisis, los aislados OWW-2011008-6, OWW-2011008-8, OWW-2011008-12, OWW-2030193-1 y OWW-2030193-9, mostraron similitudes genéticas entre el 84 y 95 % con la especie *Erwinia psidii* (**Tabla 7**). Sin embargo, los aislados OWW-2030193-2, OWW-2030193-7 y OWW-2030193-8, mostraron valores de similitud genética consistentemente bajos (≤ 40 %) con las especies del género *Erwinia*.

Tabla 7. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género *Erwinia*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	OWW-2011008-6	100														
2	OWW-2011008-8	100	100													
3	OWW-2011888-12	94	94	100												
4	OWW-2030193-1	88	88	94	100											
5	OWW-2030193-2	40	40	36	33	100										
6	OWW-2030193-7	40	40	36	33	100	100									
7	OWW-2030193-8	40	40	36	33	100	100	100								
8	OWW-2030193-9	94	94	100	94	36	36	36	100							
9	<i>E. amylovora</i>	58	58	66	73	36	36	36	66	100						
10	<i>E. billingiae</i>	70	70	77	84	18	18	18	77	77	100					
11	<i>E. malilotivora</i>	58	58	66	73	36	36	36	66	100	77	100				
12	<i>E. persicina</i>	70	70	76	81	28	28	28	76	85	85	85	100			
13	<i>E. psidii</i>	84	84	90	95	30	30	30	90	80	80	80	86	100		
14	<i>E. rhapontici</i>	80	80	85	90	28	28	28	85	76	85	76	91	86	100	
15	<i>E. tracheiphila</i>	62	62	70	77	40	40	40	70	82	70	82	70	73	80	100

Con base a los nuevos conocimientos sobre la clasificación taxonómica de especies del género *Erwinia* (Brenner y Farmer 2005, Kado 2006) que indican que dichas especies pueden ser clasificadas en otros géneros como: *Enterobacter*, *Pectobacterium*, *Pantoea* y *Brenneria*; se desarrolló un segundo análisis de similitud genética incluyendo los aislados OWW-2030193-2, OWW-2030193-7 y OWW-2030193-8 y la información correspondiente a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*. Sin embargo, dicho análisis también mostró valores de similitud promedio consistentemente bajos (datos no mostrados).

El análisis de similitud para la identificación de la especie del aislado previamente asignado al género *Escherichia* (OWW-2011008-5), se basó en los siguientes descriptores: Producción de indol, uso de Citrato, motilidad, tolerancia al Cianuro de Potasio, producción de gas a partir de Glucosa, producción de ácido Lactosa y Manitol (Brenner y Farmer 2005, Welch 2006). Dicho análisis mostró que el mencionado aislado tiene mayor proximidad genética (74%) con la especie *Escherichia vulneris* (Tabla 8).

Tabla 8. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género *Escherichia*.

		1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>E. coli</i> JM101 ATCC® 33876 TM	100							
2	OWW-2011008-5	38	100						
3	<i>E. coli</i>	84	50	100					
4	<i>E. coli</i> inactivada	33	21	66	100				
5	<i>E. blattae</i>	33	21	19	20	100			
6	<i>E. fergusonii</i>	65	38	86	78	36	100		
7	<i>E. hermannii</i>	68	72	72	58	05	64	100	
8	<i>E. vulneris</i>	47	74	79	48	45	91	62	100

El análisis de similitud para la identificación de la especie del aislado previamente asignado al género *Proteus* (OWW-2011008-11), se basó en los siguientes descriptores: Voges-Proskauer, Rojo de Metilo, uso de Citrato, producción de Sulfuro de Hidrógeno, actividad Gelatinasa, motilidad, producción de Ureasa, tolerancia al Cianuro de Potasio, actividad β -galactosidasa, producción de gas a partir de Glucosa, producción de Glicerol, Lactosa, Manitol y Sacarosa (Brenner y Farmer 2005, Manos y Belas 2006). Dicho análisis mostró que el mencionado aislado tiene mayor proximidad genética (84 %) con la cepa de referencia *Proteus vulgaris* (Tabla 9).

Tabla 9. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género *Proteus*.

		1	2	3	4	5	6
1	<i>P. vulgaris</i> ATCC® 33420 TM	100					
2	OWW-2011008-11	84	100				
3	<i>P. vulgaris</i>	90	73	100			
4	<i>P. mirabilis</i>	85	80	95	100		
5	<i>P. myxofaciens</i>	80	73	90	95	100	
6	<i>P. penneri</i>	84	66	94	90	84	100

Por último, el análisis de similitud para la identificación de la especie del aislado previamente asignado al género *Providencia* (OWW-2030193-10, OWW-2030193-11, OWW-2030193-12, OWW-2030193-13), se basó en los siguientes descriptores: Producción de indol, Voges-Proskauer, Rojo de Metilo, uso de Citrato, producción de Sulfuro de Hidrógeno, actividad DNasa y Gelatinasa, producción de Ureasa, tolerancia al Cianuro de Potasio, actividad β -galactosidasa, producción de gas a partir de Glucosa, producción de ácido a partir de Glucosa, Lactosa, Maltosa, Manitol y Sacarosa (Brenner y Farmer 2005, Manos y Belas 2006). En dicho análisis, los mencionados aislados mostraron similitudes entre 70-77 % con la cepa de referencia *Providencia alcalifaciens* ATCC® 51902TM y con la especie *Providencia rettgeri* (Tabla 10).

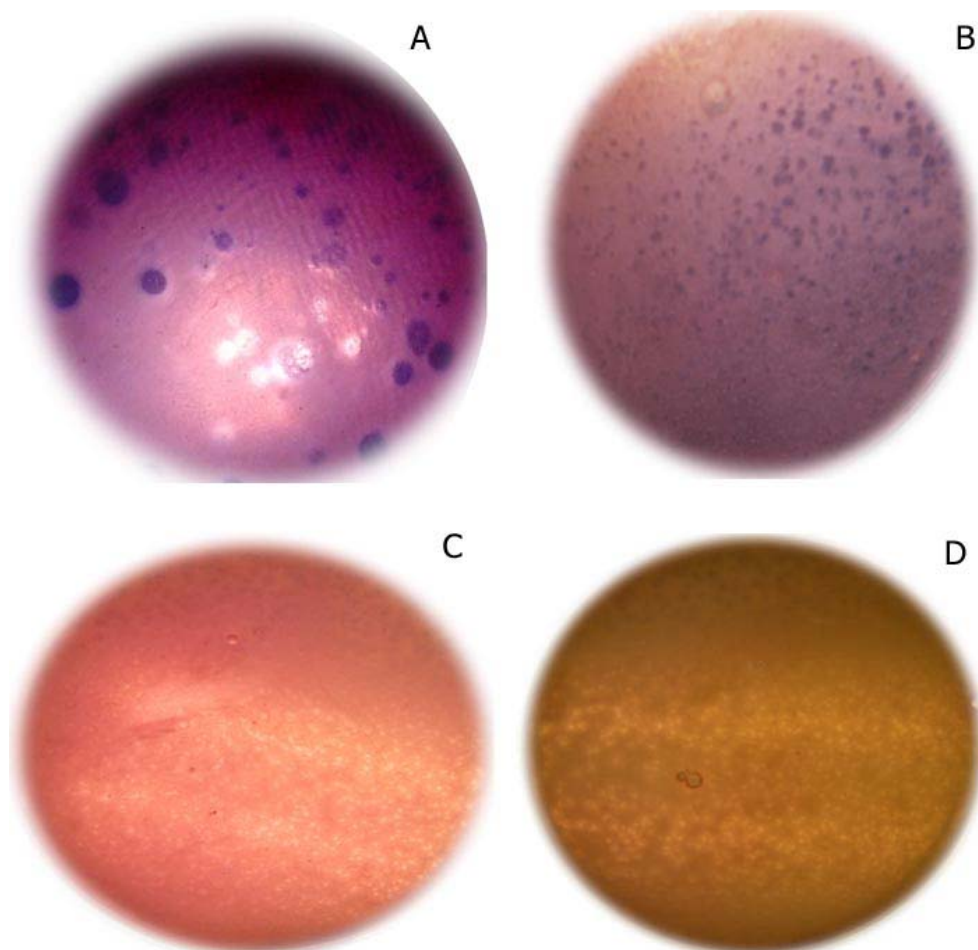
Tabla 10. Similitud Genética de Dice basada en descriptores taxonómicos de importancia para el género *Providencia*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>P. alcalifaciens</i> ATCC® 51902 TM	100									
2	OWW-2030193-10	70	100								
3	OWW-2030193-11	77	90	100							
4	OWW-2030193-12	77	90	100	100						
5	OWW-2030193-13	73	95	94	94	100					
6	<i>P. alcalifaciens</i>	82	63	70	70	66	100				
7	<i>P. heimbachae</i>	65	40	46	46	42	50	100			
8	<i>P. rettgeri</i>	88	70	77	77	73	82	46	100		
9	<i>P. rustigianii</i>	82	63	70	70	66	100	50	82	100	
10	<i>P. stuartii</i>	82	63	70	70	66	87	50	94	87	100

3.4 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Usando el método de doble capa de agar, se lograron identificar 4 bacteriófagos líticos designados como: P19LLU, P29LCSS, P311DCI y P411DCSS (Figura 2).

Figura 2. Placas líticas identificadas sobre placas de agar para cada bacteriófago aislado. A. P19LLU, B. P29LCSS, C. P311DCI y D. P411DCSS.



Los bacteriófagos identificados tienen diferentes orígenes. El bacteriófago P19LLU fue aislado a partir de muestras de agua del Lago UIS y su cepa hospedera fue el aislado bacteriano (OWW-2011008-10) correspondiente al género *Enterobacter*. El bacteriófago (P29LCSS) de diferente origen (Ciénaga San Silvestre), fue identificado en la misma cepa hospedera. Los otros dos bacteriófagos identificados (P311DCI y P411DCSS) usaron como cepa hospedera el aislado (OWW-2011008-12) correspondiente al género *Erwinia*, y sus orígenes fueron el campo petrolero Cira-Infantas y la Ciénaga San Silvestre, respectivamente (**Tabla 11**).

Tabla 11. Identificación de bacteriófagos líticos a partir de diferentes muestras de agua.

Cepa Hospedera		Muestras de agua					
Código	Género	LU	CC	CM	CSS	CI	RM
OWW-2011008-10	<i>Enterobacter</i>	P19LLU	-	-	P29LCSS	-	-
OWW-2011008-12	<i>Erwinia</i>	-	-	-	P411DCSS	P311DCI	-

LU: Lago UIS, **CC:** Campo casabe, **CM:** Ciénaga Miramar, **CSS:** Ciénaga San Silvestre, **CI:** Campo Cira-Infantas, **RM:** Rio Magdalena, **(-):** No Lisis

Considerando que se desarrollaron al menos tres ensayos independientes, para cada una de las muestras de agua estudiadas en todos los aislados bacterianos, los datos aquí obtenidos nos sugieren que los bacteriófagos correspondientes a los géneros *Enterobacter* y *Erwinia* se encuentran entre los más frecuentes en cuerpos de agua.

Un dato interesante, es el hecho que no se encontraron bacteriófagos atemperados para ninguno de los ensayos de inducción de profagos (exposición celular con 1µg/ml de Mitomicina C), desarrollados para cada uno de los aislados bacterianos (datos no mostrados). Este hallazgo, sugiere que el ciclo lítico caracteriza la forma de replicación de los bacteriófagos en los mencionados cuerpos de agua. Adicionalmente, la aparición de microcolonias bacterianas en la zona central de las placas líticas producidas por el bacteriófago P411DCSS sugiere que al menos para este bacteriófago, se puede producir eventos de fago resistencia a su cepa hospedera (aislamiento OWW-2011008-12).

3.5 RANGO HOSPEDERO DE LOS BACTERIÓFAGOS

La capacidad de los bacteriófagos aislados para producir lisis celular en aislados bacterianos diferentes a su cepa hospedera original (rango hospedero) fue ensayado mediante infección cruzada en los 23 aislados pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (**Tabla 12**).

Los resultados de estos análisis indicaron que los bacteriófagos P19LLU y P29LCSS, identificados originalmente para el aislado bacteriano (OWW-2011008-10) de la especie *Enterobacter aerogenes*, producen además placas líticas en los aislados (OWW-2030193-7 y OWW-2030193-8) pertenecientes posiblemente a especies del género *Erwinia*. El hecho que los bacteriófagos P19LLU y P29LCSS muestren similar espectro de virulencia sugiere que estamos en presencia de un único bacteriófago.

Tabla 12. Rango Hospedero de los bacteriófagos aislados.

Cepa Hospedera		Rango Hospedero			
Código	Genero o especie	P19LLU	P29LCSS	P311DCI	P411DCSS
OWW-2011008-1	<i>Staphylococcus sp</i>	NE	NE	NE	NE
OWW-2011008-2	<i>Bacillus cereus</i>	NE	NE	NE	NE
OWW-2011008-3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
OWW-2011008-4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
OWW-2011008-5	<i>Escherichia vulneris</i>	-	-	-	-
OWW-2011008-6	<i>Erwinia psidii</i>	-	-	-	-
OWW-2011008-7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
OWW-2011008-8	<i>Erwinia psidii</i>	-	-	-	-
OWW-2011008-9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-

Cepa Hospedera		Rango Hospedero			
Código	Genero o especie	P19LLU	P29LCSS	P311DCI	P411DCSS
OWW-2011008-10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CHO	CHO	+	+
OWW-2011008-11	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-
OWW-2011008-12	<i>Erwinia psidii</i>	-	-	CHO	CHO
OWW-2011008-13	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-1	<i>Erwinia psidii</i>	-	-	+	+
OWW-2030193-2	<i>Erwinia sp</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-3	<i>Bacillus cereus</i>	NE	NE	NE	NE
OWW-2030193-4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-5	<i>Staphylococcus sp</i>	NE	NE	NE	NE
OWW-2030193-6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-7	<i>Erwinia sp</i>	+	+	-	-
OWW-2030193-8	<i>Erwinia sp</i>	+	+	-	-
OWW-2030193-9	<i>Erwinia psidii</i>	-	-	-	+
OWW-2030193-10	<i>Providencia sp</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-11	<i>Providencia sp</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-12	<i>Providencia sp</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-13	<i>Providencia sp</i>	-	-	+	+
OWW-2030193-14	<i>Enterobacter sp</i>	-	-	-	-
OWW-2030193-15	<i>Desulfovibrio sp</i>	NE	NE	NE	NE

CHO: Cepa hospedera original, **NE:** No evaluado **(+):** Lisis, **(-):** No lisis.

Por su parte, los bacteriófagos P311DCI y P411DCSS, identificados originalmente para el aislado bacteriano (OWW-2011008-12) de la especie *Erwinia psidii*, producen placas líticas en otro aislado de la misma especie (OWW-2030193-1), pero además en otros aislados pertenecientes a la especie *Enterobacter aerogenes* (OWW-2011008-10) y a especies del género *Providencia* (OWW-2030193-13). Resulta interesante que el bacteriófago P411DCSS produjo placas

líticas solo en un aislado (OWW-2030193-9) de la especie *Erwinia psidii*, sugiriendo que P311DCI y P411DCSS son bacteriófagos diferentes.

Comparando con P19LLU y P29LCSS, los bacteriófagos P311DCI y P411DCSS muestran un espectro de virulencia más amplio, lisando al menos dos especies (*Enterobacter aerogenes* y *Providencia* sp) diferentes a su especie hospedera original (*Erwinia psidii*).

4. DISCUSION GENERAL

El presente estudio se ha centrado en la identificación de los géneros bacterianos que habitan en un pozo de petróleo (campo Cira-Infantas) del oriente Colombiano y los bacteriófagos relacionados con las especies bacterianas predominantes.

Los géneros bacterianos detectados con mayor frecuencia fueron miembros de la familia Enterobacteriaceae, específicamente *Enterobacter*, *Erwinia* y *Providencia*; mientras que los otros géneros bacterianos como *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Proteus* y *Staphylococcus* se encontraron en menor proporción.

Estudios previos (Neria-González *et al.* 2006) han mostrado la predominancia de géneros bacterianos de la familia Enterobacteriaceae en tuberías corroídas de la Industria del petróleo. Ellos encontraron una mayoritaria presencia de los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Halanaerobium* y en menor proporción el género *Desulfovibrio*. Otro estudio (Zhu *et al.* 2003) demostró la predominancia del género bacteriano *Comamonas* en tuberías corroídas de gas; aunque bacterias metanogénicas de los órdenes *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales*, también habitan dicho ambiente. Otros ambientes de la Industria petrolera más expuestos a la contaminación microbiana (tanques de almacenamiento o implementos para la manipulación del petróleo), muestran una composición bacteriana mucho más variada representada por los géneros: *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Desulfovibrio*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Kocuria*, *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Ochrobactrum*, *Panthoea*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* (Gaylarde *et al.* 1999, Rauch *et al.* 2006).

El presente estudio confirma la presencia de los géneros bacterianos *Enterobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio* y *Staphylococcus* en ambientes relacionados con la Industria del petróleo y reporta por primera vez la presencia de otros como *Erwinia*, *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia*; sugiriendo que estos ambientes pueden ser más diversos de lo pensado previamente.

La composición microbiana debe estar determinada en última instancia por el nivel de exposición de estos ambientes a los microorganismos, la adaptabilidad de estos al ambiente de los pozos y por la estrategia de muestreo usada. En nuestro caso particular, la composición microbiana del pozo petrolero (campo Cira-Infantas) pudo estar determinada, por el hecho de que se llevan a cabo inyecciones de agua con salmueras. Futuros estudios que utilicen secuencias específicas de ADN ribosomal para explorar la diversidad de estos ambientes, deben aportar nueva información sobre la composición microbiana en los pozos de petróleo en Colombia.

Aunque los géneros bacterianos identificados en el pozo del campo Cira-Infantas no necesariamente están asociados a procesos de corrosión, su presencia en este ambiente, y su respuesta a las pruebas de producción de ácidos orgánicos (ver **Tabla 3**), soportan la hipótesis de que géneros productores de ácidos orgánicos, en especial de la familia Enterobacteriaceae, tienen un papel significativo en los procesos de corrosión microbiana (Zhu *et al.* 2003).

Se ha reconocido que estas especies bacterianas producen exopolisacáridos que forman parte de las biopelículas microbianas y promueven el proceso de corrosión, así como la resistencia contra antimicrobianos. Adicionalmente, estas especies son capaces de usar los hidrocarburos como fuente de carbono, producir metabolitos y crear condiciones anóxicas, las cuales son requeridas por las bacterias sulfato reductoras para su adecuado crecimiento (Gaylarde *et al.* 1999, Valencia-Cantero 2003, Neria-González *et al.* 2006).

En el estudio se identificó un miembro de la familia *Desulfovibrionaceae* perteneciente al género *Desulfovibrio* (OWW-2030193-15), el cual es comúnmente encontrado en las biopelículas asociadas a los procesos de corrosión (Miranda *et al.* 2006). Los miembros de este género juegan un rol importante en la corrosión microbiana de las superficies metálicas debido a la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) a partir de sulfatos. El H_2S modifica el pH del ambiente y permite la formación del compuesto altamente corrosivo Sulfuro de Hierro (FeS), implicado en los taponamientos y pérdidas localizadas del metal de las tuberías y tanques de almacenamiento de la Industria del petróleo (Neria-González *et al.* 2006).

En el presente estudio se usó el método de doble capa de agar para la identificación de bacteriófagos líticos (Maniatis *et al.* 1989), técnica que ha sido ampliamente usada para detectar y aislar bacteriófagos. Con base en los resultados obtenidos, se puede plantear que ésta es una técnica eficaz, rápida y sencilla para identificar bacteriófagos en muestras de agua; y solo requiere de la preparación de una capa uniforme de agar suave y de células en fase exponencial de crecimiento, para la detección de los bacteriófagos. No obstante, en el estudio se aislaron 4 bacteriófagos líticos: P311DCI, P411DCSS, P19LLU y P29LCSS. Los dos primeros (P311DCI y P411DCSS) tienen como cepa hospedera un aislado de la especie *Erwinia psidii*. La cepa hospedera de los dos últimos (P19LLU y P29LCSS), es un aislado de la especie *Enterobacter aerogenes*. Bacteriófagos para especies del género *Enterobacter* han sido previamente identificados en muestras de alimentos, plantas de tratamientos de agua y efluentes industriales (Loesner *et al.* 1993, Hughes *et al.* 1998, Tait *et al.* 2002, Verthé y Verstraete 2006, Kim *et al.* 2007). Sin embargo, de acuerdo a nuestro conocimiento, este sería el primer reporte de bacteriófagos para el género *Erwinia*.

La utilidad de los bacteriófagos aquí identificados como biocidas de bacterias asociadas a la corrosión debe ser aún demostrada. Sin embargo, los resultados sobre el rango hospedero de los bacteriófagos identificados son alentadores.

Como se infiere de la **Tabla 12**, los bacteriófagos identificados mostraron un amplio espectro de virulencia (especialmente los de la especie *Erwinia psidii*) produciendo lisis celular en géneros relacionados pero taxonómicamente diversos (*Enterobacter*, *Erwinia* y *Providencia*), en concordancia con lo previamente observado para el género *Enterobacter* (Loessner *et al.* 1993). El tema de la especificidad de los bacteriófagos fue recientemente revisado por Skurnik y Strauch (2006).

Recientes estudios (Tait *et al.* 2002, Verthé y Verstraete 2006), abren nuevas perspectivas en el uso de los bacteriófagos como biocidas para la destrucción de biopelículas asociadas con los procesos de corrosión. Estas tecnologías de alta especificidad para los microorganismos asociados a estas biopelículas y que no afectan el ambiente, se vislumbran como una interesante alternativa para el control de la corrosión microbiana en la Industria petrolera.

5. CONCLUSIONES

Los géneros bacterianos cultivables presentes mayoritariamente en el pozo petrolero Cira-Infantas fueron *Enterobacter*, *Erwinia* y *Providencia*. En menor proporción se identificaron otros géneros como: *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Proteus* y *Staphylococcus*.

Los bacteriófagos para los géneros representados mayoritariamente en el pozo Cira-Infantas pueden tener diferente origen y estos muestran un amplio espectro de virulencia que sobrepasan el nivel de especie; siendo efectivos para lisar géneros bacterianos estrechamente relacionados como: *Enterobacter*, *Erwinia* y *Providencia*.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar los estudios de diversidad genética de bacterias que habitan pozos petroleros en el oriente Colombiano mediante técnicas moleculares de ADN ribosomales

Se recomienda ampliar el estudio de diversidad microbiana cultivable, en especial dentro del género *Desulfovibrio* y de sus bacteriófagos relacionados

Con fines de identificación de bacteriófagos, se debe desarrollar un estudio de caracterización morfológica de los bacteriófagos aislados mediante técnicas de microscopía electrónica

Se debe evaluar el potencial de los bacteriófagos aislados en el presente estudio para la destrucción de biopelículas asociadas a eventos de corrosión

BIBLIOGRAFIA

- Ackermann, H.W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Archives of Virology 146, 843-857.
- Ackermann, H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Research in Microbiology 154, 245-251.
- American Public Health Association (APHA). 1998. In: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater , 20th Ed, APHA Inc. Washington DC, USA.
- Beech, I.B., Gaylarde, C.C. 1999. Recent Advances In the Study of Biocorrosion- An Overview. Revista de Microbiología 30, 177-190.
- Beech, I.B and Sunner, J.A. 2007. Sulphate-reducing bacteria and their role in corrosion of ferrous materials. In: Sulphate-reducing Bacteria. Barton, L.L and Hamilton, W.A (Ed), Cambridge University Press, New York, p. 1-523.
- Beech, I.B and Sunner, J.A. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. Current Opinion in Biotechnology 15, 181–186.
- Benson. 2001. Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology. Eighth Edition, The McGraw-Hill Companies.
- Betancourth, M., Botero, J.E., Rivera, S.P. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colombia Médica 35, 34-39.

- Binetti, A.G., Capra, M.L., Álvarez, M.A., Reinheimer, J.A. 2008. PCR method for detection and identification of *Lactobacillus casei/paracasei* bacteriophages in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 124, 147-153.
- Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R and Merrill, C.R. 2002. Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic from a Clinical Isolate of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity* 70, 204-210.
- Brenner, D.J., Farmer, J.J. 2005. Family I. Enterobacteriaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Garrity, G.M (Ed), 2nd edition, Volume 2. The Proteobacteria (Part A, B, C), Springer Edition, Michigan, p. 587-607.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Garrity, G.M (Ed), 2nd edition, Volume 2. The Proteobacteria (Part A, B, C), Springer Edition, Michigan.
- Brown, M.R.W and Gilbert, P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 74, 875-975.
- Campoy, S., Hervás, A., Busquets, N., Erill, I., Teixidó, L., Barbé, J. 2006. Induction of the SOS response by bacteriophage lytic development in *Salmonella enterica*. *Virology* 351, 360-367.
- Celia, L.K., Nelson, D., Kerr, D.E. 2008. Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Veterinary Microbiology* 130, 107-117.
- Clark, J.R and March, J.B. 2006. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology* 24, 212-218.

- Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents 11, 217-221.
- Czechowski, M.H and Stoodley, P. 2002. Biofilms and Biocides. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 29, 325.
- Dice, R.L. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. Ecology 26, 297-302.
- Farrar, W.E., Rebolí, A.C. 2006. The genus *Bacillus*- Medical. Prokaryotes 4, 609-630.
- Froshauer, S., Silvia, A.M., Chidambaram, M., Sharma, B and Weinstock, G.M. 1996. Sensitization of Bacteria to Danofloxacin by Temperate Prophages. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40, 1561-1563.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A. 2007. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. International Dairy Journal 17, 1232-1239.
- Gaylarde, C.C., Bento, F.M., Kelley, J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. Revista de Microbiología 30, 1-10.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.H. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Prokaryotes 4, 5-75.
- Grimont, F., Grimont, P.A.D. 2006. The genus *Enterobacter*. Prokaryotes 6, 197-214.

- Guiamet, P.S and Gómez de Saravia, S.G. 2005. Laboratory studies of biocorrosión control using traditional and environmentally friendly biocides: An overview. *Latin American Applied Research* 35, 295-300.
- Gómez , L.M y Hernández, J. 2009. Aislamiento y caracterización morfológica y bioquímica de bacterias productoras de ácido (BPA) alojadas en aguas de producción de un campo petrolero. Tesis de Grado. Universidad Industrial de Santander, p. 1-58.
- Goldberg, J. 2002. Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. *Trends in Microbiology* 10, 264.
- Hagens, S., Loessner, M.J. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 513-519.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electronica* 4, 1-19.
- Hanlon, G.W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 118-128.
- Hay, A.J. 2007. Identificación de bacterias. En: *La Ciencia del Diagnóstico de Laboratorio*, Crocker, J., Burnett, D (Ed), Capítulo 12, McGraw-Hill Interamericana, México, p.135-157.

- Hendrix, R.W. 2002a. Bacteriophage Lambda and Its Relatives. In: Modern Microbial Genetics. Streips, U.N., Yasbin, R.B (Ed), Second Edition. Wiley and Sons, Inc, New York, p. 127-143.
- Hendrix, R.W. 2002b. Bacteriophages: Evolution of the Majority. Theoretical Population Biology 61, 471-480.
- Hibma, A.M., Jassim, S.A.A., Griffiths, M.W. 1997. Infection and removal of L-forms of *Listeria monocytogenes* with bred bacteriophage. International Journal of Food Microbiology 34, 197-207.
- Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Clark, J and Jones, M.V. 1998. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases- novel tools for study of bacterial biofilms. Journal of Applied Microbiology 85, 583-590.
- Illson, T.F. 2002. Bacterial control by bacteriophages. International publication number WO 02/40642 A1, WIPO-European Patent Office, 18p.
- Jiang, S.C., Paul, J.H. 1998. Significance of Lysogeny in the Marine Environment: Studies with Isolates and a Model of Lysogenic Phage Production. Microbial Ecology 35, 235-243.
- Kado, C.I. 2006. *Erwinia* and related genera. Prokaryotes 6, 443-450.
- Kamimura, K and Araki, M. 1989. Isolation and Characterization of a Bacteriophage Lytic for *Desulfovibrio salexigens*, a Salt-Requiring, Sulfate-Reducing Bacterium. Applied and Environmental Microbiology 55, 645-648.

- Karunasagar, I., Shivu, M.M., Girisha, S.K., Krohne, G., Karunasagar, I. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268, 288-292.
- Kim, K.P., Klumpp, J., Loessner, M.J. 2007. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 115, 195-203.
- Kimura, K and Itoh, Y. 2003. Characterization of Poly-gamma-Glutamate Hydrolase Encoded by a Bacteriophage Genome: Possible Role in Phage Infection of *Bacillus subtilis* Encapsulated with Poly-gamma- Glutamate. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2491-2497.
- Lacroix-Gueu, P., Briandet, R., Lévêque-Fort, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fontaine-Aupart, M.P. 2005. In situ measurements of viral particles diffusion inside mucoid biofilms. *Comptes Rendus Biologies* 328, 1065-1072.
- Lammertyn, E., Voorde, J.V., Meyen, E., Maes, L., Mast, J., Anné, J. 2008. Evidence for the Presence of *Legionella* Bacteriophages in Environmental Water Samples. *Microbiol Ecology* 56, 191-197.
- Little, B.J., Lee, J.S. 2007. Microbiologically Influenced Corrosion. Wiley and Sons, Inc, New Jersey, p. 1-261.
- Little, B and Ray, R. 2002. A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corrosion* 58, 424- 428.
- Loessner, M.J., Neugirg, E., Zink, R and Scherer, S. 1993. Isolation, classification and molecular characterization of bacteriophages for *Enterobacter* species. *Journal of General Microbiology* 139, 2627-2633.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2009. Biología de los microorganismos (BROCK), Decima edición, Prentice Hall Pearson. p. 1011.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Maniloff, J and Ackermann, H.W. 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order *Caudovirales*. Archives of Virology 143, 2051-2063.
- Manos, J., Belas, R. 2006. The genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. Prokaryotes 6, 245-269.
- Mah, T.F.C and O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology 9, 34-39.
- Mann, N.H. 2008. The potential of phages to prevent MRSA infections. Research in Microbiology 159, 400-405.
- Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A., García, P. 2008. Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology 122, 253-258.
- McBain, A.J., Rickard, A.H., Gilbert, P. 2002. Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 29, 326-330.
- McLaughlin, M.R., Balaa, M.F., Sims, J and King, R. 2006. Isolation of *Salmonella* Bacteriophages from Swine Effluent Lagoons. Journal of Environmental Quality 35, 522-528.

- McNeil, D.L., Romero, S., Kandula, J., Stark, C., Stewart, A., Larsen, S. 2001. Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* PV *juglandis*). Horticultural Pathology 54, 220-224.
- Miranda, E., Bethencourt, M., Botana, F.J., Cano, M.J., Sánchez-Amaya, J.M., Corzo, A., García de Iomas, J., Fardeau, M.L., Ollivier, B. 2006. Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexican oil field separator. Corrosion Science 48, 2417-2431.
- Muñoz-Berbel, X., García-Aljaro, C., Muñoz, F.J. 2008. Impedimetric approach for monitoring the formation of biofilms on metallic surfaces and the subsequent application to the detection of bacteriophages. Electrochimica Acta 53, 5739-5744.
- National Association of Corrosion Engineers (NACE).1994. Standard test method for monitoring of bacterial growth in oilfield systems; Standard TMO194 Item No. 21224. Houston, Texas, USA, 20p.
- Nakai, T., Park, S.C. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Research in Microbiology 153, 13-18.
- Nazar, J.C. 2007. Biofilms bacterianos. Revista de Otorrinolaringología 67, 61-72.
- Neria-González, I., Wang, E.T., Ramírez, F., Romero, J.M., Hernández-Rodríguez, C. 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. Anaerobe 12, 122-133.

- Parra, D.C y Hernández, J. 2008. Aislamiento y caracterización bioquímica y morfológica de bacterias reductoras de sulfato (BRS) provenientes de aguas de producción de un campo petrolero. Tesis de Grado. Universidad Industrial de Santander, p. 1-114.
- Quinones, M., Kimsey, H.H and Waldor, M.K. 2005. LexA Cleavage Is Required for CTX Prophage Induction. *Molecular Cell* 17, 291-300.
- Ramírez, B., Centrón, D., Ramírez, M.S., Lopardo, H. 2006. Isolation and characterization of lytic bacteriophages of *Enterococcus* spp. *International Congress Series* 1289, 162-164.
- Rauch, M.E., Graef, H.W., Rozenzhak, S.M., Jones, S.E., Bleckmann, C.A., Kruger, R.L., Naik, R.R., Stone, M.O. 2006. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *J Ind Microbiol Biotechnology* 33, 29-36.
- Robeson, J., Retamales, J., Borie, C. 2008. Genomic Variants of Bacteriophages Against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis With Potential Application in the Poultry Industry. *Brazilian Journal of Poultry Science* 10, 173-178.
- Rodin, V.B., Jigletsova, S.K., Kobelev, V.S., Akimova, N.A., Aleksandrova, N.V., Rasulova, G.E and Kholodenko, V.P. 2000. Development of Biological Methods for Controlling the Aerobic Microorganism-Induced Corrosion of Carbon Steel. *Applied Biochemistry and Microbiology* 36, 589-593.
- Russell, A.D. 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 794-803.

- Sillankorva, S., Pospiech, H., Azeredo, J., Neubauer, P. 2007. Biofilm control with T7 phages. *Journal of Biotechnology* 1315, 5250-5253.
- Skurnik, M., Strauch, E. 2006. Phage therapy: Facts and Fiction. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 5-14.
- Splepecky, R.A., Hemphill, H.E. 2006. The genus *Bacillus*- Nonmedical. *Prokaryotes* 4, 530-562.
- Strauch, E., Hammerl, J.A and Hertwig, S. 2007. Bacteriophages: New Tools for Safer Food? *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 2, 138-143.
- Stewart, P.S. 2001. Multicellular resistance: biofilms. *Trends in Microbiology* 9, 204.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet* 358, 135-138.
- Sutherland, I.W. 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 38, 319-328.
- Sutherland, I.W. 2001. The biofilm matrix- an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9, 222-227.
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., Tait, K. 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 232, 1-6.
- Tait, K., Skillman, L.C., Sutherland, I.W. 2002. The Efficacy of bacteriophage as a method of biofilms eradication. *Biofouling* 18, 305-311.

- Thiel, K. 2004. Old dogma, new tricks- 21st Century phage therapy. *Nature biotechnology* 22, 31-36.
- Torrado-Rincón, J.R., Calixto-Gómez, D.M., Sarmiento-Caraballo, A.E., Panqueva Alvarez, J.H. 2008. Evaluación del molibdato y nitrato sobre bacterias sulfato-reductoras asociadas a procesos de corrosión en sistemas industriales. *Revista Argentina de Microbiología* 40, 52-62.
- Verthé, K., Verstraete, W. 2006. Use of flow cytometry for analysis of phage-mediated killing of *Enterobacter aerogenes*. *Research in Microbiology* 157, 613-618.
- Videla, H.A., Herrera, L.K. 2005. Microbiologically Influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology* 8, 169-180.
- Videla, H.A. 2002. Prevention and control of biocorrosion. *International biodeterioration & Biodegradation* 49, 259-270.
- Viscardi, M., Perugini, A.G., Auriemma, C., Capuano, F., Morabito, S., Kim, K.P., Loessner, M.J., Iovane, G. 2008. Isolation and characterization of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). *International Journal of Antimicrobial Agents* 31, 152-157.
- von Rége, H., Sand, W. 1998. Evaluation of biocide efficacy by microcalorimetric determination of microbial activity in biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 33, 227-235.

- Weinbauer, M.G and Suttle, C.A. 1996. Potential Significance of Lysogeny to Bacteriophage Production and Bacterial Mortality in Coastal Waters of the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4374-4380.
- Weinbauer, M.G., Suttle, C.A. 1999. Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquatic Microbial Ecology* 18, 217-225.
- Welch, R.A. 2006. The genus *Escherichia*. *Prokaryotes* 6, 60-71.
- Withey, S., Cartmell, E., Avery, L.M., Stephenson, T. 2005. Bacteriophages-potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment* 339, 1-18.
- Wolfram, J.H., Mizia, R.E., Jex, R., Nelson, L., Garcia, K.M. 1996. The impact of Microbially influenced Corrosion on Spent Nuclear fuel and Storage Life. Idaho National Engineering Laboratory, DOE Idaho Operations Office, INEL-96/0335, USA Department of Energy, USA, 78p.
- Zhu, X.Y., Lubeck, J and Kilbane, J.J. 2003. Characterization of Microbial Communities in Gas Industry Pipelines. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5354-5363.
- Zuo, R. 2007. Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology* 76, 1245-1253.

ANEXOS

Anexo 1. Composición y forma de preparación de los medios de cultivo (Tomado de las guías docentes del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, Escuela de Biología-UIS).

COLUMBIA BASE, AGAR

Cód: CM0331 **Envase:** 500g

Fórmula base multipropósito usada para preparar diferentes medios de cultivo que permiten el crecimiento de microorganismos patógenos fastidiosos o difíciles de cultivar

Formula (por litro)

Peptonas especiales	23g
Almidón	1g
Cloruro de sodio	5g
Agar	10g
pH final: 7.3 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 39g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en cajas Petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: OXOID LTD

MACCONKEY, AGAR

Cód: 105465 **Envase:** 500g

Medio diferencial y selectivo recomendado por la Asociación Americana de Salud Pública para la identificación de microorganismos coliformes. Se usa como criterio de crecimiento presuntivo de *Escherichia coli* y bacterias coliformes en muestras de agua y leche.

Formula (por litro)

Lactosa	10g
Peptona de Caseína	3g
Sales biliares	1.5g
Peptona de Gelatina	17g
Rojo neutro	0.03g
Cloruro de sodio	5g
Violeta Cristal	0.001g
Agar	13.5g
pH final: 7.1 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 50g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en cajas Petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A

NUTRIENTE, CALDO**NUTRIENTE, AGAR**

Cód: 105450 **Envase:** 500g

Medio rico en nutrientes, de uso general para cultivar bacterias poco exigentes en términos nutricionales. Es recomendado para el recuento de microorganismos mesófilos en muestras de agua, heces y otros materiales.

Formula (por litro) del caldo

Peptona	5g
Extracto de carne	3g
pH final: 7.0 ± 0.2	

Formula (por litro) del agar

Peptona	5g
Extracto de carne	3g
Agar	15g
pH final: 7.0 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 23g/L (Agar) y 8g/L (Caldo) en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por ultimo dispensar en tubos o cajas Petri según sea el caso. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A

DEXTROSA ROJO FENOL, CALDO**DEXTROSA ROJO FENOL, TOP AGAR****DEXTROSA ROJO FENOL, AGAR**

Medio de cultivo ampliamente usado para la enumeración de bacterias heterotróficas en aguas de campos Petroleros

Formula (por litro) del caldo

Extracto de carne	1g
Peptona	10g
Rojo Fenol	0.018g
Glucosa	5g
Cloruro de sodio	5g
pH final: 7.3	

Formula (por litro) del top agar

Extracto de carne	1g
Peptona	10g
Rojo Fenol	0.018g
Glucosa	5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	7g
pH final: 7.3	

Formula (por litro) del agar

Extracto de carne	1g
Peptona	10g
Rojo Fenol	0.018g
Glucosa	5g
Cloruro de sodio	5g

Agar 15g
pH final: 7.3

Forma de preparación

Suspender la cantidad indicada en el frasco de cada reactivo por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en tubos o cajas Petri según sea el caso. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

LACTATO SULFATO REDUCCIÓN, CALDO**LACTATO SULFATO REDUCCIÓN, TOP AGAR****LACTATO SULFATO REDUCCIÓN, AGAR**

Medio de cultivo ampliamente usado para la enumeración de bacterias sulfato reductoras por la APHA

Formula (por litro) del caldo

Lactato de sodio	4ml
Fosfato ácido de dipotasio	0.56g
Extracto de Levadura	1g
Peptona	1g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	3.75g
Sulfato de sodio	1g
Cloruro de sodio	5g
Cloruro de Calcio Dihidratado	0.15g
Sulfato de Hierro Amoniacal	0.392g
pH final:	7.5

Formula (por litro) del top agar

Lactato de sodio	4ml
Fosfato ácido de dipotasio	0.56g
Extracto de Levadura	1g
Peptona	1g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	3.75g
Sulfato de sodio	1g
Cloruro de sodio	5g
Cloruro de Calcio Dihidratado	0.15g
Sulfato de Hierro Amoniacal	0.392g

Agar	7g
------	----

pH final: 7.5

Formula (por litro) del agar

Lactato de sodio	4ml
------------------	-----

Fosfato ácido de dipotasio	0.56g
----------------------------	-------

Extracto de Levadura	1g
----------------------	----

Peptona	1g
---------	----

Sulfato de Magnesio Heptahidratado	3.75g
------------------------------------	-------

Sulfato de sodio	1g
------------------	----

Cloruro de sodio	5g
------------------	----

Cloruro de Calcio Dihidratado	0.15g
-------------------------------	-------

Sulfato de Hierro Amoniacal	0.392g
-----------------------------	--------

Agar	15g
------	-----

pH final: 7.5

Forma de preparación

Suspender la cantidad indicada en el frasco de cada reactivo por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en tubos o cajas Petri según sea el caso. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

CITRATO SIMMONS, AGAR

Cód: 102501 **Envase:** 500g

Medio de cultivo para la diferenciación de diferentes géneros de Enterobacterias basándose en la utilización o no de Citrato como única fuente de carbono

Formula (por litro)

Sulfato Magnesio	0.2g
Amonio di-Hidrógeno Fosfato	1g
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	1g
Sodio Citrato tri-basico	2g
Cloruro de sodio	5g
Azul bromotimol	0.08g
Agar-Agar	13g
pH final: 6.6 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 22.5g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en cajas Petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A

DNAsa, AGAR**Cód:** 110449 **Envase:** 500g

Medio usado para determinar actividad desoxirribonucleasa producida por microorganismos, principalmente del género *Staphylococcus*

Formula (por litro)

Triptona	20g
ADN	2g
Cloruro de sodio	5g
Agar	15g
pH final: 7.3 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 42g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en cajas Petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A

LACTOSA, CALDO

Cód: CM0137 **Envase:** 500g

Medio recomendado por la Asociación Americana de Salud Pública para la identificación presuntiva de coliformes, especialmente *Escherichia coli*, en muestras de agua y alimentos.

Formula (por litro)

Lab-Lemco powder	3g
Peptona	5g
Lactosa	5g
pH final: 6.9 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 13g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Dispensar en tubos de ensayo que contienen en su interior tubos Durham y esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: OXOID LTD

LEVINE EOSINA AZUL DE METILENO, AGAR

Cód: 101342 **Envase:** 100g

Medio diferencial y selectivo recomendado por la Asociación Americana de Salud Pública para el aislamiento y diferenciación de Enterobacterias. Se usa como criterio de crecimiento presuntivo de *Escherichia coli* y *Enterobacter* durante ensayos de control microbiológico de muestras de agua, alimentos y medicamentos

Formula (por litro)

Peptona	10g
Lactosa	10g
di-Potasio Hidrogeno Fosfato	2g
Eosina Y	0.4g
Azul de Metileno	0.065g
Agar	13.5g
pH final: 6.6 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 36g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en cajas Petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A

MANITOL SALADO, AGAR

Cód: CM0085 **Envase:** 500g

Medio selectivo recomendado por la Asociación Americana de Salud Pública para el aislamiento presuntivo de bacterias patogénicas del género *Staphylococcus*. El medio inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias conocidas, con la excepción de algunas especies halófilas. Es un medio recomendado para el análisis bacteriológico de muestras de agua y alimentos

Formula (por litro)

Lab-Lemco powder	1g
Peptona	10g
Manitol	10g
Cloruro de sodio	75g
Rojo de Fenol	0.025g
Agar	15g
pH final: 6.6 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 111g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en cajas Petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: OXOID LTD

ROJO DE METILO-VOGES PROSKAUER (MR-VP), CALDO

Cód: CM0043 **Envase:** 500g

Medio recomendado para el desarrollo de las pruebas Rojo de Metilo y Voges-Proskauer, que permiten la diferenciación de los grupos de Enterobacterias coliformes y aerogenas.

Formula (por litro)

Extracto de carne	7g
D-Glucosa	5g
Buffer fosfato	5g
pH final: 6.9 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 17g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Dispensar en tubos de ensayo y esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: OXOID LTD

TRIPTONA SOJA SANGRE, AGAR

Cód: CM0131

Envase: 500g

Medio general sin inhibidores ni indicadores, recomendado por la Asociación Americana de Salud Pública y por la Farmacopea Europea y Americana, para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos

Formula (por litro)

Peptonas especiales	15g
Almidón	5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	15g
pH final: 7.3 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 40g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y añadir sangre disfribinada estéril al 7% en el medio; luego servir en cajas Petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

UREA BASE, CALDO

Cód: CM0071 **Envase:** 500g

Medio de cultivo diferencial para la detección de microorganismos, principalmente Enterobacterias que metabolizan urea.

Formula (por litro)

Peptona	1g
Glucosa	1g
Potasio di-hidrogeno fosfato	0.8g
di-Sodio hidrogeno fosfato	1g
Cloruro de sodio	5g
Rojo de fenol	0.004g
pH final: 6.8 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 0.9g en 95ml de agua destilada. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 55°C y añadir asépticamente 5ml de solución estéril 40% Urea (OXOID código: SR0020). Mezclar bien y distribuir a razón de 5ml por tubos.

Casa comercial: OXOID LTD

SIM, AGAR**Cód:** 1.05470.0500 **Envase:** 500g

Medio de cultivo usado para detectar la formación de sulfuro de hidrógeno, producción de indol y motilidad para la identificación de Enterobacterias

Formula (por litro)

Peptona de caseína	20g
Peptona de carne	6.6g
Citrato de amonio hierro	0.2g
Tiosulfato sodio	0.2g
Agar	3g
pH final: 7.3 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 30g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en tubos. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A

DEV GELATINA, AGAR

Medio de cultivo utilizado para determinar el conteo microbiano total y detectar microorganismos que licuan la gelatina

Formula (por litro)

Peptona de carne	10g
Extracto de carne	10g
Cloruro de sodio	5g
Gelatina	10g
Agar-agar	15g
pH final: 7.3 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender 50g/L en agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por último dispensar en placas petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

GLICEROL, CALDO

Medio usado para determinar si los microorganismos pueden usar glicerol como única fuente de carbono

Formula (por litro)

Lab-Lemco poder	3g
Peptona	5g
Glicerol	5ml
Rojo de Fenol	0.018g
pH final: 6.9 ± 0.2	

Forma de preparación

Disolver la cantidad indicada en el frasco por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Dispensar en tubos de ensayo que contienen en su interior tubos Durham y esterilizar a 1 atmosfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

MALTOSA, CALDO

Medio basado en la utilización o no de maltosa como única fuente de carbono

Formula (por litro)

Lab-Lemco poder	3g
Peptona	5g
Maltosa	5g
Rojo de Fenol	0.018g
pH final: 6.9 ± 0.2	

Forma de preparación

Disolver la cantidad indicada en el frasco por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Dispensar en tubos de ensayo que contienen en su interior tubos Durham y esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

ONPG, CALDO

Medio usado para demostrar la presencia en el microorganismo de la enzima galactosidasa, utilizando el orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG)

Formula (por litro)

Lab-Lemco poder	3g
Peptona	5g
Lactosa	5g
pH final: 6.9 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender la cantidad indicada en el frasco por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Dispensar en tubos de ensayo y esterilizar a 1 atmósfera de presión ($\sim 121^{\circ}\text{C}$) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

SACAROSA, CALDO

Medio usado para determinar si los microorganismos pueden fermentar sacarosa como única fuente de carbono

Formula (por litro)

Lab-Lemco poder	3g
Peptona	5g
Sacarosa	5g
Rojo de Fenol	0.018g
pH final: 6.9 ± 0.2	

Forma de preparación

Disolver la cantidad indicada en el frasco por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Dispensar en tubos de ensayo que contienen en su interior tubos Durham y esterilizar a 1 atmosfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

KCN, CALDO

Medio usado en la diferenciación de Enterobacterias, sobre la base de su capacidad para crecer en presencia de Cianuro de Potasio

Formula (por litro)

Peptona	5g
Extracto de carne	3g
pH final: 7.0 ± 0.2	

Forma de preparación

Suspender la cantidad indicada en el frasco por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Dispensar en tubos de ensayo a razón de 10 ml/tubos y esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Añadir a cada tubo 0.15 ml de solución KCN estéril al 0.5 %. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A

ALMIDON, AGAR

Medio usado para detectar microorganismos que excretan amilasas, las cuales hidrolizan polímeros hasta oligo y monosacáridos que pueden usarse como sustratos para el crecimiento

Formula (por litro)

Peptona de carne	10g
Extracto de carne	10g
Cloruro de sodio	5g
Almidón	10g
Agar- agar	15g
pH final: 7.3 ± 0.2	

Forma de preparación

Disolver la cantidad indicada en cada frasco por litro de agua destilada; agitar y calentar hasta lograr total disolución. Esterilizar a 1 atmósfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50°C y por ultimo dispensar en placas petri. Conservar entre 4 y 8°C hasta su uso.

Casa comercial: MERCK S.A, OXOID LTD

Anexo 2. Metodologías de pruebas tintoriales, fisiológicas y bioquímicas

(Tomado de las guías docentes del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, Escuela de Biología-UIS).

TINCIÓN DE GRAM

Fundamento

Coloración compuesta y diferencial. Dependiendo del colorante que toma la pared, las bacterias se diferencian y agrupan en dos grandes categorías denominadas: Gram positivas las que se tiñen con el cristal violeta y Gram negativas las que toman el color de la fuscina básica.

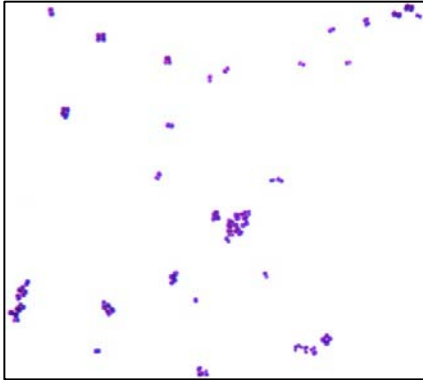
Componentes	Gram positivas	Gram negativas
Cristal violeta (colorante básico)	Bacteria de color violeta	Bacteria de color violeta
Lugol (fijador)	Bacteria de color violeta	Bacteria de color violeta
Alcohol acetona (decolorante)	Bacteria de color violeta. Deshidratación de paredes celulares, retracción de poros, disminución de permeabilidad	Bacteria incolora, extracción de lípidos de la pared, mayor porosidad, liberación del complejo colorante-fijador
Fuscina básica (Colorante de contraste)	Bacteria de color violeta	Bacteria de color rosado

Procedimiento experimental

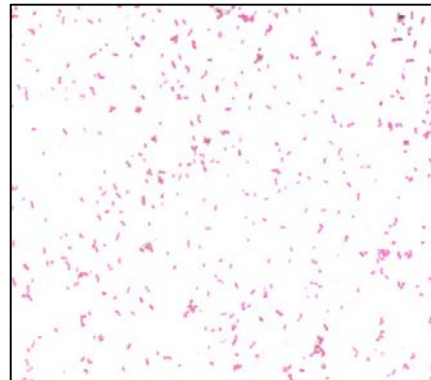
1. Tome la muestra del medio líquido con el asa de argolla estéril
2. Ponga la muestra sobre la lámina portaobjeto

3. Fije el frotis por calor
4. Aplique sobre el frotis seco y el cristal violeta y deje actuar por 1 minuto
5. Lave con agua
6. Aplique lugol, deje actuar por 1 minuto
7. Lave con agua
8. Aplique alcohol acetona, deje actuar por 5 segundos
9. Lave con agua
10. Aplique fuscina básica, deje actuar por 1 minuto
11. Lave con agua
12. Deje secar a temperatura ambiente
13. Observe al microscopio con objetivo de 100X

Interpretación



Cocos Gram positivos



Bacilos Gram negativos

METODO SCHAEFFER-FULTON

Fundamento

Las endosporas son cuerpos ovales de pared gruesa, que se forman dentro del cuerpo de la célula vegetativa. La localización y el tamaño de las esporas, varía de acuerdo a la especie; hay esporas terminales, subterminales y centrales, este aspecto es útil para el posterior diagnóstico de la Bacteria. Las endosporas dan a la bacteria alta resistencia a factores físicos y químicos desfavorables, son características del género *Bacillus* y *Clostridium*.

Procedimiento experimental

Pese 1.25g de verde de malaquita y disuelva en 500ml de agua destilada

1. Tome la muestra del medio líquido con el asa de argolla estéril
2. Ponga la muestra sobre la lámina portaobjeto
3. Fije el frotis por calor
4. Cubra el frotis con un papel absorbente del mismo tamaño de la lámina
5. Sature la lámina con verde de malaquita
6. Ponga sobre un recipiente evaporando la lámina y aplique verde de malaquita por 5 minutos
7. Lave con suficiente agua para enfriar la lámina y remueva el papel
8. Aplique safranina por 20 segundos
9. Lave con agua
10. Deje secar la lámina a temperatura ambiente
11. Observe al microscopio

MOTILIDAD BACTERIANA

Fundamento

Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles.

Procedimiento experimental

1. Ponga la muestra líquida sobre una lámina portaobjeto
2. Coloque un cubre objeto
3. Observe al microscopio con objetivo de 100x

Procedimiento experimental (SIM medio)

1. Esterilice el asa de punta recta a la llama del mechero hasta que se ponga roja
2. Destape el tubo en cuña que contiene medio SIM
3. Flamee la boca del tubo
4. Introduzca el asa fría en el tubo y realice una línea recta por el centro del medio
5. Observe los resultados

Interpretación

Motil: Difusión alrededor de la línea de punción

No motil: No hay difusión, crecimiento sobre la línea

RELACIÓN CON EL OXÍGENO

Fundamento

Las bacterias aerobias al utilizar el oxígeno, lo reducen en cuatro etapas, formando productos tóxicos como son: superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Sin embargo, estas sustancias no son nocivas para ellos, por la capacidad que tienen de producir enzimas para descomponerlas. Las bacterias anaerobias por carecer de ellas, mueren al estar en contacto con el oxígeno.

Procedimiento experimental

1. Tome la muestra del cultivo líquido con el asa recta estéril y fría
2. Siembre por picadura en el medio, introduciendo el asa por la parte central del medio hasta dos terceras partes de profundidad, procurar sacar el asa por el mismo sitio de picadura
3. Incube a 37°C durante 24 horas

Interpretación

Aerobia: crecimiento en la parte superior

Anaerobia: crecimiento en la parte inferior

Anaerobia facultativa: crecimiento en todo el tubo

ACTIVIDAD CATALASA

Fundamento

Determinar la presencia en el microorganismo de la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada en H_2O y O_2 , que se desprende en forma de burbujas en el medio. El H_2O_2 se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla a la llama del mechero hasta que se ponga roja
2. Tome una colonia pura de 18-24 h
3. Coloque la colonia sobre una lamina portaobjetos y agregue una gota de peróxido de hidrógeno al 3%
4. Observe la reacción sobre la lámina

Interpretación

Control positivo	Control negativo
Se produce efervescencia o desprendimiento de burbujas	No se observa ninguna reacción

UTILIZACIÓN DE CITRATO COMO FUENTE DE CARBONO

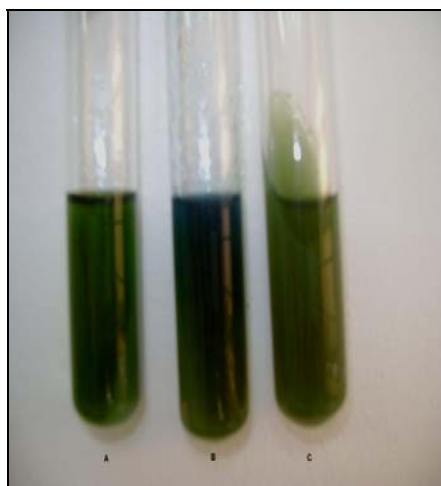
Fundamento

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de Enterobacterias. La utilización de citrato se detecta mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH ($pH \geq 7.6$) se visualiza por un viraje del indicador azul de bromotimol de verde para azul.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración

2. Inocule la superficie del medio sólido con el asa estéril y fría
3. Incube el tubo a 37°C durante 24 a 48 horas
4. Observe los resultados



TEST CITRATO
A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>C. braakii</i> ATCC® 43162™	Crecimiento y cambio de color del medio (azul)
Control Negativo	Resultados esperados
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	Crecimiento inhibido y no cambio de color (verde)

FERMENTACIÓN ACIDO-MIXTA Y 2,3-BUTANEDIOL POR FERMENTACIÓN DE GLUCOSA

Fundamento

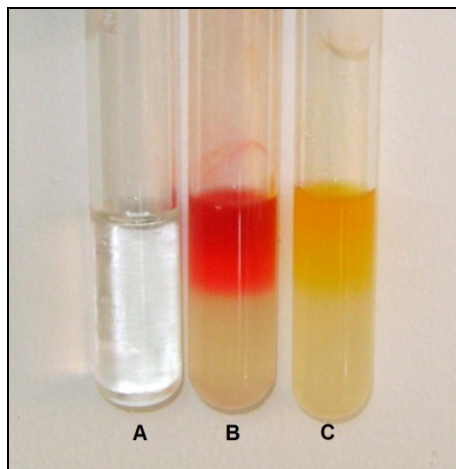
Los microorganismos que utilizan la glucosa pueden producir abundantes compuestos ácidos o pueden metabolizar los compuestos carbonados dando acetoina y butanediol, que tienen un pH más neutro. Las pruebas de rojo de metilo y de Voges Proskauer, detectan la presencia de los productos finales de éstos dos caminos metabólicos.

Procedimiento experimental

Reacción Rojo-Metilo: Detecta el comportamiento diferencial para la producción de ácidos orgánicos a partir de glucosa en ciertos grupos de Enterobacterias.

Rojo de metilo 0.1g en 300 ml de etanol 95%

1. Inocule un tubo con 5ml de medio MRVP
2. Deje creciendo a 37°C durante 48-72 horas
3. Adicione 5 gotas del reactivo rojo de metilo al medio
4. Observe la reacción



TEST ROJO DE METILO
A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	Naranja a rojo
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029™	Naranja a amarillo

Reacción Voges-Proskauer: Detecta el comportamiento diferencial de algunos organismos para la producción de acetoina (acetilmetilcarbinol), 2,3-butanediol o di-acetilo a partir de la fermentación de la glucosa.

Solución A: α -naftol 5% (5g en 100ml alcohol etílico)

Solución B: Hidróxido de Potasio 40% (40g en 100ml Agua destilada)

1. Inocule un tubo con 5ml de medio MRVP
2. Deje creciendo a 37°C durante 24 horas
3. Adicione 3ml de solución A y 3ml de solución B, agregue las soluciones en este orden (Método Barritt)

4. Agite y deje reposando por 15 minutos
5. Observe la reacción



TEST VOGES-PROSKAUER
A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029™	Rojo
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	No color

UTILIZACIÓN DE UREA COMO FUENTE DE CARBONO

Fundamento

Las bacterias que tienen la capacidad de metabolizar la urea producen la enzima ureasa, transformando la urea en carbonato de amonio.

Procedimiento experimental

1. Inocule el caldo base de urea con un cultivo puro
2. Incube a 37°C durante 24 horas
3. Observe los resultados



TEST UREASA

A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	Rosado
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	No color

ACTIVIDAD DNasa

Fundamento

Se basa en la capacidad que poseen ciertas bacterias, para hidrolizar enzimáticamente el ADN produciendo una mezcla de mono y polinucleótidos.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración al mechero
2. Inocule la caja por medio de estría por agotamiento
3. Incube la caja en forma invertida a 37°C durante 24 horas
4. Agregue 1N de HCL de tal forma que cubra toda la superficie
5. Observe las zonas traslucidas alrededor de las colonias



TEST DNasa
Control Positivo (Zonas traslucidas
alrededor de las colonias)



TEST DNasa
Control Negativo (No Zonas
traslucidas alrededor de las colonias)

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	Crecimiento, aparición de zonas traslucidas alrededor de las colonias
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	Crecimiento, no zonas

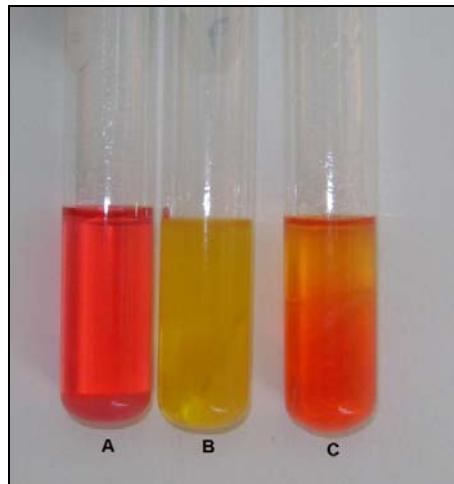
FERMENTACIÓN DE MANITOL

Fundamento

Medio que permite diferenciar aquellas bacterias que fermentan el manitol; indicador generalmente relacionado con la patogenicidad.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración al mechero
2. Tome la muestra del medio líquido con el asa
3. Inocule el tubo que contiene el medio
4. Deje creciendo a 37°C durante 24 horas
5. Observe los resultados



TEST MANITOL

A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	Crecimiento, colonias amarillas
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	No crecimiento

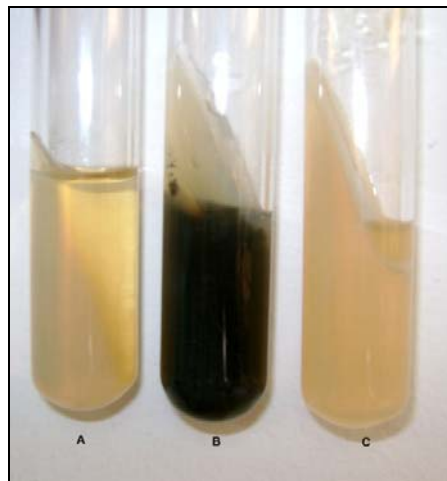
REDUCCIÓN DE SULFATOS A SULFURO DE HIDRÓGENO

Fundamento

Para detectar la producción de H_2S , el microorganismo actúa sobre el tiosulfato de sodio o los aminoácidos azufrados, los cuales proporcionan el S, este reacciona con el H_2 , proveniente de la fermentación de carbohidratos presentes en el medio, para formar H_2S . Por ser este un gas incoloro imposible de detectar directamente dentro del medio, es necesaria la presencia de indicadores; como el sulfato ferroso que al reaccionar con el H_2S forma precipitado negro de sulfuro ferroso, fácilmente observable en el medio.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de punta recta por incineración al mechero
2. Tome la muestra del medio líquido con el asa
3. Inocule el tubo que contiene el medio
4. Deje creciendo a 37°C durante 24 horas
5. Observe los resultados



TEST SULFURO HIDROGENO
A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>S. typhimurium</i> ATCC®13311™	Color negro (Presencia de H ₂ S)
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	No color

PRUEBA DE LA β-GALACTOSIDASA (ONPG)

Fundamento

Si el microorganismo posee esta enzima, el ONPG que es incoloro, es hidrolizado, produciéndose orto-nitrofenol que presenta una coloración amarilla cuando se encuentra en solución neutra o alcalina. Los microorganismos fermentadores de la lactosa poseen dos enzimas: la enzima permeasa (que regula la entrada de la lactosa en la bacteria) y galactosidasa (que desdobla la lactosa en glucosa más galactosa), requeridas para la producción de ácido en la prueba de fermentación de la lactosa.

Procedimiento experimental

1. Coloque en una placa de elisa 142μl de Buffer Z (Na₂HPO₄ 60mM mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, Mg₂SO₄ 1 mM, SDS 0.1%, β-mercaptoetanol 40 mM, pH 7.0)
2. Adicione 15 μL de células e incube durante 20 minutos a temperatura ambiente para que ocurra la lisis celular
3. Adicione 30μL de la solución Stock del sustrato β-galactosidasa (2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido, ONPG)
4. Incube durante 40 minutos a temperatura ambiente para desarrollo del color

5. Detenga la reacción añadiendo 50µL de la solución Na₂CO₃ (1M) y adicione 50 µL de la solución TRIS (2M)



TEST GALACTOSIDASA

Prueba positiva evidenciado por el desarrollo de color amarillo en los pozos de la placa de Elisa

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	Amarillo
Control Negativo	Resultados esperados
<i>S. typhimurium</i> ATCC®13311™	No color

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Fundamento

Los microorganismos, cuando se cultivan *in vitro* sobre medios que contienen sangre, pueden producir alrededor de las colonias zonas de hemólisis variables, según se origine una destrucción parcial o total de los eritrocitos. Las sustancias responsables de estos fenómenos son exotoxinas, liberadas por las bacterias al medio, llamadas hemolisinas.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración al mechero
2. Inocule la caja por medio de estría por agotamiento
3. Incube la caja en forma invertida a 37°C durante 24 horas
4. Observe las zonas traslucidas alrededor de las colonias



TEST ACTIVIDAD HEMOLITICA
Prueba positiva: Hemolisis alfa

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	Zona de Hemolisis
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	No Hemolisis

PRODUCCIÓN DE INDOL

Fundamento

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La

producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos.

Procedimiento experimental

1. Siembre con el asa de punta recta estéril el medio con el microorganismo objeto de estudio
2. Incube a 37°C durante 24-48 horas
3. Agregue 5 gotas del reactivo de Kovacs sobre el tubo incubado y agite
4. Observe los resultados



TEST INDOL
A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	Color rojo en la superficie del tubo
Control Negativo	
<i>C. braakii</i> ATCC® 43162™	Color amarillo en la superficie del tubo

HIDRÓLISIS DE GELATINA

Fundamento

Se usa para detectar la licuefacción o licuación de la gelatina por acción de las gelatinasas bacterianas producidas por algunas Enterobacterias.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración al mechero
2. Inocule la caja con un cultivo de 18-24 h, por medio de estria por agotamiento
3. Incube la caja en forma invertida a 37°C durante 24 horas
4. Agregue una solución saturada de Sulfato de Amonio (6M) de tal forma que cubra toda la superficie
5. Observe las zonas traslucidas alrededor de las colonias que licuan la gelatina



TEST GELATINA
Control Positivo (Zonas traslucidas
alrededor de las colonias)



TEST GELATINA
Control Negativo (No Zonas traslucidas
alrededor de las colonias)

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>B. cereus</i> ATCC® 10876™	Crecimiento, zonas traslucidas alrededor de las colonias
Control Negativo	Resultados esperados
<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029™	Crecimiento, no zonas traslucidas

TOLERANCIA A SALES BILIARES

Fundamento

Medio selectivo debido a la presencia en el mismo de sales biliares que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, pero permite el crecimiento de Enterobacterias. El medio tiene como fuente de carbono lactosa y las enterobacterias capaces de fermentar este azúcar, acidifican el medio produciendo colonias de color rosado a rojo vino.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración al mechero
2. Tome la muestra del medio líquido con el asa
3. Inocule el tubo que contiene el medio
4. Deje creciendo a 37°C durante 24 hora
5. Observe los resultados



TEST TOLERANCIA A SALES BILIARES
A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>E. coli</i> ATCC® 33876™	Crecimiento, Colonias rosadas a rojo vino
Control Negativo	Resultados esperados
<i>B. megaterium</i> ATCC® 9885™	No crecimiento

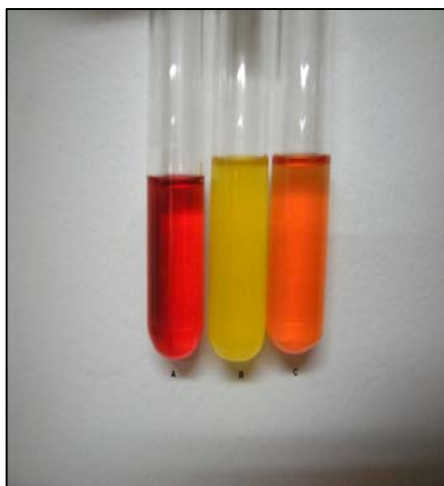
UTILIZACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Fundamento

La mayoría, pero no todas las bacterias pueden crecer en medios simples con una única fuente de carbono (glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa y glicerol). Este método permite ensayar tal habilidad y la capacidad para utilizar sustratos específicos. Las bacterias se inoculan en medios simples conteniendo diferentes sustratos orgánicos como fuentes de carbono y energía.

Procedimiento experimental

1. Inocule tubos de ensayo que contienen en su interior tubos Durham con un cultivo puro de 18-24 h
2. Incube a 37°C durante 24 horas
3. Observe la producción de gas dentro del tubo Durham y de ácidos orgánicos
4. Anote los resultados para cada una de las fuentes de carbono



PRODUCCIÓN DE ÁCIDO

A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo



PRODUCCIÓN DE ÁCIDO Y GAS

A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>C. braakii</i> ATCC® 43162™	Producción de gas
Control Negativo	Resultados esperados
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	No producción de gas

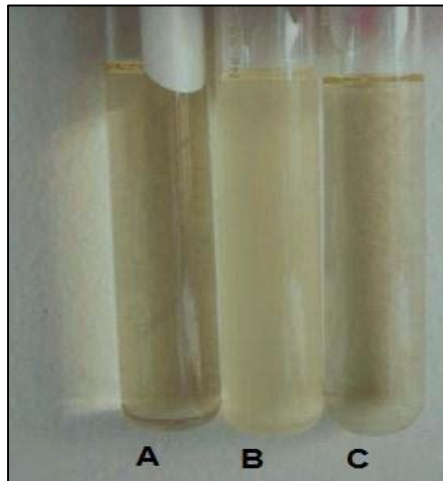
TOLERANCIA AL CIANURO DE POTASIO (KCN)

Fundamento

EL KCN inhibe la cadena de transporte de electrones uniéndose a los citocromos, impidiendo el crecimiento microbiano. Sin embargo, algunas bacterias no son inactivadas y pueden crecer.

Procedimiento experimental

1. Inocule un tubo de 10ml de caldo base para KCN (cada tubo contienen 0.15ml (0.5%) de KCN) con un cultivo de 18-24 h
2. Inocule un tubo de 10 ml de caldo base que no contiene KCN como control
3. Incube a 37°C en una atmosfera aeróbica durante 48 horas
4. Observe los resultados



TEST KCN

A. No inoculado, B. Positivo, C. Negativo

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>E. aerogenes</i> ATCC® 35029™	Crecimiento, turbidez del medio
Control Negativo	Resultados esperados
<i>S. aureus</i> ATCC® 33592™	No crecimiento

HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

Fundamento

Los polisacáridos, como el almidón son demasiado largos para ser transportados al interior de la célula. Los microorganismos excretan amilasas que hidrolizan esos polímeros hasta oligo o monosacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer. La hidrólisis de almidón es analizada en medios conteniendo almidón en placa. Después de incubar se inundan las placas con lugol que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración al mechero
2. Inocule la caja con un cultivo de 18-24 h, por medio de estría por agotamiento
3. Incube la caja en forma invertida a 37°C durante 24 horas
4. Agregue una solución de Lugol
5. Observe las zonas traslucidas alrededor de las colonias



TEST ALMIDON
Zonas traslucidas alrededor de las colonias

Interpretación

Control Positivo	Resultados esperados
<i>B. megaterium</i> ATCC® 9885™	Crecimiento, zonas traslucidas alrededor de las colonias y color púrpura

TEMPERATURAS DE CRECIMIENTO DE 50 y 65°C

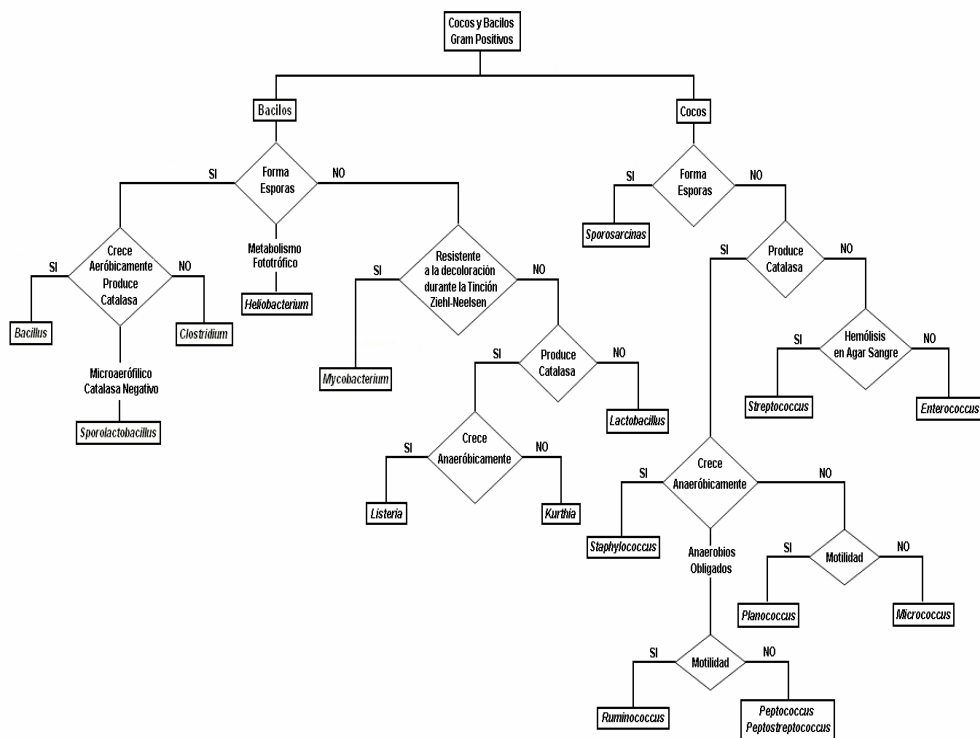
Fundamento

Comparar la susceptibilidad de los organismos a temperaturas elevadas.

Procedimiento experimental

1. Esterilice el asa de argolla por incineración al mechero
2. Inocule el tubo con un cultivo de 18-24 h
3. Incube el tubo a 50 y 65°C durante 24 horas
4. Observe los resultados

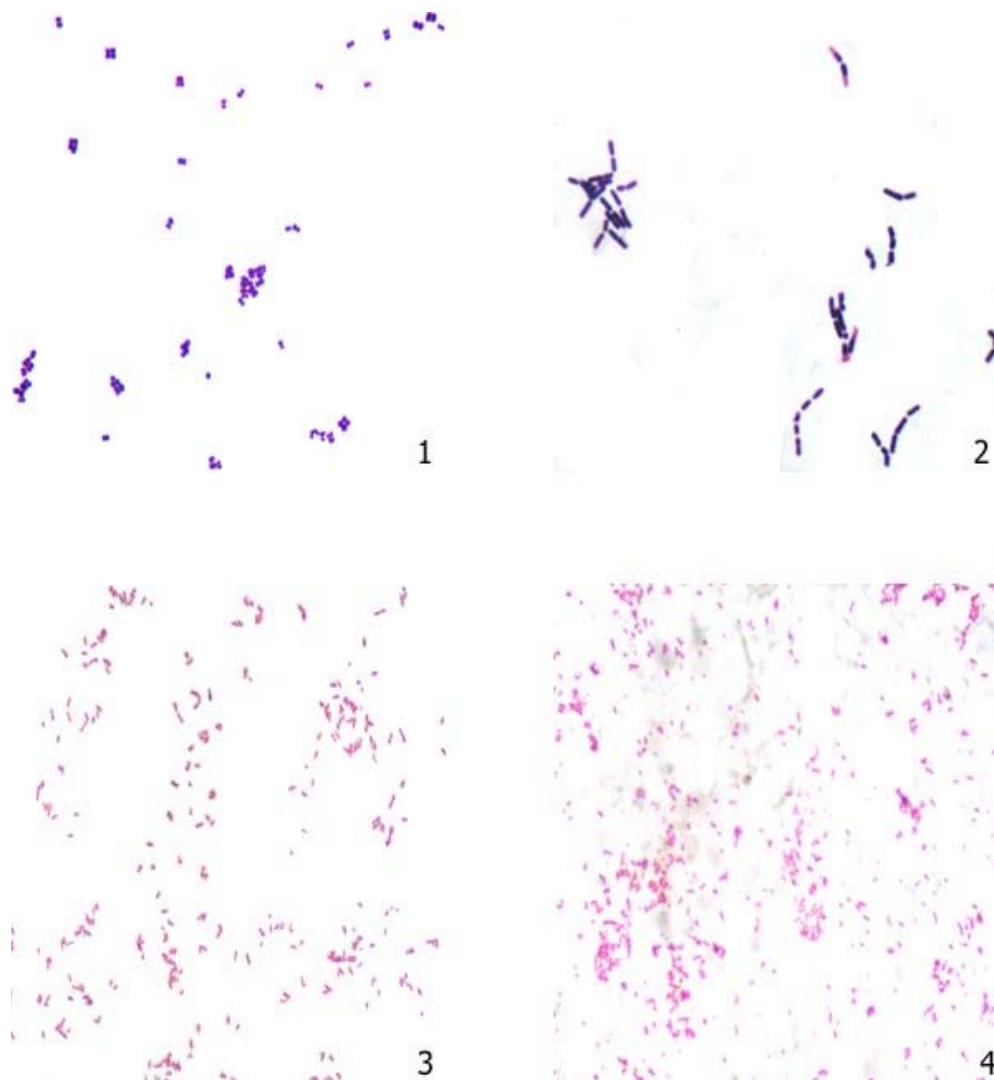
Anexo 3. Clave de identificación para bacterias con respuesta positiva a la tinción de Gram. (Tomado de las guías docentes del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, Escuela de Biología-UIS).



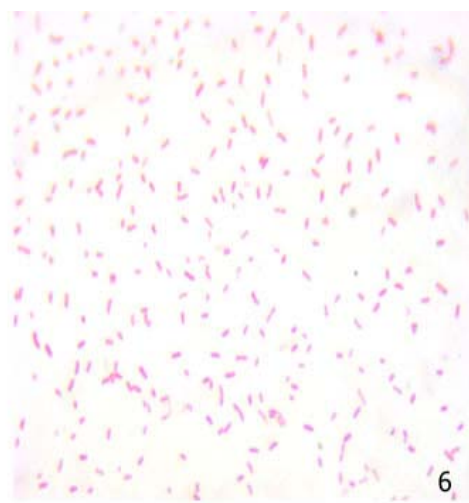
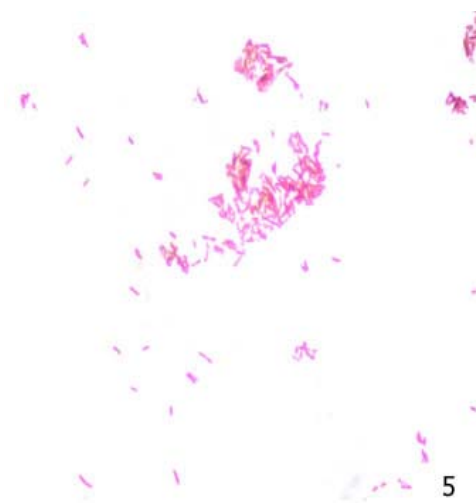
```

graph TD
    A[Bacilos Gram Negativos] --> B{Crece Anaeróbicamente}
    B -- SI --> C{Motilidad}
    B -- NO --> D[Pseudomonas  
Alcaligenes  
Hobobacterium  
Flavobacterium]
    C -- SI --> E{Utiliza Citrato y Lactosa}
    C -- NO --> F[Klebsiella  
Lemniera  
Morfelleria  
Obesumbacterium  
Rahnella  
Shigella  
Tatamella  
Yersinia]
    E -- Citrato - Lactosa - --> G{Prueba RM Indol}
    E -- Citrato + Lactosa - --> H{Prueba RM Indol}
    E -- Citrato - Lactosa + --> I{Prueba RM Indol}
    E -- Citrato + Lactosa + --> J{Prueba RM Indol}
    G -- RM + Indol - --> K{Ureasa H2S}
    G -- RM - Indol - --> L{Difasa Gelatina}
    G -- RM + Indol + --> M{Ureasa H2S}
    G -- RM - Indol + --> N{Difasa Gelatina}
    K -- Ure - H2S - --> O{Prueba VP}
    K -- Ure + H2S + --> P[Proteus]
    O -- SI --> Q[Haemalis]
    O -- NO --> R[Buttiauxella]
    L -- Difasa Gelatina + --> S[Photobacterium]
    L -- Difasa Gelatina - --> T[Enterobacter]
    M -- Ure - H2S - --> U[Edwardsiella]
    M -- Ure + H2S + --> V{Utiliza Manitol}
    V -- SI --> W[Providencia]
    V -- NO --> X[Morganella]
    N -- Difasa Gelatina + --> Y[Serratia]
    N -- Difasa Gelatina - --> Z{Ureasa H2S}
    Z -- Ure - H2S - --> AA[Budvicia]
    Z -- Ure + H2S + --> AB{Utiliza Manitol}
    AB -- SI --> AC{Utiliza Manitol}
    AB -- NO --> AD[Praga]
    AC -- SI --> AE[Pantose]
    AC -- NO --> AF{Utiliza Sacarosa}
    AF -- SI --> AG[Cedexia]
    AF -- NO --> AH[Yokenella]
    I -- RM + Indol - --> AI{Ureasa H2S}
    I -- RM - Indol - --> AJ{Difasa Gelatina}
    I -- RM + Indol + --> AK{Ureasa H2S}
    I -- RM - Indol + --> AL{Difasa Gelatina}
    AI -- Ure - H2S - --> AM[Kluysera]
    AI -- Ure + H2S + --> AN{Enterobacter}
    AJ -- Difasa Gelatina + --> AO{Ureasa H2S}
    AJ -- Difasa Gelatina - --> AP{Enterobacter}
    AK -- Ure - H2S - --> AQ{Ureasa H2S}
    AK -- Ure + H2S + --> AR{Enterobacter}
    AL -- Difasa Gelatina + --> AS{Ureasa H2S}
    AL -- Difasa Gelatina - --> AT{Enterobacter}
    J -- RM + Indol - --> AU{Fermenta Glicerol}
    J -- RM - Indol - --> AV{Fermenta Glicerol}
    J -- RM + Indol + --> AW{Fermenta Glicerol}
    J -- RM - Indol + --> AX{Fermenta Glicerol}
    AU -- SI --> AY[Escherichia]
    AU -- NO --> AZ[Budvicia]
    AV -- SI --> BA[Escherichia]
    AV -- NO --> BB[Escherichia]
    AW -- SI --> BC[Escherichia]
    AW -- NO --> BD[Escherichia]
    AX -- SI --> BE[Escherichia]
    AX -- NO --> BF[Escherichia]
  
```

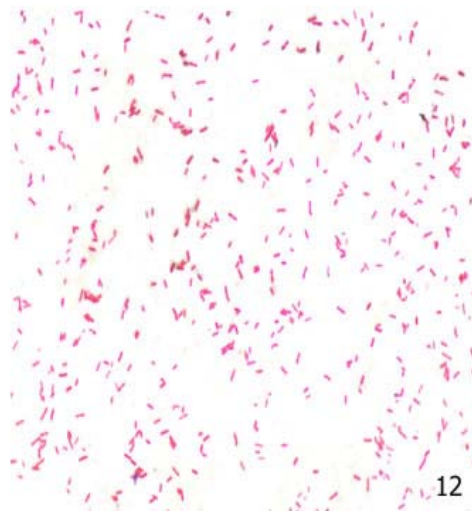
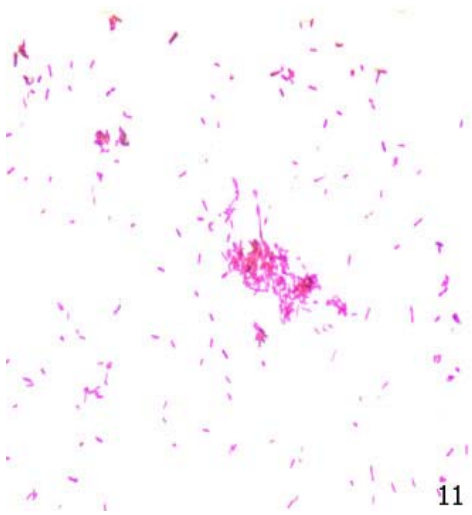
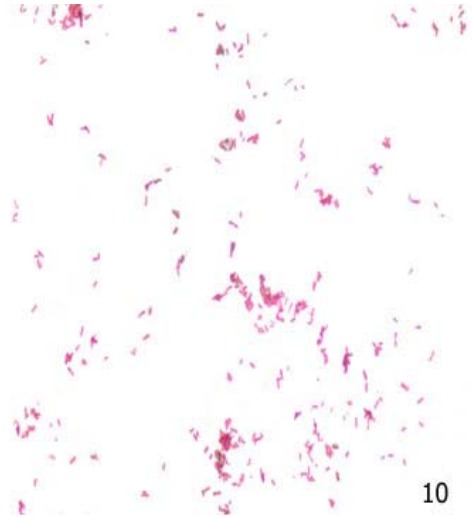
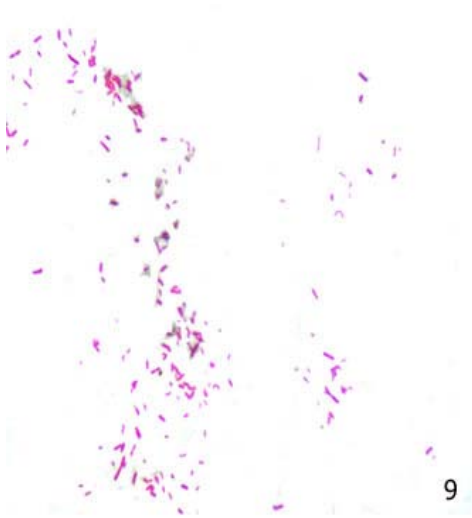
Anexo 5. Morfología celular de todos los aislados bacterianos estudiados.



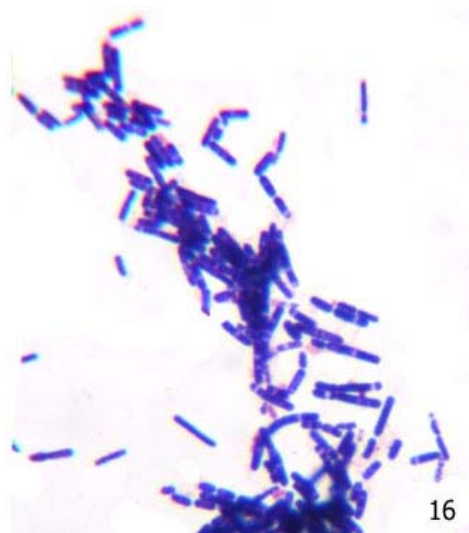
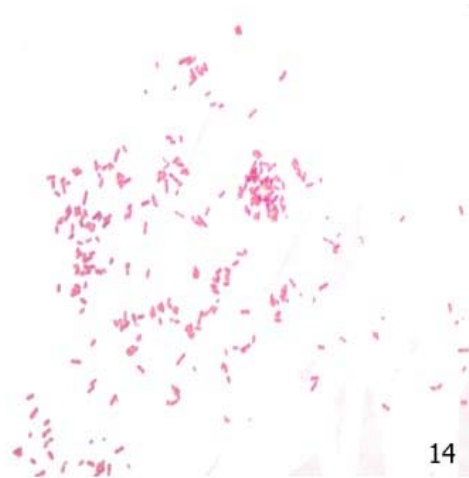
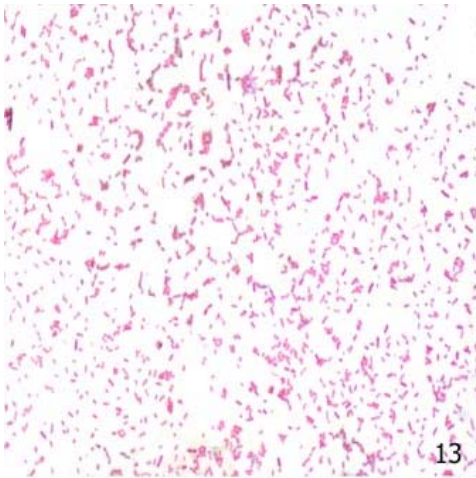
1. OWW-2011008-1, **2.** OWW-2011008-2, **3.** OWW-2011008-3, **4.** OWW-2011008-4



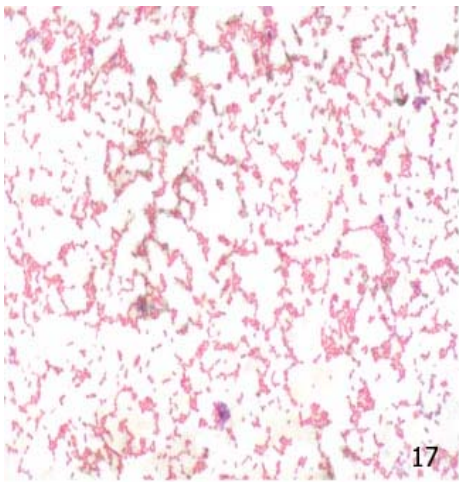
5. OWW-2011008-5, **6.** OWW-2011008-6, **7.** OWW-2011008-7, **8.** OWW-2011008-8



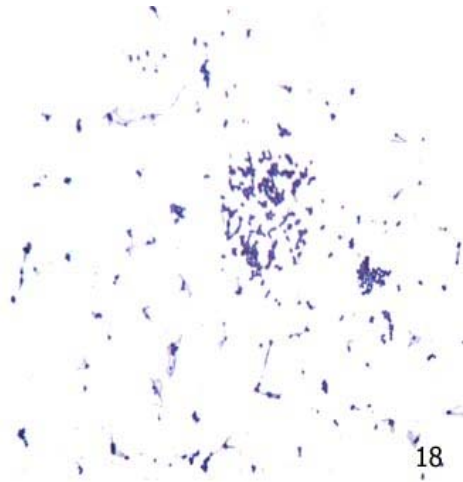
9. OWW-2011008-9, **10.** OWW-2011008-10, **11.** OWW-2011008-11, **12.** OWW-2011008-12



13. OWW-2011008-13, **14.** OWW-2030193-1, **15.** OWW-2030193-2, **16.** OWW-2030193-3



17



18



19

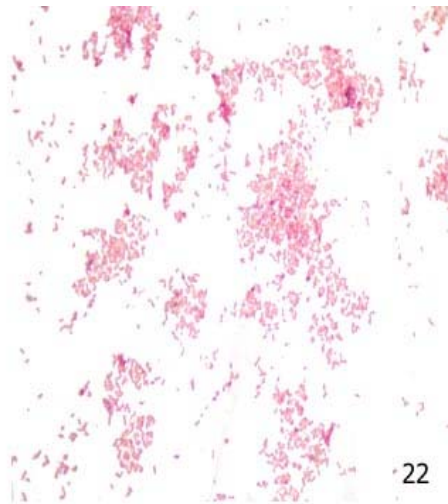


20

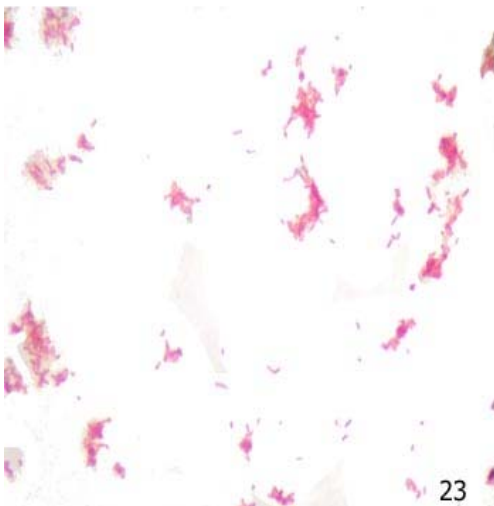
17. OWW-2030193-4, **18.** OWW-2030193-5, **19.** OWW-2030193-6, **20.** OWW-2030193-7



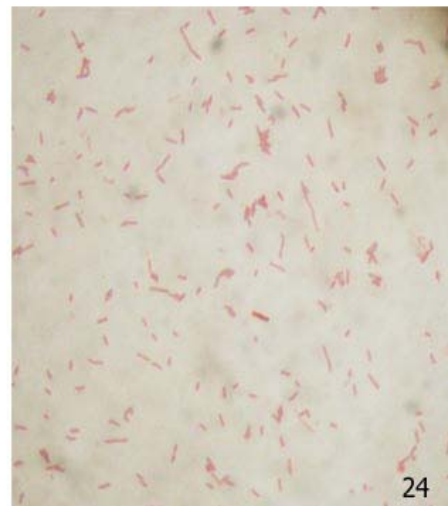
21



22

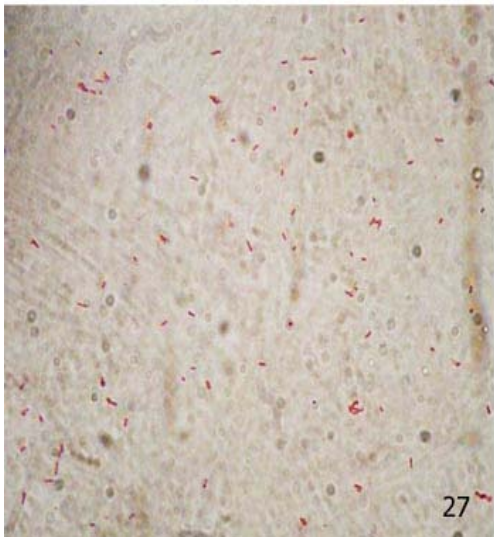
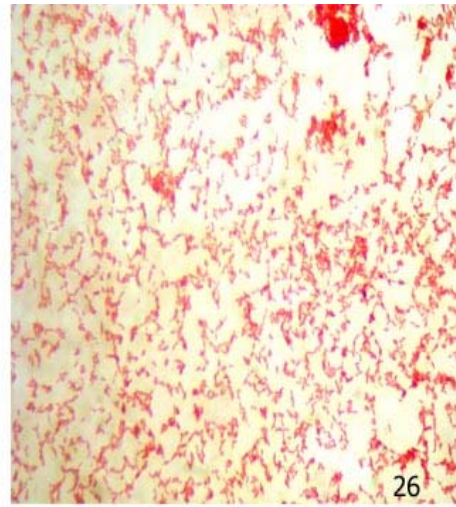
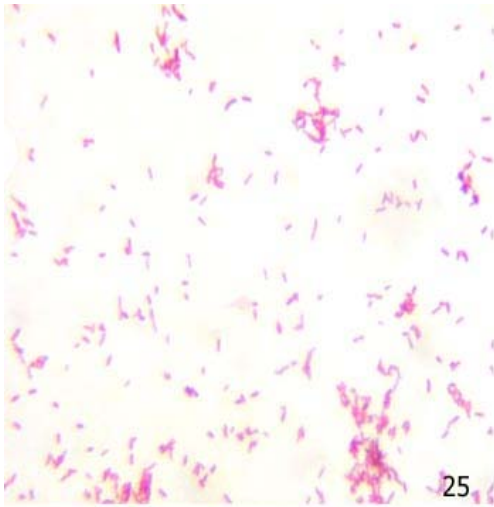


23

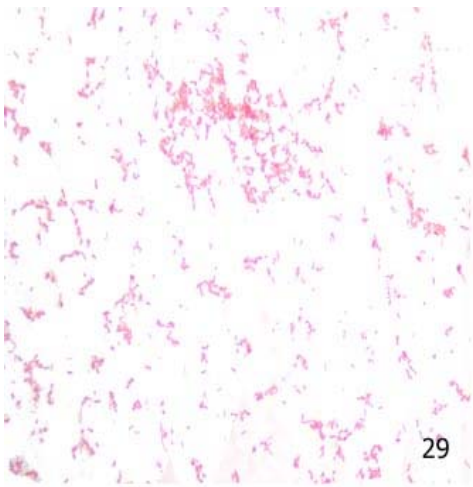


24

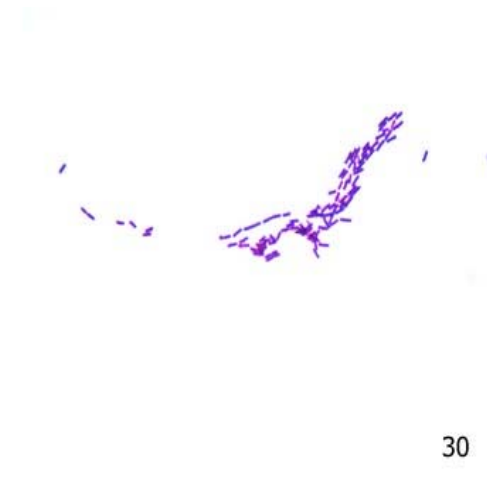
21. OWW-2030193-8, **22.** OWW-2030193-9, **23.** OWW-2030193-10, **24.** OWW-2030193-11



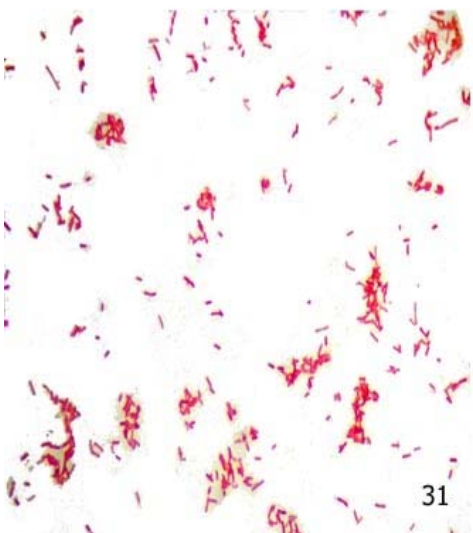
25. OWW-2030193-12, **26.** OWW-2030193-13, **27.** OWW-2030193-14, **28.** OWW-2030193-15



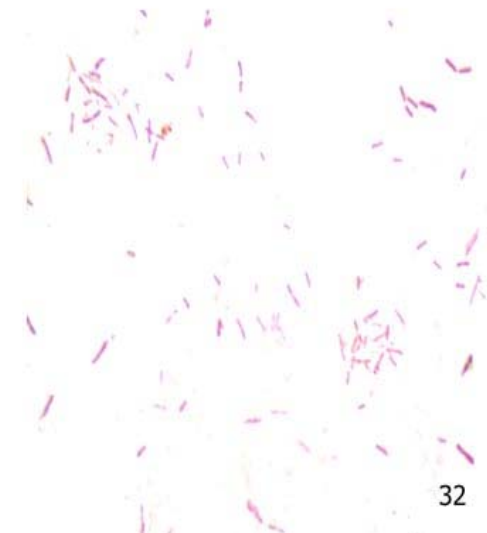
29



30

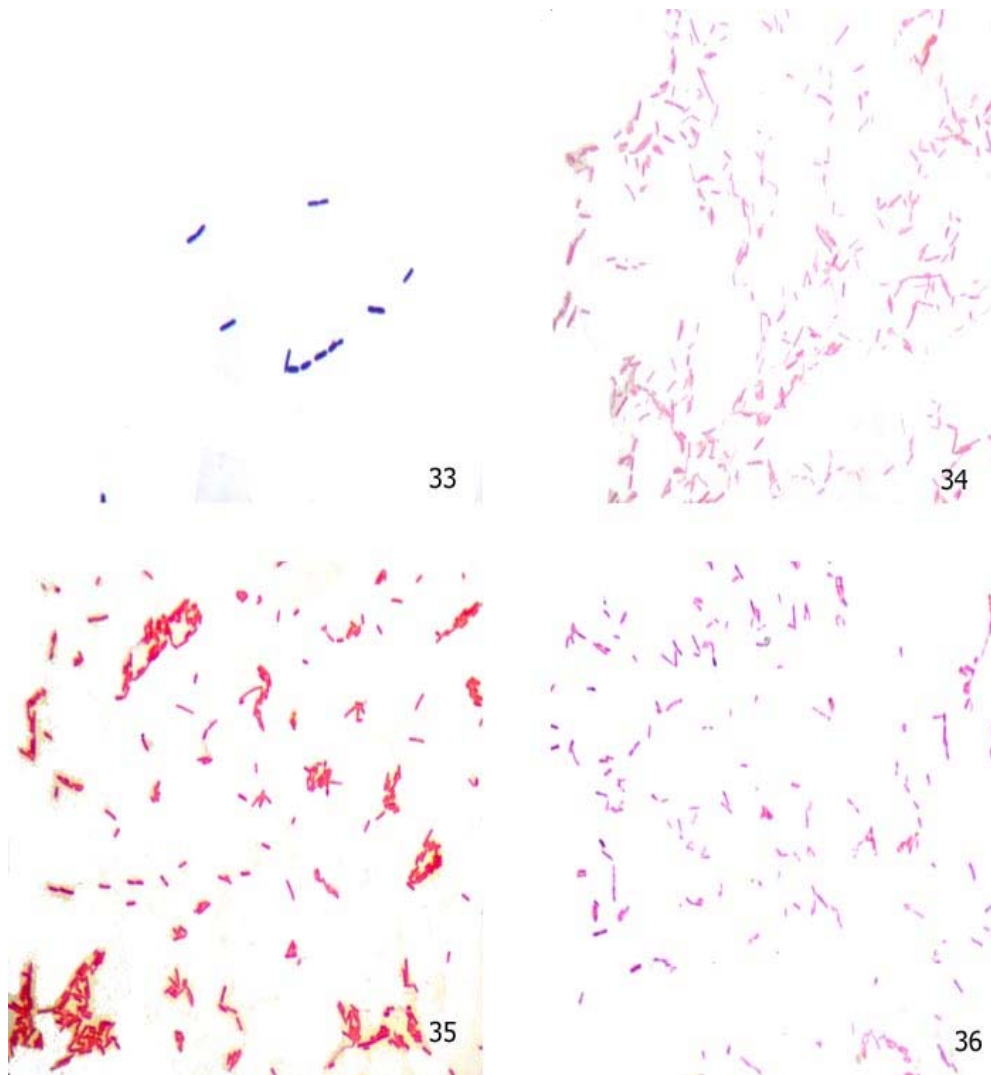


31

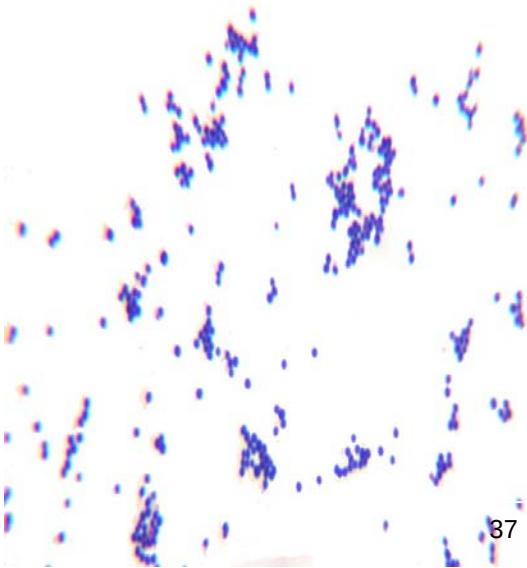


32

29. *Salmonella enterica* (subsp. entérica serovar Typhimurium) ATCC® 13331™, **30.** *Bacillus megaterium* ATCC® 9885™, **31.** *Enterobacter aerogenes* ATCC® 35029™, **32.** *Proteus vulgaris* ATCC® 33420™



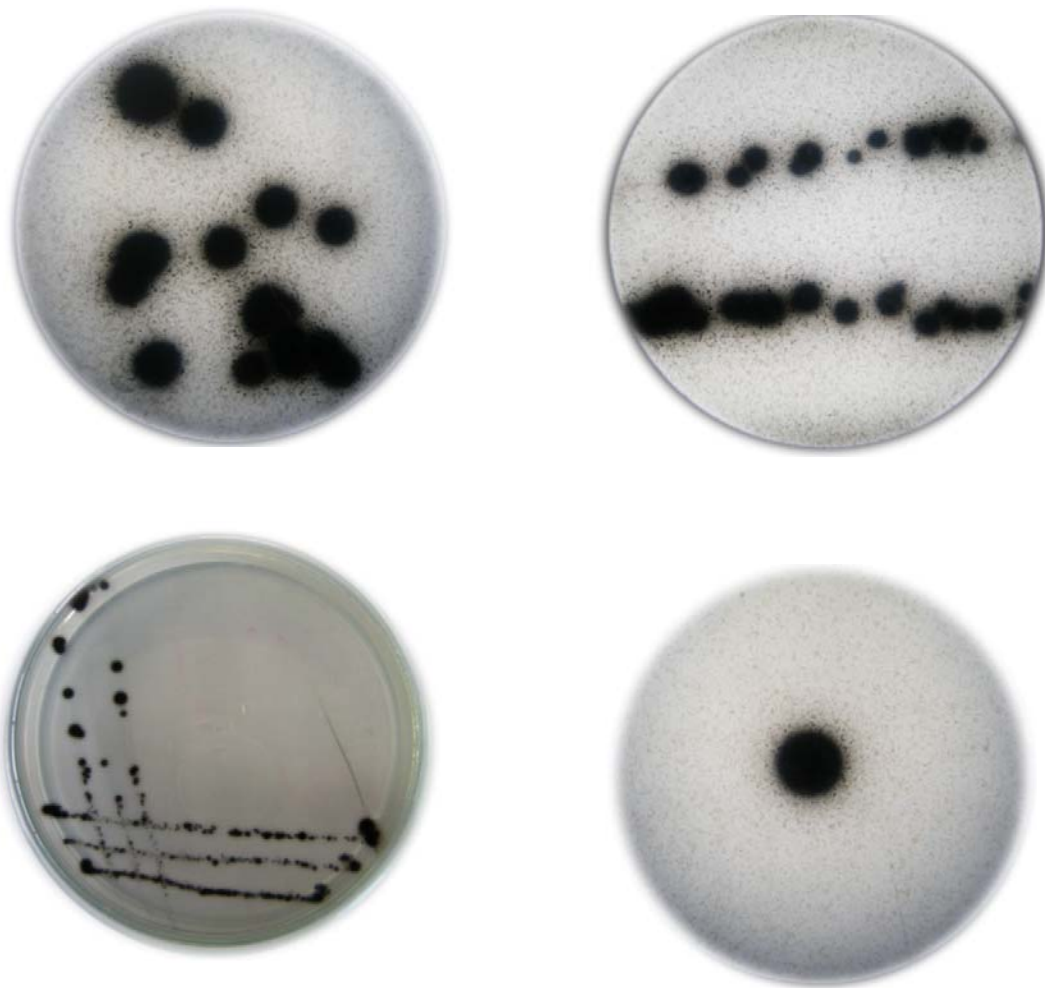
33. *Bacillus cereus* ATCC® 10876™, **34.** *Citrobacter braakii* ATCC® 43162™, **35.** *Escherichia coli* (JM101) ATCC® 33876™, **36.** *Providencia alcalifaciens* ATCC® 51902™



37

37. *Staphylococcus aureus* (subsp. Aureus) ATCC® 33592™

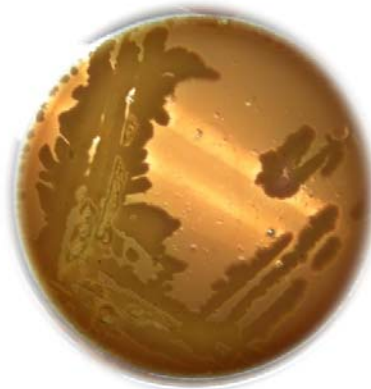
Anexo 6. Fotos de las colonias del aislado bacteriano *Desulfovibrio* sp.



Anexo 7. Crecimiento en cajas de Agar sangre de los aislados OWW-2011008-2 y OWW-2030193-3.



OWW-2011008-2 *Bacillus cereus*



OWW-2030193-3 *Bacillus cereus*