

Evaluación de la viabilidad de cepas de *Bacillus* preservadas en glicerol y caracterización de su actividad hidrolítica

Clara Sofía Mosquera Rodríguez

Trabajo de Grado para Optar el Título de Bióloga

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Doctor en ciencias agrícolas

Codirector

Diego Armando Villamizar Mantilla

Maestro en Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A mis padres, especialmente a mi papá, quienes han hecho todo y mucho más por mí, para que sea feliz y cumpla mis sueños. Esto es por y para ellos. A todos los que me acompañaron y apoyaron en este camino. A mi familia, amigos que me motivan y me inspiran constantemente a seguir, gracias.

Agradecimientos

Al profesor Jorge Luis Fuentes, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por su apoyo y guía. A Diego Villamizar y Carina Arciniegas por su acompañamiento, guía y ayuda durante todo este proceso. A mis compañeras del laboratorio y todos aquellos que me acompañaron durante la carrera.

Tabla de contenido

Introducción.....	10
1. Objetivos.....	13
1.1 Objetivo General.....	13
1.2 Objetivos Específicos	13
2. Competencias de la pasantía	13
3. Materiales y métodos.....	13
4. Resultados y Discusión.....	19
5. Conclusiones	27
6. Recomendaciones.....	28
Referencias Bibliográficas.....	29
Apéndices	34

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Listado de cepas evaluadas con su respectivo etiquetado del cepario LMMA – UIS.	14
Tabla 2. Porcentaje de viabilidad global y tiempo de viabilidad para las cepas de <i>Bacillus</i> .	19
Tabla 3. Resultados Actividad hidrolítica para las cepas de <i>Bacillus</i> .	22

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Grafica porcentaje viabilidad cepas del género <i>Bacillus</i> .	21

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Registro fotográfico a nivel macroscópico (colonias) y microscópico (tinción diferencial Gram) de las cepas del género <i>Bacillus</i> .	34
Apéndice B. Controles positivos y negativos de las pruebas de actividad enzimática evaluadas.	49
Apéndice C. Registro fotográfico resultados actividad enzimática cepas <i>Bacillus</i> para Amilasa, Celulasa, Dnasa y Gelatinasa.	52

Resumen

Título: Evaluación de la viabilidad de cepas de *Bacillus* preservadas en glicerol y caracterización de su actividad hidrolítica*

Autor: Clara Sofía Mosquera Rodríguez**

Palabras Clave: Actividad hidrolítica, Bacillus, Criopreservación, Enzimas, Viabilidad.

Descripción: Este estudio evaluó la viabilidad de cepas bacterianas del género *Bacillus* preservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA) de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Asimismo, se caracterizó la actividad hidrolítica de las cepas viables mediante pruebas enzimáticas específicas para amilasa, DNasa, gelatinasa y celulasa. Las cepas fueron sometidas a procesos de curación y preservación de acuerdo con el protocolo establecido del laboratorio, y posteriormente cultivadas en medios específicos para la evaluación de su actividad enzimática. Los resultados evidenciaron una alta viabilidad (96%) de las cepas evaluadas. Las cepas estudiadas mostraron relevante actividad hidrolítica con porcentajes por actividad enzimática como sigue: amilasa (42%), gelatinasa (68%) y celulasa (82%). En el estudio se destacaron estirpes bacterianas por su capacidad hidrolítica diversa como son: *B. cereus* UIS0036, *Bacillus* sp. UIS0037, *B. thuringiensis* UIS0038, *B. cereus* UIS0040, *B. subtilis* UIS0058, *Bacilli* sp. UIS0087 y *B. paramycoides* UIS0253; las cuales resultaron positivas en tres de las cuatro enzimas evaluadas. Ninguna cepa bacteriana mostró actividad DNasa. En conjunto, estos resultados aportan información relevante sobre la capacidad hidrolítica de las cepas del género *Bacillus* preservadas en la colección LMMA-UIS, resaltando su importancia como recursos biológicos de utilidad en diversas industrias y como una alternativa sostenible en procesos de bio-remediación ambiental.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Doctor en Ciencias Agrícolas. Codirector: Diego Armando Villamizar Mantilla. Maestro en Ciencias

Abstract

Title: Evaluation of the Viability of *Bacillus* Strains Preserved in Glycerol and Characterization of Their Hydrolytic Activity.

Author: Clara Sofía Mosquera Rodríguez

Keywords: Enzymes, Hydrolytic activity, *Bacillus*, Cryopreservation, Viability.

Description: This study evaluated the viability of bacterial strains of the genus *Bacillus* preserved in the culture collection of the Laboratory of Environmental Microbiology and Mutagenesis (LMMA) at the Industrial University of Santander (UIS). In addition, the hydrolytic activity of the viable strains was characterized through specific enzymatic assays for amylase, DNase, gelatinase, and cellulase. The strains were subjected to curing and preservation processes according to the laboratory's established protocol and were subsequently cultured in specific media to evaluate their enzymatic activity. The results revealed a high viability (96%) among the evaluated strains. The studied strains exhibited notable hydrolytic activity, with the following percentages for each enzymatic activity: amylase (42%), gelatinase (68%), and cellulase (82%). Several bacterial strains were highlighted for their diverse hydrolytic capacity, including *B. cereus* UIS0036, *Bacillus* sp. UIS0037, *B. thuringiensis* UIS0038, *B. cereus* UIS0040, *B. subtilis* UIS0058, *Bacillus* sp. UIS0087, and *B. paramycooides* UIS0253, which tested positive for three of the four enzymes evaluated. No bacterial strain showed DNase activity. Overall, these results provide relevant information about the hydrolytic capacity of *Bacillus* strains preserved in the LMMA-UIS collection, highlighting their importance as biological resources with potential applications in various industries and as a sustainable alternative in environmental bioremediation processes.

*Degree Work.

**Faculty of Sciences. School of Biology. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, PhD in Agricultural Sciences. Codirector: Diego Armando Villamizar Mantilla, MSc in Sciences.

Introducción

La crio-preservación de cepas bacterianas en colecciones de cultivos es un aspecto fundamental para la investigación microbiológica, que garantiza la disponibilidad de estos recursos esenciales para la industria biotecnológica y la sanidad ambiental. Entre los crio-preservantes más empleados para este fin se encuentra el glicerol, el cual permite mantener la viabilidad celular durante los procesos de congelación y almacenamiento a bajas temperaturas. Diversos estudios han demostrado que las condiciones de almacenamiento en glicerol, tales como la concentración utilizada y la temperatura de congelación, pueden influir de manera significativa en la viabilidad y en la estabilidad metabólica de las cepas bacterianas (Hennerbichler et al., 2006; Rivera et al., 2020; Saegeman et al., 2007).

El género *Bacillus* se ha consolidado como un recurso de gran importancia en el ámbito biotecnológico, especialmente debido a su capacidad para producir una variedad de enzimas hidrolíticas que son esenciales en múltiples aplicaciones industriales y ambientales. Estas enzimas (Ej: amilasas, lipasas, proteasas, celulasas, etc.) son cruciales en sectores que abarcan desde la agricultura hasta la industria alimentaria, textil y farmacéutica (Vojcic et al., 2012; Розанов et al., 2021). La creciente necesidad de procesos industriales más sostenibles y eficientes ha llevado a un interés renovado en el uso de microorganismos como las especies de *Bacillus* para la producción de enzimas que pueden reemplazar o complementar los tradicionales métodos químicos (Linh et al., 2025; Arbab et al., 2021).

La actividad hidrolítica de las cepas de *Bacillus* es fundamental debido a su capacidad para catabolizar diversos sustratos, facilitando así la degradación de biomasa y la transformación de compuestos complejos en productos con valor agregado. Por ejemplo, la producción de enzimas como la amilasa permite la conversión de almidones en azúcares fermentables, lo que es crucial

en la industria del biocombustible y alimentación animal (Acharya & Subedi, 2025; Alves et al., 2002). Varios estudios han indicado que la eficiencia en la producción de estas enzimas por parte de especies de *Bacillus* puede ser optimizada mediante el uso de subproductos agroindustriales como sustratos, lo que no solo reduce costos, sino que también incorpora un enfoque de economía circular a la biotecnología (Barros et al., 2013; Linh et al., 2025; Dujković et al., 2023). Esta sinergia entre la necesidad industrial de enzimas y el uso sostenible de recursos subraya la relevancia del estudio de las cepas de *Bacillus*.

La evaluación del potencial biotecnológico de las cepas de *Bacillus*, específicamente las que se preservan en glicerol, resulta crucial en este contexto. La preservación adecuada de estas cepas asegura su viabilidad y funcionalidad en condiciones industriales. Investigaciones recientes han demostrado que el uso de crioprotectores como el glicerol puede mejorar significativamente la actividad enzimática post-congelación, permitiendo que estas bacterias mantengan su capacidad hidrolítica (He et al., 2023; Dhyani et al., 2017). Además, el desarrollo de métodos de transformación más eficientes de estas cepas podría facilitar la ingeniería de características deseadas, como un aumento en la producción enzimática o la resistencia a condiciones adversas (Vojcic et al., 2012; Veras et al., 2018; Ruginescu et al., 2020). Tal “ingenierización” puede ser la clave para mejorar la competitividad de las enzimas producidas por *Bacillus* en el mercado industrial.

La presente investigación se centra en la evaluación de la viabilidad de cepas de *Bacillus* preservadas en glicerol en la colección LMMA-UIS y la caracterización de su actividad hidrolítica, entendiendo que estas características no solo son relevantes desde el punto de vista académico, sino que tienen aplicaciones directas en la industria. Un mejor entendimiento de cómo influye la preservación en la funcionalidad enzimática podría abrir nuevas vías para la aplicación de estas

enzimas en distintas industrias. Así, la investigación no solo busca contribuir al conocimiento científico sobre la Biología y manejo en colecciones de cepas de *Bacillus*, sino que también pretende ofrecer soluciones prácticas a los desafíos del sector industrial contemporáneo, resaltando la importancia de la biotecnología microbiana en la búsqueda de procesos más eficientes y sostenibles.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la viabilidad de cepas bacterianas del género *Bacillus* criopreservadas en glicerol y caracterizar su actividad hidrolítica.

1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la viabilidad de las cepas del género *Bacillus* criopreservadas en glicerol mediante su reactivación bajo condiciones controladas de laboratorio.

2. Caracterizar la actividad hidrolítica de las cepas viables del género *Bacillus* mediante la realización de pruebas enzimáticas específicas.

2. Competencias de la pasantía

Se adquirieron habilidades en el manejo de cepas de colección, incluyendo su reactivación y criopreservación.

Se adquirieron habilidades en el análisis de la capacidad enzimática de diferentes cepas del género *Bacillus*, así como en la evaluación de los factores que influyen en su producción.

3. Materiales y métodos

3.1 Material biológico

Se evaluó la viabilidad de 53 cepas del género *Bacillus* (Tabla 1), previamente criopreservadas en una solución de glicerol al 30 % sobre un sustrato de zeolita y almacenadas a -80°C en el cepario del LMMA–UIS. Se estudiaron cepas de las siguientes especies: *Bacillus cereus*,

Bacillus licheniformis, *Bacillus megaterium*, *Bacillus paramycooides*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus* sp. 1, *Bacillus* sp. 2, *Bacillus* sp. 3, *Bacillus* sp. 4, *Bacillus* sp. 5, *Bacillus* sp. 6, así como ocho (8) estirpes bacterianas identificadas solo al nivel de clase Bacilli. Las estirpes (*Bacillus* sp. 1 – *Bacillus* sp.6) corresponden a cepas del género *Bacillus* en proceso de identificación taxonómica para su posterior asignación a nivel de especie. Los códigos y el número de cepas estudiadas del cepario LMMA-UIS son descritos en la Tabla 1. Información sobre su origen, puede encontrarse en el Sistema de Información sobre la Biodiversidad de Colombia (<https://doi.org/10.15472/uq6pal>).

Tabla 1.

Listado de cepas evaluadas con su respectivo etiquetado del cepario LMMA – UIS.

Taxon (species)	Nº	No. UIS
<i>Bacillus cereus</i>	9	UIS0036, UIS0040, UIS0044, UIS0167, UIS0175, UIS0214, UIS0244, UIS0256, UIS0257
<i>Bacillus licheniformis</i>	12	UIS0039, UIS0071, UIS0072, UIS0073, UIS0074, UIS0077, UIS0165, UIS0192, UIS0194, UIS0195, UIS0196, UIS0241
<i>Bacillus megaterium</i>	1	UIS0181
<i>Bacillus paramycooides</i>	1	UIS0253
<i>Bacillus safensis</i>	2	UIS0047, UIS0051
<i>Bacillus subtilis</i>	10	UIS0042, UIS0046, UIS0048, UIS0053, UIS0055, UIS0056,

		UIS0058, UIS0060, UIS0062, UIS0064
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2	UIS0038, UIS0041
<i>Bacillus sp.1</i>	1	UIS0037
<i>Bacillus sp.2</i>	2	UIS0075, UIS0078
<i>Bacillus sp.3</i>	1	UIS0079
<i>Bacillus sp.4</i>	1	UIS0242
<i>Bacillus sp.5</i>	1	UIS0246
<i>Bacillus sp.6</i>	1	UIS0247
Bacilli*	8	UIS0061, UIS0083, UIS0084, UIS0085, UIS0086, UIS0087, UIS0088, UIS0254

*Cepas del grupo Bacilli las cuales no cuentan con secuenciación del gen 16S rRNA. Nota: Cepas trabajadas del cepario LMMA-UIS criopreservadas. N_0 : Número de cepas preservadas, No. UIS: Número de registro en el cepario LMMA-UIS.

3.2 Medios de cultivo

Se emplearon diferentes medios de cultivo manteniéndose, en la mayoría de los casos, el mismo medio usado para el aislamiento de cada cepa. Esta información fue extraída del estándar Darwin Core. Los medios de cultivo utilizados fueron: medio mínimo de sales M9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), M9 suplementado con extracto de levadura (M9Y), medio mínimo de sales M9 con extracto de levadura y acetato (M9Y + acetato), medio mínimo de sales M9 con extracto de levadura y glicerol (M9Y + glicerol), medio mínimo de sales M9 con extracto de levadura y glucosa (M9Y + glucosa), Medio Clostridial Reforzado o RCM (Oxoid LTD, Basingstoke, England), medio Sulfuro-Indol-Motilidad o SIM (Merck, Darmstadt, Germany) y caldo nutritivo

o CN (Merck, Darmstadt, Germany). Estos medios fueron preparados en tubos Falcon de 15 mL, usando la cantidad indicada de cada medio en agua destilada. Los medios solidificados (15 g de agar/L) se prepararon en cajas de Petri a razón de 30 mL por caja. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave durante aproximadamente 20–25 minutos a 1 atm.

Para activar las cepas crio-preservadas, se siguió el protocolo establecido en el laboratorio. Inicialmente, se inoculó el contenido de los crioviales de cada cepa en su respectivo medio de cultivo indicado anteriormente. La pureza de las cepas se verificó mediante siembra por estría de agotamiento, con el fin de detectar la posible presencia de contaminantes a partir de la observación de su uniformidad de colonias. Posteriormente, las colonias obtenidas fueron usadas para la tinción de Gram con el fin de confirmar la pureza de la cepa evaluando la morfología celular. Una vez comprobada la pureza, se seleccionó una colonia y se inoculó en un medio líquido específico para cada cepa. Los cultivos fueron crecidos en incubadoras microbiológicas a 37 °C. Una vez se evidenció crecimiento bacteriano, determinado por la turbidez del medio, se realizó nuevamente una tinción de Gram para verificar la pureza de las cepas. Por último, se llevó a cabo el proceso de crio-preservación usando el protocolo vigente de la colección; esto es: 30% de glicerol sobre un sustrato de zeolita y almacenamiento a -80 °C en el cepario del LMMA-UIS.

3.3 Viabilidad cepas *Bacillus*

Para la evaluación de la viabilidad de las cepas del género *Bacillus*, se registraron los datos de viabilidad de un total de seis (6) crioviales (copias) por cepa bacteriana. Así, se registró: N_0 = Número de total cepas almacenadas, N_1 = Número total de cepas viables y S (%) = Supervivencia, expresada en porcentaje, calculada dividiendo el número de cepas viables entre el número de cepas almacenadas y multiplicando por 100. Con base en los tiempos de almacenamiento de las cepas

viabiles, se calculó su promedio de viabilidad (AV) en años por especie microbiana. También se calculó el promedio de viabilidad corregido (VA_C) con la fracción de supervivencia, que representa el tiempo (años) en que sobreviven todas las cepas de cada especie.

3.4 Evaluación actividad hidrolítica *Bacillus*

Se realizó la evaluación de la actividad hidrolítica de las cepas viables del género *Bacillus* mediante el análisis de cuatro enzimas: amilasa, DNasa y gelatinasa y celulasa. (ver apéndice A).

La preparación de los medios y los protocolos empleados para la evaluación de la actividad hidrolítica de las enzimas amilasa (Merck, Darmstadt, Germany), DNasa (Oxoid, Hampshire, England), y gelatinasa (Merck, Darmstadt, Germany), se basaron en las indicaciones del fabricante de cada uno de los medios de cultivo específicos. La preparación del medio carboximetilcelulosa (CMC) para la prueba celulasa se desarrolló según indicó Rawway et al. (2018). Se usaron cajas Petri divididas en dos secciones, donde cada división requirió 11 mL del medio correspondiente para su preparación.

La siembra de cada cepa se realizó trazando una línea recta sobre el medio con un asa bacteriológica. Las cajas se incubaron durante aproximadamente 24–48 horas, dependiendo del crecimiento de cada cepa en una incubadora microbiológica a 37 °C. Una vez evidenciado el crecimiento bacteriano se llevó a cabo el proceso de revelado para cada actividad enzimática.

Para la evaluación de la hidrólisis del almidón, se añadió Lugol (2 mL) sobre el medio y se dejó reposar durante aproximadamente 3–5 minutos. La actividad amilolítica se evidenció por la presencia de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, mientras que el fondo del medio adquirió una coloración oscura debido a la reacción del yodo con el almidón no hidrolizado. La hidrólisis de gelatinasa se evidenció directamente sobre el medio con gelatina y agar sin

revelado. Una prueba con resultado positivo tras 24 horas de incubación muestra la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano y el resto del medio presentaba una coloración ligeramente blanquecina. Una prueba con resultado negativo muestra todo el medio, incluida la zona de crecimiento, con una apariencia blanquecina uniforme. Para la detección de actividad de DNasa, se adicionó HCl (1 M) al medio de cultivo, lo que permite evidenciar la formación de un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano. Por último, la detección de actividad celulasa se llevó a cabo según la metodología descrita por Rawway et al. (2018). El cultivo se dejó crecer 48 horas y luego se evidenció la actividad celulasa (hidrolisis de carboximetilcelulosa (ChemCruz, Dallas, United States) empleando 0.1% de Rojo Congo como revelador y NaCl (1 M) como fijador. Para aumentar el contraste, se colocaron las cajas Petri a 8 °C en una nevera durante 24 a 48 horas. En todos los casos, las zonas de hidrolisis se constataron visualmente y se registró fotográficamente para cada actividad enzimática.

Con el fin de tener una medida relativa de la capacidad hidrolítica de las estirpes estudiadas, se desarrollaron mediciones del ancho de los halos de hidrólisis formado en cada cepa y sustrato. A partir de las imágenes obtenidas, se determinó el ancho (mm) del halo en el punto más extendido y se establecieron rangos para clasificar la actividad enzimática así: A) ausencia de actividad (–) cuando no se observó halo de hidrólisis; B) actividad baja (+) para halos entre 1 y 3 mm; C) actividad moderada (++) para halos entre 4 y 6 mm; y D) actividad alta (+++) para halos iguales o mayores a 7 mm.

4. Resultados y Discusión

En la **Tabla 2** se presenta el porcentaje de viabilidad global y el tiempo promedio de viabilidad (VA), junto con el tiempo promedio corregido por fracción de supervivencia (VA_C), para las especies del género *Bacillus* evaluadas tras el periodo de crio-preservación. En términos globales, de 52 cepas evaluadas 50 resultaron viables (S% = 96,15%), evidenciando una alta eficiencia del método de crio-preservación empleado para las estirpes estudiadas.

Las especies bacterianas mostraron una viabilidad del 100%. Este comportamiento se observó en las especies *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. paramycoides*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, y en las estirpes identificadas solo al nivel de género (*Bacillus* sp.1–sp.6); cuyos valores de VA y VA_C fueron muy similares. Por otra parte, las estirpes bacterianas identificadas solo al nivel de clase (Bacilli) presentaron una sobrevivencia del 75%; además, mostraron valores diferentes de VA = 10,7 años y VA_C = 6.7 años. Esto indica una mayor susceptibilidad de este grupo frente al almacenamiento prolongado.

Tabla 2.

Porcentaje de viabilidad global y tiempo de viabilidad para las cepas de *Bacillus*.

No.	Taxon (species)	ST (year)	N ₀	N ₁	S (%)	Viability (year)	
						VA	VA _C
1	<i>Bacillus cereus</i>	9 – 13	9	9	100	11.0	11.0
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	4.2 – 13.7	12	12	100	11.3	11.3
3	<i>Bacillus megaterium</i>	12.0	1	1	100	12.0	12.0
4	<i>Bacillus paramycoides</i>	9.0	1	1	100	9.0	9.0
5	<i>Bacillus safensis</i>	13.7	2	2	100	13.7	13.7
6	<i>Bacillus subtilis</i>	13.0	10	10	100	13.0	13.0
7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	13.7	2	2	100	13.7	13.7

8	<i>Bacillus sp1.</i>	13.7	1	1	100	13.7	13.7
9	<i>Bacillus sp2.</i>	6.0 – 13.7	2	2	100	9.8	9.8
10	<i>Bacillus sp3.</i>	13.7	1	1	100	13.7	13.7
11	<i>Bacillus sp4.</i>	9.0	1	1	100	9.0	9.0
12	<i>Bacillus sp5.</i>	9.1	1	1	100	9.1	9.1
13	<i>Bacillus sp6.</i>	8.9	1	1	100	8.9	8.9
14	Bacilli*	9.4 – 13.3	8	6	75	10.7	6.7
Total =		4.2 - 13.7	52	50	96.15%	11.3	10.9

* Cepas del grupo Bacilli las cuales no cuentan con secuenciación del gen 16S rRNA..

Nota: Para cada especie se mostró: ST: El tiempo de crioconservación o almacenamiento en años.

N0: Número de cepas conservadas por especie. N1: Número de cepas supervivientes. (%): Supervivencia expresada en porcentaje. VA: Los valores medios de viabilidad por especie. VAc: Los valores medios de viabilidad corregidos con la fracción de supervivencia, que representan el tiempo (años) en el que sobreviven todas las cepas de un grupo.

Como se observa en los resultados, en general las diferentes cepas de *Bacillus* presentaron altos niveles de supervivencia, a pesar de haber permanecido almacenadas durante periodos prolongados en el cepario y de haber estado expuestas a condiciones adversas. Estos resultados confirman que la criopreservación constituye un método efectivo para la conservación de cepas de este género. Esto puede explicarse en gran medida por una ventaja biológica fundamental que presentan las especies del género *Bacillus* frente a muchas otras bacterias en el contexto de la preservación y el almacenamiento a largo plazo: su capacidad de formar endosporas. Esta característica permite entender por qué, al realizar una comparación retrospectiva con estudios de viabilidad llevados a cabo previamente en el LMMA con otras especies bacterianas, las cepas de *Bacillus* tienden a presentar porcentajes de viabilidad más altos. Durante la reactivación fue

posible observar crecimiento bacteriano con características morfológicas compatibles con este género, así como la presencia de estructuras esporuladas, como se muestra en el Apéndice A.

Las endosporas bacterianas son estructuras de resistencia metabólicamente inactivas que confieren a estos microorganismos una protección extraordinaria frente a una amplia gama de condiciones ambientales adversas, incluyendo temperaturas extremas, desecación, radiación y agentes químicos. De manera particularmente relevante para el presente estudio, estas estructuras también les permiten tolerar condiciones de congelación y almacenamiento a temperaturas bajo cero (Jafari et al., 2016; Payne et al., 2024; Sorokulova et al., 2008). Este aspecto resulta especialmente importante si se considera la problemática presentada en el LMMA durante la pandemia y el posterior traslado a las nuevas instalaciones, periodo en el cual se registraron múltiples desconexiones eléctricas que dejaron neveras y congeladores sin energía y con un funcionamiento interrumpido durante periodos prolongados. A pesar de estas condiciones, una gran proporción de las cepas de *Bacillus* logró mantenerse viable (Figura 1).

Figura 1.

Grafica porcentaje viabilidad cepas del género *Bacillus*.



En la **Tabla 3** se presentan los resultados de la actividad hidrolítica de las cepas viables del género *Bacillus*. En ella se muestran la especie, el código de la cepa y los niveles de actividad enzimática observados para amilasa, celulasa, DNasa y gelatinasa en las 50 cepas analizadas. Los resultados se expresan mediante categorías relativas de su actividad (–, +, ++ y +++), establecidas a partir del tamaño del halo de hidrólisis observado alrededor del crecimiento bacteriano. Ejemplos representativos de los controles positivos y negativos utilizados como criterio de interpretación para cada una de las pruebas enzimáticas se presentan en el Apéndice **B**.

De manera general, se observó variabilidad en la actividad hidrolítica entre las cepas evaluadas. Los porcentajes de positividad para cada enzima fueron los siguientes: celulasa (82%), gelatinasa (68%), amilasa (42%) y DNasa (0%). Las actividades celulólicas y gelatinolíticas fueron las más frecuentes, mientras que no se evidenció actividad DNasa en las cepas analizadas.

Tabla 3.Resultados sobre la actividad hidrolítica para las cepas del género *Bacillus* estudiadas.

Especie	Código	A.H Amilasa	A.H Celulasa	A.H Dnasa	A.H gelatinasa
<i>B. cereus</i>	UIS0036	+	+++	-	+++
<i>Bacillus sp.1</i>	UIS0037	++	+	-	+++
<i>B. thuringiensis</i>	UIS0038	+	++	-	+++
<i>B. licheniformis</i>	UIS0039	-	+	-	-
<i>B. cereus</i>	UIS0040	+++	++	-	+++
<i>B. thuringiensis</i>	UIS0041	-	++	-	+++
<i>B. subtilis</i>	UIS0042	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	UIS0044	-	++	-	+++
<i>B. subtilis</i>	UIS0046	++	-	-	+++
<i>B. safensis</i>	UIS0047	+	-	-	+++
<i>B. subtilis</i>	UIS0048	-	-	-	+++
<i>B. safensis</i>	UIS0051	-	-	-	+++
<i>B. subtilis</i>	UIS0053	-	-	-	+++
<i>B. subtilis</i>	UIS0055	++	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	UIS0056	-	++	-	+
<i>B. subtilis</i>	UIS0058	+	++	-	+
<i>B. subtilis</i>	UIS0060	-	+	-	+
<i>B. subtilis</i>	UIS0062	-	+	-	+
<i>B. subtilis</i>	UIS0064	-	++	-	-

<i>B. licheniformis</i>	UIS0071	-	++	-	+
<i>B. licheniformis</i>	UIS0072	-	++	-	-
<i>B. licheniformis</i>	UIS0073	+	+++	-	-
<i>B. licheniformis</i>	UIS0074	+	+++	-	-
<i>Bacillus sp.2</i>	UIS0075	+	++	-	-
<i>B. licheniformis</i>	UIS0077	+	+++	-	-
<i>Bacillus sp.2</i>	UIS0078	+	++	-	+
<i>Bacillus sp.3</i>	UIS0079	-	++	-	++
Bacilli	UIS0084	-	+++	-	+
Bacilli	UIS0085	-	++	-	-
Bacilli	UIS0086	-	+	-	-
Bacilli	UIS0087	+	++	-	+
Bacilli	UIS0088	-	+	-	-
<i>B. licheniformis</i>	UIS0165	-	++	-	-
<i>B. cereus</i>	UIS0167	+	++	-	++
<i>B. cereus</i>	UIS0175	-	++	-	+
<i>B. megaterium</i>	UIS0181	-	+	-	++
<i>B. licheniformis</i>	UIS0192	-	++	-	+
<i>B. licheniformis</i>	UIS0194	-	++	-	+
<i>B. licheniformis</i>	UIS0195	+	-	-	+++
<i>B. licheniformis</i>	UIS0196	+	+	-	-
<i>B. cereus</i>	UIS0214	-	++	-	-
<i>B. licheniformis</i>	UIS0241	+	++	-	++

<i>Bacillus sp.4</i>	UIS0242	-	+	-	+++
<i>B. cereus</i>	UIS0244	+	-	-	+++
<i>Bacillus sp.5</i>	UIS0246	-	++	-	+
<i>Bacillus sp.6</i>	UIS0247	-	+++	-	+
<i>B. paramycoides</i>	UIS0253	++	++	-	+
Bacilli	UIS0254	-	++	-	+
<i>B. cereus</i>	UIS0256	-	++	-	-
<i>B. cereus</i>	UIS0257	-	+	-	++

Nota: (-) ausencia de actividad; (+) actividad baja; (++) actividad moderada; (+++) actividad alta, de acuerdo con el tamaño del halo de hidrólisis observado alrededor de la colonia bacteriana.

En el estudio se destacaron estirpes bacterianas por su capacidad hidrolítica diversa como son: *B. cereus* UIS0036, *Bacillus sp.* UIS0037, *B. thuringiensis* UIS0038, *B. cereus* UIS0040, *B. subtilis* UIS0058, *Bacilli sp.* UIS0087 y *B. paramycoides* UIS0253; las cuales resultaron positivas en tres de las cuatro enzimas evaluadas. Por actividad enzimática las más promisorias fueron: Amilasa (*B. cereus* UIS0040); Celulasa (*B. cereus* UIS0036, *B. licheniformis* UIS0073, *B. licheniformis* UIS0074, *B. licheniformis* UIS0077, *Bacilli* UIS0084, *Bacillus sp.* UIS0247); Gelatinasa (*B. cereus* UIS0036, *Bacillus sp.* UIS0037, *B. thuringiensis* UIS0038, *B. cereus* UIS0040, *B. thuringiensis* UIS0041, *B. cereus* UIS0044, *B. subtilis* UIS0046, *B. safensis* UIS0047, *B. subtilis* UIS0048, *B. safensis* UIS0051, *B. subtilis* UIS0053, *B. licheniformis* UIS0195, *Bacillus sp.* UIS0242, *B. cereus* UIS0244). Estos resultados indican que la actividad gelatinasa fue la mejor representada en el género bacteriano estudiado. Las imágenes correspondientes a las pruebas enzimáticas realizadas para cada una de las 50 cepas evaluadas se presentan en el Apéndice C.

Dado que el género *Bacillus* ha sido ampliamente reconocido en la literatura científica como uno de los principales productores de enzimas hidrolíticas extracelulares de relevancia biotecnológica e industrial, era esperable encontrar una alta positividad en la mayoría de las actividades enzimáticas evaluadas. La capacidad de estas bacterias para secretar al medio extracelular un amplio espectro de hidrolasas, incluyendo amilasas, gelatinasas, celulasas, proteasas, lipasas y otras enzimas degradadoras de polímeros complejos, las convierte en un grupo bacteriano de gran valor para aplicaciones en biotecnología, industria alimentaria, biorremediación y control biológico (Chhetri et al., 2022; Sulistiyani et al., 2021; Ajuna et al., 2023).

La producción de enzimas extracelulares en bacterias se encuentra estrechamente regulada por la disponibilidad de sustratos en el ambiente, siguiendo el principio de inducción enzimática: los microorganismos tienden a sintetizar principalmente aquellas enzimas para las cuales existe un sustrato disponible en su nicho ecológico (Chhetri et al., 2022; Narmukhamedova et al., 2025; Fleming et al., 1995). En ambientes de subsuelo, la disponibilidad de ADN extracelular libre suele ser considerablemente menor que en ambientes superficiales o acuáticos, debido a la menor densidad celular presente en estos sistemas (Narmukhamedova et al., 2025; Fleming et al., 1995). Esta condición podría explicar la ausencia de resultados positivos para la actividad DNasa en las cepas analizadas, las cuales fueron aisladas a partir de diferentes muestras de subsuelo. En contraste, la alta positividad observada para las actividades de celulasa y gelatinasa podría estar asociada con la mayor disponibilidad de sustratos orgánicos complejos en el suelo, como polisacáridos y proteínas derivados de restos vegetales y materia orgánica en descomposición.

La variabilidad observada entre cepas en los niveles de actividad enzimática sugiere una importante diversidad funcional dentro del conjunto de bacterias evaluadas. Incluso dentro de un mismo género bacteriano, diferentes cepas pueden presentar capacidades metabólicas distintas, lo

cual refleja adaptaciones específicas a las condiciones del microambiente del cual fueron aisladas. Estos resultados evidencian que cada cepa puede comportarse de manera independiente, incluso cuando pertenecen al mismo género bacteriano, por lo que no todas presentan el mismo perfil de actividad enzimática frente a las enzimas estudiadas. En este sentido, las cepas que presentaron mayores niveles de actividad hidrolítica podrían considerarse candidatas para futuros estudios orientados a la producción de enzimas de interés biotecnológico.

5. Conclusiones

Las cepas de *Bacillus* estudiadas mostraron alta tolerancia para las condiciones de la criopreservación en glicerol, indicando la relevancia de las esporas bacterianas a tales fines. Esta ventaja adaptativa resultó particularmente valiosa en el contexto de las colecciones microbianas y favorece la preservación y estabilidad de las cepas durante largos periodos de almacenamiento.

Adicionalmente, las cepas estudiadas presentaron alta capacidad hidrolítica para degradar diferentes tipos de sustratos mediante la producción de enzimas extracelulares; destacando su potencial aplicación en distintos sectores industriales.

Basado en su origen geográfico, y los estudios previos referenciados en este trabajo, las enzimas producidas por las cepas de *Bacillus* de la colección “Cepario LMMA-UIS”, podrían usarse en la industria alimentaria, en procesos de degradación de materia orgánica y biorremediación ambiental; así, estas cepas constituyen recursos biológicos de interés para futuros desarrollos biotecnológicos.

6. Recomendaciones

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen una aproximación inicial al potencial enzimático de cepas del género *Bacillus* aisladas de muestras de subsuelo. La caracterización realizada fue de tipo cualitativo, basada en la observación de halos de hidrólisis en medios específicos, lo cual permite identificar la presencia de actividad enzimática, pero no cuantificar con precisión los niveles de producción de estas enzimas. En este sentido, se recomienda que estudios futuros profundicen en la evaluación del potencial hidrolítico de estas cepas mediante metodologías cuantitativas que permitan determinar con mayor exactitud la actividad enzimática, tales como ensayos espectrofotométricos o pruebas bioquímicas específicas. Esto permitiría identificar con mayor precisión aquellas cepas con mayor capacidad productora de enzimas y evaluar su posible aplicación en procesos biotecnológicos o industriales.

Referencias Bibliográficas

Acharya, A., & Subedi, S. (2025). Extraction, isolation, purification and optimization of amylase and protease enzymes isolated from *Bacillus* species. <https://doi.org/10.1101/2025.09.10.675465>

Ajuna, H. B., Lim, H., Moon, J., Won, S., Choub, V., Choi, S., ... & Ahn, Y. S. (2023). The prospect of hydrolytic enzymes from *Bacillus* species in the biological control of pests and diseases in forest and fruit tree production. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16889. <https://doi.org/10.3390/ijms242316889>

Alves, M., Campos-Takaki, G., Porto, A., & Milanez, A. (2002). Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4). <https://doi.org/10.1590/s1517-83822002000400009>

Arbab, S., Ullah, H., Khan, M., Khattak, M., Zhang, J., Li, K., ... & Hassan, I. (2021). Diversity and distribution of thermophilic microorganisms and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology*, 62(2), 95–108. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100529>

Barros, F., Simiqueli, A., Andrade, C., & Pastore, G. (2013). Production of enzymes from agroindustrial wastes by biosurfactant-producing strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/103960>

Chhetri, B. R., Silwal, P., Jyapu, P., Maharjan, Y., Lamsal, T., & Basnet, A. (2022). Biodegradation of organic waste using *Bacillus* species isolated from soil. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 10(2), 104–111. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v10i2.44303>

Costa, A., Corallo, B., Amarelle, V., Stewart, S., Pan, D., Tiscornia, S., ... & Fabiano, E. (2022). *Paenibacillus* sp. strain UY79, isolated from a root nodule of *Arachis villosa*, displays a broad spectrum of antifungal activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(2). <https://doi.org/10.1128/aem.01645-21>

Dhyani, A., Gururani, R., Selim, S., Adhikari, P., Sharma, A., Pande, V., ... & Pandey, A. (2017). Production of industrially important enzymes by thermobacilli isolated from hot springs of India. *Research in Biotechnology*, 8, 19–28. <https://doi.org/10.25081/rib.2017.v8.3594>

Dujković, T., Pajčin, I., Vlajkov, V., & Grahovac, J. (2023). *Bacillus* spp. enzymatic activity to support circular economy. *Acta Periodica Technologica*, (54), 325–335. <https://doi.org/10.2298/apt2354325d>

Fleming, A. B., Tangney, M., Jørgensen, P. L., Diderichsen, B., & Priest, F. G. (1995). Extracellular enzyme synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 3775–3780. <https://doi.org/10.1128/aem.61.11.3775-3780.1995>

He, T., Xu, Y., Li, X., Wang, X., Li, J., Ouyang, D., ... & Wang, H. (2023). A linear and circular dual-conformation noncoding RNA involved in oxidative stress tolerance in *Bacillus altitudinis*. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41491-4>

Hennerbichler, S., Reichl, B., Pleiner, D., Gabriel, C., Eibl, J., & Redl, H. (2006). The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell and Tissue Banking*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10561-006-9002-3>

Jafari, M., Alebouyeh, M., Mortazavian, A. M., Hosseini, H., Ghanati, K., Amiri, Z., ... & Zali, M. R. (2016). Influence of heat shock temperatures and fast freezing on viability of probiotic

sporeformers and the issue of spore plate count versus true numbers. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 35–42. <https://doi.org/10.18869/acadpub.nfsr.3.1.35>

Linh, N., Ndao, A., Blais, J., & Adjallé, K. (2025). Evaluation of industrial wastewaters as low-cost resources for sustainable enzyme production by *Bacillus* species. *Clean Technologies*, 7(2), 45. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol7020045>

Narmukhamedova, M., Khusanov, T., Kadirova, G., & Ахмедова, З. Р. (2025). Identification and study of extracellular enzymatic activity of *Bacillus velezensis* isolated from saline soils of the Fergana Valley. *Institute of Molecular Biology & Biotechnologies Transactions*, 9(1), 12–16. <https://doi.org/10.62088/timbb/9.1.2>

Payne, J., Bellmer, D., Jadeja, R., & Muriana, P. M. (2024). The potential of *Bacillus* species as probiotics in the food industry: A review. *Foods*, 13(15), 2444. <https://doi.org/10.3390/foods13152444>

Rafeeq, H., Zia, M., Shahid, M., & Khan, M. (2025). Cost-effective enzyme optimization and encapsulation from *Bacillus subtilis* for poultry feed enrichment. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7167781/v1>

Rawway, M., Ali, S., & Badawy, A. (2018). Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from different sources at Assiut Governorate (Upper Egypt). *Journal of Ecology of Health & Environment*, 6, 15–24. <https://doi.org/10.18576/jehe/060103>

Rivera, A., Rodríguez-Preval, N., Giono-Cerezo, S., & JA, S. (2020). Preservation evaluation of *Mycoplasma fermentans* in different conditions. *International Journal of Sciences*, 9(02), 24–27. <https://doi.org/10.18483/ijsci.2267>

Ruginescu, R., Gomoiu, I., Popescu, O., Cojoc, R., Neagu, S., Lucaci, A., ... & Enache, M. (2020). Bioprospecting for novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in

brackish, saline and hypersaline lakes of Romania. *Microorganisms*, 8(12), 1903. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121903>

Saegeman, V., Vos, R. D., Tebaldi, N. D., Wolf, J. v. d., Bergervoet, J., Verhaegen, J., ... & Ectors, N. (2007). Flow cytometric viability assessment and transmission electron microscopic morphological study of bacteria in glycerol. *Microscopy and Microanalysis*, 13(1), 18–29. <https://doi.org/10.1017/s1431927607070079>

Shyaula, M., Regmi, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Dhakal, A., Koirala, D., ... & Maharjan, J. (2023). Characterization of thermostable cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L isolated from the Himalayan soil. *International Journal of Microbiology*, 2023, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2023/3615757>

Sorokulova, I., Krumnow, A., Pathirana, S., Mandell, A. J., & Vodyanoy, V. (2008). Novel methods for storage stability and release of *Bacillus* spores. *Biotechnology Progress*, 24(5), 1147–1153. <https://doi.org/10.1002/btpr.22>

Sulistiyani, T. R., Kusmiati, M., & Putri, G. A. (2021). The 16S rRNA analysis and enzyme screening of *Bacillus* from rhizosphere soil of Lombok Island. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 26(4), 582–590. <https://doi.org/10.18343/jipi.26.4.582>




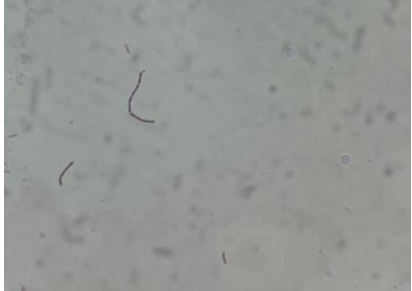


Veras, B., Santos, D., Diniz, K., Carelli, G., & Santos, E. (2018). Screening of protease, cellulase, amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain SR60. *F1000Research*, 7, 1704. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16542.1>








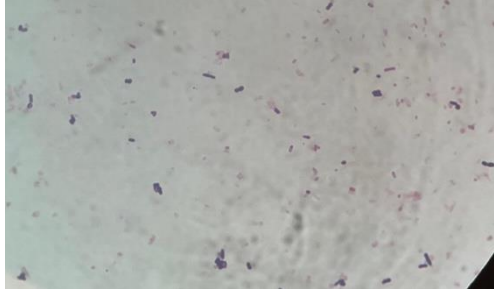

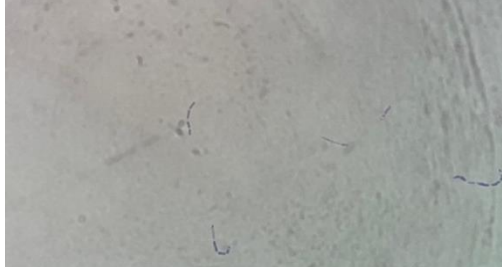
Vojcic, L., Despotović, D., Martínez, R., Maurer, K., & Schwaneberg, U. (2012). An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 487–493. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3987-2>

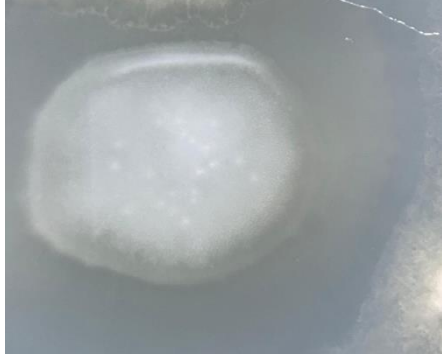
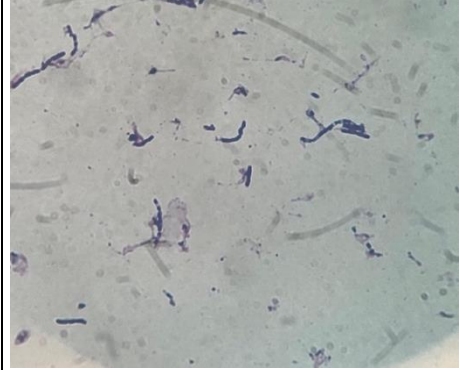

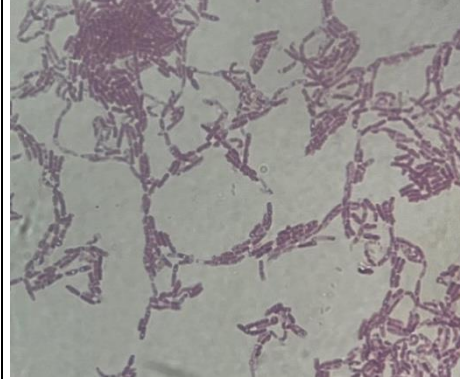

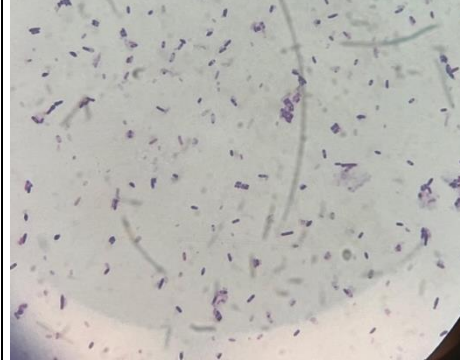

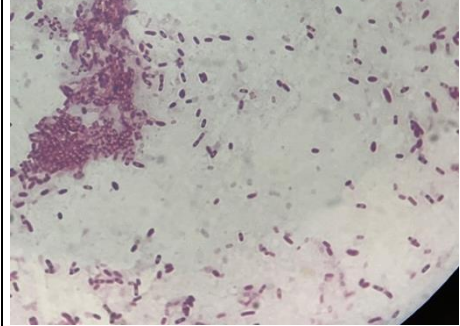
Розанов, А. С., Шеховцов, С. В., Bogacheva, N. V., Pershina, E. G., Ryapolova, A., Bytyak, D. S., ... & Peltek, S. E. (2021). Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 25(1), 125–134. <https://doi.org/10.18699/vj21.015>






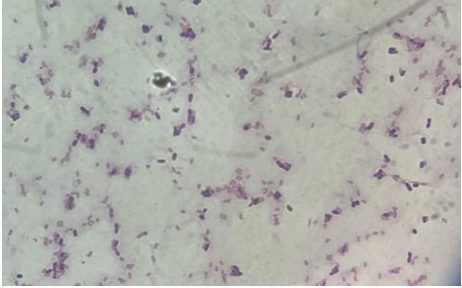
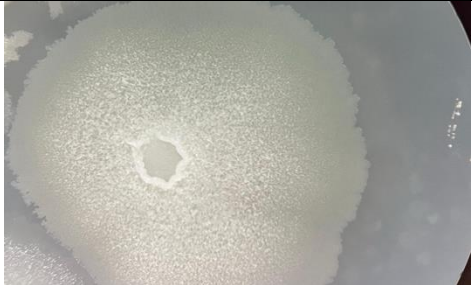
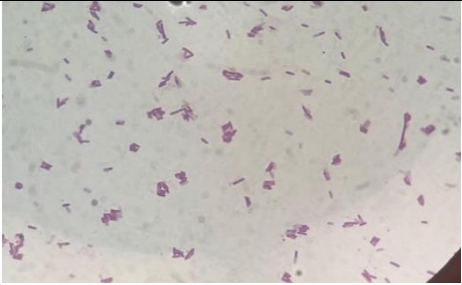
Apéndices




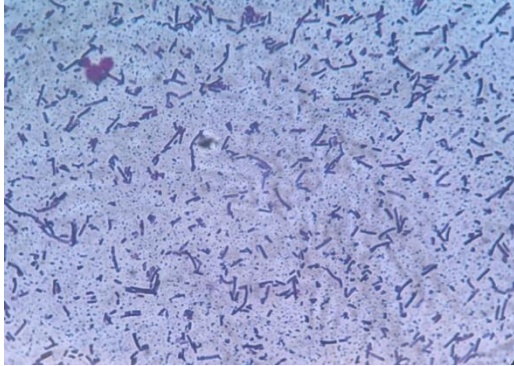

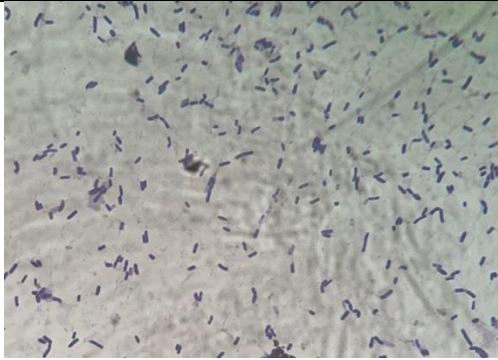

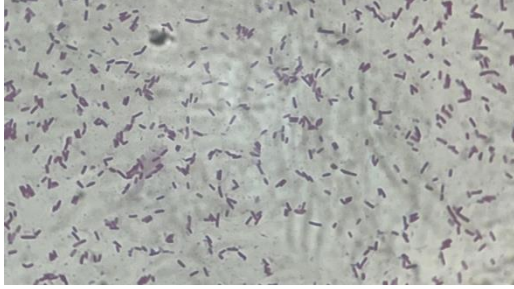
Apéndice A. Registro fotográfico a nivel macroscópico (colonias) y microscópico (tinción diferencial Gram) de las cepas del género *Bacillus*.

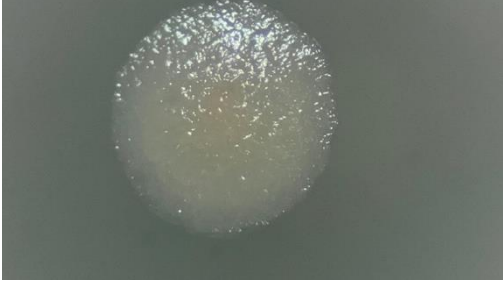
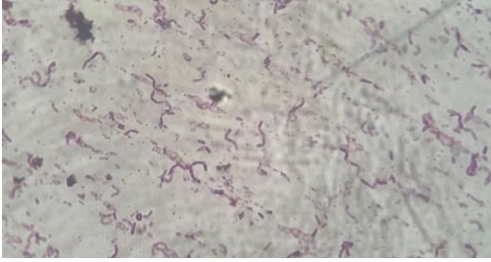
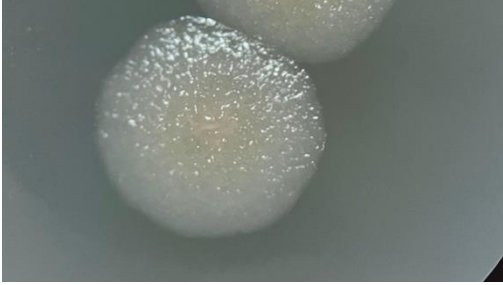
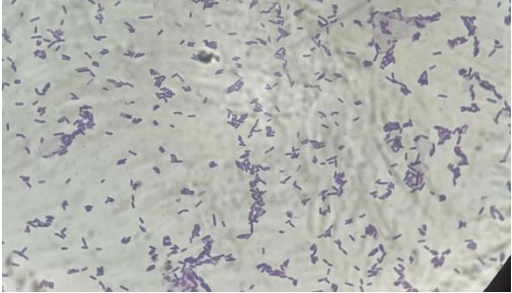

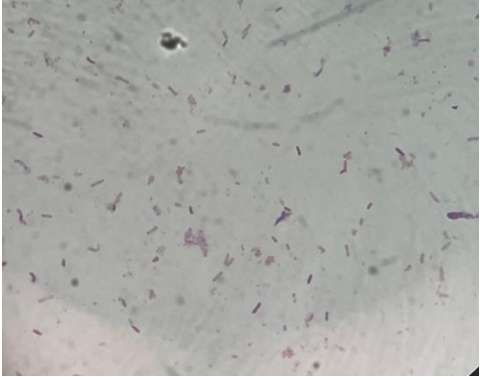

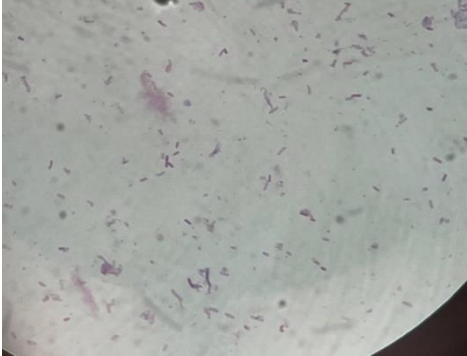
Cepa	Registro macroscópico	Registro microscópico
UIS0036		
UIS0037		
UIS0038		


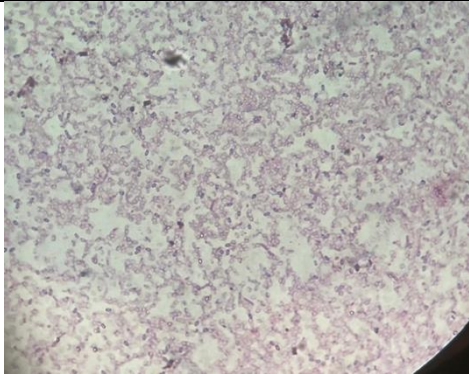

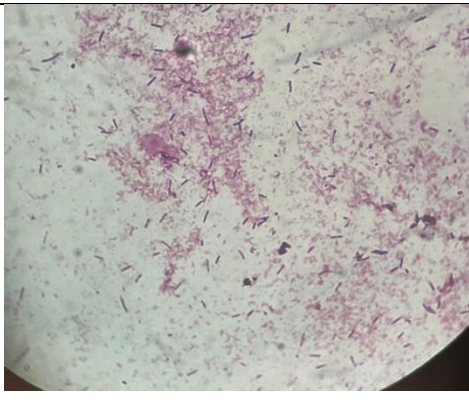
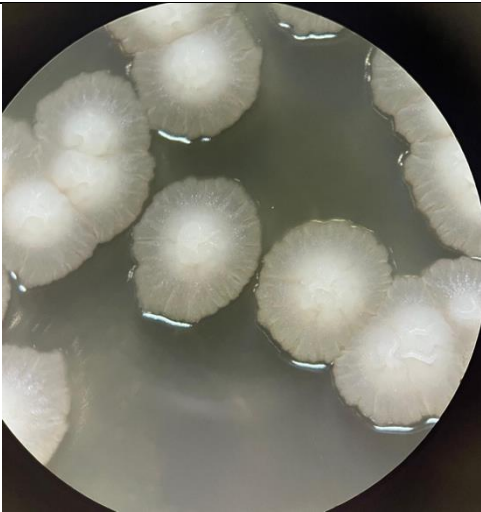
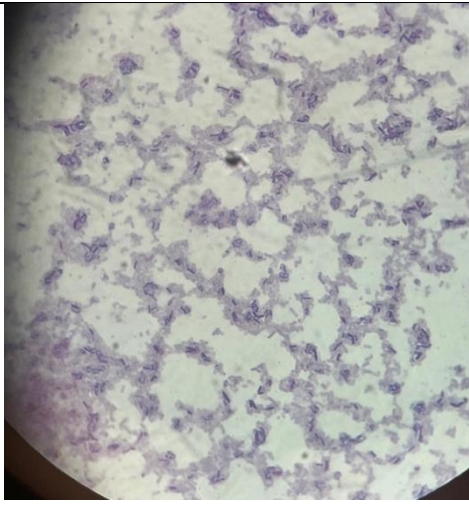
UIS0039		
UIS0040		
UIS0041		
UIS0042		
UIS0044		

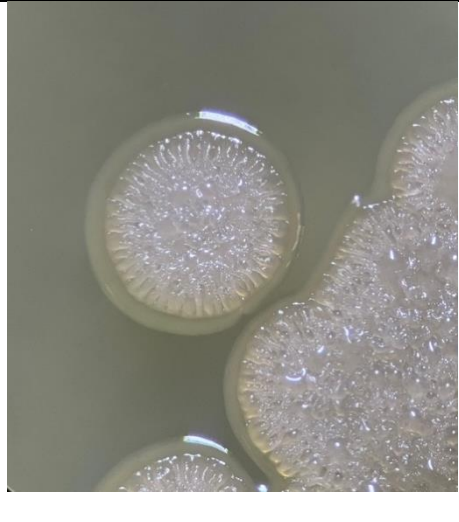
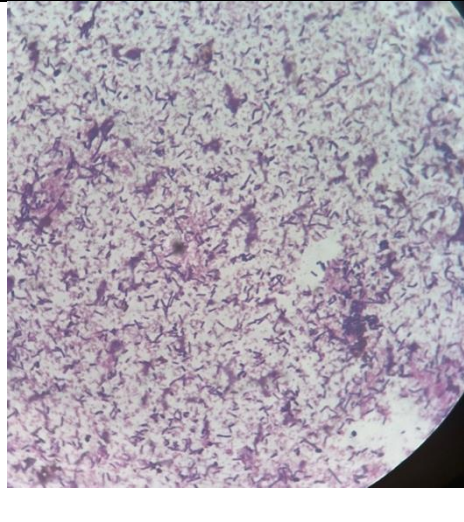

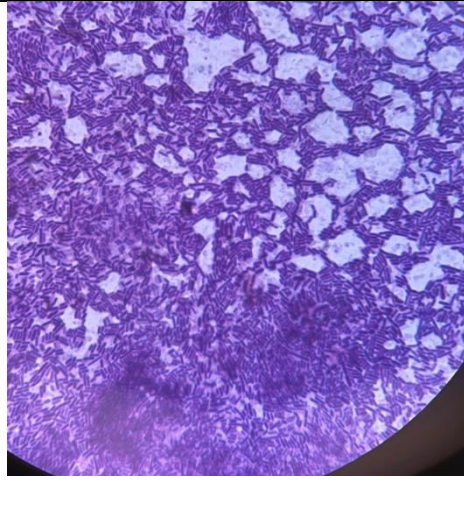
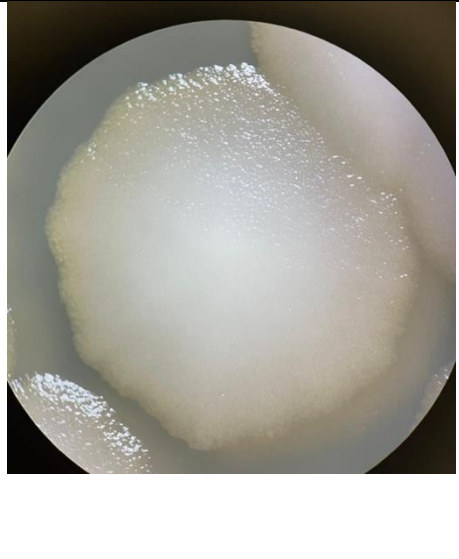

<p>UIS0046</p>		
<p>UIS0047</p>		
<p>UIS0048</p>		
<p>UIS0051</p>		

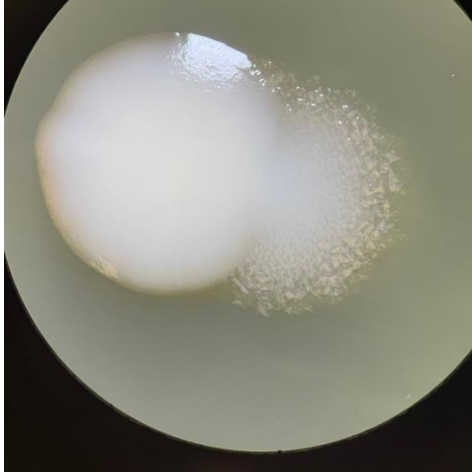
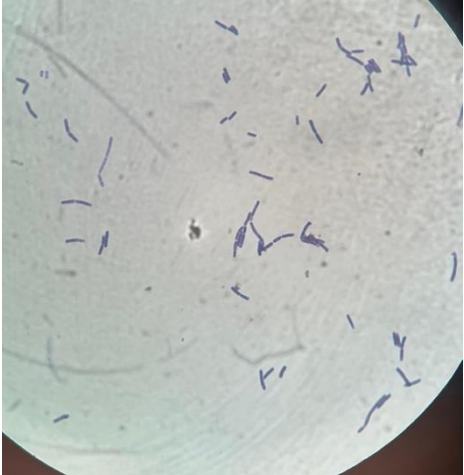
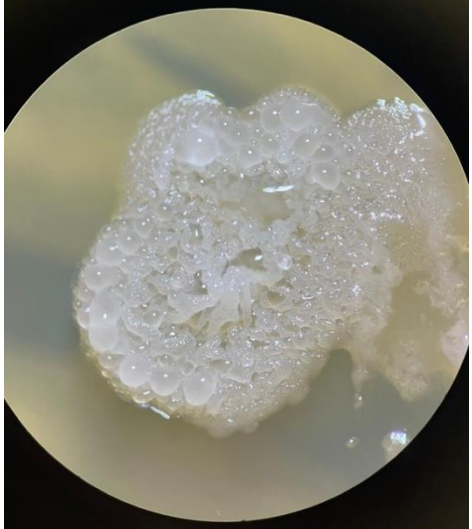
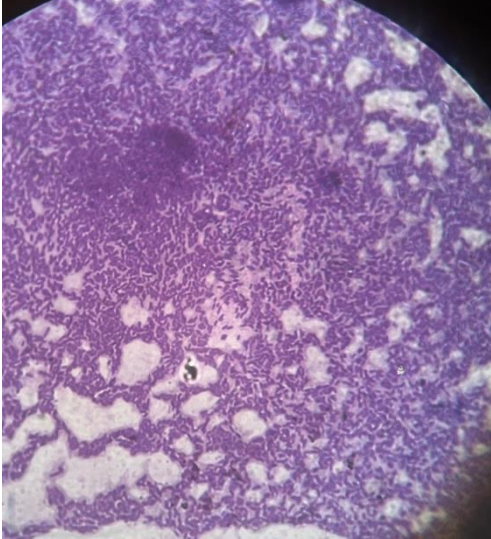

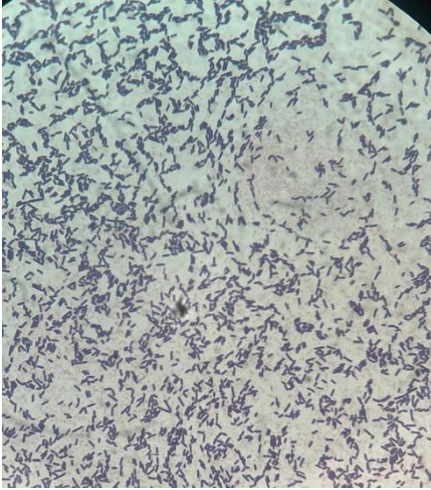
UIS0053		
UIS0055		
UIS0056		
UIS0058		

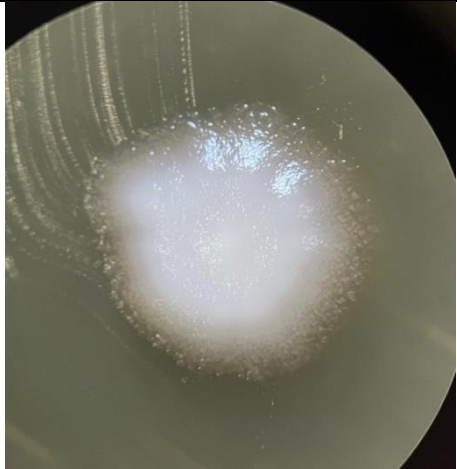
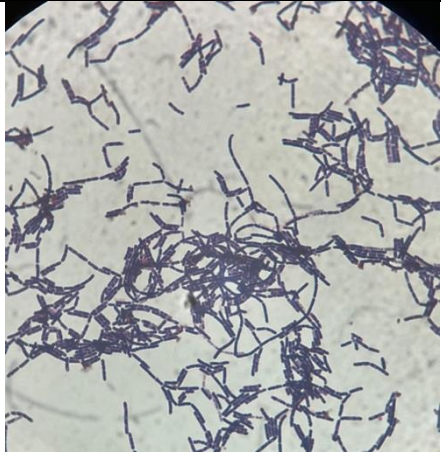
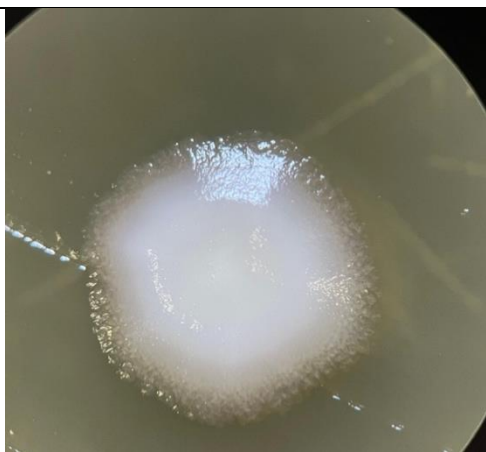
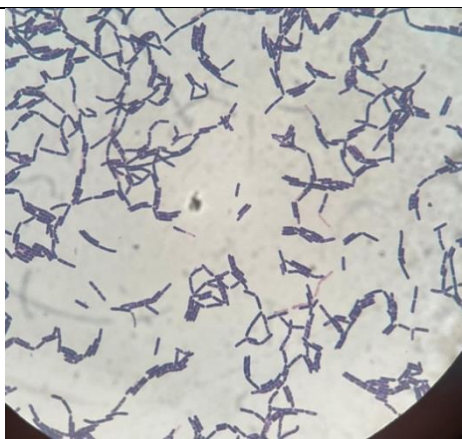

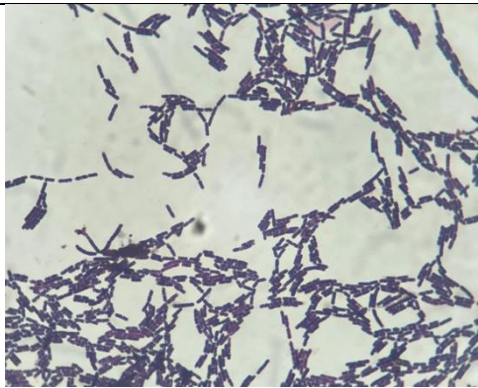
UIS0060		
UIS0062		
UIS0064		
UIS0071		

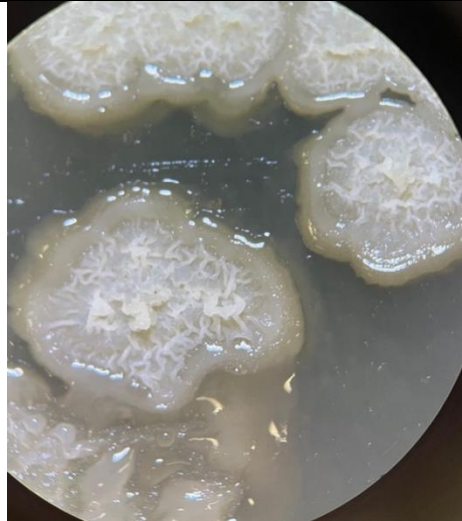
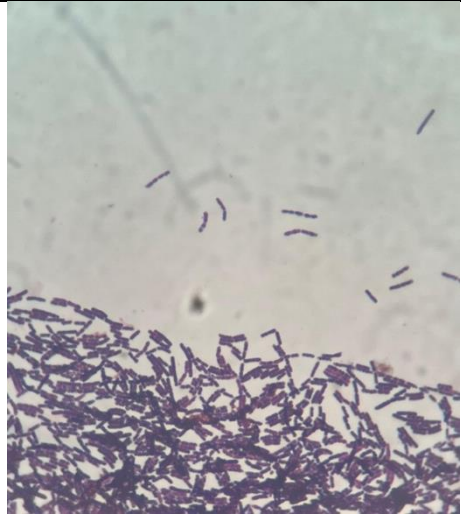
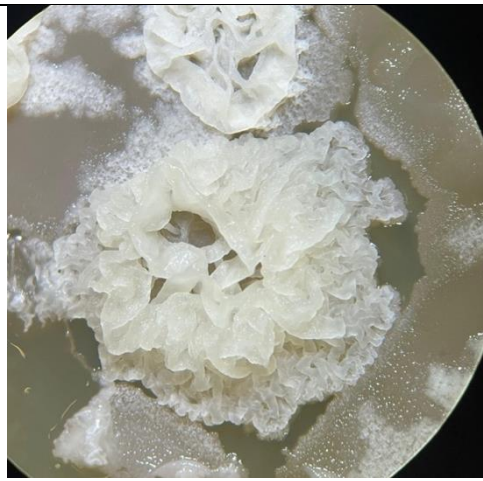
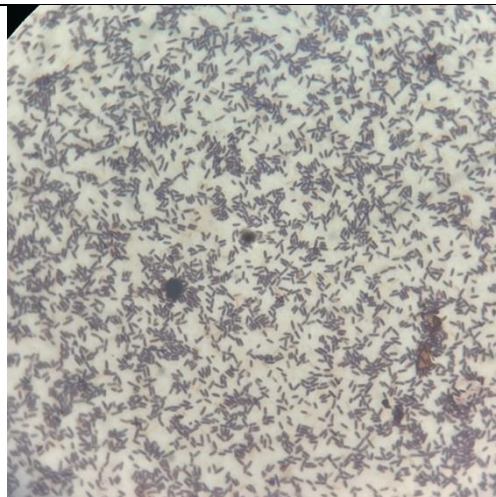
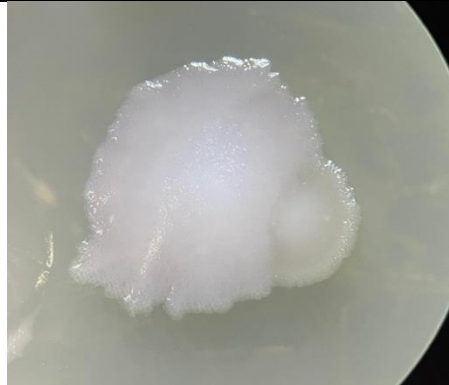
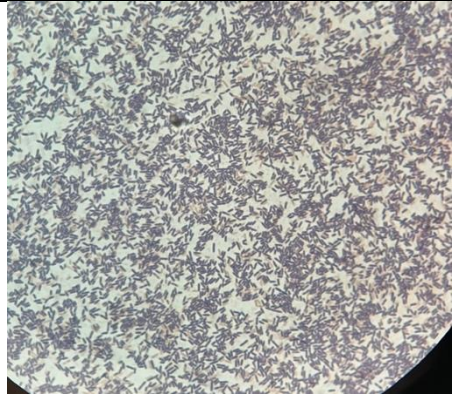
UIS0072		
UIS0073		
UIS0074		
UIS0075		


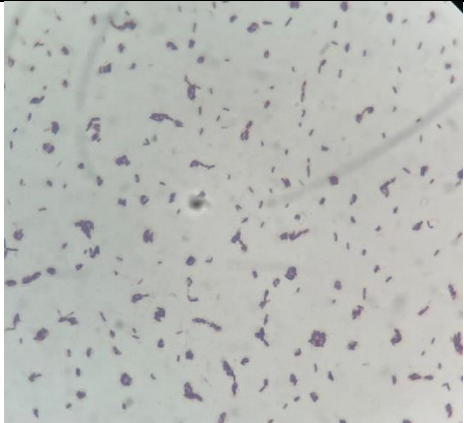
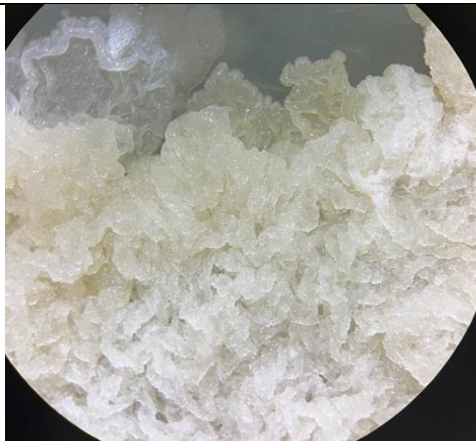
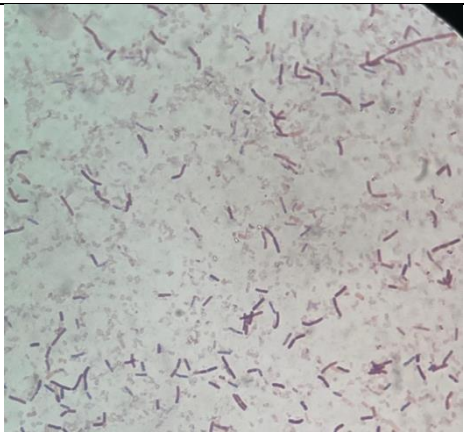
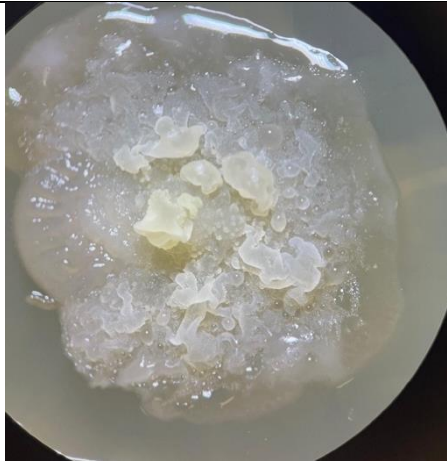
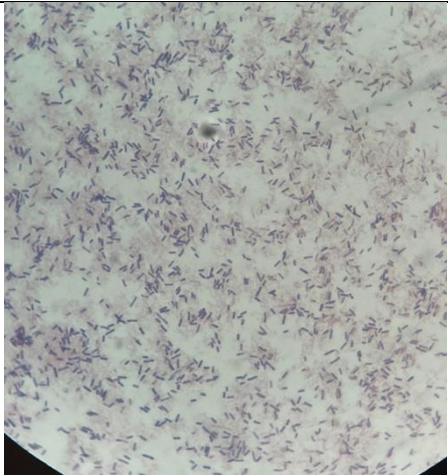
UIS0077		
UIS0078		
UIS0079		


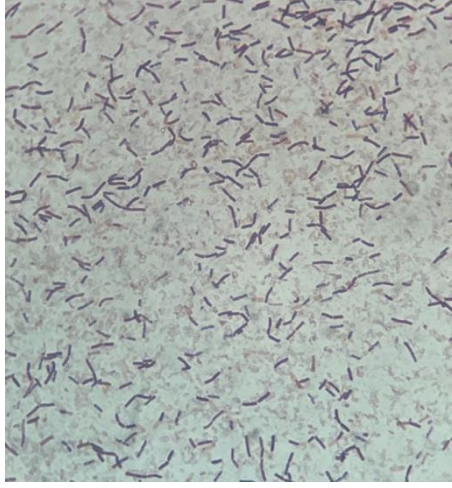


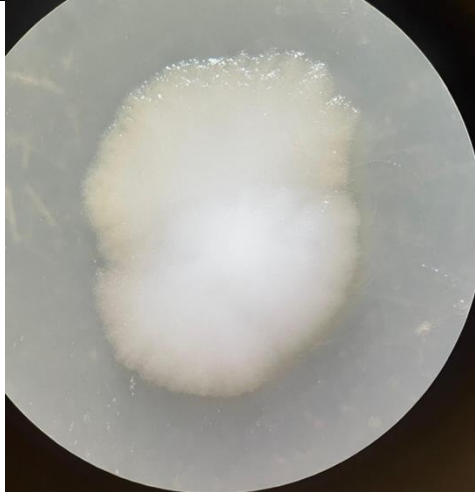
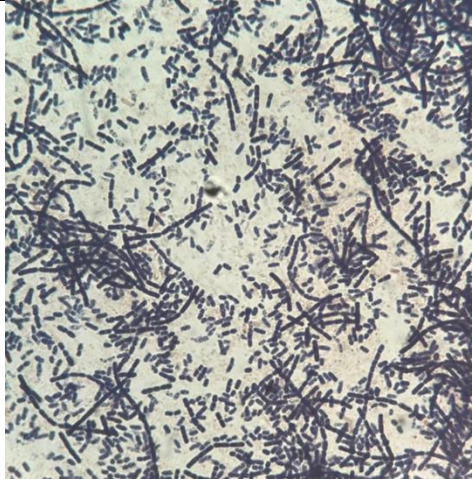
UIS0084		
UIS0085		
UIS0086		


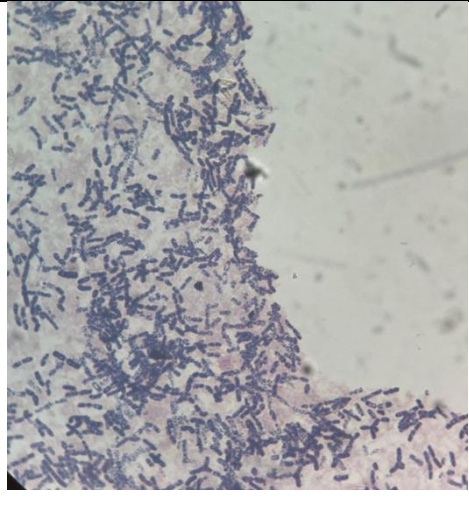

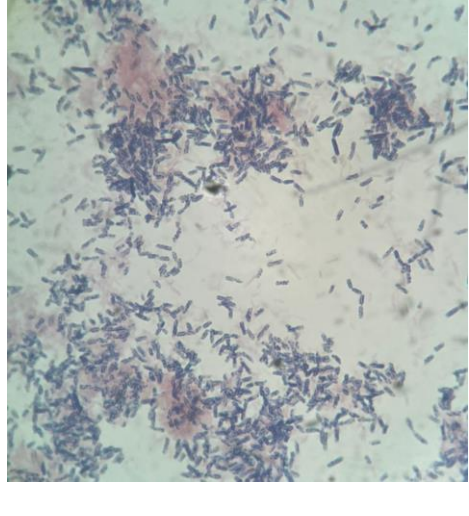

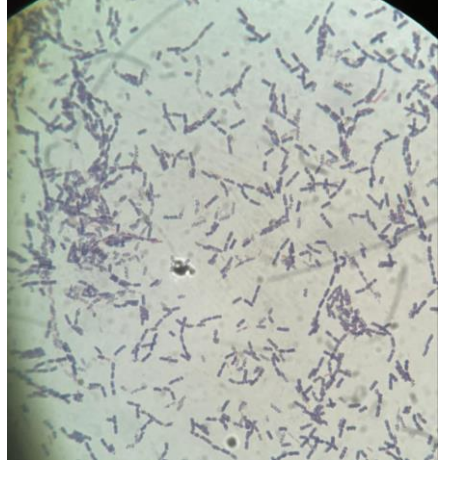
UIS0087		
UIS0088		
UIS0165		

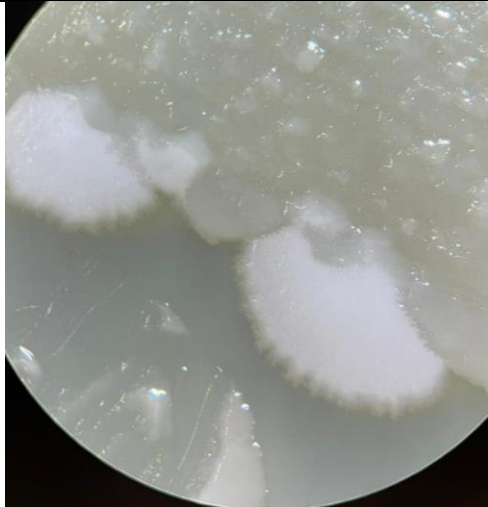
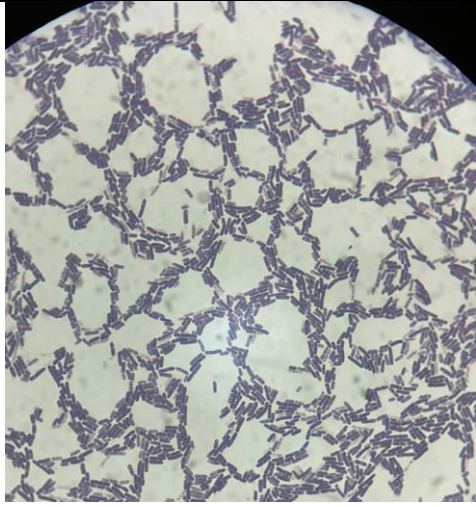
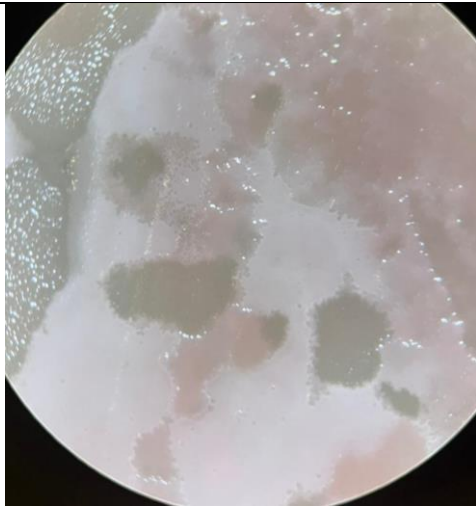

UIS0167		
UIS0175		
UIS0181		

UIS0192		
UIS0194		
UIS0195		

UIS0196		
UIS0214		
UIS0241		


UIS0242		
UIS0244		
UIS0246		


UIS0247		
UIS0253		
UIS0254		

<p>UIS0256</p>		
<p>UIS0257</p>		


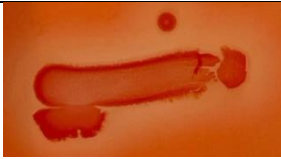




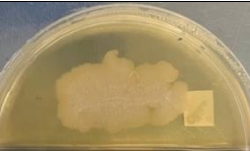



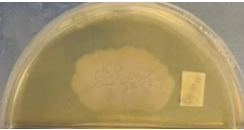
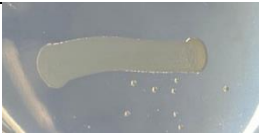

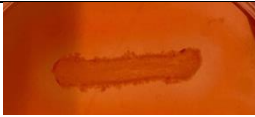
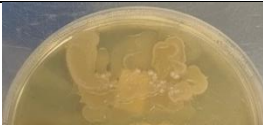













Apéndice B. Controles positivos y negativos de las pruebas de actividad enzimática evaluadas.






















Prueba	Descripción
<p data-bbox="203 422 617 453">Hidrólisis de almidón (amilasa).</p> 	<p data-bbox="831 422 1385 1104">En la división izquierda de la placa se inoculó la cepa UIS0037, observándose un halo de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano tras la adición del reactivo revelador, lo que indica actividad amilasa positiva. En la división derecha, correspondiente a la cepa UIS0084, no se evidenció zona de hidrólisis, indicando un resultado negativo bajo las condiciones evaluadas.</p>
<p data-bbox="203 1224 617 1255">Prueba de hidrólisis de celulasa.</p> 	<p data-bbox="831 1224 1409 1549">En la división izquierda de la placa se observa la cepa UIS0257, la cual presenta un resultado positivo para la actividad celulasa. En la división derecha se encuentra la cepa UIS0580, que mostró un resultado negativo.</p>






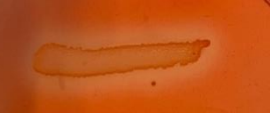

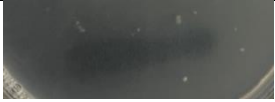
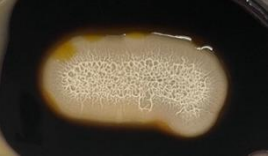
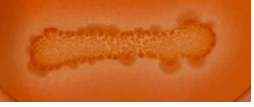





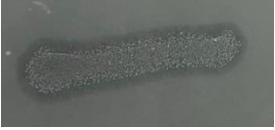
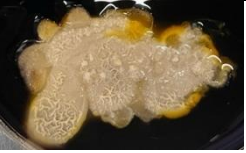



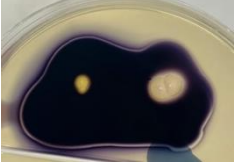
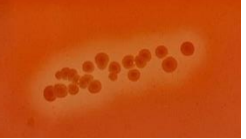



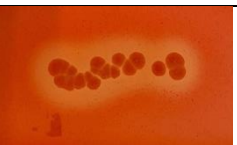
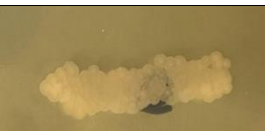
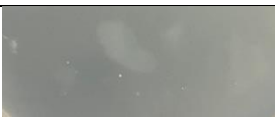




<p>Prueba de actividad DNasa.</p> 	<p>Todas las cepas evaluadas mostraron resultado negativo, ya que no se evidenció zona de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano en el medio DNasa, indicando ausencia de actividad bajo las condiciones experimentales empleadas.</p> <p>Debido a que la cepa de referencia <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592 no presentó viabilidad al momento de su reactivación, no fue posible disponer de un control positivo experimental durante la ejecución del ensayo. En consecuencia, para fines comparativos y de validación del criterio de interpretación, se utilizó una imagen de referencia previamente documentada en el manual de laboratorio, correspondiente a un resultado positivo típico (imagen superior). Asimismo, se incluyó la imagen representativa de la cepa UIS0194, la cual mostró resultado negativo (imagen inferior).</p>
--	---





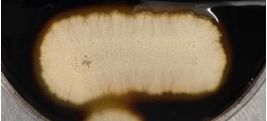




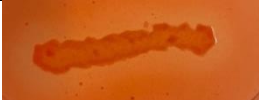



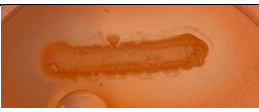
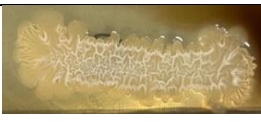
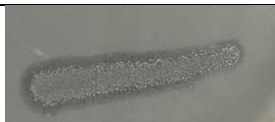



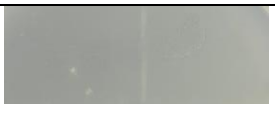



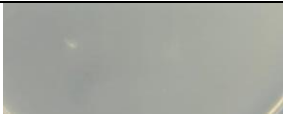



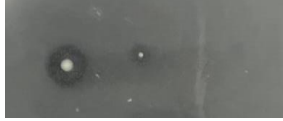






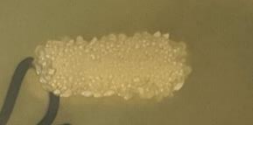

<p>Prueba de hidrólisis de gelatina (gelatinasa).</p> 	<p>En la división izquierda de la placa se inoculó la cepa UIS0167, observándose un halo de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano, lo que indica actividad gelatinasa positiva. En la división derecha, correspondiente a la cepa UIS0165, no se evidenció zona de hidrólisis, indicando un resultado negativo bajo las condiciones evaluadas.</p>
---	--









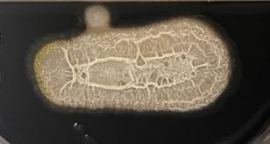


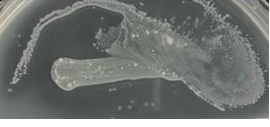

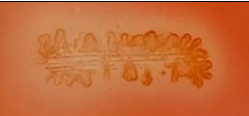



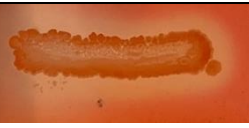


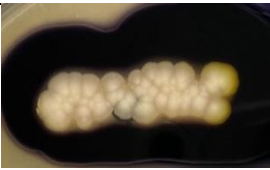

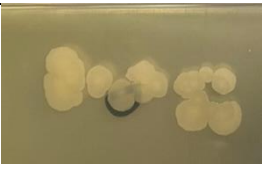



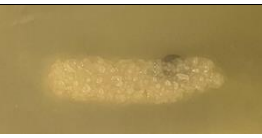
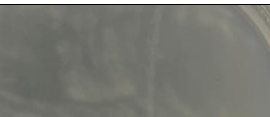




Apéndice C. Registro fotográfico resultados actividad enzimática cepas *Bacillus* para Amilasa, Celulasa, Dnasa y Gelatinasa.



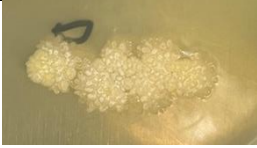
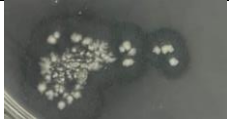
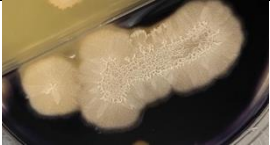



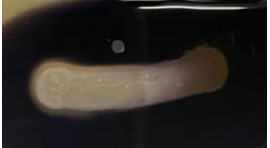

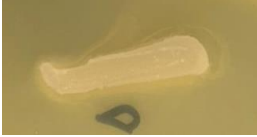
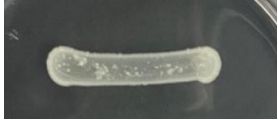

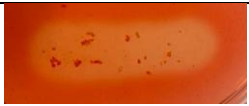

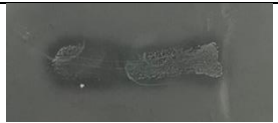


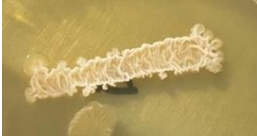

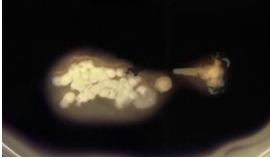
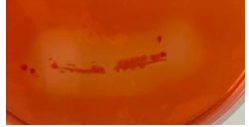

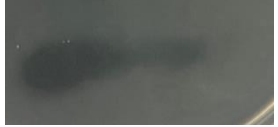








Cepa	Amilasa	Celulasa	Dnasa	Gelatinasa
UIS0036				
UIS0037				
UIS0038				
UIS0039				
UIS0040				
UIS0041				
UIS0042				

UIS0044				
UIS0046				
UIS0047				
UIS0048				
UIS0051				
UIS0053				
UIS0055				
UIS0056				
UIS0058				

UIS0060				
UIS0062				
UIS0064				
UIS0071				
UIS0072				
UIS0073				
UIS0074				
UIS0075				

UIS0077				
UIS0078				
UIS0079				
UIS0084				
UIS0085				
UIS0086				
UIS0087				
UIS0088				
UIS0165				

UIS0167				
UIS0175				
UIS0181				
UIS0192				
UIS0194				
UIS0195				
UIS0196				
UIS0214				

UIS0241				
UIS0242				
UIS0244				
UIS0246				
UIS0247				
UIS0253				
UIS0254				
UIS0256				
UIS0257	