

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ESPECIES BACTERIANAS AISLADAS
DEL CAMPO ESCUELA COLORADO Y SU PROYECCIÓN EN EL
APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS SÓLIDOS
URBANOS BIODEGRADABLES**

BLADIMIR MORANTES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRIA EN QUÍMICA AMBIENTAL BUCARAMANGA
BUCARAMANGA**

2016

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ESPECIES BACTERIANAS AISLADAS
DEL CAMPO ESCUELA COLORADO Y SU PROYECCIÓN EN EL
APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS SÓLIDOS
URBANOS BIODEGRADABLES**

BLADIMIR MORANTES APARICIO

**Trabajo de grado para optar al título de
Magister en Química Ambiental**

**Director WELLMAN RIBÓN
Bacteriólogo, Magister en Biología**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRIA EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2016

DEDICATORIA

En primer lugar, agradezco a mis padres, fuerza y motor de mi vida, quienes con su esfuerzo, dedicación y ejemplo me convierten día a día en una mejor persona y un mejor profesional.

A mi tío y amigo Juan Bastidas (QEPD), a quien debo su apoyo y sabios consejos durante las decisiones más importantes de mi vida. Estés donde estés, gracias.

Al profesor Wellman Ribón a quien agradezco profundamente darme la oportunidad de hacer parte de su equipo de trabajo, sus enseñanzas, su amistad y su respaldo ante las buenas y malas situaciones.

De igual manera agradezco al Micogrupo: Ximena, Lorena, Laurita, Yesid, Jhon y Jhoner su amistad, compañerismo, enseñanzas y momentos compartidos tanto en la labor como en la vida.

A mi amiga y colega Diana Moreno quien hizo parte de este proceso y me ha acompañado y guiado incondicionalmente durante gran parte de mi vida y a quien admiro por ser un vívido ejemplo de profesionalismo y la pujananza.

Finalmente, a la Doctora Ángela Montaña, Coordinadora de la Maestría en Química Ambiental y a los profesores que hicieron parte de este proceso formativo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 <i>OBJETIVO GENERAL</i>	21
3.2 <i>OBJETIVOS ESPECIFICOS</i>	21
4. MARCO TEORICO	22
4.1 <i>CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA BACTERIANA</i>	22
4.2 <i>MORFOLOGÍA BACTERIANA</i>	24
4.3 <i>CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA</i>	24
4.4 <i>CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA</i>	25
4.5 <i>TECNICAS DE COLORACIÓN</i>	26
4.6 <i>NUTRICIÓN BACTERIANA</i>	27
4.7 <i>ENZIMAS Y ENERGÍA</i>	28
4.8 <i>MEDIOS DE CULTIVO</i>	28
4.8.1 Pruebas y medios de cultivo convencionales para la caracterización bioquímica bacteriana	29
5. ASPECTO METODOLÓGICO	37
5.1 <i>MATERIALES</i>	37
5.2 <i>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</i>	41
5.2.1 Fase 1.	41
5.2.2 Fase 2	44
6. RESULTADOS Y DISCUSION	48

6.1	RESTABLECIMIENTO DE LA COLECCIÓN BIOLÓGICA	48
6.2	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	50
6.3	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	55
6.4	ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CORRELACIÓN CON LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	57
6.4.1	Características bioquímicas y enzimáticas generales de los sustratos evaluados	58
6.4.2.	Discusión de resultados de la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativa	60
6.4.3.	Discusión de resultados de la caracterización bioquímica de bacterias Gram positivas	62
6.4.4.	Proyección de utilidades de las cepas en el aprovechamiento de residuos orgánicos	65
7.	CONCLUSIONES	69
	BIBLIOGRAFIA	70
	ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Codificación e identificación molecular cepario CEC.	37
Tabla 2. Sustratos de composición única usados para la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas.	45
Tabla 3. Sustratos compuestos usados para la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas	46
Tabla 4. Sustratos de composición única usados para la caracterización bioquímica de bacterias Gram positivas.	47
Tabla 5. Evaluación de pureza del cepario CEC	49
Tabla 6. Características macroscópicas de las colonias del cepario CEC.	51
Tabla 7. Características microscópicas del cepario CEC.	52
Tabla 8. Resultados de la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas sobre sustratos de composición única.	55
Tabla 9. Resultados de caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas sobre sustratos compuestos.	56
Tabla 10. Resultados de la caracterización bioquímica para bacterias Gram positivas.	57
Tabla 11. Resultados de test de degradación de almidón	57
Tabla 12. Análisis de perfiles metabólicos: bacterias Gram negativas	61

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Sistema <i>BBL Crystal Enteric/No fermenter</i> , Becton Dickinson	39
Figura 2. Medios de cultivo de fabricacion <i>in house</i>	39
Figura 3. Agar MacConkey	40
Figura 4. Agar Luria Bertani	40
Figura 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> M-AI-2	53
Figura 6. <i>Microbacterium ginsengisoli</i>	53
Figura 7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Figura 8. <i>Paenibacillus hunanensis</i> FeL05	54
Figura 9. <i>Bacillus mycoides</i> C2 (G24-3)	54
Figura 10. <i>Bacillus mycoides</i> C2 (G24-3), tinción verde de malaquita, se observa en verde las esporas centrales	54
Figura 11. Principales vias de fermentacion bacteriana de azucares(Jurtshuk Jr, 1996)	58
Figura 12. Proceso de produccion de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos (Martínez-Anaya, Balcázar-López, Dantán-González, & Folch-Mallol, 2008)	62
Figura 13. Análisis de perfiles metabólicos: bacterias Gram positivas	63
Figura 14. Estructura y composicion del almidón.(Harper et al., 2004)	64
Figura 15. Representacion del mecanismo de accion de las celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y glucosidasas), el circulo blanco representa la unidad de glucosa.(Montoya, 2008).	65

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Manual de preparacion de medios de cultivo	76
Anexo B. Guia para la realización de coloraciones y tinciones para el laboratorio de bacteriologia	81

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ESPECIES BACTERIANAS AISLADAS DEL CAMPO ESCUELA COLORADO Y SU PROYECCIÓN EN EL APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS BIODEGRADABLES.*

AUTOR: BLADIMIR MORANTES **

PALABRAS CLAVE: RESIDUOS ORGANICOS, CARACTERIZACIÓN BACTERIANA, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, BIODEGRADACION.

DESCRIPCION:

Introducción: la producción de grandes cantidades de residuos sólidos urbanos se consolida actualmente como una de las mayores problemáticas ambientales debido a su efecto negativo sobre la atmosfera por emisión de gases producto de la degradación de materia orgánica, la contaminación de cuerpos hídricos por mal manejo de las basuras y daño paisajístico por la improvisación y mal manejo de rellenos sanitarios. En el Departamento de Santander, Colombia, cerca del 65 % de estos residuos están constituidos por materia orgánica la cual puede ser aprovechable en la generación de sustancias de valor agregado como biocombustibles, abonos, polímeros y plásticos. Por este motivo, los Planes de Gestión Integral de Residuos (PGIR) establecen la necesidad de buscar alternativas para el aprovechamiento de desechos en donde, la degradación microbiológica, se convierte en una alternativa eficiente, de bajo costo y amigable con el ambiente para la generación de nuevos productos.

Objetivo: realizar la caracterización bioquímica de 25 cepas bacterianas aisladas en el Departamento de Santander y a partir del análisis de sus perfiles metabólicos y enzimáticos, proyectar su posible utilidad en el aprovechamiento de residuos orgánicos

Metodología: la caracterización bioquímica se realizó usando como sustratos medios de cultivo de composición definida y kits bioquímicos comerciales. Los resultados fueron tabulados y organizados por grupo bacteriano y el análisis de proyección de utilidades se realizó mediante la revisión y análisis bibliográfico.

Resultados: Se seleccionaron 3 géneros bacterianos y se realizó la proyección de utilidades en el aprovechamiento de residuos orgánicos.

* Trabajo de grado para optar al título de Magister en Química Ambiental

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Wellman Ribón, Bacteriólogo, Magister en Biología

ABSTRACT

TITLE: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATED BACTERIA SPECIES FROM COLORADO SCHOOL FIELD AND ITS PROJECTION IN THE BIOTECHNOLOGY USE OF BIODEGRADABLE SOLID URBAN WASTE.*

AUTHOR: BLADIMIR MORANTES**

KEY WORDS: ORGANIC WASTES. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, MICROBIAL CHARACTERIZATION, BIODEGRADATION.

DESCRIPTION:

Introduction: the production of large amounts of municipal solid waste is now established as one of the biggest environmental problems due to its negative effect on the atmosphere from emissions produced by the degradation of organic matter, contamination of water bodies by mishandling garbage and landscape damage improvisation and mismanagement of landfills. In the Department of Santander, Colombia, about 65% of these wastes are composed of organic matter which can be profitable in generating value-added substances such as biofuels, fertilizers, polymers and plastics. Therefore, Plans of integral waste management (PGIR - for its acronym in Spanish) establish the need to find alternatives for the use of waste where, microbiological degradation becomes an efficient alternative, inexpensive and environmentally friendly for generating new products.

Objective: To perform the biochemical characterization of 25 bacterial strains isolated in the Department of Santander and the analysis of their metabolic and enzymatic profiles, to project its potential usefulness in the use of organic waste.

Methodology: biochemical characterization was performed using growing media as means of defined composition and commercial biochemical kits. The results were tabulated and organized by bacterial group and the profit projection analysis was conducted by analyzing and reviewing the literature.

Results: Three bacterial genera were selected and projected profits are made in the use of organic waste.

*Master thesis

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Wellman Ribón, Bacteriólogo, Magister en Biología.

INTRODUCCIÓN

Campo Colorado (CC), perteneciente a la Empresa Colombiana de Petróleos (ECOPETROL) S.A, se encuentra localizado en la cuenca del Valle Medio del Magdalena, al sureste del Municipio de Barrancabermeja y al sur del Campo La Cira.

– Infantas de Ecopetrol S.A, en jurisdicción de los municipios de San Vicente de Chucurí y Simacóta, Corregimiento Yaríma, del Departamento de Santander (Colombia).

Desde el comienzo de su vida productiva en 1945, CC mantuvo una tasa de crecimiento constante, alcanzando en el año 1961 la máxima producción de 1771 barriles de petróleo por día (BOPD). Durante la siguiente década, presentó un rápido decremento de su capacidad productiva debido a problemas mecánicos, principalmente, el taponamiento de las líneas por acúmulos de parafina, pasando de producir 692 BOPD en 1976 a 47 BOPD en 1989 y una disminución a 20 BOPD en los años subsecuentes, dando por finalizada su vida productiva.

Referido a este contexto, en el año 2006 con la firma del Convenio Interadministrativo de Cooperación Empresarial con fines Científicos y Tecnológicos entre la Universidad Industrial de Santander – UIS y ECOPETROL S.A, nace Campo Escuela Colorado (CEC), que se consolida en la actualidad como la primera experiencia academia industria del sector petrolero nacional y como un campo experimental para la formación integral de futuros profesionales.

Entre sus fortalezas de trabajo e investigación, cuenta con la línea estratégica dedicada a la mejora de la producción, que promueve la generación e

implementación de nuevas estrategias de inhibición y remediación para la formación de depósitos orgánicos e inorgánicos.

Bajo esta directriz, durante los años 2012 y 2013, el Laboratorio *Mycobacterium* de la UIS y el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) adscrito a la UIS, desarrollaron el proyecto 8710, titulado “Identificación de microorganismos con capacidad metabólica sobre depósitos orgánicos e inorgánicos con fines de optimización del aseguramiento del flujo en el Campo Escuela Colorado”, cuyo objetivo principal, fue realizar el aislamiento e identificación de microorganismos presentes en muestras ambientales empleando técnicas microbiológicas convencionales y moleculares que permitieran a corto y mediano plazo proyectar alternativas biológicas de alta efectividad, fácil manejo, bajo costo y mínimo impacto ambiental para la solución de problemas en la industria petrolera, específicamente, la remediación e inhibición de parafinas.

Como resultado de esta investigación, se obtuvo un total de 30 aislamientos microbianos entre los que se encuentran 25 cepas bacterianas tipificadas molecularmente mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de la región que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal. Los microorganismos identificados pertenecieron a los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* y *Klebsiella* entre otros, y se encuentran en estado de criopreservación en el cepario microbiológico de *Mycobacterium* Laboratorio de Investigación.

Esta tipificación molecular permite identificar con mayor exactitud diversos géneros y especies bacterianos mediante la comparación de regiones específicas de un genoma desconocido con las secuencias genéticas reportadas y almacenadas en el *GenBank* (base de datos del *National Institute of Health* Estados Unidos). En contraposición, dicha tipificación no puede ser utilizada para

obtener información sobre el comportamiento metabólico del microorganismo aislado, el cual es influenciado de manera directa por las condiciones ambientales de su hábitat.

Realizar la caracterización bioquímica y metabólica de una cepa bacteriana permite no solo establecer diferencias filogenéticas sino además, ampliar el entendimiento de los procesos por los cuales la célula realiza la captación de nutrientes, la biosíntesis de componentes celulares, sus procesos respiratorios, la división celular y en general el mantenimiento de sus funciones vitales.

El presente trabajo de aplicación tiene como finalidad caracterizar bioquímicamente 25 cepas bacterianas aisladas del CEC empleando como sustrato medios de cultivo de composición definida los cuales permitirán establecer los perfiles metabólicos de estos microorganismos y con relación a esta información proyectar su posible aplicación en el campo ambiental, específicamente, en el aprovechamiento y reúso de la fracción orgánica biodegradable de residuos sólidos urbanos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Panamericana de la Salud (PAHO) define residuo sólido urbano (RSU) como todo aquel generado en los centros poblacionales incluyendo: desechos domésticos, aquellos creados por pequeñas industrias, clínicas, hospitales, mercados, barridos de calle y residuos que se encuentran dispuestos en contenedores de basura (Martínez Arce, Daza, Tello Espinoza, Soulier Faure, & Terraza, 2010).

La alta tasa de generación de RSU se ha convertido en una de las principales problemáticas ambientales a nivel mundial. El incremento poblacional, el desarrollo económico, los malos hábitos de consumo y los cambios sociodemográficos han transformado las áreas urbanas en grandes focos de contaminación que impactan negativamente los indicadores de salud pública, afectando la calidad del aire por emisión de gases de efecto invernadero provenientes de la descomposición de la materia orgánica, la calidad del agua por vertimiento de desechos o lixiviados de las basuras y el aumento de vectores como insectos y roedores, (Ipcc, 2007).

Para el año 2012, se estimó que a nivel mundial se generaron alrededor de 1,3 billones de toneladas de RSU y se prevé que para el 2025 esta cifra alcance un aproximado de 2,2 billones de toneladas por año, representando cerca de 1,42 kg de desechos diarios por persona durante los próximos 15 años (Kreith & Tchobanoglous, 2002). La composición de estos desechos depende de manera directa de diferentes factores como la actividad económica, la cultura, las fuentes de generación de energía y las características climáticas regionales entre otras.

A nivel global, los residuos sólidos suelen estar representados en un 46 % por

material orgánico, 17% papel, 10% plásticos, 5% vidrios, 4% metales y 18% de otros materiales. Sin embargo esta distribución es diferente para los países en vía de desarrollo donde cerca del 60% de los residuos están constituidos por material orgánico (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012).

En Colombia, se considera que los residuos sólidos tienen una disposición final adecuada (DFA) cuando son recolectados por empresas prestadoras de servicio en rellenos sanitarios, celdas de contingencia y plantas de aprovechamiento. Según esta definición, en el año 2012 se estimó una DFA equivalente a 7.585.000 toneladas, lo cual representa una generación diaria de desechos promedio de toneladas de residuos sólidos en el territorio nacional (Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) & Ministerio de Ambiente y Desarrollo Territorial (MADS), 2013).

A pesar de que estas cifras indicarían que cerca del 95% de los residuos tienen una DFA, se conoce que en países en vía de desarrollo los sistemas de gestión de RSU presentan numerosas dificultades entre las que podemos mencionar: el sesgo de información (los datos de disposición de RSU proviene en su mayoría de los prestadores de servicio del sistema), carencia de herramientas de medición adecuadas para cuantificar los residuos recibidos, la falta de reporte de realización de actividades de aprovechamiento, el manejo inadecuado de los sitios disponibles para la disposición final de los residuos y la falta de planificación para la recolección y transporte de los mismos (Ramírez-Vargas, Paredes, & Guerrero, 2014).

En el Departamento de Santander, según los datos proyectados Para el 2016 en el Plan de Gestión Integral de Residuos Sólidos (PGIRS) el Área Metropolitana de Bucaramanga generará 21.132,69 toneladas mensuales de residuos de las cuales un 64% serian residuos biotransformables, 17% reciclables y el 19%

materiales como escombros y residuos incinerables, los cuales incrementarán la crisis sanitaria regional y dificultan la gestión de nuevos lugares para su DFA.

Por este motivo, las entidades gubernamentales nacionales y regionales estipulan en los planes de desarrollo sostenible la necesidad de fomentar estrategias de educación encaminadas al uso racional de los recursos, mejorar los hábitos de consumo, participar activamente en campañas de reciclaje y segregación de los residuos y paralelamente articularse con el sector educativo e industrial en la investigación y desarrollo de alternativas que permitan el aprovechamiento y reúso de los residuos orgánicos

2. JUSTIFICACIÓN

Los residuos urbanos y agroindustriales están constituidos por una gran fracción de material orgánico representando una alta disponibilidad de sustancias como carbohidratos, lípidos y proteínas. Estas características han permitido el desarrollo de nuevas tecnologías orientadas a la generación de fuentes renovables de energía y otros productos de valor agregado a partir del uso de microorganismos en un proceso denominado biorefinación (Phuong et al., 2015).

La biorefinación usa los procesos enzimáticos del metabolismo microbiano para degradar sustancias de mayor complejidad estructural a compuestos de interés comercial como combustibles, ácidos, solventes, surfactantes, polímeros y plásticos. En general, los substratos contenidos en los residuos son hidrolizados desde sustancias de alto peso molecular como almidón, amilopectinas y celulosa hasta oligosacáridos y pequeños azúcares fermentables como glucosa, maltosa, fructosa y amilosa. Esta capacidad de realizar la ruptura específica de enlaces y capacidad realizar procesos de fermentación dependerán de factores propios del desecho como su humedad (porcentaje de agua), el tamaño de las partículas, la superficie de contacto, temperatura entre otros y de manera directa de las características del factor biótico como la diversidad bacteriana presente y sus características enzimáticas individuales y conjuntas dada la presencia de consorcios microbianos.

El Laboratorio *Mycobacterium*, cuenta con un cepario de microorganismos aislados de ecosistemas terrestres y acuáticos provenientes de una zona petrolífera del Departamento y está constituido por bacterias de diferentes géneros y especies tipificados molecularmente. Sin embargo, hasta el momento se desconocen sus características bioquímicas y enzimáticas al igual que los

productos intermedios y finales de su metabolismo.

Este trabajo de aplicación se justifica en la necesidad de conocer las propiedades bioquímicas de estas cepas bacterianas permitiendo establecer perfiles metabólicos de carbohidratos y compuestos nitrogenados los cuales consoliden una primera fase para la generación de futuras investigaciones orientadas al aprovechamiento de residuos orgánicos usando microorganismos nativos del Departamento de Santander.

Por otra parte, se espera que el balance costo beneficio de conocer las capacidades metabólicas propias de los microorganismos aislados en este estudio, el descubrimiento de alternativas nuevas aplicadas a los procesos de degradación biológica de residuos y la obtención de metabolitos secundarios útiles en otros procesos de la industria, se traduzca en la fase inicial de un programa continuo de innovación de procedimientos biológicos controlados, estandarizados, útiles y auto sostenibles que generen un impacto positivo en el ambiente y contribuyan a los procesos agro industriales de nuestro departamento.

Finalmente, es importante resaltar que la planeación, ejecución y planteamiento de una idea de investigación amigable con el ambiente y potencialmente favorable para el sector empresarial, se convierte en una experiencia transcrita en grandes ventajas y amplio enriquecimiento del saber cómo profesional candidato a Magíster en Química Ambiental.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización bioquímica de especies bacterianas aisladas del Campo Escuela Colorado y proyectar su posible aplicación en el aprovechamiento de residuos sólidos urbanos biodegradables.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar la caracterización bioquímica fenotípica de 25 aislamientos bacterianos empleando medios de cultivo orientados a la evaluación de las vías metabólicas de carbohidratos y compuestos nitrogenados.
- Proyectar las capacidades metabólicas de los aislamientos bacterianos y su posible uso en el aprovechamiento de los residuos orgánicos.

4. MARCO TEORICO

4.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA BACTERIANA

Se conoce como fenotipo, toda propiedad o característica observable que se pueda relacionar directamente con la capacidad de crecimiento celular. Estas propiedades tienen en común ser fácilmente valorables y medibles sin la necesidad de técnicas o equipamiento de alto costo (Bochner, 2009).

El estudio del fenotipo microbiano, parte de las primeras observaciones microscópicas realizadas a mitad del Siglo XVII por Antonie van Leeuwenhoek, quien describió de manera gráfica, las características morfológicas de microorganismos en su hábitat natural y las influencias del ambiente sobre las mismas, proporcionando así, no solo las primeras descripciones bacterianas, sino también, los primeros estudios que más adelante se conocería como ecología microbiana (Madigan, Martinko, & Parker, 2003).

Durante los Siglos XVIII y XIX, los notables trabajos científicos de Louis Pasteur en los procesos fermentación fomentaron el desarrollo de la microbiología de alimentos y las técnicas de cultivo axénico de Robert Koch permitieron evaluar la función de los microorganismos como agentes causantes de enfermedad, donde la valoración de las características macroscópicas y microscópicas bacterianas, jugaban un rol crucial en la identificación presuntiva de agentes infecciosos. Fue hasta comienzos del Siglo XX, cuando los trabajos de los neerlandeses L.E den Dooren de Jong y Martinus Beijerinck determinaron que las bacterias podían ser distinguidas mediante ensayos de crecimiento empleando diversas fuentes de Carbono y Nitrógeno, dando paso a los primeros experimentos con cultivos enriquecidos (Atlas & Bartha, 2001).

El desarrollo de técnicas de aislamiento, cultivo y tinción de microorganismos conllevaron a la publicación del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* en 1923, permitiendo a la comunidad científica la revisión y organización sistemática de características fenotípicas bacterianas. La información actualizada y recopilada en el manual Bergey's sigue en uso en el Siglo XXI y se consolida como la fuente bibliográfica de primera mano para la identificación fenotípica de especies bacterianas (Bochner, 2009).

Las bacterias son microorganismos capaces de vivir en casi cualquier ambiente del planeta donde encuentren fuentes de nutrientes esenciales como Carbono, Nitrógeno, Oxígeno, Azufre, Fósforo e Hidrógeno para el desarrollo de sus actividades metabólicas y respiratorias. Por esto, las características del crecimiento bacteriano y por ende las características fenotípicas, dependerán de manera directa de las condiciones ambientales como la fuente de obtención de nutrientes (naturales, artificiales, tóxicas, etc.), temperatura, humedad, presión y pH entre otras (Das & Chandran, 2011).

La observación, caracterización y medición de estas variaciones fenotípicas, comprende la respuesta a tres necesidades básicas. La primera, obtener datos reales detallados de los cambios morfológicos y estructurales que sufren los organismos bajo condiciones experimentales controladas, permitiendo la organización sistémica de la información y generar modelos computacionales que permitan simular y predecir el comportamiento de los sistemas celulares. La segunda, es la necesidad de describir fenotípicamente los microorganismos con fines taxonómicos, componente que ha experimentado grandes avances gracias al desarrollo de las ciencias genómicas y las tecnologías de secuenciación masiva, permitiendo no solo describir miles de nuevas especies bacterianas y la reorganización taxonómica de las ya conocidas, si no también, realizar estudios

de asociación génica con la expresión fenotípica (Bochner, 2009).

Finalmente, la tercera necesidad, la cual hace parte del objetivo del presente trabajo, es el abordaje desde la fisiología microbiana. Las características fisiológicas medibles permiten realizar la diferenciación de especies bacterianas, identificar sus principales funciones y ampliar el entendimiento de los procesos por los cuales la célula realiza la captación de nutrientes, la biosíntesis de componentes celulares, sus procesos respiratorios, la división celular y en general el mantenimiento de sus funciones bioquímicas.

4.2 MORFOLOGÍA BACTERIANA

Las bacterias se caracterizan por ser microorganismos procariotas de tamaños y tipos morfológicos distintos, característica conocida como pleomorfismo. Su cualidad de crecer en forma de colonias, permite distinguir las diferencias entre colores, tamaños y texturas propias de cada género, lo que favorece la practicidad en su identificación a partir de una observación macroscópica inicial (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

4.3 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

La colonia, es el término que define la agrupación de bacterias que se reproducen a partir de una unidad formadora de colonia (UFC) sobre un medio de cultivo sólido. En general, estos microorganismos logran constituir una agrupación bacteriana característica de su género de acuerdo a los nutrientes disponibles en el medio de cultivo y condiciones ambientales controladas como la temperatura, pH, salinidad y atmósfera (disponibilidad de Oxígeno).

Dichas características de la colonia, suelen ser suficientemente estables en cultivos puros y permiten realizar una primera clasificación y orientar los procedimientos de diagnóstico. Una vez culminada el tiempo o período de crecimiento, una colonia puede evaluarse de acuerdo a su color; forma (circular, puntiforme, irregular o rizoide); a su grado de elevación sobre el medio de cultivo (lana, convexa o elevada) color, textura, opacidad, forma del borde, pigmentación, y presencia de actividad metabólica sobre un componente específico del medio. (Vargas Flores & Kuno Vargas, 2014).

4.4 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

La observación y análisis de las características microscópicas de un organismo son parte fundamental del que hacer del microbiólogo. Existen diferentes tipos de técnicas de microscopia que varían de acuerdo a su capacidad de aumento y resolución y al tipo, contraste y cantidad de luz o energía usada.

La microscopía óptica utiliza luz visible como fuente de iluminación permitiendo observar estructuras no inferiores a 0,2 micrómetros sobre un fondo claro. Este tipo de microscopía es el más ampliamente usado debido a su bajo costo y fácil manejo.

Usando microscopia óptica, las bacterias pueden clasificarse como: células esféricas conocidas como cocos, bacterias alargadas conocidas como bacilos y aquellas que presentan forma espiraladas denominadas espirilos.

Los cocos, presentan una morfología redonda y pueden ser clasificados de acuerdo a su agrupación como diplococos, tétradas, sarcinas o cadenas.

Los bacilos, a diferencia de los cocos, son un grupo heterogéneo debido a su variación morfológica en términos de longitud, forma, grosor o incluso, disposición de sus extremos.

4.5 TÉCNICAS DE COLORACIÓN

Las bacterias son por naturaleza células incoloras que requieren para su estudio microscópico recomendable, tinciones que mejoren su contraste y visibilidad, convirtiéndose en un procedimiento indispensable en el proceso de identificación bacteriana (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Las coloraciones de uso general pueden ser simples, diferenciales o especiales. Dentro de la primera categoría se enlistan coloraciones como el azul de metileno, que permite distinguir de manera general la presencia de bacterias y su morfología celular.

Las coloraciones de Gram y Ziehl Nielsen, se catalogan como coloraciones diferenciales y además de proporcionar color a la célula, actúan de tal manera que sus constituyentes se unen o aportan propiedades específicas según las características morfológicas del microorganismo. La coloración de Gram es la coloración más utilizada en laboratorios de investigación y laboratorios clínicos con servicios asistenciales debido a que su interpretación, permite clasificar las bacterias de acuerdo a diferencias constitutivas de su pared celular; en Gram positivas si toma color azul violeta o Gram negativas si el color varía de rosado a rojo. Las tinciones especiales permiten distinguir estructuras más definidas de la célula como la cápsula, el núcleo, los flagelos, los esporas, entre otros (Forbes, 2009).

4.6 NUTRICIÓN BACTERIANA

Como ya se mencionó anteriormente, las bacterias son microorganismos capaces de realizar reacciones químicas para la obtención de sustancias esenciales o síntesis de estructuras específicas. Estas reacciones químicas son conocidas como metabolismo, y como resultado de esta actividad metabólica se obtendrá el crecimiento bacteriano.

Las células bacterianas, además de utilizar compuestos orgánicos que sirvan como fuente de carbono para su metabolismo, precisan la degradación de nitratos y amoníaco como fuente de Nitrógeno. Ambos compuestos son fundamentales en la obtención de energía y hacen parte de las reacciones bioquímicas necesarias para la constitución de proteínas, ácidos nucleicos y la elaboración de nuevo material celular. Otros macro nutrientes como el Fósforo, Azufre, Potasio, Magnesio, Calcio y el Sodio constituyen un aporte estructural y funcional indispensable en el desarrollo de las células bacterianas. Su manera de interacción con la célula depende de su disponibilidad en la naturaleza y del metabolismo bacteriano que regula su consumo. El Hierro por su parte, es un elemento fundamental en el proceso de respiración celular y su ausencia en ambientes específicos, limita la capacidad de infección y patogenicidad de algunos géneros bacterianos.

Los micronutrientes son metales que se requieren en menor proporción comparados con los macronutrientes. El Cromo, Cobalto, Cobre y el Magnesio entre otros, desempeñan un papel importante en la función estructural de las enzimas y por lo tanto, intervienen directamente en los procesos de catálisis celular. Similar a los micronutrientes, los factores de crecimiento son generalmente vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas, necesarios solo para algunas células procariotas. La tiamina, la biotina y la piridoxina son las vitaminas

utilizadas con más frecuencia, debido a que gran parte de los microorganismos con requerimientos nutricionales complejos, responden de manera favorable a su presencia en los medios de cultivo empleados para su crecimiento (White, Drummond, & Fuqua, 2011).

4.7 ENZIMAS Y ENERGÍA

Independientemente de su nutrición, todos los microorganismos deben ser capaces de obtener energía y almacenarla en forma de ATP para desarrollar las actividades inherentes a su supervivencia. Los compuestos bioquímicos necesarios para su obtención deben estar disponibles en el ambiente y listos para ser metabolizados. La energía de activación, es definida en microbiología como la energía necesaria para hacer que todas las moléculas de una reacción química se encuentren en un estado reactivo. Sin embargo, algunas reacciones que ocurren de manera espontánea en los organismos vivos no transcurren a una velocidad adecuada sin la presencia de catalizadores.

Para lo anterior, las enzimas, son consideradas catalizadores que actúan sobre las reacciones biológicas, incrementan la velocidad de reacción sin consumirse ni interferir con la energía de activación y se caracterizan por su especificidad. Esto quiere decir que, la acción de cada enzima tiene su lugar sobre un tipo de reacción química o sobre una clase de reacciones estrictamente concernidas (Russell, 1995).

4.8 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son considerados sustancias nutritivas empleadas en el

laboratorio para favorecer el crecimiento de los microorganismos. Los medios definidos están constituidos por cantidades precisas de elementos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua destilada lo que permite conocer de manera exacta su composición. Por el contrario, los medios de cultivo no definidos se preparan con sustancias nutritivas de fácil alcance como levaduras y extractos de carne, disponibles comercialmente y fáciles de disolver. Diferente a los medios definidos, al finalizar la preparación del medio, su proporción y composición son desconocidas.

Dado lo anterior, también es posible determinar la capacidad biosintética de una bacteria puesta en crecimiento en un medio simple definido. A manera de ejemplo, una bacteria capaz de sintetizar componentes celulares y multiplicarse en un medio con una sola fuente de carbono disponible, se cataloga como un microorganismo con una capacidad biosintética óptima. En contraposición, una bacteria incapaz de crecer en un medio simple definido y que requiere factores de crecimiento para alcanzar su desarrollo, constituye un microorganismo con requerimientos nutricionales complejos y por lo tanto, una capacidad biosintética limitada. De esta manera, conocer sus exigencias metabólicas permite predecir con mayor precisión un conjunto de ingredientes nutricionales adecuados para la preparación de un medio de cultivo que busca favorecer su crecimiento (Koneman & Allen, 2008).

4.8.1 Pruebas y medios de cultivo convencionales para la caracterización bioquímica bacteriana

4.8.1.1 Enzimas asociadas a la respiración.

- **Prueba de Oxidasa**

Determina la producción de alguna de las enzimas citocromo c oxidasas las cuales median el traspaso de electrones al Oxígeno (aceptor final) formando como producto agua. Estos citocromos son propios de bacterias aerobias o anaerobias facultativas, es decir, organismos capaces de desarrollarse y crecer en la presencia de Oxígeno (Surhone, Timpdon, & Marseken, 2010).

- **Prueba de la catalase**

Evalúa la presencia de la enzima catalasa, la cual descompone peróxido de Hidrógeno en agua y Oxígeno. El peróxido, producto oxidativo de la degradación de azúcares, es un compuesto que produce alta toxicidad y muerte celular. Esta enzima se encuentra en bacterias aerobias o anaerobias facultativas que poseen citocromos (Surhone et al., 2010).

4.8.1.2 Caracterización de uso y vías metabólicas de carbohidratos.

- **Agar hierro triple azúcar (TSI)**

Medio de cultivo diferencial que tiene como fin evaluar la fermentación de hidratos de carbono y la producción de ácido sulfhídrico. Este medio contiene glucosa en una concentración de 0,1%, lactosa y sacarosa en concentración del 1%. El medio evalúa la capacidad del microorganismo de fermentar exclusivamente la glucosa o la capacidad de usar además la lactosa y/o sacarosa generando o no CO₂ y H₂.

Estos procesos de fermentación se producen por vía aeróbica en el pico de flauta del medio de cultivo o por vía anaeróbica en el fondo del tubo. El catabolismo de la glucosa se da inicialmente en el ciclo anaeróbico de Embden-Meyerhof, resultando en la formación de ácido pirúvico, intermediario que posteriormente entrará al Ciclo de Krebs en las bacterias aerobias o anaerobias facultativas obteniendo como producto final CO₂, agua y energía.

La fermentación de disacáridos permite inferir la formación de productos intermediarios y la acción de enzimas específicas como la β -galactosidasa, necesaria en la degradación de la lactosa.

El proceso metabólico anaeróbico de la glucosa a través del Ciclo de Embden-Meyerhof permite predecir que la bacteria tendrá como productos finales estables ácido láctico u otros ácidos orgánicos, además de aldehídos, alcoholes y CO₂ (Cappuccino & Sherman, 2013).

- Agar citrato de Simmons

Permite evaluar la capacidad de un microorganismo de usar el citrato como única fuente de carbón. El metabolismo del citrato realizado por algunas bacterias se realiza por el Ciclo de Krebs y requiere el desdoblamiento del citrato por la enzima citritasa (citrato-oxalacetato-liasa o citrato desmolasa). La enzima requiere un catión bivalente como el Magnesio o Manganeseo.

La citritasa actúa sobre el citrato produciendo ácido oxalacético y acetato; productos que son convertidos enzimáticamente a piruvato y dióxido de carbono. Durante esta reacción el medio comienza a alcalinizarse por el CO₂ que se genera, el cual se combina con el agua y el sodio para formar carbonato un producto alcalino, este carbonato da la alcalinidad que produce el cambio de

color del indicador de pH del medio de verde a azul prusia oscuro (indicador: azul de bromotimol, amarillo a pH < de 6.0 y azul a pH > de 7.6) (MacFaddin, 2003).

- Prueba del rojo de metilo- Voges Proskauer

La utilización de rojo de metilo como indicador de pH permite medir la capacidad de los microorganismos de generar y mantener estables los productos ácidos de la fermentación de la glucosa.

Diferentes microorganismos, producirán diferentes concentraciones de hidrogeniones debido a variaciones en las enzimas que participan en el metabolismo del ácido pirúvico. Aquellos microorganismos catalogados como rojo de metilo positivo, mantendrán constante la producción de ácidos después de 2 a 5 días de incubación, generando como resultado un pH bajo terminal (4 o menos), sobrepasando el sistema amortiguador de fosfato.

Las bacterias rojo de metilo negativo, producirán de igual manera ácidos con una producción menor de hidrogeniones que producirán una reversión del medio de cultivo hacia la neutralidad.

Por debajo de un pH de 6,3 el ácido acético es convertido a acetoína y 2,3-butanediol, productos finales neutros de la degradación de glucosa en condiciones aerobias, determinados en el Test de Voges-Proskauer (Dart & Services, 1996).

- Prueba del malonáto

Determina la capacidad bacteriana de usar el ácido malónico como única fuente

de carbono al ejercer inhibición en el proceso de oxidación del ácido succínico inactivando la enzima succinato-deshidrogenasa.

Este proceso conduce a una acumulación de ácido succínico, interrumpe el Ciclo de Krebs y la producción de energía, ocasionando la muerte a las bacterias incapaces de utilizar el malonato como fuente de carbono en sus procesos metabólicos.

- Reacciones de Oxido / Fermentación

Las pruebas de Oxido/ Fermentación (OF) permiten determinar el metabolismo energético de un microorganismo. El ensayo realizado en tubos abiertos proporciona un ambiente aerobio y da lugar al mecanismo de oxidación o respiración. Contrario a lo anterior, el uso de tubos sellados generalmente con parafina, proporciona un ambiente anaerobio dando lugar al proceso de fermentación. De igual manera, pueden emplearse varios carbohidratos como sustrato principal de la reacción, entre los más frecuentes la glucosa, la lactosa y la sacarosa.

Las bacterias aerobias y oxidativas inoculadas en el tubo abierto, metabolizan la glucosa convirtiéndola en CO₂, por lo cual el viraje del indicador (azul de bromotimol) a un pigmento amarillo por la presencia del ácido, se empieza a evidenciar en la superficie del medio. Aquellas bacterias sembradas en el tubo cerrado no tienen la capacidad de metabolizar el sustrato en ausencia de oxígeno y el color del medio permanece azul-verdoso.

Las bacterias fermentadoras pueden metabolizar la glucosa en ambos tubos de ensayo. El viraje de color azul-verdoso a amarillo se observa notoriamente en el tubo cerrado dadas las condiciones óptimas de anaerobiosis y se observa en el

fondo del tubo abierto.

Las bacterias incapaces de metabolizar la glucosa no producen viraje del indicador de color azul verdoso en el tubo cerrado. Sin embargo, en condiciones aerobias, algunas de estas bacterias son capaces de metabolizar la peptona presente en el medio de cultivo, originando aminoácidos que alcalinizan el medio y producen una coloración azul más intensa que la observada en el tubo cerrado (Koneman & Allen, 2008).

4.8.1.3 Caracterización de uso y vías metabólicas de compuestos nitrogenados

- Agar hierro-lisina (LIA)

En principio, este medio de cultivo permite medir la capacidad enzimática de un microorganismo para producir enzimas decarboxilasas, desaminasas y la producción de H₂S.

Las carboxilásas permiten atacar un aminoácido (lisina) en su extremo carboxilo, dando lugar a la formación de aminas, diaminas y CO₂ generando alcalinidad en el medio de cultivo en condiciones anaeróbicas. Las desaminasas permiten la extracción del grupo amino de la lisina para formar un cetoácido en condiciones oxidativas y la producción de H₂S esta mediada por la capacidad del microorganismo de metabolizar las sales de hierro (Brooks, Butel, & Morse, 2007).

- Agar sulfuro-indol-motilidad (SIM)

La siembra en agar SIM tiene como objetivo principal determinar la habilidad del

microorganismo de realizar la desaminación reductiva del triptófano generando indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. La reacción está catalizada por la enzima triptofanasa que ataca la molécula de triptófano en su cadena lateral sin alterar su anillo aromático.

El ácido pirúvico generado será metabolizado vía glucólisis o Ciclo de Krebs y el amoníaco usado en el anabolismo de aminoácidos.

Las cepas móviles podrán ser detectadas en el medio por turbidez cercana al sitio de punción de la siembra y la producción de H₂S será observable por la producción de un precipitado negro a partir del tiosulfato presente en el medio (MacFaddin, 2003).

- Prueba de reducción de nitrato

Permite determinar la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato en nitritos o Nitrógeno libre. Este proceso de reducción se da bajo condiciones anaeróbicas y puede generar como productos, nitritos, nitrógeno molecular, óxido nitroso, óxido nítrico, amoníaco o hidroxilamina. La formación de un producto u otro dependerá de la especie bacteriana que metabolice el nitrato (Cappuccino & Sherman, 2013).

- Prueba de la fenilalanina-desaminasa (PPA)

Esta prueba permite determinar la capacidad enzimática bacteriana para realizar la desaminación oxidativa del aminoácido aromático fenilalanina generando como producto un cetoácido (ácido fenilpirúvico) y amoníaco libre. Esta prueba permite evidenciar el catabolismo de compuestos nitrogenados orgánicos y su mineralización a nitrógeno inorgánico.

- **Prueba de la urease**

La ureasa es una importante enzima asociada con la descomposición de compuestos orgánicos a nivel extracelular. La reacción de la ureasa permite determinar y diferenciar los microorganismos con capacidad de hidrolizar la urea formando dos moléculas de amoníaco que posteriormente puede ser fijado y convertido en compuestos nitrogenados orgánicos por la vía metabólica del glutamato o la glutamina.

5. ASPECTO METODOLÓGICO

5.1 MATERIALES

- Cepas bacterianas

Durante la realización de este trabajo se usaron las cepas bacterianas pertenecientes a la colección biológica del CEC las cuales se encontraban preservadas a -70 °C en el cepario de *Mycobacterium* Laboratorio de Investigación, las cepas se encuentran identificadas y codificadas según la información relacionada en la tabla 1:

Tabla 1. Codificación e identificación molecular cepario CEC.

Código	Identificación molecular
w67-1	<i>Pseudomonas balearica</i> OAct420
w67-2	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> QD-3
w01-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01
w01-2	<i>Staphylococcus sciuri</i>
A02-3	<i>Acinetobacter radioresistens</i> WC-A-157
wp67-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-AI-2
wp67-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
wp67-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
G23-1	<i>Aeromonas taiwanensis</i>
G23-2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
G23-3	<i>Pseudomonas sp.</i>
G23-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
G24-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
G24-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AMAAS226
G24-3	<i>Bacillus mycoides</i> C2
G24-4	<i>Pseudomonas sp.</i>
GH24-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> K30
GH24-2	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Amb23-1	<i>Paenibacillus hunanensis</i> FeL05
Amb23-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> EH73
Amb23-3	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>
Amb23-4	<i>Paenibacillus bacterium</i>
Amb24-1	<i>Acinetobacter radioresistens</i> WC-A-157
Amb24-2	<i>Brevibacterium sp.</i>
Amb24-3	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>

- **Cepas de referencia**

Durante el montaje y desarrollo del estudio se usaron como controles de calidad para los medios de cultivo las cepas de referencia provenientes de aislamientos clínicos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* pertenecientes al cepario de la EM-UIS.

- **Sustratos**

Se usaron como sustratos medios de cultivo (*In house*) de composición definida y sustratos bioquímicos y enzimáticos comerciales deshidratados BBL Crystal E/NF ID y BBL Crystal GP ID de la casa comercial Becton Dickinson.

Tanto los sustratos *in house* como los comerciales tienen como fundamento la utilización de sustancias específicas presentes en el medio, las cuales al exponerse a un inóculo del microorganismo y ser sometidas a un periodo de incubación permiten la detección de enzimas utilizadas en los procesos metabólicos. Estas reacciones de fermentación, oxidación, reducción, degradación o hidrólisis, son fácilmente observables gracias a la utilización de sustancias cromógenas o fluorescentes que detectan cambios en el pH o la unión de metabolitos intermedios o finales a diferentes sistemas indicadores.



Figura 1. Sistema *BBL Crystal Enteric/No fermenter*, Becton Dickinson

Los medios de cultivo *in house* fueron elaborados de acuerdo a los parámetros establecidos en los protocolos del manual de preparación de medios de cultivo de la Escuela de Microbiología-UIS y se encuentran relacionados en el anexo 1.



Figura 2: Medios de cultivo de fabricacion *in house*

- **Medios de cultivo**

Se usarán placas de Agar Luria Bertani elaborados según el manual de preparación de medios de cultivo de la EM-UIS (ver anexo 1) para la reactivación y repique del cepario hasta garantizar sus condiciones de pureza y placas de Agar MacConkey para la clasificación de bacterias Gram negativas.



Figura 3. Agar MacConkey

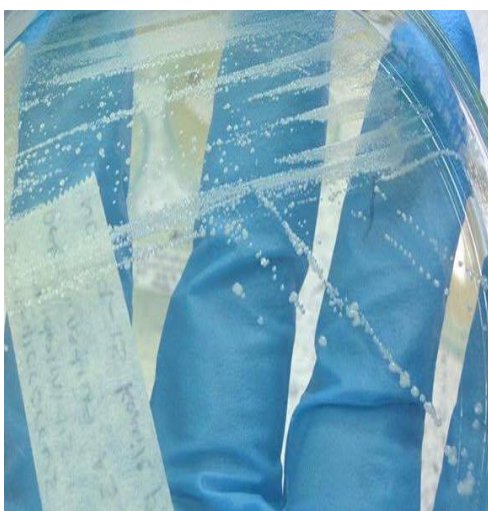


Figura 4. Agar Luria Bertani

5.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación se describen las etapas y actividades que se realizaron durante el desarrollo de este trabajo:

5.2.1 Fase 1.

Durante la primera fase de este trabajo se realizaron las siguientes actividades, las cuales estaban orientadas al cumplimiento del primer objetivo específico.

5.2.1.1 Actividad 1: restablecimiento de la colección biológica.

a) Desciopreservación escalonada

Se realizó la descongelación escalonada del cepario CEC según los parámetros establecidos en el protocolo de procedimientos de *Mycobacterium* Laboratorio de Investigación de la EM- UIS, pasando las cepas de congelación a -70°C a -20° C por una hora, 4°C durante un periodo de 30 minutos y finalmente a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se sembraron 100 microlitros de inóculo en placas de agar nutritivo realizando extensión sobre la placa con asa de drigalsky con el fin de evaluar la viabilidad de la cepa. Las placas fueron incubadas a 28 °C y se verificó que se presentara crecimiento a las 18, 24 y 48 horas posteriores.

b) Verificación de pureza de las cepas

De los cultivos iniciales se realizaron repiques por estriamiento en placas de agar

nutritivo y se incubaron nuevamente a 28°C verificando crecimiento a las 18, 24 y 48 horas.

Cumplido el tiempo de incubación se verificó la presencia de un solo tipo de colonia en el cultivo realizando observación en el estereoscopio. Estos dos criterios (tiempo de incubación y un solo tipo de morfología) se tomaron como indicadores para proseguir al procedimiento de caracterización macroscópica y microscópica. En caso de presentarse contaminación de la cepa se procedió a realizar la descrippreservación de un nuevo vial hasta garantizar la pureza del cultivo. De observarse nuevamente la presencia del contaminante, se realizaría el aislamiento de las colonias hasta garantizar la completa pureza del cultivo.

5.2.1.2 *Actividad 2: caracterización morfológica.*

Una vez garantizadas las condiciones de pureza se prosiguió a realizar la evaluación de las siguientes características:

a) Caracterización macroscópica:

Se realizó la observación de las cajas de agar nutritivo en estereoscopio y se evaluaron los siguientes parámetros:

- Color
- Tamaño: diámetro en milímetros (mm).
- Forma: puntiforme, circular, filamentosa, ameboide, alargada o fusiforme.
- Elevación: plana, elevada, convexa, pulvinada y umbonada.
- Borde: entero, ondulado, lobulado, filamentosa, enrollado o festoneado.
- Superficie: lisa o rugosa.

- Densidad: transparente, opaca.
- Consistencia: butirosa o blanda, dura o friable

b) Caracterización microscópica:

Para la evaluación de las características microscópicas se realizaron tinción de Gram y coloración con verde de malaquita para la observación de endosporas según los protocolos descritos en el anexo 2.

Realizadas las coloraciones se evaluaron las siguientes características:

- Morfología: cocos, bacilos o cocobacilos.
- Tinción de Gram: positivo o negative.
- Tinción verde de malaquita: presencia y posición de la endospora.

5.2.1.3 Actividad 3: Caracterización bioquímica. Para la realización de la evaluación bioquímica se repicaron previamente las cepas teniendo en cuenta el tiempo y las condiciones óptimas de crecimiento evaluadas en la Actividad 1.b.

Para la inoculación de los medios sólidos o semisólidos se usaron de 1 a 2 colonias jóvenes directamente de una placa de agar nutritivo. Para la inoculación de los medios deshidratados se preparó a partir de un cultivo solido una suspensión bacteriana en fluido de inóculo (FI) BBL Crystal, depositando varias colonias y agitando en agitación mecánica de 10 a 15 segundos hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland. Las pruebas bioquímicas fueron incubadas a 30°C por un periodo de 18 a 24 horas y las lecturas realizadas en los siguientes 30 minutos.

Los sustratos utilizados para la caracterización bioquímica de bacterias Gram

negativas se relacionan en las tablas 2 y 3 y los empleados para las bacterias Gram positivas en la tabla 4.

5.2.2 Fase 2. Las actividades realizadas en esta fase comprenden la organización de la información y el análisis de resultados orientado al cumplimiento del segundo objetivo específico.

5.2.2.1 Actividad 4: Análisis de información. Se realizó la tabulación y elaboración de una base de datos en Microsoft Excel la cual contiene los resultados por grupo de microorganismo (Gram negativos o Gram positivos) de las características bioquímicas evaluadas.

Partiendo de esta información se seleccionaron la(s) cepa(s) con la mayor cantidad de pruebas positivas para realizar el estudio de proyección de utilidades.

5.2.2.2 Actividad 5: proyección de posibles aplicaciones en el aprovechamiento de residuos orgánicos. Se realizó una revisión bibliográfica en la cual se relacionó los géneros bacterianos seleccionados en el numeral anterior y partiendo de sus perfiles metabólicos se correlacionó la información con casos específicos de su aplicación en el aprovechamiento de residuos orgánicos, específicamente en temáticas de generación de biocombustibles, alternativas de compostaje y elaboración de bioproductos.

Tabla 2: Sustratos de composición única usados para la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas.

Metabolismo de carbohidratos				
Sustrato	Codigo	Positivo	Negativo	Fundamento
Arabinosa	ARA	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	La utilizacion de carbohidratos causa un descenso del pH haciendo virar el indicador
Manosa	MNS	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Sacarosa	SUC	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Melibiosa	MEL	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Ramnosa	RHA	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Sorbitol	SOR	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Manitol	MNT	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Adonitol	ADO	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Galactosa	GAL	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
Inositol	INO	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	
p-n-p-fosfato	PHO	Amarillo	Incoloro	La hidrolisis enzimatica del glucosido o ester de fosfato libera p-nitrofenol amarillo
p-n-p α-β-	BGL	Amarillo	Incoloro	
p-n-p-β-	NPG	Amarillo	Incoloro	
p-n-p bis-	BPH	Amarillo	Incoloro	
p-n-p-xilósido	BXY	Amarillo	Incoloro	
p-n-p-α-	AAR	Amarillo	Incoloro	
p-n-p-	PHC	Amarillo	Incoloro	
p-n-p-β-	GLR	Amarillo	Incoloro	
g-L-glutamil p-	GGL	Amarillo	Incoloro	
Metabolismo de compuestos nitrogenados				
Sustrato	Codigo	Positivo	Negativo	Fundamento
Prolina	PRO	Dorado	Amarillo	Evalua la desaminacion oxidativa de la fenilalanina
Urea	URE	Turqueza/azul	Amarillo/verde	La hidrolisis de la urea produce amoníaco el cual cambia el color
Glicina	GLY	Turqueza/azul	Amarillo/verde	La degradacion del aminoácido libera metabolitos alcalinos que
Arginina	ARG	Rojo/purpura	Amarillo/pardo	El catabolismo anaerobico del aminoácido
Lisina	LYS	Rojo/purpura	Amarillo/pardo	

-Sistema de Identificación BD BBL Crystal (E/NF).

Tabla 3. Sustratos compuestos usados para la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas

Prueba bioquímica	Siembra	Lectura	Indicador y viraje
Agar MacConkey	Agotamiento en caja de petri.	Fucsia: fermentador de lactosa. Amarillo: no fermentador de lactosa	Rojo Neutro Fucsia 6,8 - 8,0 Amarillo
T.S.I (Agar con azúcar triple y hierro)	Punción al fondo y estría en superficie. Tapa ajustada.	Fucsia/Amarillo [K/A] : Sólo fermenta glucosa. Amarillo/Amarillo [A/A] : Fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. Fucsia/Fucsia [K/K]: No fermenta azúcares. Productor de H ₂ S: +++ Productor de gas: +++	Rojo de Fenol Amarillo 6.8 - 8.4 Fucsia
Citrato	Estría en superficie. Tapa suelta.	Azul: [Citrato permeasa positivo] Verde: [Citrato permeasa negativo]	Azul de Bromotimol Amarillo 6.0 - 7.6 Azul
Rojo de metilo	Inoculación directa. Tapa asegurada.	Rojo [+]: Generación de producto final ácido. (acetoina y 2,3 Butanodiol) Toma la vía metabólica de ácidos mixtos. Ausencia de color rojo [-]: Producto final no ácido.	Rojo de metilo Rojo 4.4 – 6.2 Amarillo
Voges proskauer	Inoculación directa. Tapa cerrada.	Rojo [+]: Generación de producto final neutro. Ausencia de color rojo [-]: Producto final no neutro.	Solución A: Alfa naftol (6 gotas) Solución B: Hidróxido de Potasio (2 gotas)
Metabolismo de compuestos nitrogenados			
L.I.A (Lisina Hierro Agar)	Dos punciones al fondo y estría en superficie. Tapa suelta.	Violeta/Amarillo [K/A]: Sólo fermenta glucosa. Rojo/Amarillo [R/A]: Desaminación lisina. Fermentación glucosa. Violeta/Violeta [K/K]: Descarboxilación lisina. Fermentación glucosa. Productor de H ₂ S: +++	Púrpura de bromocresol Amarillo 5.2 - 6.8 Violeta
Urea	Estría en superficie. Tapa de algodón.	Rosado: Hidrólisis de la urea. Amarillo: No se hidroliza la urea.	Rojo de Fenol Amarillo 6.8 - 8.4 Fucsia
Motilidad	Punción de profundidad aproximada a 1,25 cm. Tapa de algodón.	Motilidad positiva: Turbidez difusa que se extiende más allá de la línea de punción. Movilidad negativa: Crecimiento a lo largo de la línea de punción.	NA
SIM	Siembra por picadura hasta la mitad del medio	El desarrollo de un color rojo-fucsia en la interfase del reactivo y del medio indica la presencia de indol y por lo tanto una prueba positiva.	Reactivo de Kovacs

Tabla 4. Sustratos de composición única usados para la caracterización bioquímica de bacterias Gram positivas.

Prueba	Código	Principio
Control negativo de Fluorescencia	FCT	Control para estandarizar los resultados de fluorescencia arrojados por los distintos sustratos
4MU-b-D-glucosido	FGC	La hidrólisis enzimática de la amida o el glucósido resulta en la emisión de fluorescencia derivada de cumarina
L-valina-AMC	FVA	
L-fenilalanina-AMC	FPH	
4MU-a-D-glucosido	FGS	
L-ácido piro glutámico-AMC	FPY	
L-triptófano-AMC	FTR	
L-arginina-AMC	FAR	
4MU-N-acetil-b-D-glucosaminida	FGA	
4MU-fosfato	FHO	
4MU-b-D-glucuronida	FGN	
L-isoleucina-AMC	FIS	
Trealosa	TRE	La utilización de los carbohidratos resulta en un pH bajo y por consiguiente en el cambio del indicador Rojo de fenol
Lactosa	LAC	
Metil-a & b-glucósido	MAB	
Sacarosa	SUC	
Manitol	MNT	
Maltotriosa	MTT	
Arabinosa	ARA	
Glicerol	GLR	
Fructosa	FRU	
p-nitrofenil-b-D-glucósido	BGL	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro arilo sustituido resulta en un p-nitrofenol amarillo
p-nitrofenil-b-D-celobiósido	PCE	
Prolina & Leucina-p-nitroanilida	PLN	La hidrólisis enzimática del sustrato de amida incolora, libera p-nitroanilina de color amarillo
p-nitrofenil-fosfato	PHO	
p-nitrofenil-a-D-maltósida	PAM	
o-nitrofenil-b-D-galactósido (ONPG) & p-nitrofenil-a-D-galactósido	PGO	
Urea	URE	La hidrólisis de la urea resulta en la liberación de amoníaco que al cambiar el pH del medio, resulta en el viraje del indicador azul de bromotimol
Arginina	ARG	La utilización de arginina resulta en el cambio de pH y viraje del indicador púrpura de bromocresol

Sistema de Identificación BD BBL Crystal (GP).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 RESTABLECIMIENTO DE LA COLECCIÓN BIOLÓGICA

Se realizó satisfactoriamente la descongelación escalonada del cepario CEC de acuerdo a las pautas estipuladas en el protocolo de descriopreservación de cepas bacterianas del Laboratorio.

Se obtuvo crecimiento de un único tipo de colonia en las cepas reactivadas lo que demostró la pureza de los criopreservados iniciales. Para casi la totalidad de las cepas, se obtuvo crecimiento cumplidas de 18 a 24 horas de incubación. Cabe resaltar que las cepas Amb 23-3, Amb 23-4 y Amb 24-3 las cuales fueron aisladas por exposición de placas al ambiente presentaron crecimiento en un tiempo igual o superior a las 48 horas.

Estos resultados pueden deberse tanto a motivos fisiológicos del microorganismo como a las características climáticas del CC. Según la información documentada en el Manual Bergey's de Bacteriología Determinativa (Bergey & Holt, 1994), bacterias del género *Microbacterium*, suelen requerir de 3 a 5 días de incubación al crecer sobre medios de cultivos enriquecidos sólidos.

Por otra parte, una amplia cantidad de especies del género *Rhodococcus* poseen la capacidad de almacenar y movilizar triacilglicerol (TAG) como estrategia evolutiva de adaptación para sobrevivir en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, es decir, su baja velocidad de crecimiento, estaría relacionada con el almacenamiento de energía en forma de ácidos grasos, los cuales, pueden ser usados para el mantenimiento de las funciones metabólicas y garantizar la sobrevivencia en ausencia de disponibilidad de otras fuentes de energía.

Funciones similares de adaptación, han sido observadas en bacterias del genero *Mycobacterium*, las cuales usarían TAG como fuente de energía para sobrevivir durante largos periodos de latencia dentro de un hospedero, manteniendo un estado metabólico basal y no replicativo que puede durar incluso décadas (Alvarez, 2010).

En la tabla 5, se relacionan los resultados obtenidos durante las actividades de verificación de pureza del cepario y los tiempo de incubación requeridos para el crecimiento de cada una de las cepas de este estudio.

Tabla 5. Evaluación de pureza del cepario CEC

Código de la cepa	Numero de tipos de colonia	Tiempo de incubación (horas)
w67-1	1	18
w67-2	1	18
w01-1	1	18
w01-2	1	18
A02-3	1	18
wp67-1	1	18
wp67-2	1	24
wp67-3	1	18
G23-1	1	24
G23-2	1	24
G23-3	1	24
G23-4	1	24
G24-1	1	18
G24-2	1	24
G24-3	1	24
G24-4	1	24
GH24-1	1	18
GH24-2	1	18
Amb23-1	1	24
Amb23-2	1	24
Amb23-3	1	>48
Amb23-4	1	48
Amb24-1	1	24
Amb24-2	1	24
Amb24-3	1	>48

6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

En la actualidad, el desarrollo de las ciencias genómicas y técnicas moleculares han cambiado el panorama de la clasificación taxonómica que solía proceder de acuerdo a estándares y patrones internacionales altamente limitados por las pocas características morfológicas observables por microscopia y haciendo uso de la evaluación de la diversidad bioquímica y enzimática propia de cada microorganismo, convirtiendo la identificación en una tarea en ocasiones imposible de realizar(Emerson, Agulto, Liu, & Liu, 2008).

Sin embargo, la tipificación molecular bacteriana pese a ser una alternativa rápida y altamente específica para la identificación de microorganismos de difícil crecimiento o nutricionalmente exigentes tiene como limitación el ofrecer poca o escasa información sobre las propiedades fisiológicas y metabólicas del organismo objeto del estudio(Benson et al., 2000).

En relación a lo anterior, las bacterias pertenecientes al cepario de CEC, fueron tipificadas molecularmente mediante el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas de la amplificación de una región del rRNA 16S obteniendo porcentajes de identidad que van desde el 98 a 99,9% pero carecían de una tipificación fenotípica adecuada.

Los resultados obtenidos de la valoración macroscópica de las colonias y de las características microscópicas se relacionan en las tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Características macroscópicas de las colonias del cepario CEC.

Características macroscópicas								
Código de la cepa	Tamaño (mm)	Forma	Elevación	Borde	Color	Superficie	Densidad	Consistencia
w67-1	2	circular	convexa	entero	blanco	brillante	transparente	mucosa
w67-2	3-4	circular	plana	entero	amarillo	brillante	opaca	mucosa
w01-1	2	circular	convexa	entero	incolora	brillante	transparente	mucosa
w01-2	1	puntiforme	plana	entero	blanca	mate	opaca	mucosa
A02-3	2-3	circular	convexa	entero	blanca	brillante	opaca	mucosa
wp67-1	5	circular	elevada	entero	crema	brillante	opaca	mucosa
wp67-2	2-3	circular	convexa	entero	rosada	brillante	translúcida	mucosa
wp67-3	2-3	circular	convexa	entero	amarillo	brillante	translúcida	mucosa
G23-1	5	Circular	convexa	entero	incolora	mate	opaca	mucosa
G23-2	3-5	Circular	plana	irregular	incolora	brillante	punto rosado	mucosa
G23-3	2	circular	plana	irregular	incolora	mate	opaca	seca
G23-4	5	Circular	plana	irregular	crema	mate	opaca	mucosa
G24-1	3	Circular	convexa	entero	incolora	brillante	punto rosado	mucosa
G24-2	5	circular	elevada	entero	incolora	mate	opaca	mucosa
G24-3	-	rizada	plana	-	blanca	mate	opaca	seca
G24-4	3-5	circular	Convexa	entero	Incolora	brillante	punto rosado	mucosa
GH24-1	5-7	circular	elevada	entero	blanca	brillante	opaca	mucosa
GH24-2	5	Circular	plana	irregular	incolora	brillante	transparente	mucosa
Amb23-1	3-5	Circular	plana	entero	incolora	brillante	translucido	mucosa
Amb23-2	3-5	Circular	plana	entero	incolora	brillante	translucido	mucosa
Amb23-3	2-3	Circular	Convexa	entero	amarillo	mate	opaca	mucosa
Amb23-4	2-3	circular	convexa	entero	blanca	brillante	translúcidas	mucosa
Amb24-1	3	circular	plana	entero	blanca	mate	opaca	mucosa
Amb24-2	1	puntiforme	plana	entero	blanca	mate	opaca	mucosa
Amb24-3	1	puntiforme	plana	entero	naranja	mate	opaca	mucosa

Tabla 7. Características microscópicas del cepario CEC.

Código de la cepa	Identificación molecular	Morfología	Gram	Esporas	Posición de la espora
w67-1	<i>Pseudomonas balearica</i> OAct420	Bacilos	Neg	NA	NA
w67-2	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> QD-3	Bacilos	Pos	NA	NA
w01-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Bacilos	Neg	NA	NA
w01-2	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Cocos	Pos	NA	NA
A02-3	<i>Acinetobacter radioresistens</i> WC-A-157	Cocobacilos	Variable	NA	NA
wp67-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-AI-2	Bacilos	Neg	NA	NA
wp67-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos	Neg	NA	NA
wp67-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bacilos	Neg	NA	NA
G23-1	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	Bacilos	Neg	NA	NA
G23-2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	Bacilos	Neg	NA	NA
G23-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilos	Neg	NA	NA
G23-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos	Neg	NA	NA
G24-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos	Neg	NA	NA
G24-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AMAAS226	Bacilos	Neg	NA	NA
G24-3	<i>Bacillus mycoides</i> C2	Bacilos	Pos	Pos	Central
G24-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilos	Neg	NA	NA
GH24-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> K30	Bacilos	Neg	NA	NA
GH24-2	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Bacilos	Neg	NA	NA
Amb23-1	<i>Paenibacillus hunanensis</i> FeL05	Bacilos	Pos	Pos	Polar
Amb23-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> EH73	Bacilos	Neg	NA	NA
Amb23-3	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	Bacilos	Pos	Neg	NA
Amb23-4	<i>Paenibacillus bacterium</i>	Bacilos	Pos	Neg	NA
Amb24-1	<i>Acinetobacter radioresistens</i> WC-A-157	Cocobacilos	Variables	NA	NA
Amb24-2	<i>Brevibacterium</i> sp.	Bacilos	Pos	Neg	NA
Amb24-3	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	Cocobacilos	Pos	Neg	NA

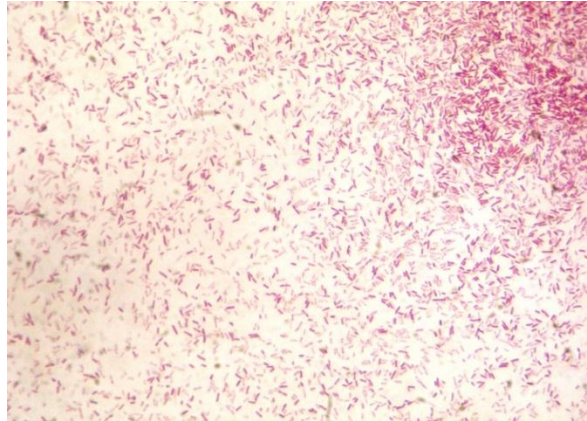


Figura 5. *Klebsiella pneumoniae* M-AI-2

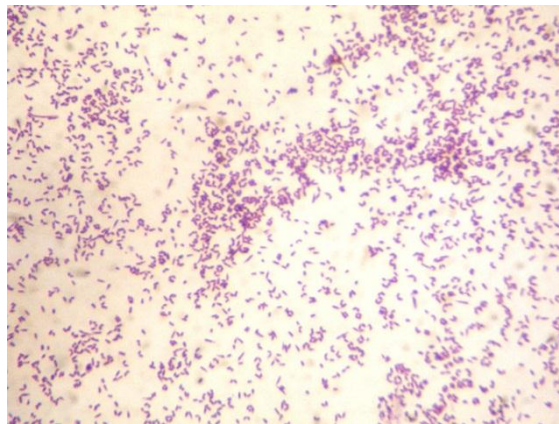


Figura 6. *Microbacterium ginsengisoli*

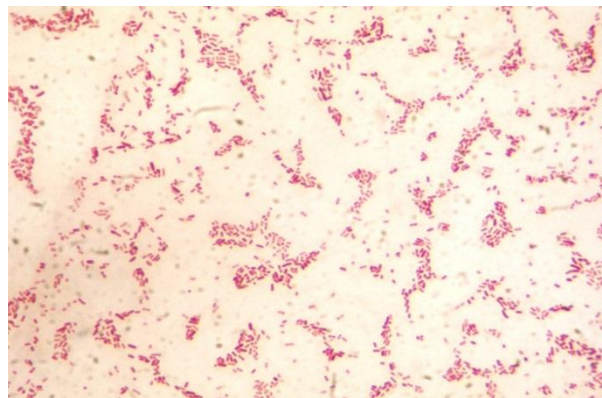


Figura 7. *Pseudomonas aeruginosa*

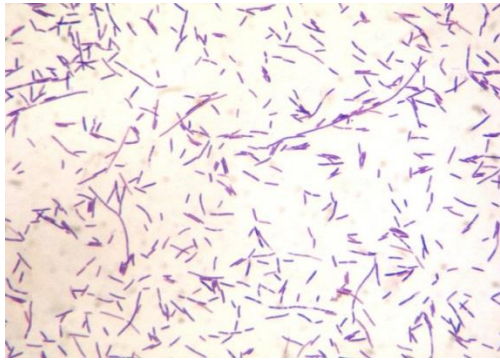


Figura 8. *Paenibacillus hunanensis* FeL05

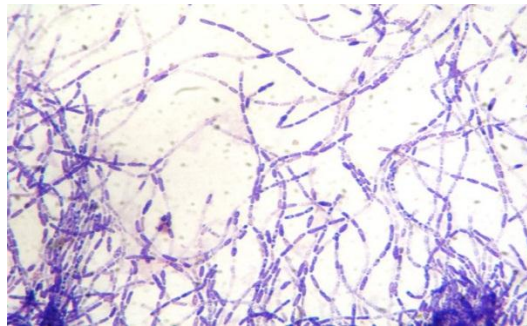


Figura 9. *Bacillus mycoides* C2 (G24-3)

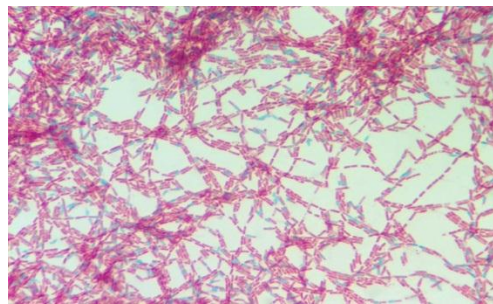


Figura 10. *Bacillus mycoides* C2 (G24-3), tinción verde de malaquita, se observa en verde las esporas centrales

6.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Los resultados de la caracterización bioquímica se encuentran divididos de la siguiente manera:

Las tablas 8 y 9 contienen respectivamente la información referente a los resultados de las pruebas bioquímicas de sustratos simples y compuestos realizados a Bacterias Gram negativas.

Tabla 8. Resultados de la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas sobre sustratos de composición única.

	Sustratos de composición única																			
Cepa	Carbohidratos															Compuestos nitrogenados				
	AR	MN	SUC	MEL	RHA	SOR	MNT	ADO	GAL	INO	PHO	BGL	NPG	BPH	BXY	AAR	PHC	GLR	GGL	PRO
w67-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
w01-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A02-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
wp67-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
wp67-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
wp67-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
G23-1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
G23-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
G23-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
G23-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
G24-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
G24-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
G24-4	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
GH24-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
GH24-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amb23-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Amb24-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Alta actividad metabólica

Baja actividad metabólica

+

 Positivo

-

 Negativo

Tabla 9. Resultados de caracterización bioquímica de bacterias Gram negativas sobre sustratos compuestos.

		Sustratos compuestos											
		Carbohidratos							Compuestos nitrogenados				
Cepa	Oxidasa	Fermentación de lactosa	TSI	H2S	Gas	RM	VP	Citrato	Urea	PPA	Sim	Motilidad	LIA
w67-1	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	k/k
w01-1	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	k/k
A02-3	Neg	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	No	Neg	Neg	Neg	Neg	k/k
wp67-1	Neg	Pos	A/A	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	k/A
wp67-2	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	k/k
wp67-3	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	k/k
G23-1	Pos	Pos	A/A	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	k/A
G23-2	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	k/k
G23-3	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	k/k
G23-4	Neg	Pos	A/A	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	k/A
G24-1	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	k/k
G24-2	Pos	Pos	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	k/k
G24-4	Pos	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	k/k
GH24-1	Neg	Pos	A/A	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	k/k
GH24-2	Neg	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	No	Neg	Neg	Neg	Neg	k/k
Amb23-2	Neg	Pos	A/A	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	k/k
Amb24-1	Neg	Neg	k/k	Neg	Neg	Neg	Neg	No	Neg	Neg	Neg	Neg	k/k



Alta actividad
metabólica



Baja actividad
metabólica



Positivo



Negativo

La tabla 10 contiene los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a Bacterias Gram positivas. Además, se incluye en la tabla 11 los resultados de producción de amilasa realizada a bacterias con morfología de bacilos Gram positivos.

Tabla 10. Resultados de la caracterización bioquímica para bacterias Gram positivas.

Cepa	FCT	FGC	FVA	FPH	FGS	FPY	FTR	FGA	FHO	FGN	FIS	TRE	LAC	MAB	SUC	MNT	MTT	ARA	GLR	FRU	BGL	PCE	PLN	PHO	PAM	PGO	URE	ARG
w67-2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
w01-2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
G24-3	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
Amb23-1	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Amb23-3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Amb 23-4	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Amb24-2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
Amb24-3	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Tabla 11. Resultados de test de degradación de almidón

Código	Cepa	Hidrólisis de almidón
G24-3	<i>Bacillus mycoides</i> C2	+
Amb 23-1	<i>Paenibacillus hunanensis</i> FeL05	+
Amb 23-3	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	-
Amb 23-4	<i>Paenibacillus bacterium</i>	-
Amb 24-2	<i>Brevibacterium</i> sp.	-

 Alta actividad metabólica
  Baja actividad metabólica
  Positivo
  Negativo

6.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CORRELACIÓN CON LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

6.4.1 Características bioquímicas y enzimáticas generales de los sustratos evaluados. Los carbohidratos (monosacáridos o disacáridos) son la principal fuente de energía tanto en organismos procariotas como eucariotas y su catabolismo se puede realizar por vía oxidativa o fermentativa. Esta última, se realiza en ausencia del Oxígeno como aceptor final de electrones por medio de un proceso denominado fosforilación a nivel de sustrato y tiene como producto final alcoholes, ácidos tipo acético, láctico o butírico, ATP y NADH oxidado que permite comenzar nuevamente la primera fase de la vía glucolítica(Harper, Murray, & González, 2004).

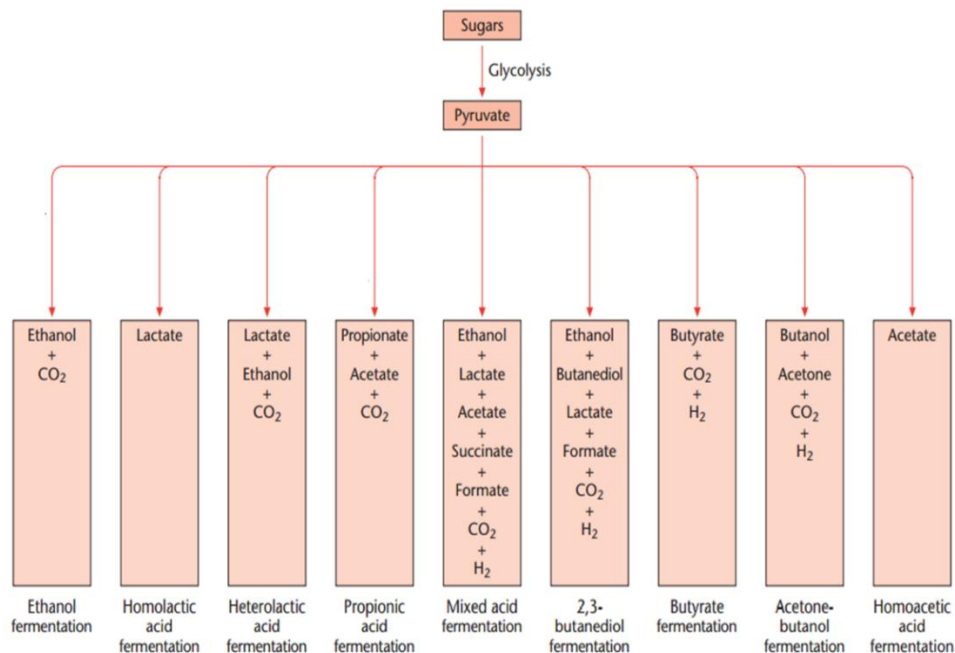


Figura 11. Principales vías de fermentación bacteriana de azúcares(Jurtshuk Jr, 1996)

La actividad de las enzimas glucosidasas como la β - galactosidasa, β - glucoronidasa, β -glucosidasa, α - arabinosidasa entre otras, tienen como función la ruptura y formación de enlaces glucosídicos y son de importancia para la degradación de biomasa tipo celulosa y hemicelulosa(Casablanca Alarcón, Ríos Manríquez, Terrazas Siles, & Álvarez Aliaga, 2011).

En general todos los organismos necesitan además de una fuente de Carbono cantidades específicas de Nitrógeno para mantener sus procesos vitales, sintetizar nucleótidos y fabricar material genético. Este nitrógeno en su gran mayoría es fijado desde la atmosfera por un grupo reducido de microorganismos, ciclado de la descomposición de materia orgánica mediante enzimas extracelulares y transformado en compuestos nitrogenados orgánicos por medio de reacciones enzimáticas de transferencia de grupos amino (Atlas & Bartha, 2001).

Como se mencionó anteriormente en los aspectos metodológicos de este trabajo los análisis bioquímicos realizados a las bacterias Gram negativas fueron divididos en dos grupos de acuerdo a la complejidad del sustrato (ver tabla 2 y 3).

El primer grupo consiste en 24 sustratos de composición única de los cuales 18 están orientados a identificar la actividad metabólica de carbohidratos y 6 la capacidad de utilizar algunos compuestos nitrogenados. El panel de carbohidratos consiste en 10 pruebas de fermentación de azúcares y 8 sustratos que evalúan la actividad hidrolítica de glucósidos y amidas por la presencia de enzimas de tipo glucosidasa.

El grupo de sustratos compuestos evalúa además de la fermentación de azúcares, la presencia de citocromos necesarios para realizar la respiración, la naturaleza de los productos de las vías fermentativas, la utilización de fuentes alternativas de Carbono como el citrato, el cual es un compuesto intermediario del ciclo de Krebs y la utilización o no de aminoácidos esenciales como la lisina y el triptófano (MacFaddin, 2003).

Para el grupo de bacterias Gram positivas se utilizaron en total 29 sustratos, 9 azúcares para evaluar la capacidad fermentativa bacteriana y 20 restantes que en

general evalúan las mismas reacciones enzimáticas mencionadas con anterioridad (glucósidos, amidas y aminoácidos). Además, se realizó la evaluación de la actividad degradadora de almidón en el grupo de bacilos Gram positivos.

6.4.2. Discusión de resultados de la caracterización bioquímica de bacterias Gram negativa. Como se puede observar en las tablas 8 y 9, las cepas wp67-1, G23-4, GH24-1 y Amb 23-2, pertenecientes al género *Klebsiella*, poseen una alta capacidad de fermentación de azúcares tipo monosacárido y disacárido al igual que actividad hidrolítica sobre compuestos glucósidos. De igual manera, presentan una alta actividad catabólica de compuestos nitrogenados y poseen ureasa, enzima extracelular que les permitiría realizar la fijación de amonio, los perfiles metabólicos de estos microorganismos se encuentran relacionados en la table 12.

Estos resultados se relacionan directamente con el Origen del cepario, donde en su gran mayoría los aislamientos fueron realizados de muestras de suelo, vegetación y algunos cuerpos acuáticos.

Muchas especies de *Klebsiella* son con frecuencia aisladas de este tipo de sistemas ecológicos en donde existe gran cantidad de materia orgánica. Las bacterias del género *Klebsiella*, suelen encontrarse en gran proporción en muestras de suelo haciendo parte de consorcios microbianos y en un 30 % de las veces como bacteria de vida libre fijadoras de Nitrógeno bajo condiciones anaeróbicas, característica que la convierte en una bacteria con potencial para el desarrollo de fertilizantes y degradación de residuos que contengan celulosa. Es importante hacer claridad que las especies de *Klebsiella* de carácter saprofito pueden ser usadas en procesos biotecnológicos ya que, en general, son diferentes a las bacterias con potencial patógeno para los humano. Esto se debe a que las bacterias ambientales pueden usar el cetogluconato como fuente de carbono y carecen de capsula, principal mecanismo de patogenicidad de

Klebsiella Pneumoniae (López, Vega, Ph, Montoya, & Ph, 2013).

La cepa G23-1, *Aeromonas taiwanensis*, es un microorganismo anaerobio facultativo capaz de fermentar glucosa y lactosa y usar un amplio espectro de aminoácidos como fuente de Nitrógeno. La prueba positiva de rojo de metilo permite establecer que esta bacteria realiza un proceso de fermentación ácido mixta, teniendo como productos finales ácido acético, etanol, H₂, CO₂ y al igual que ácido láctico y propiónico (Koneman & Allen, 2008).

Tabla 12. Análisis de perfiles metabólicos: bacterias Gram negativas

Cepa	Género y especie	Metabolismo de carbohidratos			Metabolismo de compuestos nitrogenados
		Fermentación	Sustratos hidrolizados	Utilización de citrato	
wp67-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-AI-2	Todos los monosacáridos y disacáridos evaluados, incluyendo lactosa y glucosa	α-β-glucósido β-xilósido g-L-glutamyl p-nitroanilida	Positivo	Producción de ureasa. Catabolismo de arginina, lisina y fenilalanina
G23-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
GH24-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> K30		α-β-glucósido β-galactósido β-Xilósido g-L-glutamyl p-nitroanilida		Producción de ureasa. Catabolismo de arginina. Descarboxilación de lisina
Amb23-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> EH73				
G23-1	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	Arabinosa, sacarosa, manitol, galactosa, lactosa y glucosa. Productos ácidos de fermentación	α-β-glucósido β-galactósido α-arabinósido g-L-glutamyl p-nitroanilida	Negativo	Prolina triptófano fenilalanina

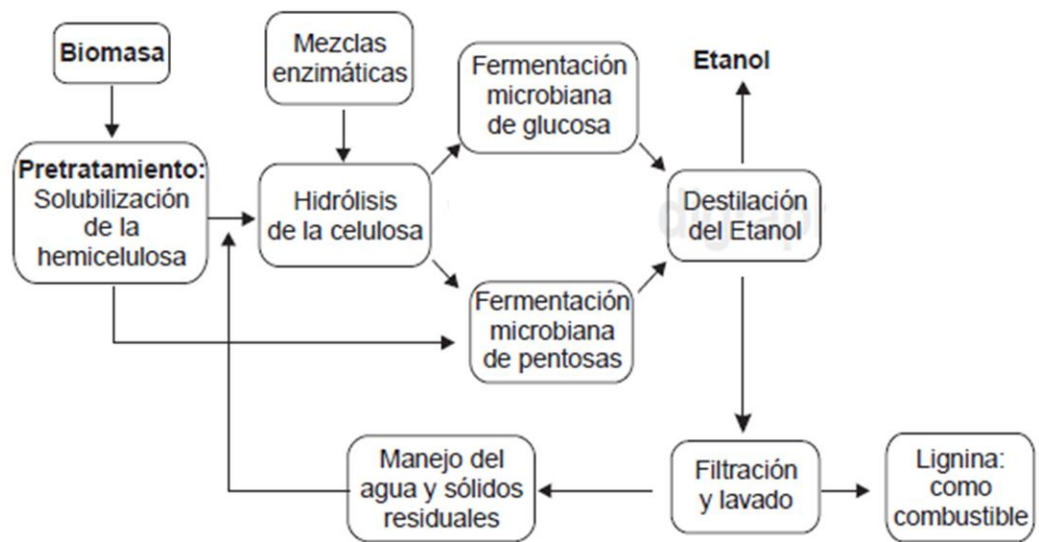


Figura 12. Proceso de producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos (Martínez-Anaya, Balcázar-López, Dantán-González, & Folch-Mallol, 2008)

6.4.3. Discusión de resultados de la caracterización bioquímica de bacterias Gram positivas. De los resultados obtenidos en el estudio bioquímico de las bacterias Gram positivas, sobresale una alta capacidad fermentativa e hidrolítica de compuestos glucósidos por parte de las cepas Amb 23-1 (*Paenibacillus hunanensis* y Amb 23- 3(*Microbacterium ginsengsoli*).

En la evaluación de degradación de almidón dos de las cepas: G24-3, *Bacillus mycoides* y Amb 23-1 *Paenibacillus hunanensis* arrojaron resultados positivos.

Figura 13. Análisis de perfiles metabólicos: bacterias Gram positivas

Cepa	Género y especie	Metabolismo de carbohidratos		Metabolismo de compuestos nitrogenados
		Fermentación	Sustratos hidrolizados	
G24-3	<i>Bacillus mycoides</i> C2	Trealosa, maltotriosa, fructosa	Amilasa 4MU-b-D-glucosido o-nitrofenil-b-D-galactósido (ONPG) & p-nitrofenil-a-D-galactósido. L-ácido piro glutámico-AMC	Degradación de arginina
Amb23-1	<i>Paenibacillus hunanensis</i> FeL05	Trealosa Lactosa Metil-a & b-glucósido Sacarosa Manitol Maltotriosa Arabinosa Glicerol Fructosa	Amilasa 4MU-b-D-glucosido 4MU-a-D-glucosido L-ácido piro glutámico-AMC p-nitrofenil-b-D-glucósido p-nitrofenil-b-D-celobiósido p-nitrofenil-a-D-maltósida o-nitrofenil-b-D-galactósido (ONPG) & p-nitrofenil-a-D-galactósido Negativo para la hidrólisis de enlaces amida	Negativo
Amb23-3	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	Negativo	4MU-b-D-glucosido 4MU-a-D-glucosido L-ácido piro glutámico-AMC 4MU-b-D-glucuronida Negativo para la hidrólisis de enlaces amida	Valina, fenilalanina, triptófano, isoleucina. Arginina. Negativo para la degradación de urea.

Bacterias de los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus mycoides*, están evolutivamente relacionadas y se caracterizan por ser bacilos Gram positivos formadores de endosporas encontrados en altas cantidades en suelos y lodos en donde pueden producir un amplio espectro de exoenzimas como amilasas, proteasas y enzimas inducibles como la levansacarasa (que cataliza la conversión de sacarosa en glucosa y β 2-6 fructosilo), características que les confiere además de una alta adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, una alta capacidad degradativa de compuestos tipo almidón y celulosa como fuente de carbono (Priest, 1977).

Por otra parte, *Microbacterium* se caracteriza por ser un bacilo Gram positivos cortos, similares a el género *Corynebacterium* a la observación microscópica, aerobio estricto, no presenta movilidad y posee un pigmento amarillo característico y suelen habitar una amplia variedad de ambientes.

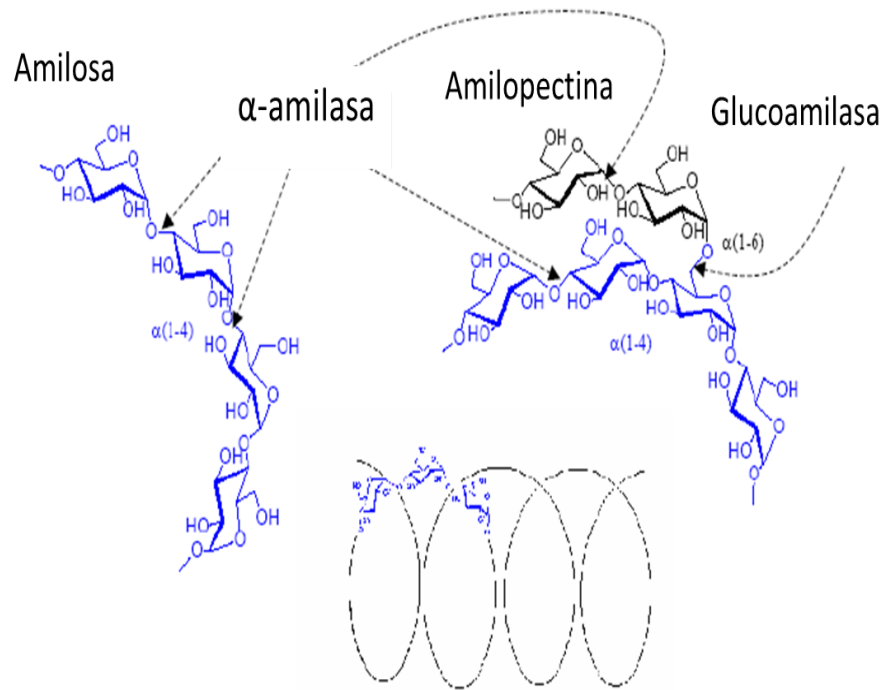


Figura 14. Estructura y composición del almidón.(Harper et al., 2004)

Por ser aerobio estricto, es incapaz de realizar la fermentación de azúcares (se correlaciona con los resultados obtenidos en la tabla 10) pero destaca su capacidad de producir la enzima β- galactosidasa, también conocida como celobiasa o celulasa, la cual presenta especificidad para varios sustratos β-D- glucósidos y cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores en beta-D- glucósidos, produciendo finalmente glucosa (Park et al., 2015).

Estas cualidades, le confieren la propiedad de ser un microorganismo con alta

actividad en la degradación de celulosa a azúcares de menor tamaño. Pese a esto, no hay mayor información de su aplicación en procesos específicos de aprovechamiento de residuos.

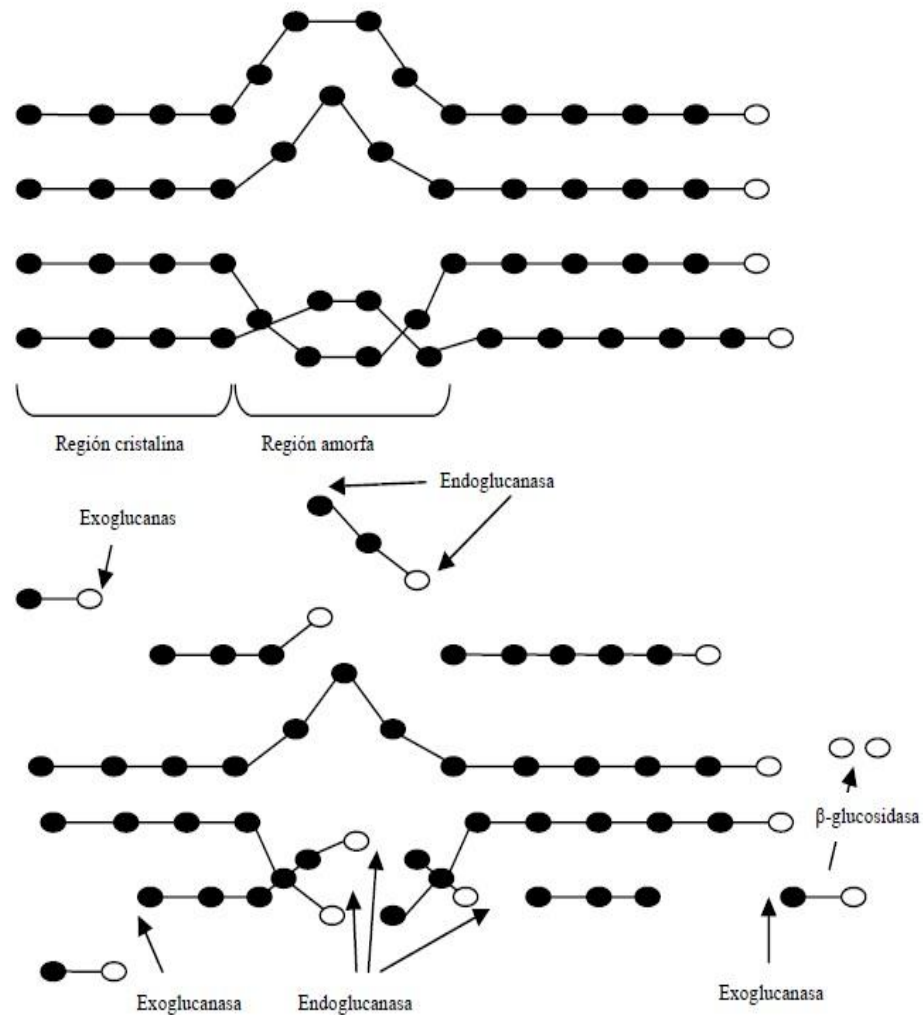


Figura 15. Representación del mecanismo de acción de las celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y glucosidasas), el círculo blanco representa la unidad de glucosa. (Montoya, 2008).

6.4.4. Proyección de utilidades de las cepas en el aprovechamiento de residuos orgánicos. Las cepas bacterianas con mayor proyección de su posible utilidad en el aprovechamiento de residuos orgánicos son según lo anteriormente mencionado, pertenecientes a los géneros: *Klebsiella*,

Bacillus y Paenibacillus.

Como se había mencionado, las bacterias del genero *Klebsiella* posee una alta actividad fermentativa sobre una amplia variedad de azúcares y producen enzimas glucosidasas, proyectando una amplia utilidad en la degradación de compuestos orgánicos.

En un estudio realizado en el año 2014 por Waghmare y colaboradores en la Universidad de Shivaji, Kolhapur, India, realizaron el aislamiento de una cepa de *Klebsiella* sp. (PRW-1) proveniente de muestras de suelo del campus universitario. Para el desarrollo de este trabajo se emplearon medios de cultivo suplementados con dos sustratos con alto contenido de celulosa (carboximetilcelulosa y avicel) bagazo de caña de azúcar, barbojo, cascaras de sorbo, polvo de césped y paja de maíz y arroz evaluando el efecto de la variación de la fuente de Carbono en la producción de enzimas exoglucanasa, endoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasa y glucoamilasa, la degradacion de celulosa y la producción de azúcares reductores. Como resultado se obtuvo, una alta capacidad de hidrolisis de celulosa y una alta producción de azúcares reductores en todos los sustratos evaluados, siendo la máxima 590 mg L⁻¹ al usar polvo de césped como fuente de Carbono. Los investigadores concluyen que, la degradación biológica de compuestos de celulosa, es una alternativa de fácil implementación, bajo costo, bajo consumo energético, altamente eficiente en la producción de azúcares y de un bajo impacto ambiental si se compara con procesos químicos(Waghmare, Kshirsagar, Saratale, Govindwar, & Saratale, 2014).

Estos resultados permiten proyectar el uso de bacterias del género *Klebsiella* en la degradacion de residuos con alto contenido de celulosa como barridos de parques, pasto cortado de escenarios deportivos o sitios de recreación, desechos

de vegetales de plazas de mercado, siempre y cuando se evalúe la relación costo- beneficio del gasto energético que conlleva la disminución del tamaño de partícula del sustrato utilizado.

En otro trabajo reciente realizado por Yadav y colaboradores, se demostró la eficiencia de una cepa de *Klebsiella Pneumoniae* que presentaba sinergismo con *Bacillus subtilis* en la degradación de lignina kraft desechada en el proceso de fabricación de maderas tipo rayon. La actividad lignolítica fue medida usando el consorcio bacteriano y cultivos axénicos individuales, tomando lecturas de absorbancia y confirmando los resultados por HPLC y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas. Los resultados demostraron una decoloración del contaminante relacionada con la degradación de lignina en la muestra de hasta un 80% y una disminución de la toxicidad de 62% y 73% al disolver la lignina en agua y realizar mediciones de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) respectivamente (Yadav & Chandra, 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio permiten prever que tanto *Klebsiella pneumoniae* como bacterias del género *Bacillus* poseen una alta actividad de descomposición de material orgánico, incluso de complejidad estructural como la lignina. Estudios realizados por Ping y colaboradores, asocian esta capacidad de degradación de lignina con una alta degradación de compuestos hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y una alta tasa de biorremediación en sitios afectados por este tipo de contaminantes (Ping et al., 2014).

Según la revisión realizada por Lal y colaboradores, bacterias del género *Paenibacillus* son de alto interés comercial en la industria de biofertilizantes dada su capacidad de aumentar la fijación de nitrógeno que promueve el crecimiento de plantas (Algami et al., 2010) y su capacidad de producir enzimas hidrolíticas y sintetizar exopolisacáridos (Lal & Tabacchioni, 2009).

Durante el desarrollo de este trabajo, se demostró la capacidad de la cepa *Paenibacillus hunanensis* y *Bacillus Mycoides* para producir enzimas hidrolíticas tipo amilasa, resultado que permite proyectar su utilidad en la fermentación de sustratos como residuos de comida y desperdicios de plazas de mercado con un alto contenido de almidón y celulosa(Gautam, Bundela, Pandey, Awasthi, & Sarsaiya, 2012).

Una aplicación interesante de estos polisacáridos es su capacidad de unirse e inmovilizar metales pesados. En un estudio realizado por morillo y colaboradores, lograron una máxima producción de 2 g L^{-1} de polímero usando como sustrato para la fermentación desecho de almazara de la industria del aceite de oliva. Finalmente, evaluaron la capacidad de adsorción de este polímero frente a Pb (II), Cd (II), Cu (II), Zn (II), Co (II), and Ni (II) obteniendo un consumo máximo de 230 mg por g de polímero(Morillo, Aguilera, Ramos- cormenzana, & Monteoliva-sánchez, 2006)

7. CONCLUSIONES

- Se realizó exitosamente la caracterización bioquímica de 25 cepas bacterianas del cepario CEC, EM-UIS y además se realizó paralelamente la caracterización morfológica del mismo, permitiendo obtener como resultado al final de este trabajo, un cepario aislado en el Departamento de Santander, perteneciente a la UIS el cual cuenta con una caracterización biológica completa es decir, una identificación molecular de género y especie y una base de datos con las características fenotípicas de las cepas, aportando una base sólida para el desarrollo de nuevas propuestas de investigación y aplicación orientadas al aprovechamiento de sus características enzimáticas y metabólicas.
- El análisis de resultados permitió seleccionar 3 géneros bacterianos (*Bacillus*, *Paenibacillus* y *Klebsiella*) como posibles candidatos para la proyección y elaboración de nuevas propuestas encaminadas al aprovechamiento de residuos orgánicos en el Departamento de Santander.
- Es necesario realizar más investigaciones orientadas a establecer otras posibles aplicaciones del cepario CEC en diferentes campos industriales, como podría ser, la industria petrolera y la búsqueda de alternativas biológicas para la remediación de impactos ambientales y la generación de nuevos productos de interés para el sector como surfactantes y biosolventes.

BIBLIOGRAFIA

1. Algam, S. A. E., Xie, G., Li, B., Yu, S., Su, T., & Larsen, J. (2010). Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of *Ralstonia* wilt in tomato. *Journal of Plant Pathology*, 593-600.
2. Alvarez, H. M. (2010). *Biology of Rhodococcus*. Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=v5E9tszGUoQC>
3. Atlas, R. M., & Bartha, R. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*.
4. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A., & Wheeler, D. L. (2000). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 15–18.
5. Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=jtMLZaa5ONcC>
6. Bochner, B. R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria, 33, 191–205. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x>
7. Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2007). *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. McGraw-Hill Medical. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=C9JpAAAAMAAJ>
8. Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2013). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Pearson Education. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=ERMtAAAAQBAJ>
9. Casablanca Alarcón, E., Ríos Manríquez, N., Terrazas Siles, E., & Álvarez Aliaga, M. T. (2011). Producción de β -glucosidasas por cultivos de bacterias termófilas indígenas del altiplano boliviano . *Revista Colombiana de Biotecnología* . scieloco .
10. Dart, R. K., & Services, R. S. of C. (Great B. I. (1996). *Microbiology for the Analytical Chemist*. Royal Society of Chemistry, Information Services. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=7dMJkhDGJiAC>

11. Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 941810. <http://doi.org/10.4061/2011/941810>
12. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), & Ministerio de Ambiente y Desarrollo Territorial (MADS). (2013). Iniciativa Latinoamericana y Caribeña para el Desarrollo Sostenible (ILAC) Indicadores generados por Colombia.
13. Emerson, D., Agulto, L., Liu, H., & Liu, L. (2008). Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics, 58(10), 925–936.
14. Forbes, B. A. (2009). *Diagnostico Microbiologico*. Editorial Medica Panamericana Sa de. Retrieved from <https://books.google.com.ar/books?id=239cauKqSt0C>
15. Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2012). Diversity of Cellulolytic Microbes and the Biodegradation of Municipal Solid Waste by a Potential Strain, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/325907>
16. Harper, H. A., Murray, R. K., & González, H. R. P. (2004). *Harper, bioquímica ilustrada*. El Manual Moderno. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=ICtUGQAACAAJ>
17. Hoornweg, D., & Bhada-Tata, P. (2012). What a waste: a global review of solid waste management. World Bank, Washington DC. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:WHAT+A+WASTE:+A+global+review+of+solid+waste+management#0>
18. Ipcc. (2007). Mitigation of climate change: Contribution of working group III to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change.
19. Jurtshuk Jr, P. (1996). Bacterial metabolism.
20. Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). Koneman. *Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*.

- Editorial Médica Panamericana S.A. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=jyVQueKro88C>
21. Kreith, F., & Tchobanoglous, G. (2002). Solid Waste. Waste Management Research (Vol. 13). <http://doi.org/10.1006/wmre.1995.0050>
 22. Lal, S., & Tabacchioni, S. (2009). Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview, (March), 2–10. <http://doi.org/10.1007/s12088-009-0008-y>
 23. López, C. L. Á., Vega, N. W. O., Ph, D., Montoya, M. M., & Ph, D. (2013). Molecular Identification of Microorganisms Associated to the Rhizosphere of Vanilla Plants in Colombia, 18(2), 293–306.
 24. MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=FYWSzy7EjR0C>
 25. Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos. (P. EDUCACION, Ed.).
 26. Manafi, M., Kneifel, W., & Bascomb, S. (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiological Reviews, 55(3), 335–348.
 27. Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3), 119-131.
 28. Martínez Arce, E., Daza, D., Tello Espinoza, P., Soulier Faure, M., & Terraza, H. (2010). Regional Evaluation on Urban Solid Waste Management in Latin America and the Caribbean: 2010 Report. IDB, AIDIS, PAHO. Retrieved from <http://www.iadb.org/en/publications/publication-detail,7101.html?id=67292&dcLanguage=en&dcType=All>
 29. Montoya, S. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del micromiceto *Grifola frondosa*.

Univeridad Nacional de Colombia.

30. Morillo, J. A., Aguilera, M., Ramos-cormenzana, A., & Monteoliva-sunchez, M. (2006). Production of a Metal-Binding Exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* Using Two-Phase Olive-Mill Waste as Fermentation Substrate, 53, 189–193. <http://doi.org/10.1007/s00284-005-0438-7>
31. Park, M., Kim, M. K., Kim, H., Im, W., Yi, T., Kim, S., ... Yang, D. (2015). *Microbacterium ginsengisoli* sp . nov ., a α -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field, (2008), 429–433. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.65226-0>
32. Phuong, T., Pham, T., Kaushik, R., Parshetti, G. K., Mahmood, R., & Balasubramanian, R. (2015). Food waste-to-energy conversion technologies : Current status and future directions. *Waste Management*, 38, 399–408. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.12.004>
33. Ping, L., Zhang, C., Zhang, C., Zhu, Y., He, H., Wu, M., ... Zhao, H. (2014). Isolation and characterization of pyrene and benzo[a]pyrene-degrading *Klebsiella pneumonia* PL1 and its potential use in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3819–3828. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-5469-6>
34. Priest, F. G. (1977). Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*, 41(3), 711–753.
35. Ramírez-Vargas, C. A., Paredes, D., & Guerrero, J. (2014). Sostenibilidad financiera y económica de plantas de manejo de residuos sólidos urbanos en Colombia. *Ingeniería Y Competitividad*.
36. Russell, J. B. (1995). Energetics of Bacterial Growth : Balance of Anabolic and Catabolic Reactions, 59(1), 48–62.
37. Surhone, L. M., Timpledon, M. T., & Marseken, S. F. (2010). *Oxidase Test*. VDM Publishing. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=9gccygAACAAJ>

38. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Editorial Medica Panamericana Sa de. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=Nxb3iETuwpIC>
39. Vargas Flores, T., & Kuno Vargas, A. (2014). *Morfología Bacteriana*. Revista de Actualización Clínica Investiga . revbol .
40. Waghmare, P. R., Kshirsagar, S. D., Saratale, R. G., Govindwar, S. P., & Saratale, G.D. (2014). Production and characterization of cellulolytic enzymes by isolated *Klebsiella* sp . PRW-1 using agricultural waste biomass, 26(1), 44–59. <http://doi.org/10.9755/ejfa.v26i1.15296>
41. White, D., Drummond, J., & Fuqua, C. (2011). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*.
42. Willey, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. McGraw-Hill Higher Education. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=qJVwQgAACAAJ>
43. Yadav, S., & Chandra, R. (2015). Syntrophic co-culture of *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumonia* for degradation of kraft lignin discharged from rayon grade pulp industry. *Journal of Environmental Sciences*, 33, 229–238. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.01.018>

ANEXOS

Anexo A. Manual de preparacion de medios de cultivo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER ESCUELA DE MICROBIOLOGIA

MANUAL DE PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

1. AGAR NUTRITIVO:

Ingredientes del medio: pluripectona (5 g/l), extractos de carne (3.0 g/l), cloruro de sodio (8.0 g/l), agar (15.0g/l).

Preparaciòn

- a. Suspender 3.1gr de polvo por litro de agua destilada
- b. Mezclar y dejar reposar 5 minutos
- c. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución.
- d. Distribuir y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

2. AGAR MAC CONKEY:

Ingredientes del medio: peptona (17g/l), pluripectona (3 g/l), lactosa (10 g/l), mezcla de sales biliares (1.5 g/l), Cloruro de sodio (5.0 g/l), agar (13.5 g/l), Rojo Neutro (0.03 g/l), cristal violeta (0.0001 g/l)

Preparación:

- a. Suspender 50gr de polvo por litro de agua destilada
- b. Mezclar y dejar reposar 5 minutos y mezclar para uniformar
- c. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución.
- d. Distribuir y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

3. AGAR TSI:

Ingredientes del medio: extracto de carne c pluripeptona (20 g/l), lactosa (10 g/l), sacarosa (10g/l), glucosa (1.0 g/l), sulfato de hierro y amonio (0.2g/l), tiosulfato de sodio (0.2 g/l)mezcla de sales biliares (1.5 g/l), Cloruro de sodio (5.0 g/l), agar (13.0 g/l), Rojo de fenol(0.025 g/l)

Preparación:

- a. Suspender 62.5 gr de polvo por litro de agua destilada
- b. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente.
- c. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución.
- d. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo
- e. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- f. Enfriar en pico de flauta profundo

4. AGAR MIO: MOVILIDAD:

Ingredientes del medio: Dextrosa (1.0 g/l), Extracto de levadura (3 g/l), Peptona (10 g/l), Tripteína (10 g/l) Clorhidrato de L-ornitina (5.0 g/l), agar (2.0 g/l), purpura de bromocresol (0.02)

Preparación:

- a. Suspender 3.1 gr de polvo por litro de agua destilada
- b. Calentar a ebullición hasta completa disolución.
- c. Distribuir y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

5. AGAR SM:

Ingredientes del medio: Sulfato de Hierro y amonio (0.2 g/l), tiosulfato de sodio (0.2g/l), Peptona (6.1 g/l), Tripteína (20 g/l), agar (3.5 g/l).

Preparación:

Suspender 30 gr de polvo por litro de agua destilada

- a. Mezclar hasta completa disolución.
- b. Calentar y hervir durante un minuto.
- c. Distribuir en 4 tubos de hemolisis
- d. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos
- e. Solidificar en posición vertical

6. AGAR UREA:

Ingredientes del medio: Urea (20 g/l), fosfato mono potásico (9.1g/l), fosfato di sódico (9.5 g/l), extracto de levadura (0.1 g/l), rojo fenol (0.01g/l).

Preparación:

- a. Suspender 3,87 gr del medio deshidratado por cada 100 ml de agua destilada
- b. Disolver sin calentar y esterilizar por filtración.
- c. Distribuir en tubos pequeños estériles entre 0.5 y 2 ml.

7. AGAR CITRATO:

Ingredientes del medio: Citrato de sodio(2.0 g/l), cloruro de sodio (5.0g/l), fosfato di potásico (1.0 g/l), fosfato mono amónico (1.0 g/l), sulfato de magnesio (0.2g/l), azul de bromotimol (0.08 g/l), agar (15.0g/l).

Preparación:

- a. Suspender 24,2 gr del medio deshidratado por cada 100 ml de agua destilada
- b. Dejar reposar 5 minutos
- c. Calentar y mezclar hasta ebullición durante 1 o 2 minutos
- d. Distribuir en tubos
- e. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos
- f. Enfriar en posición inclinada

8. AGAR LISINA HIERRO:

Ingredientes del medio: Peptona de gelatina (5.0 g/l), extracto de levadura (3.0g/l), glucosa (1.0 g/l), lisina (10 g/l), citrato de hierro y amonio (0.5 g/l), Tiosulfato de sodio (0.04 g/l), purpura de bromocresol (0.02 (g/l), agar (15.0g/l).

Preparación:

- a. Suspender 35 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- b. Dejar reposar 15 minutos
- c. Calentar cuidadosamente, agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa.
- d. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos
- e. Enfriar en pico de flauta dejando un fondo vertical apto para la punción.

9. MEDIO ROJO DE METILO - VOGES PROSKAUER:

Ingredientes del medio: pluripeptona (7.0 g/l), fosfato di potásico (5.0g/l), glucosa (5.0 g/l), (0.02 (g/l).

Preparación:

- a. Suspender 17 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- b. Calentar cuidadosamente hasta disolver.

- c. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos

Revelado: para revelar se deben añadir algunas gotas de solución del rojo de metilo al 0.04%. Para la prueba de voges proskauer añadir 0.6 ml de alfa naftol al 5% en alcohol etílico absoluto y 0.2 ml de hidróxido de potasio al 40% a 2.5 ml de cultivo. Agitar vigorosamente y dejar a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos.

10. AGAR FENILALANINA:

Ingredientes del medio: D-L fenilalanina (2.0 g/l), extracto de levadura (3.0g/l), Cloruro de sodio (5.0 g/l), fosfato di sódico (1.0 g/l), agar (12.0g/l).

Preparación:

- a. Suspender 23 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- b. Calentar en ebullición hasta dilución total
- c. Colocar en tubos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos
- d. Enfriar en pico de flauta

11. AGAR ALMIDON:

Ingredientes del medio: pluripectona (15 g/l), almidón soluble (1.0g/l), fosfato di potásico (4.0 g/l), fosfato mono potásico (1.0 g/l), cloruro de sodio (5.0 g/l), agar (15 g/l)

Preparación:

- a. Preparar una suspensión de 1,3 g de agar en 90 mL de medio nutritivo (caldo de carne).
- b. Calentar hasta disolver el agar.
- c. Agregar 10 mL de goma de almidón al 1% y mezclar bien
- d. Esterilizar.
- e. Dejar enfriar hasta una temperatura de 60°C aproximadamente, antes de distribuir en las placas de Petri previamente esterilizadas.

12. AGAR NITRATO:

Ingredientes del medio: Peptona (10.0 g/l), cloruro de sodio (5.0(g/l), extracto de carne (3.0g/l), glucosa (10.0 g/l), azul de bromotimol (0.01 g/l), nitrato de potasio (1.0 (g/l), agar (4.0g/l).

Preparación:

- a. Suspender 33 gr del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- b. Dejar reposar 2 minutos, calentar en ebullición hasta disolver
- c. Distribuir en 10 mm de diámetro, 10 ml por tubo.
- d. Esterilizar a 121°C 15 minutos
- e. Solidificar en posición vertical.

Anexo B. Guia para la realización de coloraciones y tinciones para el laboratorio de bacteriología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

ESCUELA DE MICROBIOLOGIA

GUIA PARA LA REALIZACIÓN DE COLORACIONES Y TINCIONES PARA EL

LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA

1. Coloración de Gram

1.1. Fundamento: El examen microscópico de un extendido coloreado por el método de Gram con una flora bacteriana mixta, aparecen las características diferenciales del método. Muchas bacterias conservan la coloración cristal-violeta-yodo y se teñirán de púrpura (Gram positivas), otras se colorean de rojo debido al contra-colorante el cual puede ser safranina o fucsina (Gram negativa)

1.2. Materiales

- Cristal Violeta
- Lugol de Gram
- Alcohol acetona
- Safranina
- Cultivos bacterianos

1.3. Método para la coloración

- a. Preparar un extendido fino de una colonia bacteriana y dejarlo secar al aire.
- b. Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el portaobjeto 3 ó 4 veces sobre la llama del mechero.
- c. Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución cristal-violeta durante 1 minuto.
- d. Lavar bien con agua destilada.
- e. Cubrir el preparado con solución de yodo (Lugol de Gram) durante un

minuto.

- f. Lavar nuevamente con agua destilada.
- g. Sostener el portaobjeto y bañar la superficie con el decolorante (alcohol cetona), hasta no arrastrar más colorante violeta (esto requiere habitualmente unos 10 segundos más o menos).
- h. Lavar nuevamente con agua corriente y colocar el porta objeto sobre el soporte, cubrir con safranina o el contra-colorante a utilizar durante un minuto.
- i. Lavar nuevamente con agua destilada.
- j. Examinar el preparado al microscopio, las bacterias Gram positivas se observan de color violeta y las Gram negativas de color rojo o rosadas.

2. Verde de malaquita: Coloración para esporas

2.1.Fundamento: La envuelta de la endospora es más compleja e impermeable que la envuelta de las células vegetativas en las que se forma. Solo se puede teñir el contenido de la espora alterando su envuelta. La impermeabilidad de las cubiertas dificulta que las endosporas se decoloren una vez teñidas.

2.2.Materiales

- Verde de malaquita al 5% en agua
- Safranina al 1% en agua
- Platina de Koch

2.3. Método para la coloración:

- a. Cubrir la extensión con papel de filtro (dificulta la precipitación del colorante sobre las bacterias)
- b. Depositar la preparación sobre una platina de Koch. Añadir verde de malaquita. Esperar un minuto
- c. Seguir la tinción con calor : en emisión de vapores durante 5-10 minutos
- d. Lavar con agua abundante. Seca
- e. Teñir con safranina (dos minutos). Lavar con agua. Secar. Observar con objetivo de inmersión
- f. Esporas teñidas de verde y células vegetativas teñidas de rosa. Observar la forma, tamaño relativo y posición de la espora en la célula vegetativa.