



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

#### **CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**“VERIFICACIÓN DE UNA CEPA MICROBIANA DEL  
SEDIMENTO DE LA LAGUNA DE SAN ANTONIO, CANTÓN  
RIOBAMBA, PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

Trabajo de titulación para optar por el título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORA:**

**DANIELA ALEJANDRA ROMÁN CÁCERES**

**DIRECTORA:**

**DRA. NANCY VELOZ MAYORGA**

**RIOBAMBA-ECUADOR**

**Marzo 2016**

©2016, Daniela Alejandra Román Cáceres

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“VERIFICACIÓN DE UNA CEPA MICROBIANA DEL SEDIMENTO DE LA LAGUNA DE SAN ANTONIO, CANTÓN RIOBAMBA, PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**, de responsabilidad de la señorita egresada Daniela Alejandra Román Cáceres, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dra. Nancy Veloz

**DIRECTORA DEL  
TRABAJO DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing. Sofía Godoy

**MIEMBRO**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, DANIELA ALEJANDRA ROMÁN CÁCERES, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 18 de Marzo del 2016

DANIELA ALEJANDRA ROMÁN CÁCERES  
060440767-6

Yo, Daniela Alejandra Román Cáceres, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

Daniela Alejandra Román Cáceres.

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme salud, fuerza y sabiduría, para alcanzar esta meta importante.

A mis queridos padres Danilo y Carmen por su sacrificio y esfuerzo, por todo el amor, la dedicación y paciencia, por ser los promotores principales de mis sueños.

A mi hermana Nikole por su alegría, por brindarme su confianza y su cariño.

A toda mi familia que gracias a su apoyo he podido llegar a cumplir esta meta.

Daniela.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por darme vida, fuerza y fe para creer en mí y llegar hasta esta etapa de mi vida.

A mis padres por ser la luz que me indica la salida a cada obstáculo que se me presenta.

De forma muy especial a la Dra. Nancy Veloz, por la confianza depositada y su valiosa colaboración para el desarrollo del presente trabajo.

Mi sincero agradecimiento a mi Asesora del Trabajo de Titulación, Ing. Sofía Godoy por todo su tiempo y ayuda desinteresada, por su motivación por compartir conmigo su conocimiento y mostrarme la excelente persona y profesional que es.

A quienes me apoyaron en el desarrollo de esta investigación con el financiamiento y colaboración en el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (LABCESTTA), principalmente al Dr. Roberto Erazo por todo el apoyo que he recibido de su parte.

Ing. Verónica Bravo, Ing. Daniel Luna por su seriedad, responsabilidad, conocimiento, tiempo y paciencia para guiarme durante el desarrollo de la investigación.

Ing. Fernanda Rivera, por su amistad, su tiempo, su ayuda y su apoyo siempre que lo necesité.

Y de forma general a todos aquellos que me brindaron su cariño, palabras de apoyo y motivación para seguir adelante y conseguir esta meta.

Daniela.

## Tabla de contenido

CAPÍTULO I .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Identificación del problema.....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos .....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos .....	3
CAPÍTULO II.....	5
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
2.2 MARCO TEÓRICO.....	6
2.2.1. Laguna San Antonio .....	6
2.2.2. Sedimentos.....	7
2.2.3. Biotecnología .....	8
2.2.4. Biotecnología Ambiental .....	10
2.2.5. Bacterias.....	13
2.2.6. La bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	32
2.2.7. Reacción en Cadena Polimerasa (PCR).....	36
CAPITULO III.....	41
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	41
3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	41
3.1.1. Lugar de la Investigación.....	41
3.1.2. Hipótesis y especificación de las variables.....	41
3.1.3. Tipo y diseño de investigación .....	42
3.1.4. Unidad de análisis .....	43
3.1.5. Población de estudio .....	44
3.1.6. Tamaño de muestra .....	44
3.1.7. Selección de muestra .....	45
3.2. Análisis de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	46
3.2.1. Activar la cepa de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	46
3.2.2. Identificación y reconocimiento del tipo de bacteria por tinción Gram ...	47
3.2.3. Preparación de medios de cultivo .....	48
3.2.4. Preparación de agar para la siembra .....	51
3.2.5. Siembra de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	54

3.2.6. Conteo bacteriano .....	57
3.2.7. Purificación, ampliación y secuenciación de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	58
CAPITULO IV .....	59
4. Análisis y Resultados.....	59
4.1. Conteo bacteriano Siembra 1.....	59
4.2. Conteo bacteriano Siembra 2.....	62
4.3. Conteo bacteriano Siembra 3.....	64
4.4. Características que presentan las colonias de la bacteria en estudio en agar nutritivo.....	68
4.5. Características de los caldos nutritivos.....	69
4.6. Secuenciación de la cepa L3 <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	70
CAPÍTULO V.....	72
5. Propuesta para aplicabilidad en Biorremediación .....	72
5.1 <i>Bacillus pumilus</i> .....	72
5.2 <i>Bacillus altitudinis</i> .....	77
5.3 Presupuesto estimado para la realización de las investigaciones propuestas	80
CONCLUSIONES .....	81
BIBLIOGRAFIA .....	83
ANEXOS .....	87

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3 Variable de control .....	42
Tabla 2-3 Diseño Experimental .....	43
Tabla 3-3 Nomenclatura del Diseño Experimental.....	43
Tabla 4-3 Codificación cepas bacterianas .....	44
Tabla 5-3 Lógica del Diseño Experimental .....	44
Tabla 6-3 Tipos de Bacterias .....	45
Tabla 7-3 Materiales, Equipos, Sustancias y Reactivos utilizados para la activación de la cepa bacteriana.....	46
Tabla 8-3 Tabla de Siembra.....	55
Tabla 9-4 Conteo Bacteriano Siembra 1 .....	60
Tabla 10-4 Conteo Bacteriano Siembra 2.....	63
Tabla 11-4 Conteo Bacteriano Siembra 3 .....	65
Tabla 12-4 Características de las colonias bacterianas en agar nutritivo .....	68
Tabla 13-4 Incubación de los caldos nutritivos .....	69
Tabla 14-5 Parámetros de control de B.pumilus.....	75
Tabla 15-5 Parámetros de control B. altitudinis .....	78
Tabla 16-5 Presupuesto para la propuesta descrita.....	80

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2 Laguna de San Antonio .....	6
Ilustración 2-2 Sedimentos Lacustres .....	8
Ilustración 3-2 Curva de crecimiento bacteriano .....	17
Ilustración 4-2 Cultivo de enriquecimiento .....	27
Ilustración 5-2 Cultivo puro.....	29
Ilustración 6-2 Cultivo Mixto .....	30
Ilustración 7-2 Ciclo de vida bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	34
Ilustración 8-2 Modo de Acción de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> .....	35
Ilustración 9-2 Análisis ARNr 16s.....	40
Ilustración 10-3 Cepa activada en Caldo Nutritivo .....	47
Ilustración 11-3 Tinción Gram .....	48
Ilustración 12-3 Caldo Nutritivo 1 .....	49
Ilustración 13-3 Caldo X.....	50
Ilustración 14-3 Caldo BHI.....	51
Ilustración 15-3 Agar Nutriente .....	52
Ilustración 16-3 Agar MacConkey .....	53
Ilustración 17-3 Agar Eosin.....	53
Ilustración 18-3 Material utilizado para la Siembra .....	54
Ilustración 19-3 Siembra Bacteriana.....	56
Ilustración 20-3 Caldos Nutritivos a las 72 .....	57
Ilustración 21-3 Conteo Bacteriano .....	57
Ilustración 22-4 conteo bacteriano Siembra1 .....	59
Ilustración 23-4 Conteo Bacteriano Siembra 2.....	64
Ilustración 24-4 Conteo Bacteriano agar MacConkey.....	66
Ilustración 25-4 Conteo Bacteriano agar Nutriente .....	66
Ilustración 26-4 Secuenciación Genética.....	70
Ilustración 27-4 Resultados PCR.....	71
Ilustración 28-5 Cultivos en los que <i>B.pumilus</i> actúa como control biológico .....	74

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A : Procedimiento Tinción Gram .....	87
Anexo B: Preparación del medio de cultivo Caldo Nutritivo1 .....	88
Anexo C: Preparación del medio de cultivo Caldo X.....	90
Anexo D: Preparación del medio de cultivo BHI.....	91
Anexo E: Proceso para preparar Agar Nutritivo.....	92
Anexo F: Proceso para preparar Agar MacConkey .....	93
Anexo G: Proceso para preparar agar Eosin .....	95
Anexo H: Procedimiento para realizar la Siembra 1 .....	96
Anexo I: Procedimiento para realizar la Siembra 2.....	97
Anexo J: Proceso para realizar la Siembra 3 .....	99
Anexo K: Resultados de la secuenciación de la bacteria objeto de estudio .....	101
Anexo L: Estudio de la bacteria <i>B. pumilus</i> .....	105
Anexo M: Estudio de la bacteria <i>B. altitudinis</i> .....	107

## RESUMEN

En la presente investigación se realizó la verificación de la cepa microbiana de la Laguna de San Antonio, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, determinándose mediante pruebas de crecimiento en caldos nutritivos y agares específicos si la cepa microbiana objeto de estudio (L3) correspondía a la bacteria *Xenorhabdus nematophilys*, de característica Gram-, que previamente fue estudiada en otra investigación. Se evaluó la presencia de UFC en cada medio utilizado, se realizó la secuenciación de la cepa microbiana aplicando la reacción en cadena polimerasa (PCR), para finalmente establecer la aplicabilidad del microorganismo definido en un proceso de Biorremediación. En la fase experimental se eligieron cuatro muestras al azar de la cepa L3, mismas que fueron activadas mediante la preparación de caldo nutritivo e incubadas a 35°C. Posteriormente para la masificación de las muestras activadas se prepararon tres tipos diferentes de medios de cultivo: Caldo nutritivo1, Caldo X, Caldo BHI, y para la siembra tres tipos de agares: Agar nutritivo, Agar MacConkey, Agar Eosin. Mediante el método de dilución y vertido en placa, se realizaron tres siembras de las cepas alimentadas en los diferentes medios de cultivo. Tras la incubación se realizó el conteo bacteriano en las cajas que presentaron mayor crecimiento y una vez finalizado, se realizó la purificación, ampliación y secuenciación mediante la PCR de las cepas bacterianas en el laboratorio MacroGen en Corea del Sur. Conociendo las características previas mediante revisión documentada de *Xenorhabdus nematophilys*, y al observar el comportamiento de la bacteria en cada medio utilizado, que no concordaba con lo que se conocía acerca de la misma, era imprescindible recurrir al análisis de secuenciación genética en PCR para confirmar datos. Los resultados determinaron la presencia de dos tipos de bacterias Gram+: *Bacillus pumilus* y *Bacillus altitudinis*, distintas a la especie estudiada, lo que concluye que la identificación de consorcios bacterianos puede ser validada únicamente por este tipo de procedimientos y análisis. La aplicabilidad de los microorganismos encontrados mediante secuenciación genética: *Bacillus pumilus* y *Bacillus altitudinis* son específicamente como control biológico, fungicidas e insecticidas, los mismos que pueden ser aplicados en procesos de biorremediación.

## SUMMARY

The verification of the microbial strain of Laguna de San Antonio, Cantón Riobamba, Chimborazo Province was carried out in this investigation, being determined by growth tests in nutrient broths and specific agars if the microbial strain under study (L3) corresponded to the bacterium *Xenorhabdus nematophilys*, of Gram- characteristic, which was previously studied in other research. The presence of Colony- forming unit (UFC) was evaluated in each means used; the sequencing of the microbial strain was conducted using the polymerase chain reaction (PCR), to finally establish the applicability of the microorganism defined in a bioremediation process. Four samples at random were chosen in the pilot phase from the L3 strain, which were activated by preparing nutrient broth and incubated at 35°C. Subsequently three different types of culture media were prepared for the overcrowding of the activated samples: Nutrient broth 1, Broth X, Broth BHI, and for sowing, three types of agars: Nutrient Agar, MacConkey Agar, and Eosin Agar. Also three sowings of feeding strains were made in the different culture media using the dilution and Pour plate method. The bacterial counting was carried out after the incubation in the boxes which showed a greater growth, and the purification, enlargement and sequencing were performed once completed the process using the PCR of the bacterial strains at Macrogen laboratory in South Korea. Knowing the previous features by documented review of *Xenorhabdus nematophilys*, and observing the behavior of the bacterium in each medium, which was not consistent with what was known about it, it was imperative to resort to the analysis of genetic sequencing in PCR to confirm data. The results showed the presence of two types of Gram+ bacteria: *Bacillus pumillus* and *Bacillus altitudinis*, different from the species under study, which concludes that the identification of bacterial consortiums can be validated only by this type of procedures and analysis. The applicability of microorganisms found through genetic sequencing: *Bacillus pumillus* and *Bacillus altitudinis* are specifically as biological control, fungicides and insecticides, the same that can be applied in bioremediation processes.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Identificación del problema

La contaminación en agua, aire y suelo en la actualidad ha llegado a ser un tema de estudio importante, empezando a tomar conciencia de lo que significa realmente es por ello que hoy en día se han desarrollado varias formas de mitigar la contaminación, entre ellos es el caso de la Biotecnología Ambiental con el uso y la aplicación de microorganismos, los cuales tienen la capacidad de biotransformar cierto tipo de contaminantes. Las bacterias pueden trabajar de manera sinérgica dando buenos resultados, además es importante reconocer que estas se adaptan a distintos medios, como en el caso de lugares contaminados, desarrollando así distintas capacidades para transformar los contaminantes en sustancias menos dañinas para el ambiente.

En la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba, en el lago San Antonio encontramos varios microorganismos entre ellos bacterias, las mismas que se ha demostrado tienen potencial para disminuir o controlar el efecto causado por plagas en los principales cultivos, actualmente existe un uso indiscriminado de pesticidas sintéticos o químicos, de alta, mediana y baja toxicidad, lo que produce una gran contaminación ambiental y envenenamiento sistemático de productores y consumidores de los diferentes productos alimenticios.

Hoy en día se conoce que existe gran contaminación debido a los pesticidas inorgánicos. Con el afán de conservar o alterar lo menos posible la contaminación existente en los

distintos ecosistemas la práctica de bio-control de insectos plaga, mediante el uso de bacterias que trabajan en simbiosis con nematodos entopatógenos (NEP).

## **1.2. Justificación**

La laguna de San Antonio de Padua mediante el análisis de los sedimentos de este cuerpo de agua, permite el desarrollo de la investigación y con el mismo determinar nuevas técnicas que promuevan el cuidado al ambiente, como es el caso de comprobar que microorganismos como la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* que se presume habita en la misma tenga un potencial para actuar como insecticida biológico para el control de plagas en cultivos.

Es una investigación original debido que en el país no se ha hecho el análisis de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* que vive en simbiosis con nematodos que se encargan de transmitir la bacteria al insecto y esta una vez adentro libera toxinas que provocan inmunodepresión al insecto causándole la muerte; es por ello que esta investigación sirve de base para el desarrollo futuro de utilizar *Xenorhabdus nematophilys* como control de plagas en cultivos, contribuyendo a la carrera de Biotecnología Ambiental para que se continúe con este tipo de investigaciones.

Esta investigación es viable desde el punto de vista técnico, debido a que la bioestimulación microbiana nativa es una técnica innovadora, aparte también es viable económicamente ya que se cuenta con el aval y financiamiento del Centro de Transferencia Tecnológica Ambiental (LAB-CESTTA) de la ciudad de Riobamba, el mismo que cuenta con los equipos, insumos e infraestructura necesaria para llevar a cabo la investigación

El desarrollo de la investigación beneficiará a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ya que este tipo de investigación puede ser pionera para alcanzar resultados beneficiosos para la ciudad de Riobamba y los habitantes del área de influencia los cuales se verían beneficiados en cuanto a calidad y salud ambiental, que podrían resultar de esta investigación, aparte es un aporte para alcanzar el desarrollo sostenible de la comunidad, cantón y provincia en general.

El Plan Nacional del Buen Vivir propone el derecho ciudadano a vivir en un ambiente sano, libre de contaminación y sustentable, y la garantía de los derechos de la naturaleza, a través de una planificación integral que conserve los hábitats, gestione de manera eficiente los recursos, repare de manera integral e instaure sistemas de vida en una armonía real con la naturaleza; es por ello que con este tipo de investigaciones se apuesta por la transformación productiva bajo un modelo ecoeficiente con valor económico social y ambiental para así promover la conservación y el uso sostenible de los recursos naturales que tiene el Ecuador.

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo General***

- Verificación de una cepa microbiana del sedimento de la laguna de San Antonio, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo

#### ***1.3.2. Objetivos Específicos***

- Determinar mediante pruebas de crecimiento en caldos nutritivos y agares específicos si la cepa microbiana objeto de estudio corresponde a la bacteria *Xenorhabdus nematophilys*, establecida en investigaciones anteriores.

- Evaluar la presencia de UFC en cada uno de los medios utilizados
- Realizar la secuenciación de la cepa microbiana aplicando la reacción en cadena de la polimerasa
- Establecer la aplicabilidad del microorganismo encontrado en la cepa analizada en un proceso de Biorremediación.

## **CAPÍTULO II**

### **2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN**

En los años ochenta la Laguna de San Antonio de Padua era uno de los principales atractivos turísticos, se observaba su flora y su fauna y permitía compartir momentos de sano esparcimiento al realizar paseos y como un lugar de juegos para los pobladores aledaños. Por otro lado, actualmente su estado ambiental se ve deteriorado la misma que se ve reflejada con la proliferación de totora, alteración de la calidad del agua, sedimentos y deterioro del hábitat de numerosas especies vegetales y animales.

Debido a la contaminación que presenta el lago, surgió el interés de realizar estudios ambientales dirigidos a la descontaminación del agua, principalmente porque estos contaminantes afectan a la salud humana y a las especies que habitan en la misma.

En el año 2014 se realiza la “OBTENCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO NATIVO DEL SEDIMENTO DE LA LAGUNA SAN ANTONIO DEL CANTÓN RIOBAMBA”. Proyecto realizado por la señorita Evelyn Cazorla y financiado bajo el apoyo del CESTTA siendo el fin principal obtener un consorcio bacteriano nativo de la Laguna San Antonio presuntamente contaminado por metales pesados, que ayude en procesos de biorremediación y de esta forma disminuir los impactos ambientales, por esta razón se encuentra empeñado en desarrollar proyectos que contribuyan a este fin, tal es el caso de la investigación realizada para la obtención del consorcio bacteriano.

Los microorganismos del consorcio bacteriano se encuentran aislados e identificados en el área de microbiología del CESTTA para continuar con diferentes investigaciones que

ayuden a mitigar impactos ambientales, estas investigaciones son una inversión para alcanzar un ambiente saludable que ayude al desarrollo sostenible y sustentable logrando así el equilibrio deseado entre el hombre y la naturaleza.

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### ***2.2.1. Laguna San Antonio***

La Laguna San Antonio de Padua se encuentra en la vía a Guano tras las instalaciones de la Universidad Nacional de Chimborazo, en esta podemos encontrar diversos pajaritos de pecho rojo y plumas grises, especies como la garza blanca, patos de plumas negras, además de anfibios como ranas y sapos.

Alrededor de la misma es notoria la invasión y construcción de viviendas sin los permisos correspondientes, a esto se suman otros factores como la contaminación y proliferación de totora, siendo esta crítica, influyendo directamente en la eutrofización, modificación de los niveles de agua y sedimentación, dando como resultado un deterioro del hábitat. Es visible la presencia de basura, material de construcción, animales muertos, pastoreo de animales, dando lugar a que todos estos factores representen una amenaza en la conservación de este recurso (Naranjo, 2013, pág. 129)



**Ilustración 1-2 Laguna de San Antonio**

Fuente: (Naranjo, 2013, pág. 129)

### **2.2.2. Sedimentos**

El sedimento es un material sólido que se encuentra en suspensión en líquido el cual precipita por gravedad hacia el fondo. Los sedimentos pueden permanecer estables durante largos periodos de tiempo así como también pueden ser movidos por fuerzas naturales como el viento o escurrimiento de agua ya sea en la superficie o por curso de agua, ríos y arroyos. (Mayoral, 2000, pág. 505)

La sedimentación ocurre cuando el material sólido es transportado por una corriente de agua y se posa en el fondo del rio, embalse etc. Las corrientes de agua pueden transportar varios materiales sólidos en suspensión y generar sedimentos por sus propias características o a través de la erosión de los causes. (Mayoral, 2000, pág. 507)

#### **2.2.2.1 Tipos de sedimentos lacustres.**

Los procesos sedimentarios depende del tipo de lago que están ligados a los procesos físicos, químicos y biológicos, la sedimentación en lagos está controlada principalmente por el aporte de materiales clásicos, la química de sus aguas y el rango de fluctuaciones de la línea de costa. (Mayoral, 2000, pág. 509)

El medio lacustre está condicionado por la geometría que tenga el lago (volumen, perímetro, área y profundidad), el clima y las señas de identidad del agua del lago, las características del agua que pueden afectar al medio que nos ocupa son la salinidad que tenga, los nutrientes y el oxígeno que posea y finalmente la temperatura, y es que en función de este último valor nos encontramos con diversos lagos: dimícticos, amícticos, monomícticos, polimícticos. (Mayoral, 2000, pág. 510)



### **Ilustración 2-2 Sedimentos Lacustres**

Fuente: (Mayoral, 2000)

#### ***2.2.3. Biotecnología***

La biotecnología es una ciencia tecnológica biológica; la simbiosis de la tecnología con la biología, la aplicación de organismos vivos para crear o modificar productos para usos específicos, esto requiere una serie de procesos industriales que involucran plantas, animales o microorganismos, es así como se buscan nuevas formas de aprovechar la tecnología biológica para generar alimentos más saludables, mejores medicinas, materiales menos contaminantes, fuentes de energía limpia, y sistemas que ayuden a reducir o eliminar la contaminación. (Siqueira, 2008, pág. 55)

Es utilizada para producir bienes y servicios amigables con el ambiente, aun así no siempre es fácil y rápido encontrar organismos adecuados para el fin al que se quiere llegar o para producir un determinado producto, es necesario investigar y así la biotecnología se ve como un enfoque multidisciplinario que involucra varias disciplinas y ciencias como la biología, bioquímica, genética, agronomía, virología, ingeniería química, medicina entre otras. (Palma, 2005, pág. 76)

Entre los bienes que ofrece la biotecnología están los productos químicos, alimentos, combustibles, medicamentos y los servicios incluyen el tratamiento de residuos para disminuirlos o eliminarlos por completo para tener un control en la contaminación. (Palma, 2005, pág. 77)

La biotecnología ha estado presente desde hace mucho tiempo con la utilización de bacterias, levaduras o procesos para mejorar el suelo como es el compost que permite que microorganismos descompongan residuos orgánicos, la biotecnología no es algo nuevo ya que desde la antigüedad se la utilizado en diferentes actividades tales como la preparación de pan utilizando la levadura y de bebidas alcohólicas como el vino con la fermentación de las uvas. (Corona, 2011, pág. 34)

La biotecnología moderna utiliza una gran cantidad de técnicas asociadas con investigaciones en las diferentes disciplinas; la biotecnología es utilizada en cualquier industria que utilice microorganismo, células vegetales y animales, tiene gran impacto en industrias basadas en el carbono, productos químicos y manejo de residuos. Ofrece productos innovadores y tecnologías para combatir las enfermedades debilitantes y raros, reducir nuestra huella ambiental, alimentar a los hambrientos, utilizar menos y una energía más limpia, y tienen más seguro, más limpio y procesos industriales de fabricación más eficientes. (Muñoz, 2001, págs. 55-70).

El interés que ha despertado la biotecnología en los medios académicos y empresariales presenta nuevos retos para desarrollar técnicas y tecnologías más sofisticadas para obtener resultados de forma más rápida y más efectivas presentando nuevos enfoques para el empleo de seres vivos sus procesos y productos para beneficio de estos y de su entorno. (Muñoz, 2001, págs. 57-70)

La biotecnología tiene un impacto global que avanza rápidamente recibiendo un gran apoyo académico político y financiero, esto con el fin de una mejora sustancial en procesos que ya se han conocido anteriormente.

La biotecnología y su impacto en la naturaleza se aplica en gran cantidad de áreas como la agricultura, la alimentación, el medio ambiente, esto para una población que demanda atención sanitaria, alimentos saludables y la conservación de recursos naturales, y así también tiene un impacto en la economía pudiendo considerarse un motor para el crecimiento económico. (Palma, 2005, pág. 103)

#### ***2.2.4. Biotecnología Ambiental***

El uso de Biotecnología Ambiental es común desde tiempo atrás en sistemas de tratamiento de aguas residuales estos fueron desarrollados en la segunda mitad del siglo XIX por ingenieros civiles, incluso si los procesos microbiológicos no eran ampliamente adoptado hasta 1930. (Palma, 2005, pág. 67)

Poco a poco, los ingenieros mecánicos comenzaron a trabajar más en estrecha colaboración con los biólogos para desarrollar sistemas de tratamiento adaptado a la creciente cantidad de aguas residuales procedentes de la fuente urbana e industrial.

La Biotecnología ambiental tiene un papel clave en la realización del desarrollo sostenible duradero, ha desarrollado enfoques innovadores para la mejora de las tecnologías existentes de biorremediación. (Palma, 2005, pág. 70)

Los procesos microbiológicos responsables de la transformación de contaminantes (biodegradación, la movilización, la inmovilización, la desintoxicación) son el motor que impulsa los fenómenos de atenuación natural de la contaminación, es decir, la capacidad de auto purificación de los ecosistemas, sin embargo, la acumulación de contaminantes altamente tóxicos en el ambiente deja claro que el flujo de contaminantes de origen humano es demasiado alta debido a que los microorganismos en condiciones naturales, son capaces por sí mismos para disponer de él, por tanto, es necesario para ayudar a sacar el máximo provecho de su potencial y traducirlos en tecnologías de biorremediación eficaces. (Montero, 2011, pág. 57)

La biotecnología ambiental tiene un enfoque directo a potenciar la biorremediación, mediante bioaugmentación (adición de bacterias competentes, nativos o no nativos, para aumentar la capacidad catabólica relevante para el proceso de biorremediación), que se ha traducido en resultados positivos en relación con algunas cuestiones de la co-contaminación. (Muñoz, 2001, pág. 56)

Los inóculos introducido, tiene que ser metabólicamente competentes y capaces de sobrevivir y para capturar el flujo de energía para guiar activamente a toda la comunidad microbiana hacia los procesos bioquímicos necesarios para la remediación.

La investigación de la biotecnología ambiental se dirige a la identificación de poblaciones metabólicamente competentes y estables presentes en las comunidades microbianas autóctonas de matrices contaminadas. El enfoque implica la caracterización bio-geo-química, el de la matriz, de los contaminantes, así como su concentración y biodisponibilidad. La comunidad microbiana nativa debe estar bien caracterizado, tanto metabólico y estructural. La recopilación de esta información ayuda a evaluar el potencial de las matrices de biorremediación intrínsecas a sí mismos a tratar. (Montero, 2011, pág. 58)

La importancia que se le ha dado al medio ambiente en este tiempo es de gran magnitud, existe un gran desarrollo científico y tecnológico, en lo que se refiere con la transformación de materiales por la acción de agentes biológicos como microorganismos enzimas, células animales, vegetales, bacterias virus entre otros con el fin de proveer bienes y servicios a la sociedad. (Palma, 2005, pág. 60)

Se define a la biotecnología ambiental al conjunto de actividades tecnológicas para entender y manipular sistemas biológicos como los sistemas microbianos que existen en el ambiente, con el fin de aprovecharlos y crear productos y servicios.

La biotecnología ambiental abarca las aplicaciones destinadas a minimizar la contaminación, con la ayuda de microorganismos que ayudan a la generación de combustibles, utilización de microorganismos para la absorción y eliminación de sustancias tóxicas. (Palma, 2005, pág. 63)

El desarrollo de la biotecnología ambiental continúa con el avance de diferentes áreas científicas que presenta un compromiso de calidad, para distintos tratamientos para eliminar o mitigar riesgos al ambiente, así contribuye al desarrollo de procesos que nos permitan disponer de fuentes renovables, tecnologías limpias, bioenergías que ayuden a aligerar problemas ambientales globales. (Muñoz, 2001, pág. 34)

La biotecnología ambiental utiliza tratamientos biológicos viables que son de gran interés ya que presentan un coste relativamente más bajo y conlleva un menor impacto ambiental, esto en base a la degradación de compuestos orgánicos contaminantes, estos procedimientos en la mayoría se los realiza en el mismo lugar de la contaminación, donde se ha producido el impacto, evitando costes de desplazamiento a otras ubicaciones.

La biotecnología ambiental se orienta a aislar microorganismos del medio ambiente, clasificarlos y caracterizarlos fisiológicamente, para de esta manera conocer su potencial, analizar sus capacidades enzimáticas degradadoras para procesos que se puedan aplicar en ayudar al ambiente, en algunos casos llegando a una mejora genética en los microorganismos para obtener cepas más eficientes en degradación de compuestos contaminantes. (Muñoz, 2001, pág. 68)

La biotecnología ambiental junto con tecnologías moleculares ha permitido tener un nuevo enfoque en el estudio de consorcios microbianos y así extender el ámbito de aplicaciones biotecnológicas más allá que se han utilizado en la antigüedad.

La biotecnología ambiental se centra en algunas actividades de interés como las energías alternativas, la creación y disponibilidad de fuentes energéticas renovables, que es uno de los objetivos tecnológicos de este siglo, el control de emisiones de metano procedentes de residuos, de prácticas agrícolas entre otras actividades. (Montero, 2011, pág. 40)

La biotecnología ambiental constituye toda una estrategia preventiva para frenar el deterioro ambiental causado por el abuso de plaguicidas, solventes, herbicidas, fungicidas, metales pesados y otros compuestos químicos, para remediar aguas residuales así como técnicas utilizadas en bioprocesamiento y bioadsorción. (Muñoz, 2001, pág. 26)

#### **2.2.4.1. Biorremediación**

La biorremediación es una técnica innovadora que surge como una rama de la biotecnología con el afán de remediar entornos contaminados, esta técnica se ha venido dando desde la década de los 80 y 90 aplicándose exitosamente en el tratamiento de agentes contaminantes. (Palma, 2005, pág. 56)

Es una tecnología que desarrolla el potencial metabólico de los organismos vivos principalmente bacterias, hongos y levaduras con el fin de transformar contaminantes orgánicos en compuestos poco o nada contaminantes. Con el fin de realizar una biotransformación que es la descomposición de un compuesto orgánico en otro menos tóxico o también una mineralización que es la descomposición a dióxido de carbono, agua, sales inorgánicas y/o biomasa. (Corona, 2011, pág. 47)

#### **2.2.4.1.1. Tipos de Biorremediación**

En los procesos de biorremediación se utilizan organismos con capacidad de biodegradar o de acumular contaminantes como compuestos orgánicos derivados de petróleo o sintéticos o a su vez metales pesados. (Palma, 2005, pág. 72)

##### **a. Biorremediación microbiana**

Se refiere al uso de microorganismos directamente en el foco de la contaminación, estos microorganismos pueden ya existir en ese sitio o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser inoculados en el sitio contaminado.

Hay bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas entre otros. También pueden degradar aunque parcialmente otros compuestos químicos como el PCB, arsénico, selenio, cromo. (Montero, 2011, pág. 45)

También existen contaminantes difíciles de degradar y para los cuales no se han encontrado microorganismos capaces de transformarlos. La biotecnología moderna puede solucionar en parte este problema, generando organismos genéticamente modificados con nuevas capacidades para eliminar tales contaminantes. (Palma, 2005, pág. 73)

#### **2.2.5. Bacterias**

Las bacterias son organismos generalmente unicelulares, microscópicos su tamaño es variable cuyo límite inferior esta en las 0,2m y el superior en las 50m sus dimensiones oscilan entre 0,5 y 1m; pueden presentarse desnudas o con una capsula gelatinosa, aisladas o en grupos y pueden tener cilios o flagelos. (Dreyfus Cortés, 2012, pág. 123)

Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de organismos superiores, por tratarse de células procariotas carecen de núcleo u orgánulos internos, estas pueden tener forma de barra, esfera o hélice. (Stanier, 1996, pág. 134)

Las bacterias son ubicuas, es decir, pueden vivir en tierra, agua, materia orgánica o en plantas y animales y son los seres más abundantes del planeta.

Las bacterias juegan un papel importante en la naturaleza y en el hombre, una de las razones es que están presentes en los ciclos naturales del nitrógeno, del carbono, del fósforo etc. La presencia de una flora bacteriana normal es indispensable, a pesar de que algunos sean patógenos, son de interés por su capacidad de transformar sustancias orgánicas en inorgánicas y viceversa. (Schelegel, 1997, pág. 143)

Las bacterias están presentes desde hace mucho antes que cualquier otra vida en el planeta, desde la antigüedad las bacterias han sido aprovechadas en la industria ya que son muy importantes en la fermentación y en la producción de antibióticos; las bacterias también son un factor importante en la destrucción de plantas y animales muertos ya que pueden desdoblar las distintas sustancias rompiendo sus moléculas, degradándolas y permitiendo que en un futuro puedan ser aprovechadas por otros seres vivos. (García V. , 2004, pág. 125)

Las bacterias de forma natural son también importantes para la creación de medicamentos para el ser humano, alimentos y otras utilidades que se les da, como en la agricultura, las bacterias cumplen una función importante en el suelo ya que las pueden hacer más o menos ricas en todo tipo de sustancias químicas y minerales. (Stanier, 1996, pág. 134)

En la actualidad las bacterias son muy utilizadas en ingeniería genética, son usadas para mejorar cepas bacterianas con fines comerciales; en la industria de los cosméticos son aprovechadas por sus proteínas y péptidos de bajo peso molecular que tienen ingredientes antioxidantes. (Stanier, 1996, pág. 136)

#### **2.2.5.1. Estructura física y química de las bacterias**

- Las bacterias no poseen membrana nuclear por lo que su ADN está libre en la célula, son de organización muy sencilla.
- La célula bacteriana consta de Citoplasma la cual presenta un aspecto viscoso, tiene permeabilidad selectiva frente a las sustancias que entran y salen de la

bacteria, en la zona central aparece un nucleoide donde se encuentra la mayor parte del ADN bacteriano y en algunas existen fragmentos de ADN dispersos en el citoplasma (plasmidos)

- La capsula que poseen las bacterias no son constantes, esta capa gelatinomucosa de tamaño variable, es de importancia en las bacterias patógenas.
- La membrana plasmática presenta mesosomas que son unas pequeñas invaginaciones donde se encuentran enzimas para la síntesis de ATP
- Las bacterias presentan cilios o flagelos, están no existen en ciertas especies, tienen una longitud variable, le sirven a la bacteria como órganos de locomoción
- Las bacterias poseen ARN y ribosomas característicos, para la síntesis de proteínas.
- La pared que la mayoría de bacterias posee es rígida, dúctil, elástica y con moléculas exclusivas de la bacteria, la pared de las bacterias es la que explica su forma.
- Las bacterias por la composición bioquímica de las paredes que poseen, presentan un comportamiento diferente frente a un colorante, conocido como Coloración Gram.
- El núcleo de las bacterias es el encargado de llevar el material genético, que está formado por un único filamento de ácido desoxirribonucleico (ADN). (Stanier, 1996, págs. 130-132)

#### **2.2.5.2. Clasificación de las bacterias**

Existen diferentes criterios para clasificar a las bacterias, ya que estas presentan una gran diversidad metabólica y necesitan de aporte energético para desarrollarse. (Stanier, 1996)

##### **2.2.5.2.1. Según las necesidades de crecimiento:**

- Las bacterias que utilizan luz son fotótrofas, y quimiótrofos obtienen energía de los procesos de oxidorreducción

- Las bacterias quimiosintetizantes, utilizan un compuesto químico como fuente de carbono, y a su vez, este mismo compuesto es la fuente de energía. La mayor parte de las bacterias cultivadas en laboratorios y las bacterias patógenas son de este grupo.
- Las bacterias aparte de fuentes de energía precisan de sustancias precisas para su crecimiento, esto es conocido como factores de crecimiento, ya que son indispensables para el desarrollo del organismo.
- Las bacterias que necesitan de estos factores de crecimiento, son las bacterias autótrofas
- Las bacterias heterótrofas, dentro de este grupo se encuentran las bacterias patógenas o parasitarias, esto es porque este tipo de bacterias parasitan y causan enfermedades a los seres vivos, en este grupo también se encuentran las bacterias de la putrefacción, las encargadas de descomponer las sustancias orgánicas en las que habitan, las bacterias simbióticas que viven cooperando con otros organismos y las bacterias que realizan fermentaciones, fermentos lácticas entre otras. (García, 2004) (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 130)

#### ***2.2.5.2.2. Clasificación de las bacterias según la respiración***

- Bacterias aerobias: son bacterias que necesitan oxígeno para poder vivir, necesitan un medio que contenga gas ya sea disuelto en agua o en forma aérea.
- Bacterias anaerobias: este tipo de bacterias no viven ni se desarrollan en presencia de oxígeno, estas bacterias sustituyen el oxígeno por moléculas inorgánicas como las del carbono, sin necesitar oxígeno suelen realizar procesos de fermentación. (Stanier, 1996, pág. 156)

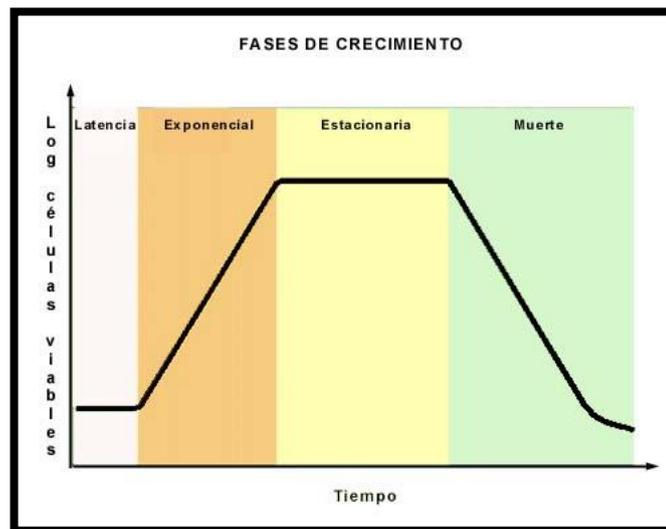
#### ***2.2.5.2.3. Clasificación de las bacterias según su forma***

- Bacilos: este tipo de bacterias poseen una forma semejante a la de una vara, son alargados, curvas o rectas y pueden presentar flagelos; los bacilos pueden ser tanto Gram negativos como Gram positivos.

- Cocos: estas bacterias se caracterizan por poseer una forma redonda o esférica, pueden encontrarse de forma aislada, en pares (diptococos), en cadena (estreptococos), en forma de cuboides (sarcina) y cuando forman configuraciones irregulares similares a racimos de uvas (estafilococos).
- Espirilos: son bacterias que presentan forma helicoidal o también forma de espiral, este tipo de bacterias son muy sensibles a los cambios existentes en el medio en el que viven. (García, 2004) (Prescott, Harley, & otros., 2004, pág. 145)

### 2.2.5.3. Curva de crecimiento de las bacterias

En las bacterias el crecimiento se analiza por medio de la curva de crecimiento de una población microbiana, la misma que tiene cuatro fases diferentes.



**Ilustración 3-2 Curva de crecimiento bacteriano**

Fuente: (García, 2004)

#### a) Fase de latencia

En esta primera fase no se produce una división celular inmediatamente, esto quiere decir que no existe un incremento neto de masa ya que la célula se encuentra sintetizando componentes nuevos. (Stanier, 1996, pág. 127)

En esta fase de latencia replican su ADN, incrementan levemente su masa y se dividen, el tiempo que dura esta fase varía dependiendo del microorganismo y del medio en el que se encuentren, puede ser muy prolongada cuando el inóculo viene de un cultivo viejo o de un cultivo refrigerado. (Schelegel, 1997, pág. 145)

#### b. Fase exponencial

En esta fase exponencial también conocida como logarítmica, si las condiciones del medio son óptimas los microorganismos se desarrollan y dividen hasta un nivel máximo, la velocidad de crecimiento en esta etapa es constante, aquí se duplican en número a intervalos regulares, la población se presenta de manera más uniforme. (Schelegel, 1997, pág. 146)

#### c. Fase estacionaria

En la fase estacionaria la curva de crecimiento se hace horizontal, esto debido a que el crecimiento de la población bacteriana cesa, ya que la concentración de la población es aproximadamente  $10^9$  células/mL, dependiendo de los nutrientes y del tipo de bacteria que sea, se conoce el tamaño final de la población; las bacterias en esta fase permanecen constantes, existe un equilibrio entre la división y la muerte de células. (García V. , 2004)

En la fase estacionaria se agotan los nutrientes esenciales del medio o porque también existen productos de desecho de la fase exponencial, que hacen que este medio sea inhóspito para el crecimiento de la población (Schelegel, 1997, pág. 146)

#### d. Fase de muerte

Las bacterias presentan cambios ambientales nocivos es por ello que se da una disminución en el número de células vivas provocando que se dé inicio a la fase de muerte; hay una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

La muerte de la población microbiana es la pérdida irreversible de la capacidad para multiplicarse; al igual que el crecimiento la muerte es una representación logarítmica, la

velocidad de muerte es muy variable y depende tanto del ambiente como del organismo en concreto. (García, 2004) (Muñoz, 2001)

#### ***2.2.5.4. Identificación de bacterias por la composición de la pared celular que reacciona a la tinción Gram***

La tinción de Gram es quizás la más conocida tinción bacteriana. Es una denominada tinción diferencial, debido a que emplea más de un colorante (a diferencia de las coloraciones simples que emplean sólo una). La tinción Gram consiste en identificar la forma de la célula bacteriana en cocos y en bacilos Gram positivos y Gram negativos dependiendo de la estructura de su pared celular. (García, 2004)

Esta tinción Gram se ha convertido en una característica para diferenciar bacterias, dependiendo de la toma de color: en general se llaman Gram positivas todas las bacterias que son de color de púrpura, mientras que las llamadas Gram negativo cualquier bacteria que se vuelven de color rosa (Stanier, 1996)

##### ***2.2.5.4.1. Diferencias entre Gram Negativas y Gram Positivas***

Las reacciones de tinción en la célula bacteriana son notablemente uniformes.

Para colorear una preparación que se trata con una tinción con cristal violeta durante 2-3 minutos, luego lavar y el colorante se fija con una solución de yodo y yoduro de potasio en agua (líquido de Lugol) durante 1 minuto; en este punto se trata con un blanqueador (alcohol etílico o acetona) y finalmente con un segundo colorante (fucsina, safranina) de color rojo. Las bacterias están teñidas con el segundo colorante son Gram negativos, los que no lo hacen son Gram-positivas. (García, 2004)

La pared celular bacteriana es una estructura muy importante para la fisiología de la bacteria y a menudo también por su acción patógena, se encuentra fuera de la membrana celular y a veces puede estar rodeado por una cápsula mucosa. Sus funciones son para filtrar los nutrientes de la resistencia osmótica. El componente fundamental está formada por un gran polímero llamado peptidoglucano, cuya única estructura está formado por

dos hidratos de carbono: la N-acetil-glucosamina y N-acetil-murámico ácido (NAG y NAM) encadenado entre ellos. (García, 2004)

#### ***2.2.5.4.2. Pared celular de las bacterias Gram positivas***

En las bacterias Gram positivas la pared celular está formada en un 90% de peptidoglicano, se caracteriza por tener un espesor de 15 a 40nm y constituye de 20 a 40% del peso seco de la célula. (García, 2004)

La pared celular además de peptidoglicano, está compuesta por ácidos teicoicos, son constituyentes de la pared y de la membrana celular que están presentes en pequeñas cantidades, estos ácidos teicoicos están unidos por ésteres fosfato y a menudo presentan otros azúcares y D-alanina; los ácidos teicoicos no contribuyen a que la pared tenga rigidez.

La función de los ácidos teicoicos se creen contribuye a la fijación del magnesio, con esto los ácidos teicoicos mantienen las condiciones iónicas adecuadas para las enzimas, constituyen componentes antigénicos superficiales importantes de las bacterias Gram positivas. (García, 2004)

#### ***2.2.5.4.3. Pared celular de las Gram negativas***

Las bacterias Gram negativas presentan una pared celular más delgada que la pared celular que presentan las bacterias Gram positivas, la pared celular de las Gram negativas poseen una capa con peptidoglicán y gran cantidad de lípidos. (Stanier, 1996)

La pared celular de las bacterias Gram negativas es más compleja que la pared celular de las Gram positivas, la capa de peptidoglicano tiene un espesor de 3 a 8nm, esto la hace más delgada que las de las Gram Positivas, además muestran un aspecto ondulado, la pared celular de las Gram negativas constituye alrededor del 20% del peso seco de la célula, y la gran cantidad de lípidos, constituye aproximadamente el 20% del peso seco de la célula. (García, 2004)

#### 2.2.5.5. *Nutrición microbiana*

El crecimiento de los microorganismos va ligado a la presencia de agua y las sustancias que se encuentran disueltas, a partir de las cuales los microorganismos forman su material celular y obtienen energía. (Schelegel, 1997)

Los requerimientos de los distintos microorganismos en cuanto a la composición del medio de cultivo y a las demás condiciones ambientales son muy variables, es por ello que se han descrito varias recetas de la composición de los medios de cultivo para los microorganismos. (Stanier, 1996)

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes, estos sirven para cultivar y mantener microorganismos en un laboratorio, los medios de cultivo dan las condiciones físicas para el desarrollo de los microorganismos, para que este desarrollo sea óptimo el medio de cultivo debe ser el adecuado. (García, 2004)

Para que estos medios sean adecuados ya sea en preparación líquida o sólida y se utilicen para el crecimiento o mantenimiento de los microorganismos deben reunir ciertas condiciones como son: temperatura, grado de humedad, oxígeno y pH; estos deben contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y libres de otros microorganismos contaminantes. (Stanier, 1996)

Las bacterias que necesitan requerimientos más complejos son las bacterias patógenas ya que estas necesitan nutrientes parecidos a los líquidos orgánicos que tiene el cuerpo humano, es por ello que varios cultivos para este tipo de bacterias tienen como base extractos de carne y peptona con algunos otros ingredientes. (Stanier, 1996)

Se usan estos medios para aislar, identificar, valorar la sensibilidad antibiótica entre otras actividades, un medio de cultivo adecuado para estudios microbiológicos poseen fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y diferentes minerales, la composición de los nutrientes dentro del medio de cultivo dependerá del tipo de microorganismo con el que se quiera trabajar, esto se debe a que cada tipo de microorganismos presentan diferentes necesidades nutricionales. (Prescott, Harley, & otros., 2004)

Cuando se preparan medios de cultivo se debe tener cuidado de no contaminarlos, hay que seguir un proceso de control de calidad, para determinar la sus condiciones fisicoquímicas y microbiológicas de esta manera sean óptimos para su uso, de no ser así puede traer resultados negativos al momento de utilizarlos con el microorganismo de estudio, los medio de cultivo se deben almacenar en envases sellados, en un lugar fresco, nunca cerca de autoclaves ni otras fuentes de calor o vapor. (García, 2004)

Para elegir un medio de cultivo adecuado es necesario el conocimiento del hábitat en el que se desarrolla el microorganismo, esto es útil porque el medio de cultivo refleja las condiciones y nutrientes de su ambiente natural. (Schelegel, 1997)

#### ***2.2.5.5.1. Condiciones generales para el cultivo de microorganismos***

##### **a. Nutrientes Adecuados**

En los medios de cultivo es necesario la presencia de vitaminas y sustancias que ayuden al crecimiento, debe tener fuente de carbono, azufre, nitrógeno, fosforo y sales inorgánicas, que harán adecuados los estudios microbiológicos que se lleven a cabo. (Prescott, Harley, & otros., 2004)

##### **b. Fuentes de carbono y energía**

Los organismos que obtienen su energía a través de la fotosíntesis o de la oxidación de compuestos inorgánicos son capaces de utilizar el anhídrido carbónico como fuente principal de carbono. Estos organismos autótrofos para el C reducen el CO<sub>2</sub>. Todos los demás organismos obtienen carbono celular principalmente a partir de nutrientes orgánicos estos se utilizan como fuente de carbono y también como fuente de energía, muchos microorganismos son capaces de utilizar los componentes monoméricos de estos polímeros. (Madigan, Martinko, & Parker, págs. 103-105)

### c. Suplementos

Muchos organismos requieren para su nutrición, además de minerales fuentes de carbono y energía, algunos suplementos o factores de crecimiento. Se trata de algunas sustancias que pertenecen a los componentes básicos de la célula t que no pueden sintetizarse a partir de componentes más sencillos. (Schelegel, 1997)

Los factores de crecimiento pertenecen a tres grupos de sustancias, los aminoácidos, las purinas y pirimidinas así como las vitaminas. Los aminoácidos, purinas y pirimidinas son componentes de las proteínas y los ácidos nucleicos, y la célula los requiere en las cantidades correspondientes; las vitaminas por el contrario, con componentes de coenzimas o grupos prostéticos y tienen por ello funciones enzimáticas o catalíticas y se utilizan únicamente en cantidades muy pequeñas. (Schelegel, 1997)

### d. Azufre y nitrógeno

Ambos elementos se encuentran en la célula predominante en forma reducida, como grupos sulfhidrilo o amino. La mayoría de los microorganismos son capaces de captar estos elementos en su forma oxidada y de reducirlos hasta sulfato y nitrato. La fuente de nitrógeno más común entre los microorganismos es la sal de amonio. (Prescott, Harley, & otros., 2004)

Algunos procariotas son capaces de reducir el nitrógeno molecular, otros microorganismos necesitan aminoácidos, esto es fuentes de nitrógeno que lo contengan ya en forma orgánica, tampoco todos los microorganismos son capaces de reducir el sulfato; algunos requieren sulfuro de hidrógeno y otros cisteína como fuente de S. (Stanier, 1996)

### e. Oxígeno

El oxígeno se encuentra a disposición de las células en forma de agua, está contenido además en el anhídrido carbónico y en muchos compuestos orgánicos, muchos microorganismos necesitan además oxígeno molecular O<sub>2</sub>, cuya principal función es la de aceptor final de electrones en la respiración aeróbica, el O<sub>2</sub> se reduce entonces a agua, las moléculas de oxígeno procedentes del O<sub>2</sub> únicamente se incorporan al material celular

cuando la fuente de carbono es el metano o hidrocarburos de cadena larga o aromáticos. (Stanier, 1996)

Los organismos aeróbicos obligados o estrictos sólo pueden obtener energía mediante la respiración y necesitan O<sub>2</sub>.

Los organismos anaeróbicos obligados sólo pueden crecer en un medio sin O<sub>2</sub> ya que para ellos es tóxico

Los microorganismos anaeróbicos facultativos crecen tanto en presencia o ausencia de O<sub>2</sub>, entre ellos se distinguen dos tipos: las bacterias del ácido láctico, aunque pueden crecer en presencia del oxígeno atmosférico no pueden utilizarlo, sino que obtienen la energía exclusivamente por fermentación son aerotolerantes; otras bacterias anaeróbicas facultativas y muchas levaduras pueden obtener energía tanto por respiración en presencia de O<sub>2</sub> o como fermentación en ausencia de O<sub>2</sub>. (Madigan, Martinko, & Parker)

f. Efecto tóxico del oxígeno sobre bacterias aerobias y anaerobias

El oxígeno es el aceptor terminal de electrones de la respiración aeróbica y por ello esencial para todos los organismos aeróbicos, se sabe bien desde los tiempos de PASTEUR en las investigaciones sobre la formación de ácido butírico por bacterias que el oxígeno es tóxico para las bacterias anaeróbicas estrictas, sin embargo también se conoce que el oxígeno tiene una acción tóxica sobre los organismos aeróbicos y que la mayoría de los organismos dispongan de enzimas que desarrollan un efecto protector contra los productos tóxicos del oxígeno. (Schelegel, 1997)

Otros medios de cultivo tienen como componentes principales infusiones de carne, extractos de levadura, sangre, peptona entre otros, estos componentes representan una fuente fácil de nitrógeno y carbono, en algunos casos también es necesario la presencia de carbohidratos y sales minerales como calcio, magnesio, sodio, potasio y otras sustancias que promuevan el crecimiento. (Prescott, Harley, & otros., 2004)

g. Consistencia adecuada del medio

La consistencia es una parte importante para que el medio de cultivo este en buenas condiciones, dependiendo que sea para medio liquido o sólido se puede modificar su consistencia añadiendo productos como gelatina, agar o albúmina.

Los medios de cultivo solidos son los más utilizados debido a que presentan gran versatilidad y comodidad, pero existen inconvenientes de que no todos los microorganismos se desarrollan adecuadamente a temperaturas inferiores al punto de fusión del solidificante. (García, 2004)

h. Presencia o ausencia de oxígeno

Las bacterias aerobias pueden obtener oxigeno directamente de diferentes sustratos, sin embargo las bacterias anaerobias se desarrollaran en una atmosfera sin oxígeno ambiental. (Stanier, 1996)

i. Condiciones de humedad

Para un buen desarrollo es necesario un nivel mínimo de humedad tanto en el medio como en la atmosfera, es importante que las estufas donde se pone el medio de cultivo a 35-37°C tengan una fuente de agua adecuada para mantener la humedad necesaria y evitar que el medio se dañe. (Schelegel, 1997)

j. Luz ambiental

En su gran mayoría a excepción de los microorganismos fotosintéticos, los microorganismos se desarrollan de mejor manera cuando se encuentran en la oscuridad. (Stanier, 1996)

k. pH

Es un factor muy importante para el crecimiento de los microorganismos, la mayoría crece en medios que tienen un pH neutro ya que en algunas ocasiones puede influenciar y altera o inhibe el crecimiento bacteriano, sin embargo existen algunos tipos de microorganismos que requieren de medios más o menos ácidos. (Madigan, Martinko, & Parker)

## 1. Esterilidad del medio

La esterilidad en los medios de cultivo evita la presencia de otros microorganismos que pueden alterar o impedir el crecimiento normal del microorganismo en estudio, es por ello que deben estar perfectamente estériles, el método más utilizado para esterilizar el medio de cultivo es el uso del autoclave. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 137)

### 2.2.5.6. *Tipos de medio de cultivo*

#### a. Medios sintéticos o definidos

Este tipo de medios se obtienen disolviendo agua destilada con distintas sustancias químicas puras, la composición de este medio dependerá del tipo de microorganismo con el que se trabaje, los componentes de este tipo de medios son de alta pureza. (Schelegel, 1997, pág. 202)

Estos medios definidos se utilizan frecuentemente en investigaciones ya que se quiere conocer que es lo que metaboliza el microorganismo experimental, varias cianobacterias y algas eucariotas se desarrollan bien en este tipo de medios. (Schelegel, 1997, pág. 204)

#### b. Medios Complejos

Este tipo de medios está compuesto por ciertos nutrientes cuya composición química se desconoce, estos medios son producto de realizar infusiones y extractos de materiales complejos. Suelen ser muy útiles, aunque son indefinidos químicamente satisface las necesidades nutricionales de varios microorganismos y se obtiene un buen crecimiento bacteriano. (Schelegel, 1997, pág. 196)

Para muchos microorganismos exigentes no se conoce bien sus requerimientos nutricionales, se cultivan en disoluciones que contienen extracto de levadura, autolisado de levadura, peptona, variadas de nitrógeno, carbono, sales minerales y micronutrientes.

Para algunos grupos de organismos son también utilizados nutrientes como extracto de malta, infusión de heno, jugo de ciruelas, jugo de zanahoria, leche de coco. (Madigan, Martinko, & Parker)

#### **2.2.5.7. Métodos de cultivo selectivo**

El conocimiento de la diversidad de los microorganismos se debe a dos procedimientos, algunos microorganismos han despertado el interés por la formación de colonias, agrupaciones llamativas o por modificaciones en el medio, que a simple vista pueden someterse a un aislamiento directo, para estos microorganismos pudieron establecerse fácilmente los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento que permiten su crecimiento. (Schelegel, 1997, pág. 204)

##### **a. Cultivo de enriquecimiento**



**Ilustración 4-2 Cultivo de enriquecimiento**

Fuente: (wikipedia, 2015)

El método del cultivo de enriquecimiento es muy sencillo, ya que las condiciones son aquellas en las que un organismo se implanta por competencia estableciendo una serie de

factores como fuente de energía de carbono, nitrógeno, aceptor de hidrógeno, atmósfera, luz temperatura, pH entre otros, se determinan condiciones ambientales precisas y se siembra con una población mixta, como la que se presenta en el suelo y en los lodos. (Prescott, Harley, & otros., 2004, pág. 150)

En un caldo de enriquecimiento de este tipo se desarrolla mejor el más adaptado a todos los demás microorganismos, mediante varias transferencias en el mismo caldo de cultivo y extensión en el mismo medio solidificado puede aislarse fácilmente la cepa enriquecida, una resiembra líquido- líquido, después de cortos intervalos de tiempo impide el crecimiento de microorganismos acompañantes. (Schelegel, 1997, pág. 203)

El cultivo de enriquecimiento permite aislar microorganismos con cualquier combinación de requerimientos nutritivos, naturalmente con la premisa de que el tipo elegido se presente en la naturaleza, para los microorganismos muy especializados puede establecerse condiciones de enriquecimiento especialmente selectivas, un medio mineral sin nitrógeno combinado expuesto a la luz es muy selectivo para cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

El éxito de un medio de cultivo de enriquecimiento radica en satisfacer tan solo los requerimientos mínimos de tipo fisiológico que se intenta enriquecer, si por ejemplo se buscan bacterias que oxiden metano o hidrógeno con nitrato o sulfato como aceptor de hidrógenos, hay que procurar eliminar el oxígeno, de otro modo predominarían las bacterias oxidadoras del metano. (Madigan, Martinko, & Parker)

La selección también puede emplear la resistencia o tolerancia frente a ácidos o bases, la influencia del calor o las radiaciones, frecuentemente la selección incluye también una contra selección mediante el empleo de sustancias inhibidoras selectivas.

El material utilizado como inóculo por el experimentador puede haber varias cepas o variantes del mismo tipo fisiológico, que se diferencien por ejemplo solo los óptimos de pH o en las velocidades de crecimiento, si se inocula con este material un cultivo de enriquecimiento predominara la mejor cepa adaptada o la de crecimiento más rápido y el resto de las cepas quedará sobrecrecida por ella y no podrá aislarse. (Madigan, Martinko, & Parker)

b. Cultivo puro



**Ilustración 5-2 Cultivo puro**

Fuente: (wikipedia, 2015)

Se conoce como cultivo puro a la descendencia de una sola célula, la función principal del microbiólogo es la obtención de cultivo puro, demostrar su pureza y mantener el cultivo puro libre de contaminación, el aislamiento del cultivo puro tiene lugar con alguna excepción, sobre o en medios sólidos. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 122)

Se inicia por la separación de una sola célula a partir de una población y requiere también que la colonia que surja de esta célula se mantenga separada de otras células o colonias. Las bacterias aeróbicas se aíslan según el método de vertido en placa (KOCH) o por siembra en estría con el asa de platino sobre medios con agar. Las bacterias anaeróbicas se suspenden en agar calentado a una temperatura de 45°C y se incuban en ausencia de aire, con la separación cuidadosa de una colonia, posterior suspensión en un líquido y nueva siembra por estría o dilución en agar puede conseguirse cultivos puros de la mayoría de microorganismos. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 210)

El aislamiento de un cultivo puro puede hacerse también en medios líquidos, siempre que el organismo predomine en el material de partida. (Stanier, 1996)

c. Cultivo mixto



**Ilustración 6-2 Cultivo Mixto**

Fuente: (wikipedia, 2015)

Las poblaciones naturales están compuestas por lo general de una mezcla de distintos microorganismos, entre ellos se establecen interrelaciones de distinto tipo, estas se basan en la competencia por el sustrato común como comensalismo o mutualismo.

Para el estudio de las interrelaciones de distinto tipo, y otras interrelaciones se hace cada vez más uso de los cultivos discontinuos, tanto en los cultivos estáticos como continuos pueden establecerse condiciones definidas y pueden determinarse sucesiones de distintos organismos y acumulaciones de productos metabólicos, a partir de aquí pueden extraerse conclusiones de relaciones sinérgicas o antagónicas entre los organismos. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 136)

**2.2.5.8. Fisiología del crecimiento bacteriano**

Se entiende por crecimiento el incremento de materia viva y por lo general el incremento en el número de células y de la masa celular, la tasa de crecimiento es una medida de la modificación del número de células o de la masa celular en una unidad de tiempo.

En los microorganismos unicelulares el crecimiento consiste en un incremento en el número de células, la célula bacteriana se multiplica por división binaria, inicialmente la

célula duplica su tamaño a continuación se divide en dos células hijas que tienen el mismo tamaño que la célula madre, el intervalo de tiempo para la duplicación del número de células se denomina tiempo de generación (Madigan, Martinko, & Parker, págs. 146-147)

El tiempo necesario para la duplicación de la masa celular se denomina tiempo de duplicación, si consideramos que el número de células y la masa celular se duplican a lo largo de un mismo lapso de tiempo, el tiempo de generación es igual al tiempo de duplicación. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 148)

#### **2.2.5.9. Método de determinación del número de células y de la masa bacteriana**

Entre el incremento en el número de células y de la masa no tiene que haber una relación fija durante el crecimiento de una población bacteriana en un cultivo discontinuo o por cargas, como por ejemplo una suspensión de bacterias en un matraz de Erlenmeyer, tras la inoculación en el medio de cultivo algunas bacterias se dividen más rápidamente que el incremento en la masa, las células son inicialmente más pequeñas, en una fase posterior del crecimiento, la tasa de incremento de la masa puede sobrepasar a la del número de células. (Schelegel, 1997, pág. 155)

En la consideración de las fases del crecimiento, en las que el incremento del número de células y de la masa son en cierto modo iguales no es necesario diferenciar entre ambas magnitudes, se habla entonces de “células estándar” (Prescott, Harley, & otros., 2004, pág. 166)

#### **2.2.5.10. Determinación del número de bacterias**

En una población bacteriana no todas las células son viables, se consideran células vivas a aquellas que son capaces de formar colonias sobre medios de agar, o de formar suspensiones en caldos líquidos.

Las células viables se establecen mediante los métodos para determinar el número de células viables, en el número total de células se incluyen todas las células que pueden

verse o demostrarse de otro modo esto es se incluyen también las células muertas y las lesionadas. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 147)

#### **2.2.5.11. Determinación de la masa bacteriana**

La elección del método para la determinación de la masa bacteriana depende de para qué se tome como referencia a la masa bacteriana, para la determinación de rendimientos se indica frecuentemente la masa húmeda o seca, para actividades metabólicas o enzimáticas se utiliza el contenido proteico o en nitrógeno, frecuentemente la elección de un método apropiado se efectúa bajo el punto de vista de la sencillez y la rapidez del método. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 148)

##### **a. Métodos indirectos**

Los métodos basados en la determinación en la turbidez son útiles para establecer la masa celular, en los trabajos rutinarios se mide la densidad de una suspensión por su extinción (turbidimetría). En algunas ocasiones la nefelometría es más precisa. La dependencia lineal entre los valores medidos y la masa bacteriana solo se da en ambos métodos cuando se trabaja en la zona de muy baja densidad celular. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 148)

Como la dispersión de la luz depende el diámetro, la forma y el índice de refracción de las partículas dispersantes, también de los componentes internos de la célula, las relaciones entre los valores ópticos y otras magnitudes más directas (masa seca, contenido en nitrógeno o en carbono) hay que establecerlas de nuevo para cada caso. (Madigan, Martinko, & Parker, pág. 150)

#### **2.2.6. La bacteria *Xenorhabdus nemathophilys***

La bacteria *Xenorhabdus nemathophilys* se caracteriza por ser Gram Negativa de la familia Enterobacteriaceae. Este microbio puede ser descrito como entomopatógenos (por

ejemplo, un organismo que puede matar a los artrópodos por envenenamiento con sus propias toxinas o aquellos que alberga). (Akhurst & Boemare, 1988)

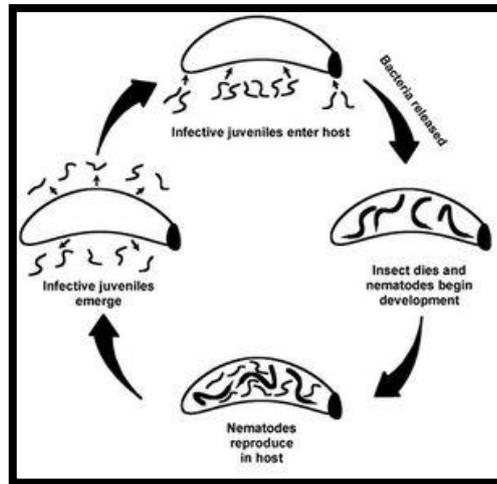
Además de ser patógenas a insectos (Boemare y Akhurst, 1988; Burnell y Stock, 2000; Hinchliffe et al., 2010), producen metabolitos antimicrobianos, antibióticos de bajo peso molecular y enzimas extracelulares. Estos compuestos están involucrados en la destrucción de tejidos de insectos. (Forst y Nealson, 1996; Adams et al., 2006; Hinchliffe et al., 2010).

Este tipo de bacterias tiene una gran importancia ecológica en la agricultura, como una forma de control biológico de especies de insectos plaga. La bacteria *Xenorhabdus nematophilys* actúa en mutualismo con nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Los procesos biológicos de la bacteria corresponden con las necesidades del nematodo y viceversa, juntos en esta relación mutualista resulta en la depredación de especies de insectos plaga. (Hazir et al., 2003). *Xenorhabdus nematophilys* es una bacteria Gram negativa transportadas por nematodos entomopatógenos, esta bacteria produce enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, fosfolipasas y DNAsas, los cuales están involucrados en la destrucción de tejidos de insectos que son utilizados como alimento para los nematodos, por otra parte el nematodo asegura el suministro de nutrientes permitiendo que las bacterias crezcan, también provee una protección contra los depredadores y la dispersión de la especie, ya que la bacteria *Xenorhabdus* encontrándose sola es incapaz de cumplir con sus sitios de multiplicación. La bacteria *Xenorhabdus nematophilys* transportada por el nematodo y una vez liberada prolifera y causa la muerte del insecto a causa de una infección grave en el lapso de 24 a 48 horas. En las etapas iniciales de la infección en insectos, *X. nematophilus* inhibe el crecimiento de varios competidores fúngicos y bacterianas (Ansari et al. 2005). Los metabolitos exudados por la bacteria *Xenorhabdus* se sabe que tienen antifúngico, nematicida, o efectos insecticidas. *X. nematophilus* elimina la competencia de modo que el nematodo en sí pueden usar los nutrientes de la canal larvas de insectos (Floyd et al 2012, Khandelwal et al 2003). La bacteria *X. nematophilus* no se encuentra en el ambiente del suelo. No puede sobrevivir en el agua o el suelo durante mucho tiempo por sí mismo, es por ello que necesita de la ayuda de nematodos (Morgan et al. 2003).

*S. carpocapsae* facilita la muerte del huésped larval. El nematodo es solamente estar libre durante su etapa juvenil infecciosa, y es en este momento que puede dispersarse a través

del ambiente del suelo para localizar una serie de larvas. Esta función ha permitido que ambos organismos se conviertan en omnipresente en casi todos los ambientes del suelo (Shapiro-Ilan et al. 2012).

### 2.2.6.1. Ciclo de vida de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys*



**Ilustración 7-2 Ciclo de vida bacteria *Xenorhabdus nematophilys***

Fuente: (Dreyfus Cortés, 2012)

La bacteria *Xenorhabdus nematophilys* vive en mutualismo con nematodos entopatógenos del género *Steinernema* y son patógenos para algunos tipos de insectos, estos nematodos actúan como vectores en la transmisión de las bacterias a las larvas de insectos, que mueren a los pocos días de la infección. (Dreyfus Cortés, 2012)

Las bacterias *Xenorhabdus* tienen un ciclo de vida extracelular en la hemolinfa y rápidamente coloniza la región del intestino en larvas en estado juvenil de insectos; las bacterias ocupan la matriz extracelular de los tejidos conectivos dentro de las capas musculares del intestino del insecto. (Martens, 2003)

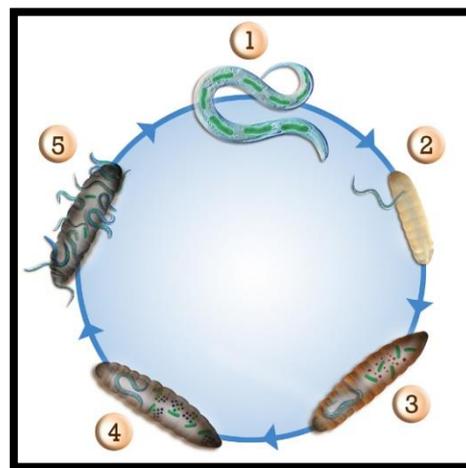
Cuando los nematodos en estado infectivo juvenil alcanzan el intestino del insecto, las células bacterianas se liberan rápidamente, las bacterias salen por el ano de los nematodos y se incrustan en la pared intestinal del insecto.

Una vez allí la bacteria *Xenorhabdus* se encuentra sola en la región del intestino del insecto y es ahí cuando se lleva a cabo la liberación de toxinas que causan la muerte del insecto, las bacterias aun dentro del insecto contribuyen al establecimiento y mantenimiento de condiciones adecuadas para la reproducción de los nematodos en el cadáver del insecto; estos nuevos juveniles infectivos se reasocian con las bacterias *Xenorhabdus* antes de abandonar el cadáver del insecto. (Martens, 2003)

#### 2.2.6.2. Modo de acción de la bacteria *Xenorhabdus nematophylis*

La bacteria *xenorhabdus nematophylis* es transportada por medio del nematodo en estado juvenil II, en la porción ventricular del intestino, una vez que el nematodo consigue entrar al insecto la bacteria es liberada dentro de la hemolinfa donde se propaga, donde se da lugar a diferentes efectos dañinos sobre los insectos hospedantes. (Dreyfus Cortés, 2012)

La bacteria *Xenorhabdus* dentro del insecto incluye efectos como la esterilidad, reducción de la fertilidad, reducción de la actividad de vuelo, desarrollo retardado y otros cambios de conducta tanto físicos como morfológicos, causando muerte por septicemia dentro de 48 horas.



**Ilustración 8-2 Modo de Acción de la bacteria *Xenorhabdus nematophylis***

Fuente: (Dreyfus Cortés, 2012)

La bacteria al multiplicarse dentro del insecto produce enzimas proteolíticas (destructoras de proteínas), que inhibe las defensas antibacteriales del insecto y también produce

antibióticos que evitan el crecimiento de otras bacterias, la bacteria *Xenorhabdus* y sus subproductos proveen al nematodo los componentes necesarios para su desarrollo, principalmente para su sistema reproductor. (Dreyfus Cortés, 2012)

### **2.2.7. Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)**

Es una técnica que permite conseguir varias copias de ADN y es uno de los procedimientos más relevantes que han surgido en genética molecular, antes la obtención de grandes cantidades de ADN para su secuenciación era un proceso largo y fastidioso, actualmente la PCR permite obtener rutinariamente copias y copias de ADN provenientes de muestras muy pequeñas, en una célula la doble cadena de ADN es abierta por enzimas para permitir su replicación. (Ohmae, 1992, pág. 71)

En la PCR las hebras simples de ADN se obtienen calentando fragmentos del mismo a 95°C, luego la muestra es enfriada para permitir que los “primers” complementarios se “anillen” a la hebra original de ADN, de esta manera la ADN polimerasa puede pegarse e iniciar la copia de cada hebra con calentamientos y enfriamientos repetidos se pueden producir millones de ADN en unas pocas horas.

En una reacción de PCR el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos, en la PCR el ADN o gen a amplificar se define como “target” (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como “primers” (cebadores). Un set de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de estos extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación. (Ruano, 1991, págs. 1-4)

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. La automatización del proceso se debe al descubrimiento de la enzima Taq polimerasa termoestable. (Ruano, 1991)

### **2.2.7.1. Componentes de la PCR**

a. Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs).

Es una mezcla de deoxi nucleótidos que sirve de sustrato para la síntesis de nuevo ADN.

b. Iniciadores (primers).

Dos oligonucleótidos que son, cada uno complementarios a una de las dos hebras de ADN, son secuencias cortas de entre 10-30 nucleótidos, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Tienen que estar enfrentados uno en cada hebra del ADN, para delimitar el fragmento a amplificar.

c. ADN polimerasa.

El descubrimiento en 1976 de la Taq polimerasa, un ADN polimerasa extraída de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* que habita medios de muy alta temperatura 50-80°C eliminó los grandes inconvenientes del método de la PCR.

d. ADN molde

Molécula que contiene la región de ADN que se va a amplificar.

### **2.2.7.2 Etapas de la PCR**

La PCR consiste en una serie de cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, por lo general el número de ciclos es de 20 a 30, cada ciclo consiste en tres cambios de temperatura, las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo, dependen de algunos parámetros en los que se incluye, la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción así como la temperatura de unión de los iniciadores.

a. Desnaturalización del ADN

En la primera etapa, la reacción es llevada a una temperatura de 94-96°C y se mantiene entre 30 segundos y 1 minuto, a estas temperaturas el ADN se desnaturaliza, la temperatura a la cual se decide llevar a cabo esta etapa va a depender de la proporción de Guanina- Citocina (G-C) que tenga la hebra, así como también del largo de la misma. (Ruano, 1991, págs. 1-4)

b. Alineamiento del iniciador a la secuencia complementaria

En la segunda etapa también conocida como hibridación, los iniciadores se unen a las regiones 3' complementarias que flanquean el fragmento que se quiere amplificar. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50°C durante 35 segundos, permitiendo el alineamiento, la polimerasa se une entonces al híbrido formado por la cadena molde y el iniciador empezando la síntesis del ADN, los iniciadores actúan como límite de la región de la molécula que va a ser amplificada. (Rodríguez Sánchez, 2004, pág. 3)

c. Extensión de la cadena

En la tercera etapa, la polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementario a la hebra molde, añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5'3' uniendo el grupo 5'fosfato de los dNTPs con el grupo 3'hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente. (Rodríguez Sánchez, 2004)

La temperatura en esta etapa depende de la ADN polimerasa que se utilice, para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está entre 74-80°C, aunque por lo general se usa 74°C, el tiempo de elongación va a depender del tipo de polimerasa empleado, así como también del tamaño de fragmento de ADN que se quiere amplificar. (Ruano, 1991)

d. Elongación final

En la cuarta etapa, la temperatura es regulada de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR, con el objeto de asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado. (Ruano, 1991)

Por último el producto amplificado es mantenido a una temperatura de 4°C por un periodo indefinido lo cual permite conservar el producto de la reacción.

Para comprobar que la PCR ha generado el fragmento de ADN esperado, se emplean técnicas como la electroforesis, que permite separar los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su tamaño, por lo general se emplea la electroforesis en gel de agarosa para fragmentos grandes, en acrilamida para fragmentos más pequeños y asociada a marcaje fluorescente así como la electroforesis capilar. (Rodríguez Sánchez, 2004)

La detección del producto de la PCR se realiza normalmente mediante una corrida electroforética, dependiendo del tamaño del producto de la amplificación y la resolución que se desea, se utiliza diferentes matrices de separación a distintas concentraciones, la posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio con una lámpara de luz UV, tinción de plata, fluorescencia o radioactividad.

La identidad del producto puede ser confirmada mediante hibridación con una sonda marcada radiactivamente, cuya secuencia de bases esté contenida en el fragmento de interés. (Ruano, 1991)

### **2.2.7.3. ARN ribosómico 16s**

En un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16s, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica de los procariotas. (Calvo, 2009, pág. 43)

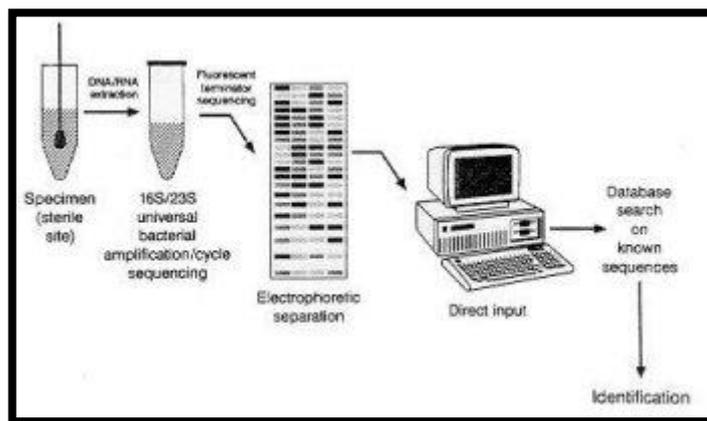
El ARNr se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el ARNr 18s es la macromolécula equivalente, sus secuencias se encuentran altamente conservadas, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen variaciones que se concentran en zonas específicas.

El análisis de la secuencia de los ARNr 16s de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma, se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. (Calvo, 2009, pág. 44)

#### 2.2.7.4. Las aplicaciones del análisis del ARNr 16s

La secuenciación del ARNr 16s es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas, debido a que la molécula ARNr 16s contiene regiones altamente variables, es usualmente posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias.

La caracterización filogénica de los organismos es más que un ejercicio de taxonomía, puesto que las relaciones evolutivas están establecidas en una forma creíble y cuantitativa, se espera que los organismos cercanamente relacionados sean similares en sus propiedades bioquímicas generales y por el contrario la diversidad en las secuencias de ARNr indica diferencias bioquímicas potenciales. (Calvo, 2009, pág. 46)



**Ilustración 9-2 Análisis ARNr 16s**

Fuente: (Calvo, 2009)

Los métodos moleculares pueden ser usados para obtener esencialmente cualquier gen directamente del medio ambiente sin cultivar el organismo en cuestión, así que puede obtener genes de una comunidad total de ADN con la ayuda de genes ya conocidos de organismos que ya se conocen y los genes nuevos pueden también seleccionarse del ADN clonado del medio ambiente por sus actividades, usando vectores diseñados para activar promotores extraños. (Calvo, 2009, págs. 49-50)

## CAPITULO III

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

##### 3.1.1. *Lugar de la Investigación*

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental CESTTA, cuyo personal que desarrolla actividades en cada una de sus diferentes áreas es adecuadamente capacitado.

El CESTTA está ubicado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo-ESPOCH, Facultad de Ciencias, a 2 756 m.s.n.m. con una temperatura que oscila entre 13 – 17 °C, una humedad relativa entre 30 – 40 % y una presión atmosférica de 540 mm Hg.

##### 3.1.2. *Hipótesis y especificación de las variables*

- *Hipótesis*

La cepa microbiana en estudio pertenece a la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* indicada en el estudio antecesor.

### ***Variables de la investigación***

- *Variable Dependiente*

El crecimiento de la cepa microbiana estudiada

- *Variable Independiente*

Condiciones de los medios de cultivo

- *Variable control*

**Tabla 1-3 Variable de control**

<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>
<b>Temperatura</b>	Las cepas de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i> se desarrolla a temperatura adecuada aproximadamente a 35.5°C

Elaborado por: Román D.

#### ***3.1.3. Tipo y diseño de investigación***

Esta investigación es de tipo Descriptiva, experimental, se trabajan con variables en condiciones rigurosamente controladas, esto con el fin de poder describir el comportamiento y el avance de la investigación. Se emplea un grupo de control para comparar los resultados obtenidos en el grupo experimental, para así poder investigar relaciones de causa-efecto.

Es por ello que las muestras de cepas bacterianas de la laguna San Antonio se tomaron de forma aleatoria y se manipuló la variable independiente para determinar el posible potencial de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* como biopesticida.

Por lo tanto se planteó un diseño con preprueba-postprueba y grupo control, en la que se denota:

**Tabla 2-3 Diseño Experimental**

RGE <sub>1</sub> O <sub>1</sub> X <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
RGE <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
RGE <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
GC <sub>4</sub> O <sub>7</sub> - O <sub>8</sub>

Elaborado por: Román D.

**Dónde:**

**Tabla 3-3 Nomenclatura del Diseño Experimental**

Código	Descripción
RGE <sub>1</sub> RGE <sub>2</sub> RGE <sub>3</sub> RGE <sub>4</sub>	Grupos experimentales de cepas seleccionados al azar.
GC <sub>4</sub>	Grupo de control.
O <sub>1</sub> O <sub>3</sub> O <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Observaciones previa al tratamiento
X <sub>1</sub>	Medio de cultivo 1(caldo nutritivo 1 rico en glucosa)
X <sub>2</sub>	Medio de cultivo 2 (caldo X
X <sub>3</sub>	Medio de cultivo 3. (caldo BHI rico en C, N)
O <sub>2</sub> O <sub>4</sub> O <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	Observaciones posteriores al tratamiento.

Elaborado por: Román D.

#### 3.1.4. Unidad de análisis

Cepas de la Bacteria *Xenorhabdus nematophilys* encontrada en sedimentos de la Laguna de San Antonio que se encuentran almacenadas y congeladas en LABCESTTA

### 3.1.5. Población de estudio

La población corresponde a 3 cepas de bacterias *Xenorhabdus nematophilys*, codificadas RGE1, RGE2, RGE3 que se explica en la tabla 4-3

### 3.1.6. Tamaño de muestra

Por los requerimientos para el análisis de laboratorio, se requirió una muestra de 3 cepas de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* tabla 4-3

**Tabla 4-3 Codificación cepas bacterianas**

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
<b>RGE1</b>	CEPA 1
<b>RGE2</b>	CEPA 2
<b>RGE3</b>	CEPA 3
<b>GC4</b>	CEPA 4

Elaborado por: Román D.

**Tabla 5-3 Lógica del Diseño Experimental**

<b>RGE1 (CEPA1)</b>	<b>O1</b>	<b>X1</b>	<b>O5</b>	-
<b>RGE2 (CEPA2)</b>	O2	X2	O6	-
<b>RGE3 (CEPA3)</b>	O3	X2	X3	O7
<b>GC4(CEPA4)</b>	O4	-	-	O8

Elaborado por: Román D.

La tabla 5-3 se trata de la lógica del diseño experimental, el cual consta de un grupo experimental aleatorio asociado con tres tratamientos, y sus observaciones una previa al tratamiento y una observación posterior a la fase experimental, concluyendo con un grupo de control que no está sometido a ningún tipo de tratamiento y con el que se puedan relacionar los resultados.

### 3.1.7. Selección de muestra

El muestreo es por conveniencia; se tomará la cantidad necesaria de las bacterias *Xenorhabdus nematophilys* que se encuentran aisladas en el LAB-CESTTA, recolectadas e identificadas previamente en la tesis de grado titulada "OBTENCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO NATIVO DEL SEDIMENTO DE LA LAGUNA SAN ANTONIO DEL CANTÓN RIOBAMBA"

Se realizó la obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna San Antonio, ciudad Riobamba, provincia Chimborazo, para posteriormente realizar la biorremediación en sedimentos contaminados.

Se inocularon las muestras del sedimento, consecutivamente estas se aislaron hasta obtener cepas puras, se realizó la caracterización macroscópica y microscópica, seguidamente se elaboraron bancos bacterianos, con la ayuda de equipos como autoclave, cámara de flujo horizontal e incubadora.

Se realizaron pruebas de degradación de contaminantes, pruebas de antagonismo y finalmente se llevó a cabo la masificación del consorcio bacteriano.

Por medio de la identificación bioquímica se determinó que existen las siguientes cepas:

**Tabla 6-3 Tipos de Bacterias**

NOMBRE DE LA CEPA	CÓDIGO SOFTWARE	NOMBRE CIENTÍFICO	PORCENTAJE DE PROBABILIDAD
L3	00044020	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	98.46%
L4	00200000	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	93.5%
L5	00240000	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	93.5%
L7	00654020	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	79.51%
L9	24340220	<i>E. coli – inactiva</i>	87.94%
L10	00044020	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	98.46%
L12	60200024	<i>E. coli – inactiva</i>	96.48%

Elaborado por: Cazorla E.

La tabla 6-3 representa la identificación bioquímica y la probabilidad de tener cepas de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* las cuales fueron codificadas como L3, L4, L5, L7, L10 resultado de la tesis de grado titulada "OBTENCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO NATIVO DEL SEDIMENTO DE LA LAGUNA SAN ANTONIO DEL CANTÓN RIOBAMBA" a partir de estos resultados se eligió la cepa L3 de *Xenorhabdus nematophilys* que se encuentra en LAB-CESTTA para continuar con la investigación debido a que presenta el mayor porcentaje de probabilidad, se cogió al azar tres cepas codificadas como RGE1, RGE2, RGE3 y una cepa más como grupo de control GC4 se explica en la tabla 4-3

### 3.2. Análisis de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys*

#### 3.2.1. Activar la cepa de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys*

Las cepas de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* se encontraban almacenadas y congeladas, se eligieron cuatro cepas al azar para su activación se las dejó a temperatura ambiente durante una hora, se preparó caldo nutritivo para 10mL con agua destilada para cuatro tubos tapa rosca, se esterilizó el caldo nutritivo a 121°C y 1 atm de presión se dejó enfriar para que no exista un choque térmico, una vez que estaban a temperatura ambiente se introdujo la bacteria en el caldo nutritivo y se dejó incubar por 24h en una estufa a 35.5°C

**Tabla 7-3 Materiales, Equipos, Sustancias y Reactivos utilizados para la activación de la cepa bacteriana**

Elaborado por: Román D.

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Sustancias y Reactivos</b>
Tubo tapa rosca	Incubadora	Caldo nutritivo
	Autoclave	Cepa de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophilys</i>



**Ilustración 10-3 Cepa activada en Caldo Nutritivo**

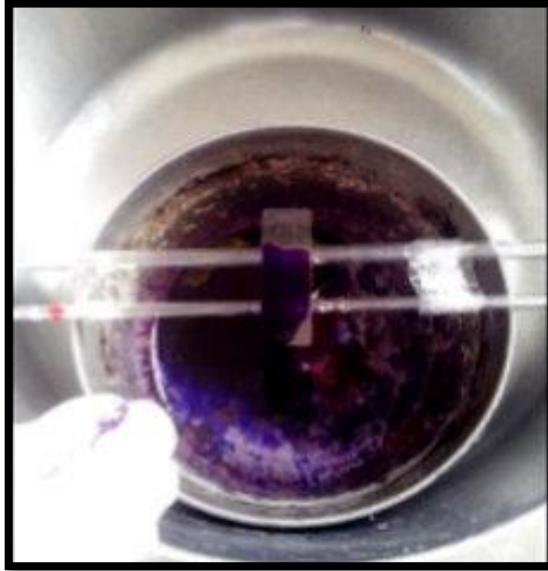
Elaborado por: Román D.

### ***3.2.2. Identificación y reconocimiento del tipo de bacteria por tinción Gram***

La tinción se realizó para comprobar que las bacterias son Gram negativas, ya que por revisión bibliográfica se sabe que la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* presentan doble membrana celular característica de las bacterias Gram negativas.

Se utilizaron las bacterias inoculadas durante 24h en caldo nutritivo, se tomó una muestra directa de la superficie, del medio y del final del tubo tapa rosca que contenía la bacteria y se realizaron frotis en tres portaobjetos limpios que se observaron en el microscopio.

Se puede ver el procedimiento en el anexo A.



### **Ilustración 11-3 Tinción Gram**

Elaborado por: Román D.

#### **3.2.3. Preparación de medios de cultivo**

Se prepararon tres tipos diferentes de medios de cultivo se denominaron:

- Caldo nutritivo 1
- Caldo X
- Caldo BHI

##### **3.2.3.1. Caldo Nutritivo 1**

Se eligió el caldo nutritivo 1 debido a que fue utilizado para la masificación del consorcio bacteriano de la tesis que precede a esta investigación.

Se pesaron todos los componentes de caldo nutritivo para 1000 mL de agua destilada una vez que se mezcló homogéneamente en un Erlenmeyer, se esterilizó a 121°C y 1atm de presión para mantener las condiciones de asepsia y evitar que otros microorganismos contaminen el medio.

Una vez esterilizado se dejó enfriar hasta que esté a temperatura ambiente y se introdujo la cepa activada anteriormente, se colocó una manguera conectada a un motor de pecera

con el fin de proporcionar aireación al medio y que las bacterias pudieran desarrollarse de mejor manera, se dejó incubar por 24h a temperatura ambiente.

Se puede ver el procedimiento en el anexo B.



**Ilustración 12-3 Caldo Nutritivo 1**

Elaborado por: Román D.

### ***3.2.3.2. Caldo nutritivo denominado Caldo X***

El medio de cultivo denominado caldo X fue elegido mediante revisión bibliográfica según el método Akhurst para aislamiento e identificación de bacterias *Xenorhabdus nematophilys*

Se pesaron todos los componentes de caldo X para 1000mL de agua destilada una vez que se mezcló homogéneamente en un Erlenmeyer, se esterilizó a 121°C y 1atm de presión para mantener las condiciones de asepsia y evitar que otros microorganismos contaminen el medio.

Una vez esterilizado se dejó enfriar hasta que esté a temperatura ambiente y se introdujo la segunda cepa activada anteriormente, se colocó una manguera conectada a un motor

de pecera con el fin de proporcionar aireación al medio y que las bacterias pudieran desarrollarse de mejor manera, se dejó incubar por 24h a temperatura ambiente.

Se puede ver el procedimiento en el anexo C.



**Ilustración 13-3 Caldo X**

Elaborado por: Román D.

### **3.2.3.3. Caldo nutritivo BHI**

El caldo nutritivo BHI fue elegido mediante revisión bibliográfica ya que es un medio rico en nutrientes para bacterias Gram negativas, y se conoce que la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* si se desarrolla en este medio.

Se pesó caldo BHI para 1000mL de agua destilada una vez que se mezcló homogéneamente en un Erlenmeyer, se esterilizó a 121°C y 1atm de presión para mantener las condiciones de asepsia y evitar que otros microorganismos contaminen el medio.

Una vez esterilizado se dejó enfriar hasta que esté a temperatura ambiente y se introdujo la tercera cepa activada anteriormente, se colocó una manguera conectada a un motor de pecera con el fin de proporcionar aireación al medio y que las bacterias pudieran desarrollarse de mejor manera, se dejó incubar por 24h a temperatura ambiente.

Se puede ver el procedimiento en el anexo D.



**Ilustración 14-3 Caldo BHI**

Elaborado por: Román D.

#### ***3.2.4. Preparación de agar para la siembra***

Se prepararon tres diferentes tipos de agar para realizar la siembra

- Agar nutritivo
- Agar MacConkey
- Agar Eosin

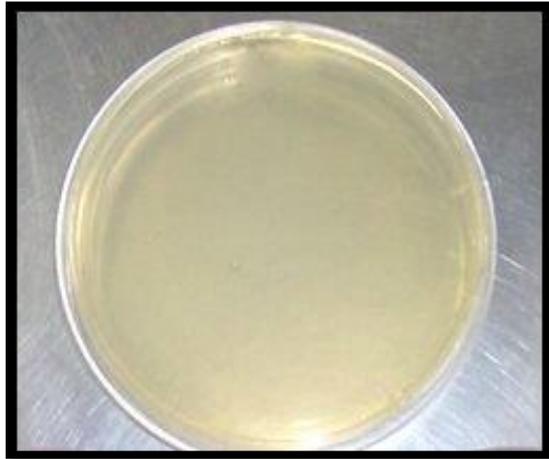
##### ***3.2.4.1. Agar Nutritivo***

Se eligió agar nutritivo debido a que es muy útil para el crecimiento de varios tipos de bacterias, las características de sus componentes son ideales para bacterias que son poco exigentes en sus requerimientos nutricionales.

Se pesó agar nutritivo para 2000 mL de agua destilada una vez mezclado homogéneamente se puso en el autoclave a 121°C y 1atm de presión, se dejó enfriar hasta una temperatura adecuada para poner en las cajas Petri, se dejó solidificar se sellaron con cinta parafilm y se pusieron a refrigerar para posteriormente ser utilizadas en la siembra.

Se preparó esa cantidad de agar debido a que las siembras estaban programadas para realizarse varias repeticiones en diferentes horas, también se tuvo mucho cuidado con la asepsia para evitar contaminar el agar y evitar la presencia de otros microorganismos.

Se puede ver el procedimiento en el anexo E.



**Ilustración 15-3 Agar Nutriente**

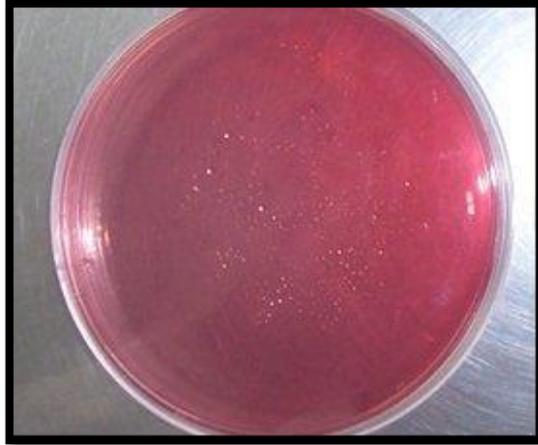
Elaborado por: Román D.

#### ***3.2.4.2. Agar MacConkey***

Se eligió el agar MacConkey mediante revisión bibliográfica, este agar es adecuado para el crecimiento de bacterias Gram negativas ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas.

Se pesó agar MacConkey para 2000 ml de agua destilada una vez mezclado homogéneamente se puso en el autoclave a 121°C y 1atm de presión, se dejó enfriar hasta una temperatura adecuada para poner en las cajas Petri, se dejó solidificar se sellaron con cinta parafilm y se pusieron a refrigerar para posteriormente ser utilizadas en la siembra.

Se puede ver el procedimiento en el anexo F.



**Ilustración 16-3 Agar MacConkey**

Elaborado por: Román D.

#### **3.2.4.3. Agar Eosin**

Se eligió el agar Eosin debido a que también es adecuado para el crecimiento de bacterias Gram negativas pero que poseen escasas exigencias nutricionales.

Se pesó agar Eosin para 100 mL de agua destilada una vez mezclado homogéneamente se puso en el autoclave a 121°C y 1atm de presión, se dejó enfriar hasta una temperatura adecuada para poner en las cajas Petri, se dejó solidificar se sellaron con cinta parafilm y se pusieron a refrigerar para posteriormente ser utilizadas en la siembra.

Se puede ver el procedimiento en el Anexo G.



**Ilustración 17-3 Agar Eosin**

Elaborado por: Román D.

### 3.2.5. *Siembra de la bacteria Xenorhabdus nematophilys*

#### 3.2.5.1. *Siembra 1*

La siembra 1 se realizó mediante el método de dilución y vertido en placa, donde se utilizó el medio de cultivo Caldo nutritivo 1 y el agar nutritivo se realizaron siembras en la hora0, hora1, hora2, hora3, hora4, hora5, hora6, en cada hora se hizo diluciones hasta  $1 \times 10^{-9}$  y en la hora 24 y hora 30 fue una siembra directa se dejaron incubar por 48h a  $37^{\circ}\text{C}$  y a continuación el conteo bacteriano.

Tabla 8-3 La primera columna indica las horas a las que se realizaron las siembras de la bacteria en las cajas Petri, la segunda columna indica el número de diluciones realizadas para las siembras de la bacteria, la tercera columna indica el tipo de agar

Se puede ver el procedimiento en el Anexo H



**Ilustración 18-3 Material utilizado para la Siembra**

Elaborado por: Román D.

Tabla 8-3 Tabla de Siembra

HORA	DILUCION	AGAR
0	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente
1	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente
2	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente
3	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente
4	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente
5	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente
6	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente
24	directo	Nutriente
		Nutriente
30	directo	Nutriente
		Nutriente

Elaborado por: Román D.

### 3.2.5.2. *Siembra 2*

La siembra 2 se realizó mediante el método de dilución y vertido en placa; se utilizó el medio de cultivo Caldo X y el agar MacConkey se realizaron siembras en la hora0, hora1, hora2, hora3, hora4, hora5, hora6, en cada hora se hizo diluciones hasta  $1 \times 10^{-5}$  y en la hora 24 y hora 30 fue una siembra directa se dejaron incubar por 48h a  $37^{\circ}\text{C}$  y a continuación el conteo bacteriano.

Se puede ver el procedimiento en el Anexo I.



**Ilustración 19-3 Siembra Bacteriana**

Elaborado por: Román D.

### 3.2.5.3. *Siembra 3*

La siembra 3 se realizó mediante el método de dilución y vertido en placa, donde se utilizó el medio de cultivo Caldo X y el medio de cultivo BHI, el agar MacConkey, agar Nutritivo y agar Eosin se realizaron siembras en la hora0, hora1, hora8, en cada hora se hizo diluciones hasta  $1 \times 10^{-5}$  en la hora 24 y hora 48 fue una siembra directa, se dejaron incubar por 72h a  $35.5^{\circ}\text{C}$ ,  $44^{\circ}\text{C}$  y a continuación el conteo bacteriano.

Se puede ver el procedimiento en el Anexo J.



**Ilustración 20-3 Caldos Nutritivos a las 72**  
Elaborado por: Román D.

### 3.2.6. *Conteo bacteriano*

Tras la incubación se observan las colonias bacterianas en la superficie del agar, cada colonia representa a una unidad formadora de colonia (UFC).

Se seleccionaron las cajas donde se observó un número de colonias comprendidas entre 30-300 y se contó el número de colonias presentes

Las cajas que presentaron mayor crecimiento se realizó conteo por cuadrantes.



**Ilustración 21-3 Conteo Bacteriano**  
Elaborado por: Román D.

### ***3.2.7. Purificación, ampliación y secuenciación de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys****

Una vez finalizado el conteo, se procedió a realizar la purificación, ampliación y secuenciación de las cepas bacterianas almacenadas en LABCESTTA para tener la seguridad de que existe la presencia de bacterias *Xenorhabdus nematophilys*.

Al no contar con los equipos necesarios para el procedimiento, se envió muestras de la cepa L3 tabla 6-3, al laboratorio Macrogen en Corea del Sur.

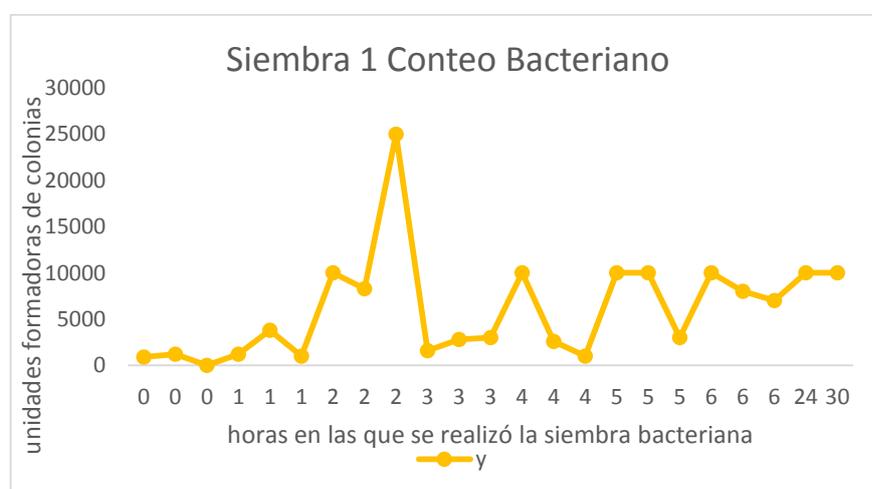
## CAPITULO IV

### 4. Análisis y Resultados

En el capítulo anterior se detalla cómo se han realizado las tres siembras de la cepa objeto de estudio en tres diferentes caldos nutritivos y agares específicos, con la finalidad de evaluar el crecimiento en cada uno de ellos, así poder determinar que medio es el adecuado y verificar si la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* se encuentra presente en la cepa microbiana.

#### 4.1. Conteo bacteriano Siembra 1

El conteo bacteriano de la Siembra 1 se indica en la Tabla 9-4 que se realizó con caldo nutritivo1 y agar nutritivo, la cuarta y quinta columna indican las colonias de bacteria que crecieron en la caja Petri, y la sexta indica la temperatura a la que se incubaron las cajas. La ilustración 22-4 expresa el crecimiento obtenido en la Siembra 1, el eje de las “y” representa la UFC, mientras que en el eje de las “x” las horas y las diluciones realizadas durante la siembra.



**Ilustración 22-4 conteo bacteriano Siembra1**

Elaborado por: Román D.

**Tabla 9-4 Conteo Bacteriano Siembra 1**

HORA	DILUCION	AGAR	RESULTADO		T°
0	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente	90	900 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente	12	1200 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente	-	-	37
1	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente	120	1200 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente	38	3800 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente	1	1000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-9</sup>	Nutriente	-	-	37
2	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente	incontable	incontable	37
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente	83	8300 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente	25	25000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente	-	-	37
3	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente	160	1600 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente	28	2800 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente	3	3000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente	-	-	37
4	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente	incontable	incontable	37
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente	26	2600 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente	1	1000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	Nutriente	-	-	37
5	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente	incontable	incontable	37
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente	incontable	incontable	37
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente	3	3000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente	-	-	37
6	1x10 <sup>-1</sup>	Nutriente	3	30000000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-2</sup>	Nutriente	incontable	incontable	37
	1x10 <sup>-3</sup>	Nutriente	80	8000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-4</sup>	Nutriente	7	7000 ufc/ml	37
	1x10 <sup>-5</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	Nutriente	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	Nutriente	-	-	37
24	directo	Nutriente	incontable	incontable	37
		Nutriente			37
30	directo	Nutriente	incontable	incontable	37
		Nutriente			37

Elaborado por: Román D.

A continuación se indica el crecimiento microbiano en función del tiempo.

- Hora 0: Se revisaron las cajas de agar Nutritivo en la que se observó crecimiento bacteriano en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  en las cuales las colonias se presentan de tal forma que pueden ser contadas con facilidad. En las cajas de las diluciones  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  no se observó crecimiento bacteriano.
- Hora 1: Se revisaron las cajas de agar Nutritivo en la que se observó crecimiento bacteriano en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  en las cuales las colonias se presentan de tal forma que pueden ser contadas con facilidad. En las cajas de las diluciones  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$  no se observó crecimiento bacteriano.
- Hora 2: Se revisaron las cajas de agar Nutritivo en la que se observó crecimiento bacteriano en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$  en la que el crecimiento bacteriano fue alto lo cual no pudo ser contado,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  en las cuales las colonias se presentan de tal forma que pueden ser contadas con facilidad. En las cajas de las diluciones  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$  no se observó crecimiento bacteriano.
- Hora 3: Se revisaron las cajas de agar Nutritivo en la que se observó crecimiento bacteriano en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  en las cuales las colonias se presentan de tal forma que pueden ser contadas con facilidad. En las cajas de las diluciones  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$  no se observó crecimiento bacteriano.
- Hora 4: Se revisaron las cajas de agar Nutritivo en la que se observó crecimiento bacteriano en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$  en la que el crecimiento bacteriano fue alto lo cual no pudo ser contado,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  en las cuales las colonias se presentan de tal forma que pueden ser contadas con facilidad. En las cajas de las diluciones  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$  no se observó crecimiento bacteriano.
- Hora 5: Se revisaron las cajas de agar Nutritivo en la que se observó crecimiento bacteriano en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  en las que el crecimiento bacteriano fue alto las cuales no pudieron ser contadas,  $1 \times 10^{-3}$  en las cuales las colonias se presentan de tal forma que pueden ser

contadas con facilidad. En las cajas de las diluciones  $1 \times 10^{-4}$   $1 \times 10^{-5}$   $1 \times 10^{-6}$   $1 \times 10^{-7}$   $1 \times 10^{-8}$   $1 \times 10^{-9}$  no se observó crecimiento bacteriano.

- Hora 6: Se revisaron las cajas de agar Nutritivo en la que se observó crecimiento bacteriano en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$  en la que el crecimiento bacteriano fue alto lo cual no pudo ser contado,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  en las cuales las colonias se presentan de tal forma que pueden ser contadas con facilidad. En las cajas de las diluciones  $1 \times 10^{-4}$   $1 \times 10^{-5}$   $1 \times 10^{-6}$   $1 \times 10^{-7}$   $1 \times 10^{-8}$   $1 \times 10^{-9}$  no se observó crecimiento bacteriano.
- Hora 24: la siembra se realizó de forma directa del tubo que contenía la bacteria, el crecimiento fue alto en las cajas.
- Hora 30: la siembra se realizó de forma directa del tubo que contenía la bacteria, el crecimiento fue alto en las cajas.
- En la siembra 1 solo se observaron crecimiento en las diluciones  $1 \times 10^{-1}$   $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ , esto se debe a que existe mayor concentración de muestra de las bacterias alimentadas en caldo nutritivo, es por ello que en la primera dilución  $1 \times 10^{-1}$ , la concentración de biomasa es más alta por lo cual hace que no sea posible contar las colonias que se forman en el agar.

#### 4.2. Conteo bacteriano Siembra 2

En la siembra 2 se utilizó agar MaConkey y caldo nutritivo X, medios de cultivos específicos para la especie *Xenorhabdus nematophilys*, se observó las cajas sembradas durante 48h para evaluar el crecimiento bacteriano

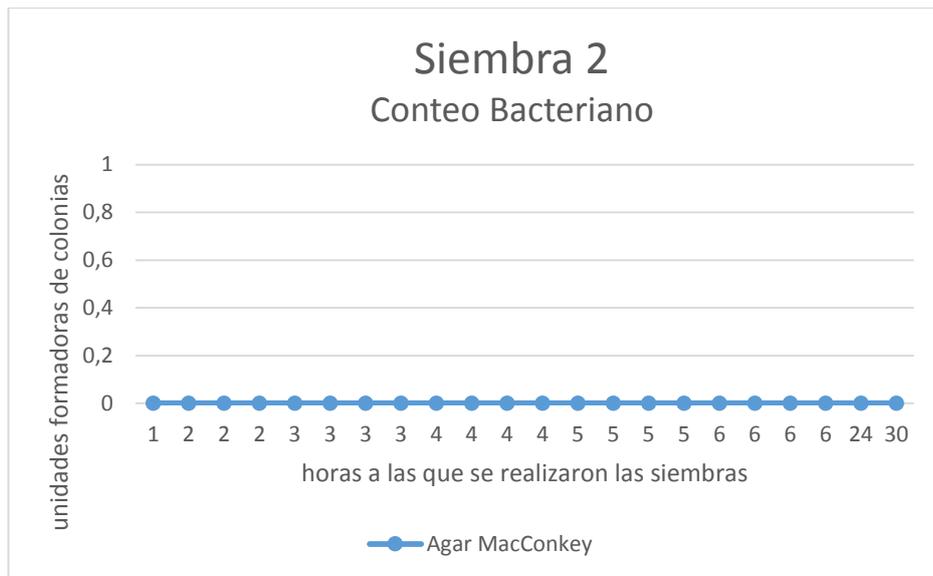
Tabla 10-4: la tabla indica el resultado del conteo bacteriano de la Siembra 2 que se realizó con Caldo X y agar MacConkey, la cuarta y quinta columna indican las colonias de bacteria que crecieron en la caja Petri, la sexta columna indica la temperatura a la que se incubaron las cajas.

La ilustración 23-4 expresa el crecimiento obtenido en la Siembra 2, el eje de las “y” representa la UFC, mientras que en el eje de las “x” las horas y las diluciones realizadas durante la siembra.

**Tabla 10-4** Conteo Bacteriano Siembra 2

HORA	DILUCION	AGAR	RESULTADO		T°
			NUMERO DE COLONIAS OBSERVADAS	CONCENTRACION DE UFC	
0	1x10 <sup>-1</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-2</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-3</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-4</sup>	MacConkey	-	-	37
1	1x10 <sup>-1</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-2</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-3</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-4</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-9</sup>	MacConkey	-	-	37
	2	1x10 <sup>-1</sup>	MacConkey	-	-
1x10 <sup>-2</sup>		MacConkey	-	-	37
1x10 <sup>-3</sup>		MacConkey	-	-	37
1x10 <sup>-4</sup>		MacConkey	-	-	37
1x10 <sup>-5</sup>		MacConkey	-	-	37
1x10 <sup>-6</sup>		MacConkey	-	-	37
1x10 <sup>-7</sup>		MacConkey	-	-	37
1x10 <sup>-8</sup>		MacConkey	-	-	37
1x10 <sup>-9</sup>		MacConkey	-	-	37
3	1x10 <sup>-1</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-2</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-3</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-4</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-9</sup>	MacConkey	-	-	37
4	1x10 <sup>-1</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-2</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-3</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-4</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-9</sup>	MacConkey	-	-	37
5	1x10 <sup>-1</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-2</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-3</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-4</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-9</sup>	MacConkey	-	-	37
6	1x10 <sup>-1</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-2</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-3</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-4</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-5</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-6</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-7</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-8</sup>	MacConkey	-	-	37
	1x10 <sup>-9</sup>	MacConkey	-	-	37
24	Directo	MacConkey	-	-	37
		MacConkey	-	-	37
30	Directo	MacConkey	-	-	37
		MacConkey	-	-	37

Elaborado por: Román D.



**Ilustración 23-4 Conteo Bacteriano Siembra 2**  
Elaborado por: Román D.

En la siembra realizada no se observó crecimiento bacteriano en agar MacConkey en ninguna de las horas que se realizó la siembra de la bacteria

Debido a que se revisó bibliografía documentada acerca del comportamiento y crecimiento de la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* y los medios en esta siembra eran los adecuados para obtener un crecimiento óptimo de la bacteria y al no observar crecimiento en agar MacConkey propio de bacterias Gram- como lo es *Xenorhabdus nematophilys*, se considera la idea de que existe un error con la codificación del consorcio bacteriano de investigaciones pasadas (tabla 6-3).

### 4.3. Conteo bacteriano Siembra 3

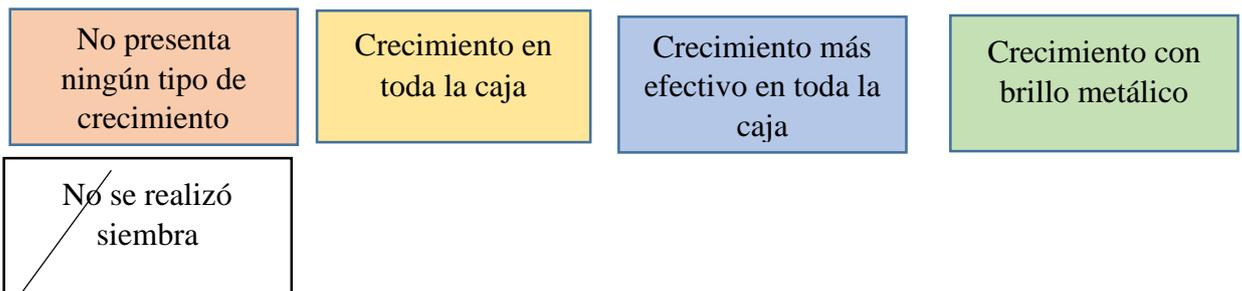


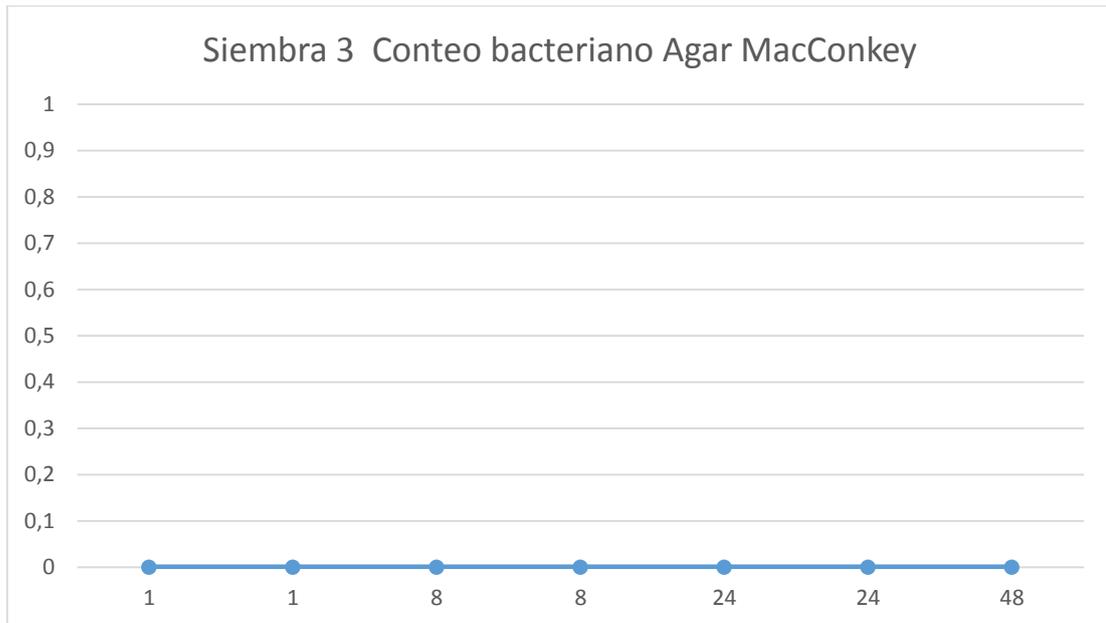
Tabla 11-4: la tabla indica el resultado del conteo bacteriano de la Siembra 3 que se realizó con Caldo X, Caldo BHI, agar MacConkey, agar nutritivo y agar Eosin.

La ilustración 24-4 expresa el crecimiento obtenido en la Siembra 3, donde se utilizó dos caldos nutritivos en agar MacConkey el eje de las “y” representa la UFC, mientras que en el eje de las “x” las horas y las diluciones realizadas durante la siembra.

**Tabla 11-4 Conteo Bacteriano Siembra 3**

HORA	AGAR	DILUCIÓN	RESULTADO		T°
			CALDO X	BHI	
1	Maconkey	1x10 <sup>-1</sup>			37
		1x10 <sup>-2</sup>			37
		1x10 <sup>-3</sup>			37
		1x10 <sup>-4</sup>			37
		1x10 <sup>-5</sup>			37
1	Nutriente	1x10 <sup>-1</sup>			37
		1x10 <sup>-2</sup>			37
		1x10 <sup>-3</sup>			37
		1x10 <sup>-4</sup>			37
		1x10 <sup>-5</sup>			37
8	Maconkey	1x10 <sup>-1</sup>			35
		1x10 <sup>-2</sup>			35
		1x10 <sup>-3</sup>			35
		1x10 <sup>-4</sup>			35
		1x10 <sup>-5</sup>			35
8	Nutriente	1x10 <sup>-1</sup>			35
		1x10 <sup>-2</sup>			35
		1x10 <sup>-3</sup>			35
		1x10 <sup>-4</sup>			35
		1x10 <sup>-5</sup>			35
24	Maconkey	Directo			35
		Directo			44
	Eosin	Directo			35
		Directo			44
	Nutriente	1x10 <sup>-4</sup>			35
1x10 <sup>-4</sup>				44	
48	Maconkey	Directo			35
	Eosin	Directo	60 ufc/ml colonias pequeñas de color azul		35
		Nutriente	Directo		

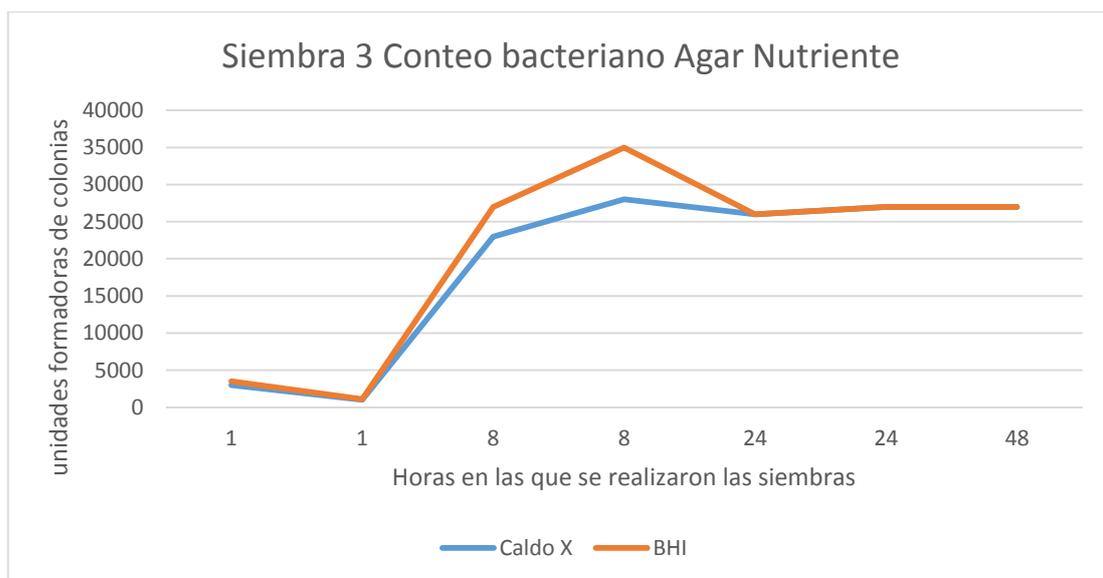
Elaborado por: Román D.



**Ilustración 24-4 Conteo Bacteriano agar MacConkey**

Elaborado por: Román D.

La ilustración 25-4 expresa el crecimiento obtenido en la Siembra 3, donde se utilizó dos caldos nutritivos en agar nutritivo el eje de las “y” representa la UFC, mientras que en el eje de las “x” las horas y las diluciones realizadas durante la siembra.



**Ilustración 25-4 Conteo Bacteriano agar Nutriente**

Elaborado por: Román D.

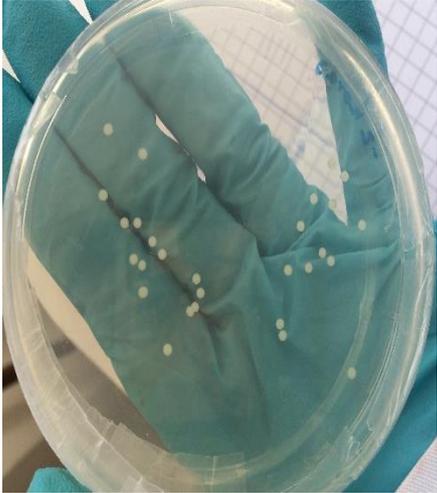
- Hora 1: Se revisaron las cajas de agar MacConkey en la que no se observó crecimiento bacteriano. En el agar Nutriente de caldo se observó el crecimiento de bacterias en todas las cajas por lo tanto fue incontable las colonias. Sin embargo al parecer el caldo nutritivo BHI presenta un poco más de crecimiento que el Caldo X
- Hora 8: Se revisaron las cajas de agar MacConkey y no se observó crecimiento, no había presencia de ninguna colonia ni ningún cambio dentro de las cajas. Se revisaron las cajas de agar Nutriente y se observa el crecimiento de bacterias en todas las cajas por lo tanto es incontable las colonias que existen en la cajas. Sin embargo al parecer el caldo nutritivo BHI presenta un poco más de crecimiento que el Caldo X
- Hora 24: Se revisaron las cajas de agar MacConkey en ambas temperaturas 35°C y 44°C y no se observó crecimiento. Se revisaron las cajas de agar Nutriente en ambas temperaturas 35°C y 44°C y se observa el crecimiento de bacterias en toda la cajas por lo tanto es incontable las colonias que existen en la cajas. Se revisó las cajas de agar Eosin en la caja incubada a 35°C se observaron colonias muy pequeñas, redondas de con brillo metálico, incontable debido al tamaño de las colonias, en la caja incubada a 44°C no se observó nada había humedad en la caja y existía un poco de agua.
- Hora 48: Se revisaron las cajas de agar MacConkey y no se observó crecimiento. Se revisaron las cajas de agar Nutriente y se observa el crecimiento de bacterias en las cajas pero en estas existe un crecimiento más fuerte solo a un extremo de la caja aun así es incontable. Se revisó las cajas de agar Eosin en Caldo X se observó colonias redondas de color azul y colonias muy pequeñas con brillo verde metálico, incontable debido al tamaño de las colonias, en la caja de BHI colonias de color verde metálico apenas se observaban debido a su tamaño que era muy pequeño.
- En esta siembra se utilizó dos tipos de caldos nutritivos y en las primeras horas dos tipos de agar, esto con la finalidad de probar ambos caldos en diferentes agares para observar en cual existe mayor crecimiento, sin

embargo en agar MacConkey no se observó crecimiento, esto a causa de que la bacteria en estudio no correspondería a una Gram-

- En las últimas horas se probó agar Eosin debido a que también es para Gram- pero con pocos requerimientos dejando crecer a algunas bacterias Gram+.

#### 4.4. Características que presentan las colonias de la bacteria en estudio en agar nutritivo

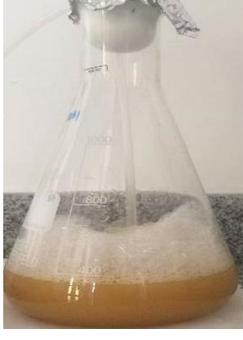
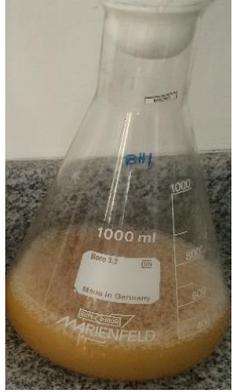
**Tabla 12-4 Características de las colonias bacterianas en agar nutritivo**

CARACTERISTICAS	
Colonias de color blanco	
Circular con bordes regulares	
Colonias uniformes	
Al pasar las horas las colonias toman un color amarillento	
Con una elevación ligeramente convexa	
Una superficie lisa ligeramente cremosa	

Elaborado por: Román D.

#### 4.5. Características de los caldos nutritivos

Tabla 13-4 Incubación de los caldos nutritivos

OBSERVACIONES	CALDO X	CALDO BHI	CALDO NUTRITIVO
Caldos nutritivos apenas se colocó la cepa activada en cada uno de ellos.			
Caldo X y BHI a las 24h donde se observó que existe multiplicación celular por lo cual se tornan ligeramente turbios. Caldo nutritivo se dejó de incubar a las 30h debido a que presencia de velo en la superficie disminuyo notblemente.			
Caldo X y BHI a las 48h Donde se observó el crecimiento de la población microbiana, la presencia de velo en la superficie de ambos, pero en BHI existía un olor característico más fuerte.			NO SE INCUBÓ POR 48 HORAS
Caldo X y BHI a las 72h Se dejó de oxigenar ambos medios, y se observó que BHI tenía mayor turbidez que Caldo X, también existía la presencia de sedimento, y el olor era más fuerte.			NO SE INCUBÓ POR 72 HORAS

Elaborado por: Román D.

#### 4.6. Secuenciación de la cepa L3 *Xenorhabdus nematophilys* tabla 6-3 Anexo K

La muestra de la cepa L3 almacenada en el laboratorio CESTTA, fue enviada al laboratorio Macrogen de Korea del Sur. Debido a que la cepa de estudio iba a ser enviada conjuntamente con otras, se cambió la codificación a C9.

Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron la presencia de dos tipos de bacterias Gram+ que contradicen a lo que inicialmente se consideró. Las especies encontradas fueron:

- Bacteria *Bacillus Pumillus*
- Bacteria *Bacillus Altitudinis*

[::: C9\\_contig\\_1 Report ::::::::::::::::::::::::::::::](#)

-

1. Analysis Report

Name	Read Length (Normal)	Read Length (Q16)	Read Length (Q20)	GC Content
C9_contig_1	1513	1428	1428	54.72571050892267
C9_F	682	677	676	54.83870967741935
C9_R	878	866	865	54.66970387243736

**Ilustración 26-4 Secuenciación Genética**  
Fuente: Laboratorio Macrogen

- Query name : C9\_contig\_1

- Query length : 1513

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
19	1507	Bacillus pumilus strain MB4 NIOT 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HQ858060.1	1509	13	1501	2750	1489	0.0	1489	1489	100	Plus/Plus
19	1513	Bacillus stratosphericus strain IHB B 6832 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KF668462.1	1506	6	1500	2745	1486	0.0	1492	1495	99	Plus/Plus
19	1504	Bacillus stratosphericus strain JQZST-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KF973238.1	1541	17	1502	2745	1486	0.0	1486	1486	100	Plus/Plus
19	1504	Bacillus pumilus strain MTCC B6033, complete genome	CP007436.1	3763493	877135	878620	2745	1486	0.0	1486	1486	100	Plus/Plus
19	1507	Bacillus sp. BAB-3163 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KF984461.1	1500	2	1490	2745	1486	0.0	1488	1489	99	Plus/Plus
19	1504	Bacillus pumilus strain BFB30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KF512664.1	1513	17	1502	2745	1486	0.0	1486	1486	100	Plus/Plus
19	1504	Bacillus aerophilus strain MCCC 1A08371 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JX680141.1	1513	17	1502	2745	1486	0.0	1486	1486	100	Plus/Plus
19	1504	Bacillus aerophilus strain MCCC 1A08370 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JX680140.1	1513	17	1502	2745	1486	0.0	1486	1486	100	Plus/Plus
19	1504	Bacillus stratosphericus strain MCCC 1A08157 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JX680139.1	1513	17	1502	2745	1486	0.0	1486	1486	100	Plus/Plus
19	1504	Bacillus stratosphericus strain MCCC 1A08156 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JX680138.1	1513	17	1502	2745	1486	0.0	1486	1486	100	Plus/Plus

### Ilustración 27-4 Resultados PCR

Fuente: Laboratorio Macrogen

## CAPÍTULO V

### 5. Propuesta para aplicabilidad en Biorremediación

Una vez concluida con la investigación y al conocer que No existe la bacteria *Xenorhabdus nematophilys* y que al contrario prevalece la presencia de dos diferentes tipos de bacterias, se presentan las posibles utilidades de estas para procesos de biorremediación.

#### 5.1 *Bacillus pumilus*

*B. pumilus* es una bacteria Gram+ en forma de bacilo que se encuentra comúnmente en el suelo, *B. pumilus* crece como una colonia lisa que se vuelve amarilla conforme avanza el tiempo de incubación. (García, 2011)

Se considera que no es una bacteria patógena, ni para invertebrados ni vertebrados, no obstante algunas cepas producen hemolisinas, moléculas determinantes de virulencia bacteriana, lo que hace que se la considere como una especie patógena oportunista contra algunas especies de hongos. (Badía, Hernández, & Murrel, 2011) (Ghasemi, 2010)

Se la conoce como una bacteria fácil de encontrar en la naturaleza, asociada a animales, a plantas y a restos de vegetales. Es comúnmente aislada de una gran variedad de fuentes ambientales como suelo, mar y sedimentos marinos. (Badía, Hernández, & Murrel, 2011)

### 5.1.1. Aplicaciones en Biotecnología

*B. pumilus* posee un amplio rango de actividades importantes desde el punto de vista biotecnológico.

Se conoce que algunas cepas de *B. pumilus* tienen actividad fungicida y han sido usadas como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos (Bottone 2000, Lehman 2001, Reynaldi 2004).

Esta propiedad ha sido una de las más explotadas, así por ejemplo Bottone y Peluso (2003) describen un compuesto producido por *B. pumilus* que inhibe especies de *Mucoraceae* y *Aspergillus* causantes de grandes pérdidas económicas en los cultivos a nivel mundial debido a que afectan a gran variedad de cultivos como lechuga, tomate, acelga, limón entre otros. El compuesto activo aislado inhibe la germinación de las esporas de estos dos géneros de hongos y evita la elongación de las hifas, posiblemente produciendo una lesión en la pared celular. (García, 2011)

A pesar de la diversidad de actividades biológicas útiles de *B. pumilus*, esta especie de bacteria no es considerada como un agente de control biológico de insectos plagas eficiente, las aplicaciones más efectivas se han orientado extensamente al uso de bioplaguicidas basados en esta bacteria para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en raíces de varias especies de cultivos. (Badía, Hernández, & Pérez, 2011)

Se conoce que *B. pumilus* es productora de metabolitos con propiedades fungicidas contra ciertos patógenos específicos de plantas, pero no contra bacterias, esta bacteria es capaz

de proteger las raíces y las frutas de varias especies de cultivos de infecciones de hongos. (Badía, Hernández, & Murrel, 2011).

El mecanismo de acción de algunas cepas de *B. pumilus* para inducir sistemas de resistencia en plantas es conocida por ejemplo, en remolacha azucarera, donde *B. pumilus* induce la resistencia sistémica por el incremento de la producción de quitinasa; en tabaco la resistencia mediada por *B. pumilus* es determinada por el aumento de los niveles de ácido salicílico. (García, 2011) (Badía, Hernández, & Murrel, 2011)

Se puede ver una investigación realizada de *B.pumilus* en el Anexo L.

Planta	Enfermedad	Patógeno
Remolacha azucarera	Mancha de la hoja por <i>Cercospora</i>	<i>Cercospora beticola</i>
Tabaco	Moho azul	<i>Peronospora hyoscyami</i> pv. tabacina
Pepino	Marchitez bacteriana	<i>Erwinia tracheiphila</i>
Tomate	Mancha de la hoja	Virus mosaico del pepino (CMv)
Tomate	Tizón tardío	<i>Phytophthora infestans</i>
Pino de incienso	Roya fusiforme	<i>Cronartium quercuum</i> , <i>Miyabe exsirai</i> f. sp. Fusiforme
Pepino	Mancha angular	<i>Pseudomonas syringae</i>
Tomate	Mancha de la hoja	Virus del moteado del tomate (ToMov)
Tabaco	Fuego salvaje	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tabaco

**Ilustración 28-5 Cultivos en los que *B.pumilus* actúa como control biológico**

Fuente: (García, 2011)

### 5.1.2. *Parámetros de control*

*B. pumilus* es una bacteria Gram+, esporulante, de forma bacilar, aerobia con bajo contenido en Guaninas y Citosinas, se la considera una especie mesófila, aunque también existen cepas que pueden ser termófilas y alcalófilas. (Badía, Hernández, & Murrel, 2011)

Según estudios hechos *B. pumilus* es una especie móvil tolerante a las sales y susceptible a la penicilina. (Badía, Hernández, & Pérez, 2011)

*B. pumilus* al ser una especie esporulante, puede permanecer en estado de inactividad durante largos períodos de tiempo cuando las condiciones ambientales son desfavorables. (García, 2011)

Sus esporas son resistentes al calor, desecación, radiación UV y a la escasez de nutrientes, son más resistentes que otras bacterias de su género. (García, 2011)

La nutrición para *B. pumilus* debe presentar todos los macronutrientes (carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno) que son los que constituyen el esqueleto de las , así como las moléculas orgánicas pequeñas. (Badía, Hernández, & Murrel, 2011)

**Tabla 14-5 Parámetros de control de *B.pumilus***

pH óptimo	6 - 8
Tipo de bacteria	Gram+, móviles en forma de bastoncillo
Tiempo de crecimiento exponencial	24h
Limitaciones	Sensible a la penicilina
Característica de <i>B.pumilus</i>	ausencia de exosporio

Elaborado por: Román D.

### 5.1.3. *Propuesta de un tema de investigación para B. pumilus*

El hongo del género *Aspergillus* produce moho negro en vegetales es común en lechuga, tomate, papas, limón. El tipo de moho que produce es peligroso para los cultivos, también para los seres humanos causando enfermedades e infecciones. (Raper, 2000)

Los mohos *Aspergillus* se desarrollan mejor en ambientes ricos en oxígeno. Los mohos *Aspergillus* también crecen bien sobre materiales ricos en carbono, de donde obtiene sus nutrientes. Sin embargo, algunas especies de mohos *Aspergillus* pueden sobrevivir en ambientes con muy pocos nutrientes y pueden sobrevivir con muy poca humedad, como sólo la humedad en el aire (conocidos como xerófilos). (Quiroz-Sarmiento, Ferrera-Cerrato, Alarcón, Hernández, & Encarnación, 2008)

Un lugar común donde puede encontrar *Aspergillus* creciendo es en el abono o en las hojas caídas, ya que los *Aspergillus* crecen bien en la vegetación en descomposición. (Quiroz-Sarmiento, Ferrera-Cerrato, Alarcón, Hernández, & Encarnación, 2008)

El moho negro causa necrosis en las flores, las hojas y las frutas de las plantas que son susceptibles a esta enfermedad, el moho puede infectar a cientos o miles de plantas, la infección ocurre en condiciones de humedad, cuanto más humedad exista en la planta, más riesgo correrá de infectarse de moho negro.

La cantidad de zonas infectadas ha aumentado como así también la cantidad de plantas atacadas y el grado de gravedad de las infecciones (desarrollo más rápido de la enfermedad y necrosis del tejido). (Villena, 2003)

La botritis a veces se confunde con los daños que se manifiestan cuando las plantas envejecen. Se debe revisar los pétalos atentamente para diferenciar la marchitez causada por el envejecimiento de la que causa la enfermedad. Los síntomas varían según el tipo de planta atacada, la parte de la planta atacada y las condiciones de crecimiento. Cuando hay mucha humedad se puede ver un entretejido fino gris (micelio). (Shali, y otros, 2010)

La humedad también acelera la liberación de las esporas. La mala circulación de aire también contribuye a la supervivencia y al desarrollo de la enfermedad. Cuando la

temperatura oscila entre los 20 – 25 °C y la humedad es elevada, la enfermedad demora aproximadamente 20 horas para comenzar a infectar. El clima cálido a muy caluroso y seco contribuye a reducir o detener el desarrollo y la diseminación de la enfermedad. (Villena, 2003)

Los fungicidas químicos no son muy recomendables para tratar esta enfermedad ya que afecta comúnmente a los pétalos de las flores, es por ello que se propone la utilización de la bacteria *Bacillus pumilus* para ser estudiada y utilizada como fungicida biológico.

“*Bacillus pumilus* como control biológico contra el moho negro producido por *Aspergillus* en cultivos de lechuga.”

## **5.2 *Bacillus altitudinis***

*B. altitudinis* es una bacteria Gram+ en forma de bastoncillos, son bacterias aerobias, crece como una colonia lisa de color blanco y bordes regulares, no es considerado como una bacteria patógena. (De Macedo, Segura, & Bonilla, 2002)

### **5.2.1. *Aplicaciones en Biotecnología***

*B. altitudinis* al igual que otras especies del género *Bacillus* pueden producir grandes cantidades de enzimas que se hacen uso como control biológico de hongos, sin embargo *B. altitudinis* tiene gran importancia en la degradación de los residuos de plumas, esto es importante debido a que las plumas de aves de corral constituye el material queratinoso más abundante en la naturaleza. El componente principal de la pluma es la queratina, una proteína resistente y químicamente no reactivo, lo que la hace difícil de digerir por la mayoría de las enzimas proteolíticas.

El reciclaje de plumas es un tema de interés debido a que es un suplemento potencialmente barata y alternativa de proteína para ser utilizado en la alimentación animal. (Bonilla, Vidal, & Coello, 2000)

En estudios realizados se ha observado que *B. altitudinis* digiere toda la pluma incluyendo raquis debido a que *B. altitudinis* lleva a cabo la producción de la enzima queratinasa, un pH alcalino ayuda la producción de esta enzima y la degradación de la pluma. (De Macedo, Segura, & Bonilla, 2002)

Se puede ver una investigación realizada de *B. altitudinis* en el Anexo M

### 5.2.2. *Parámetros de Control*

*B. altitudinis* es una bacteria Gram+ propia del aire, para su recolección se utilizan tubos estériles, pero también habitan en el suelo, no es común trabajar con estas bacterias por lo que no se conoce mucho acerca de su comportamiento. (Bonilla, Vidal, & Coello, 2000)

Al igual que otras especies de *Bacillus* durante la esporulación producen cristales proteínicos algunas como posibles potenciales de insecticidas

Es una bacteria aerobia que también puede ser anaerobio facultativo, algunas cepas de *B. altitudinis* crecen entre los 10 a 48°C y se considera que la temperatura óptima es entre 28-35°C (De Macedo, Segura, & Bonilla, 2002)

Se conoce que poseen antígenos somáticos y flagelares de esporas, los antígenos de las esporas son termo resistentes al igual que las propias esporas.

*B. altitudinis* se desarrolla con un pH entre 5 – 9. (Bonilla, Vidal, & Coello, 2000)

**Tabla 15-5 Parámetros de control *B. altitudinis***

pH óptimo	5 – 9
Tiempo de saturación	98h
Tiempo de crecimiento exponencial	24h

Densidad de crecimiento	29%
Descripción	Gram+, móviles en forma de bastoncillo
Temperatura de crecimiento	35°C

Elaborado por: Román D.

### 5.2.3. Propuesta de un tema de investigación para *B. altitudinis*

El agua, el suelo y el aire son recursos naturales esenciales que dan vida y deben ser protegidos. Desafortunadamente hay áreas en diversas partes del mundo donde estos recursos están contaminados. (Wright, 2010)

En el ámbito mundial, la avicultura es una de las ramas de la producción animal de mayor importancia porque contribuye a satisfacer las necesidades proteicas de la población. Esto se logra a partir de la explotación de dos de sus vertientes básicas: la producción de carne y huevo. Durante los últimos 20 años, en la mayoría de los países ha aumentado continuamente el consumo de carne de pollo, lo que equivale al incremento de la producción anual de estas aves. Inevitablemente, al aumentar la producción avícola, es mayor la cantidad de residuos que estas dejan entre ellas sus plumas. (Thornton, 2010)

La industria avícola si bien no es, según las estadísticas, la mayor contaminante con desechos orgánicos, no puede ser causa de complacencia porque cualquier desecho que generen estas aves, si se presenta en cantidades suficientes puede tener serias consecuencias ambientales. Wiseman (1992) estimó que 1000 gallinas ponedoras con 2 kg de peso promedio producen 115 l de desechos por día.

Se conoce que se han realizado investigaciones de la bacteria *Bacillus altitudinis* y su potencial para degradar la queratina, uno de los principales componentes de plumas de gallinas. El desarrollo de la investigación puede ser pionera para alcanzar resultados beneficiosos para la ciudad de Riobamba y los habitantes del área de influencia los cuales se verían beneficiados en cuanto a calidad y salud ambiental, que podrían resultar de esta investigación, aparte es un aporte para alcanzar el desarrollo sostenible de la comunidad, cantón y provincia en general.

“Análisis de *Bacillus altitudinis* degradadora de desechos avícolas ricos en queratina”

### 5.3 Presupuesto estimado para la realización de las investigaciones propuestas

En el siguiente presupuesto se ha fijado los detalles y costos de los procesos básicos para realizar la investigación de ambos temas propuestos para pruebas de laboratorio.

Los valores presentados a continuación son estimaciones posibles, pero que van a variar de acuerdo a las necesidades y condiciones de trabajo.

**Tabla 16-5 Presupuesto para la propuesta descrita**

<b>N°</b>	<b>ACTIVIDADES</b>	<b>COSTOS</b>
1	Revisión bibliográfica	
2	Diseño y aprobación del proyecto	
3	Medios de cultivo	100
4	Diferentes tipos de agares	100
5	Material para laboratorio: cajas Petri, asas, guantes, mechero, alcohol, gasas.	200
6	Análisis físico de las bacterias	250
7	Análisis químicos	250
8	Análisis microbiológicos	250
9	Pruebas experimentales	300
10	Interpretación de resultados	
11	Conclusiones finales.	
<b>TOTAL</b>		1.450

Elaborado por: Román D.

## CONCLUSIONES

- La cepa estudiada en la investigación “Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna San Antonio del cantón Riobamba” , evaluada en los caldos denominados: caldo nutritivo, caldo X y caldo BHI, y los agares: Nutritivo, MacConkey y Eosin, se evaluó la presumible especie *Xenorhabdus nemathophilys*, crecía en los caldos nutritivos, pero en los medios sólidos se pudo presenciar que crecía solo en el agar nutritivo, más no en Macconkey y Eosin que son agares específicos de bacterias Gram negativas, lo que conllevó a pensar que en la cepa de análisis no existía *Xenorhabdus nemathophilys* ya que esta es una bacteria Gram negativa.
- En los caldos nutritivos: caldo nutritivo 1, caldo X y caldo BHI, se evaluó el crecimiento de biomasa bacteriana mediante la observación de las distintas turbiedades y olor que cada uno de estos presentaron. Los tiempos de incubación fueron dependientes de los cambios que estos presentaban en turbiedad, solamente el caldo nutritivo 1 fue incubado durante 30 horas al presentar en este periodo la mayoría de cambios, mientras que caldo X y caldo BHI fueron incubados por 72 horas. El caldo BHI presentó mayor turbidez a partir de las 48h y presentar un olor más fuerte que en caldo X, esto conllevó a presumir que el caldo nutritivo ideal para la cepa en estudio fue caldo BHI.

En los agares sólidos específicos: agar Nutritivo, agar MacConkey , agar Eosin al realizar las siembras, se pudo presenciar mayor número de unidades formadoras de colonias en agar Nutritivo, en diluciones  $1 \times 10^{-1}$   $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  , mientras que en agar MacConkey propio de bacterias Gram negativas no existió crecimiento alguno, agar Eosin también es específico para bacterias Gram negativas sin embargo debido a sus escasas exigencias algunas bacterias Gram positivas crecen en este agar y se presenciaron colonias muy pequeñas con brillo verde metálico, con lo que se puede concluir que el agar adecuado para el crecimiento de la bacteria de la cepa en estudio es agar nutritivo.

- Conociendo las características previas mediante revisión bibliográfica y en investigaciones anteriores de *Xenorhabdus nematophilys*, y al observar que el comportamiento de la bacteria en cada uno de los medios utilizados no concuerda con lo que se conoce acerca de la misma, se presumió que no existe la presencia de *Xenorhabdus nematophilys*, y que por lo tanto era imprescindible recurrir al análisis de secuenciación genética en reacción de cadena de la polimerasa para confirmar la hipótesis que hasta ese momento surgió. Los resultados arrojados confirmaron la presencia de dos tipos de bacterias Gram positivas distintas a la bacteria objeto de característica Gram negativa, lo que conllevó a concluir que la identificación de consorcios bacterianos puede ser validada únicamente por este tipo de procedimientos y análisis. Las pruebas bioquímicas realizadas en investigaciones antes mencionadas no fueron suficientes para afirmar la presencia de *Xenorhabdus nematophilys* en los sedimentos de la Laguna de San Antonio.
- La aplicabilidad de los microorganismos encontrados mediante secuenciación genética: *Bacillus pumilus* y *Bacillus altitudinis* son específicamente como control biológico, fungicidas e insecticidas, los mismos que pueden ser aplicados en procesos de biorremediación, como una tecnología innovadora y a la vez que tiene menos costos comparados con otros métodos físico químicos. Son bacterias que aún no han sido evaluadas completamente en el área de la biotecnología, por lo que las propuestas surgidas en este documento son pertinentes con las líneas de investigación de la carrera de ingeniería en Biotecnología Ambiental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

## BIBLIOGRAFIA

- Akhurst, R. J., & Boemare, N. (1988). A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of general Microbiology*, 134-141.
- Badía, M., Hernández, B., & Murrel, J. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas *Bacillus*. *Revista Brasileira de Agroecología*, 1-10.
- Badía, M., Hernández, B., & Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC*, 131-138.
- Bonilla, J., Vidal, L., & Coello, N. (2000). Caracterización y aislamiento de una cepa de *Bacillus* degradadora de plumas de aves de corral. *FCV-luz*, 124-130.
- Bottone, E. J. (2003). Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology*, 69-74.
- Calvo, J. &.-M. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 42-52.
- Corona, M. (2011). *Historia de la Biotecnología y sus aplicaciones*. Obtenido de Historia de la Biotecnología y sus aplicaciones: <http://siladin.cch>.
- De Macedo, M., Segura, R., & Bonilla, J. (2002). obtención de hidrolizado proteico por fermentación utilizando en *Bacillus altitudinis*. 204-211.

- Dreyfus Cortés, G. (2012). *El Mundo De Los Microbios*. México: Fondo de Cultura Económica.
- García, D. (2011). *Caracterización del perfil proteico de una cepa entopatógena de Bacillus pumilis*. Granada.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología*.
- Ghasemi, S. A. (2010). Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1437-1443.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (s.f.). *Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson Educación.
- Martens, E. C.-B. (2003). Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *Journal of bacteriology*, 3147-3154.
- Mayoral, E. &. (2000). Icnofacies y sedimentación en zona costera. *Acta geológica hispánica*, 21(1), 507-513.
- Montero, J. (2011). Biotecnología: presente y futuro. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 52-59. Obtenido de Biotecnología: presente y futuro.
- Muñoz, E. (2001). *Biotecnología y sociedad (Vol. 1)*. Ediciones AKAL.
- Naranjo, C. (2013). *Diseño de un plan de manejo integral para la recuperación de la laguna de San Antonio de Riobamba*.

Ohmae, K. B. (1992). *El mundo sin fronteras*. 71.

Palma, I. M. (2005). *Biotechnología y medioambiente*. Editorial Ephemera.

Prescott, Harley, & otros., y. (2004). *Microbiología*. Madrid - España.: McGraw Hill.

Quiroz-Sarmiento, V. F., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Hernández, L., & Encarnación, M. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista mexicana de micología*, 27-34.

Raper, K. B. (2000). The genus *Aspergillus*. *The genus Aspergillus.*, 15-20.

Rodríguez Sánchez, I. P. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 3.

Ruano, G. B. (1991). PCR. 1-4.

Schelegel, H. (1997). *Microbiología General*. Barcelona: Omega S.A.

Shali, A., Ghasemi, S., Ahmadian, G., Ranjbar, G., Dehestani, A., & Vahed, M. (2010). *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. *Phytoparasitica.*, 141-147.

Siqueira, J. O. (02 de 11 de 2008). *Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems*. Recuperado el 2015, de Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems:

[http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689109382307#.VZ8Zf\\_1\\_Oko](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689109382307#.VZ8Zf_1_Oko)

Stanier, R. Y. (1996). *Microbiología*. Reverté. Madrid.

Thornton, G. (2010). Competitividad futura de la industria avícola estadounidense. *Industria avícola*.

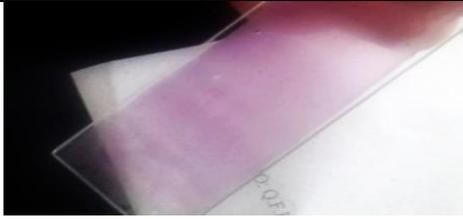
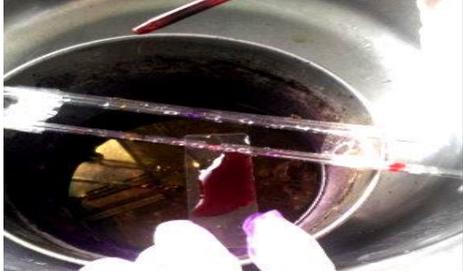
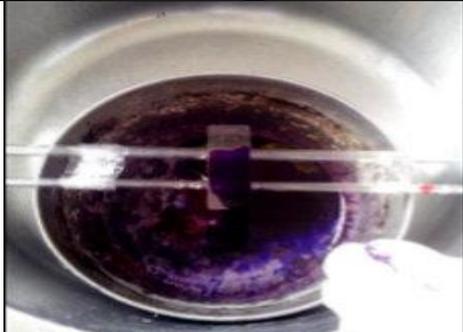
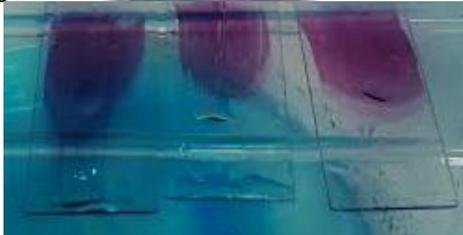
Villena, G. K.-C. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista peruana de Biología*, 78-87.

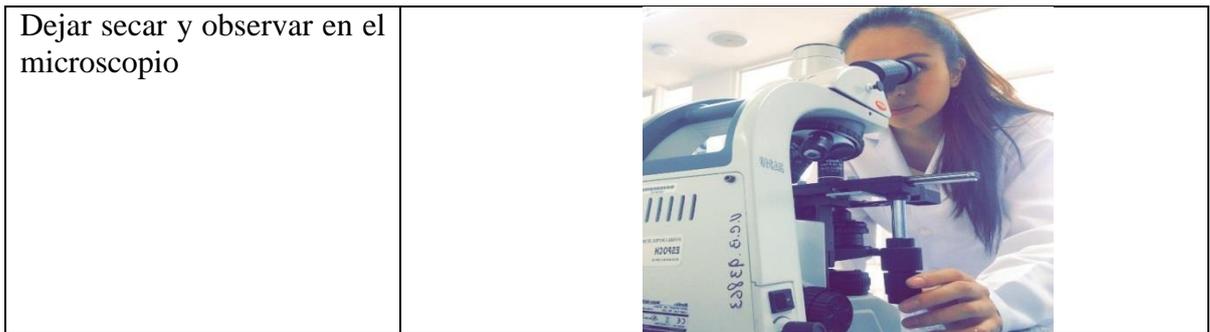
Wright, C. (2010). La industria avícola brasileña. potencia mundial. *Industria avícola*.

## ANEXOS

### Anexo A : Procedimiento Tinción Gram

Materiales	Equipos	Sustancias y reactivos
Portaobjetos	Microscopio óptico	Agua destilada
Asa microbiológica		Cristal violeta
Mechero de alcohol		Yodo Gram
		Alcohol cetona
		Safranina
		Aceite de inmersión

De la cepa activada a 35°C y con la ayuda del asa colocar unas gotas de inculo bacteriano en el portaobjetos			
Realizar un frotis de cada cepa en los portaobjetos y dejar secar			
Se añade cristal violeta y dejar durante un minuto para que haga efecto			
Lavar la muestra coloreada con agua destilada y se añade alcohol cetona para desteñir las bacterias se deja pasar un minuto y se lava con agua destilada			
Se añade safranina, que tiñe de rosa las bacterias que no se han teñido de color purpura se lava y se coloca una gota de aceite de inmersión			



### Anexo B: Preparación del medio de cultivo Caldo Nutritivo1

Materiales	Equipos
Erlenmeyer 2000ml	Balanza digital
Papel aluminio	Motor para la oxigenación
Cinta parafilm	Autoclave
Algodón	
Manguera de pecera	
Gasa	
Guantes de látex	

Sustancias	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
Cloruro de sodio	3 g/L
Sulfato de magnesio	0,5 g/L
Fosfato acido de potasio	1 g/L
Cloruro de amonio	1 g/L
Fosfato di potásico	1 g/L
Glucosa	3 g/L
Peptona	4 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Cepa activa de bacterias	

<p>Preparar el medio de cultivo para 1000 mL de agua destilada.</p>	
<p>Esterilizar a 121°C y 1atm de presión</p>	
<p>Colocar las cepas activadas en el medio de cultivo.</p>	
<p>Colocar la manguera dentro del Erlenmeyer poner un tapón de algodón Conectar la manguera al motor para que de oxígeno al medio con las bacterias.</p>	
<p>Dejar incubar durante 24h</p>	

### Anexo C: Preparación del medio de cultivo Caldo X

Materiales	Equipos
Erlenmeyer 2000mL	Balanza digital
Papel aluminio	Motor para la oxigenación
Cinta parafilm	Autoclave
Algodón	
Manguera de pecera	
Gasa	

Sustancias	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
Cloruro de sodio	5 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,2 g/L
Fosfato di potásico	0,5 g/L
Fosfato mono amónico	0,5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cepa activa de bacterias	

Preparar el medio de cultivo para 1000 mL de agua destilada.	
Esterilizar a 121°C y 1atm de presión	
Colocar las cepas activadas en el medio de cultivo.	
Colocar la manguera dentro del Erlenmeyer poner un tapón de algodón Conectar la manguera al motor para que de oxígeno al medio con las bacterias.	

Dejar incubar durante 24h	
---------------------------	--

#### Anexo D: Preparación del medio de cultivo BHI

Sustancias	Cantidad
Agua destilada	1000 ml
Brain Heart Infusion (BHI)	15 g/L
Cepa activa de bacterias <i>Xenorhabdus nematophilys</i>	

Materiales	Equipos
Erlenmeyer 2000ml	Balanza digital
Papel aluminio	Motor para la oxigenación
Cinta parafilm	Autoclave
Algodón	
Manguera de pecera	
Gasa	
Guantes de látex	

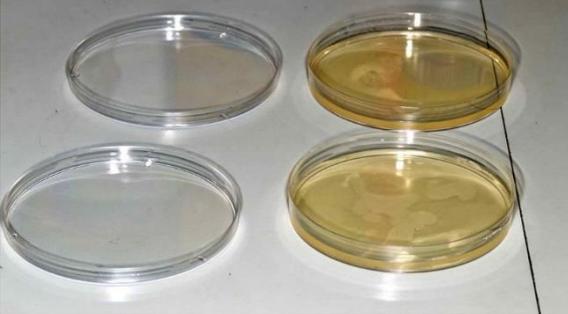
Preparar el medio de cultivo para 1000 mL de agua destilada.	
Esterilizar a 121°C y 1atm de presión	

Colocar las cepas activadas en el medio de cultivo.			
Colocar la manguera dentro del Erlenmeyer poner un tapón de algodón Conectar la manguera al motor para que de oxígeno al medio con las bacterias.			
Dejar incubar durante 24h			

### Anexo E: Proceso para preparar Agar Nutritivo

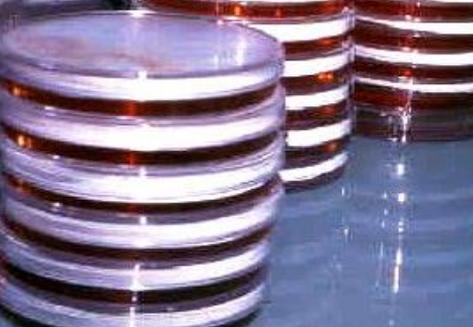
Materiales	Equipos	Sustancias y Reactivos
Cajas Petri	Autoclave	Agar nutritivo
Cinta parafilm	Cámara de flujo horizontal	Agua destilada
Erlenmeyer 2000ml		
Guantes de latex		
Algodón		
Gasas		

Se pesa el agar Nutritivo en polvo y junto con el agua destilada se mezcla.	
---	--

<p>se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1atm de presión.</p>	
<p>Ambientar la mezcla para poder distribuirlas de manera uniforme En condiciones adecuadas de asepsia distribuir el agar en las cajas un aproximado de 15ml en cada caja</p>	
<p>Dejar solidificar cada una de las cajas Petri.</p>	

### Anexo F: Proceso para preparar Agar MacConkey

Materiales	Equipos	Sustancias y Reactivos
Cajas Petri	Autoclave	Agar MacConkey
Cinta parafilm	Cámara de flujo horizontal	Agua destilada
Erlenmeyer 2000ml		
Guantes de latex		
Algodón		
Gasas		

<p>Se pesa el agar MacConkey en polvo y junto con el agua destilada se mezcla.</p>			
<p>Homogenizar la mezcla y se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1atm de presión.</p>			
<p>Ambientar la mezcla para poder distribuirlas de manera uniforme En condiciones adecuadas de asepsia distribuir el agar en las cajas un aproximado de 15ml en cada caja</p>			
<p>Dejar solidificar cada una de las cajas Petri.</p>			

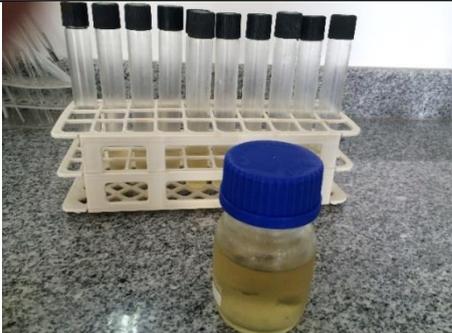
## Anexo G: Proceso para preparar agar Eosin

Materiales	Equipos	Sustancias y Reactivos
Cajas Petri	Autoclave	Agar Eosin
Cinta parafilm	Cámara de flujo horizontal	Agua destilada
Erlenmeyer 2000ml		
Guantes de latex		
Algodón		
Gasas		

<p>Se pesa el agar Eosin en polvo y junto con el agua destilada se mezcla.</p>	
<p>Homogenizar la mezcla y se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1atm de presión.</p>	
<p>Ambientar la mezcla para poder distribuirlas de manera uniforme En condiciones adecuadas de asepsia distribuir el agar en las cajas un aproximado de 15ml en cada caja</p>	
<p>Dejar solidificar cada una de las cajas Petri.</p>	

## Anexo H: Procedimiento para realizar la Siembra 1

Materiales	Equipos	Sustancias y Reactivos
Cinta parafilm	Cámara de flujo horizontal	Agar nutritivo
Papel aluminio	Incubadora	Caldo nutritivo
Pipeta automática 10ml		Agua de peptona
Pipeta automática de 1ml		Alcohol
Pipeta automática de 0.1ml		
Mechero de alcohol		
Fósforos		
Puntas de 0,1ml		
Puntas de 1ml		
Marcador de punta fina		
Frascos estériles		
Asa		
Gradilla		
Tubos tapa rosca		

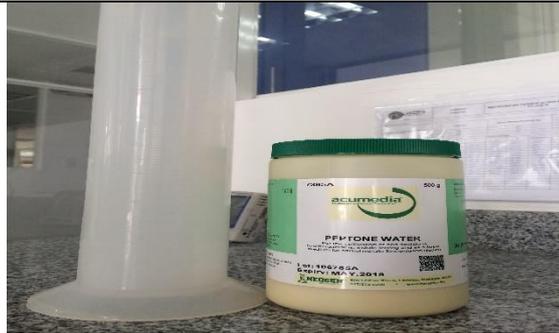
Preparar 1000mL de agua de peptona	
Colocar el agua de peptona en los frascos estériles y en los tubos tapa rosca	
Esterilizar en el autoclave por 20 minutos a 121°C y 1atm de presión.	
Tomar 10mL de muestra del caldo nutritivo y colocar en el frasco de 90mL de agua de peptona, agitar durante 3 minutos.	
Realizar diluciones hasta la dilución $1 \times 10^{-9}$ . Etiquetar las cajas Petri.	
Tomar 0.1mL de cada dilución y sembrar con la ayuda de un asa en las cajas Petri con agar nutritivo	
Realizar siembras en la hora0, hora1, hora2, hora3, hora4,	

<p>hora5, hora6, 24horas y 30horas Incubar por 48h a 35.5°C</p>	
---	--

### Anexo I: Procedimiento para realizar la Siembra 2

Materiales	Equipos	Sustancias y Reactivos
Cinta parafilm	Cámara de flujo horizontal	Agar MacConkey
Papel aluminio	incubadora	Caldo X
Pipeta automática 10ml		Agua de peptona
Pipeta automática de 1ml		Alcohol
Pipeta automática de 0.1ml		
Mechero de alcohol		
Fósforos		
Puntas de 0,1ml		
Puntas de 1ml		
Marcador de punta fina		
Frascos estériles		
Asa		
Gradilla		
Tubos tapa rosca		

Preparar 1000mL de agua de peptona



Colocar el agua de peptona en los frascos esteriles y en los tubos tapa rosca

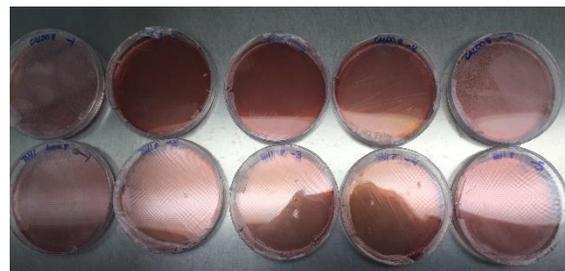
Esterilizar en el autoclave por 20 minutos a 121°C y 1atm de presión.



Tomar 10mL de muestra del caldo X y colocar en el frasco de 90mL de agua de peptona, agitar durante 3 minutos.

Realizar diluciones hasta la dilución  $1 \times 10^{-5}$ .

Etiquetar las cajas Petri.



Tomar 0.1mL de cada dilución y sembrar con la ayuda de un asa en las cajas Petri con agar MacConkey.

Realizar siembras en la hora0, hora1, hora2, hora3, hora4, hora5, hora6, 24horas y 30horas

Incubar por 48h a 35.5°C



### Anexo J: Proceso para realizar la Siembra 3

Materiales	Equipos	Sustancias y Reactivos
Cinta parafilm	Cámara de flujo horizontal	Agar MacConkey
Papel aluminio	Incubadora	Agar Nutritivo
Pipeta automática 10ml		Agar Eosin
Pipeta automática de 1ml		Caldo X
Pipeta automática de 0.1ml		Caldo BHI
Mechero de alcohol		Agua de Peptona
Fósforos		Alcohol
Puntas de 0,1ml		
Puntas de 1ml		
Marcador de punta fina		
Frascos estériles		
Asa		
Gradilla		
Tubos tapa rosca		

Preparar 1000mL de agua de peptona

Colocar el agua de peptona en los frascos estériles y en los tubos tapa rosca

Esterilizar en el autoclave por 20 minutos a 121°C y 1atm de presión.

Tomar 10mL de muestra del caldo X y colocar en el frasco de 90mL de agua de peptona, agitar durante 3 minutos.

Realizar diluciones hasta la dilución  $1 \times 10^{-5}$ .

Etiquetar las cajas Petri.

Tomar 0.1mL de cada dilución y sembrar con la



ayuda de un asa en las cajas Petri con agar MacConkey.

Tomar 0.1mL de cada dilución y sembrar con la ayuda de un asa en las cajas Petri con agar Nutritivo.

Tomar 0.1mL de caldo X y sembrar con la ayuda de un asa en las cajas Petri con agar Eosin

Tomar 10mL de muestra del caldo BHI y colocar en el frasco de 90mL de agua de peptona, agitar durante 3 minutos.

Tomar 0.1mL de cada dilución y sembrar con la ayuda de un asa en las cajas Petri con agar MacConkey.

Tomar 0.1mL de cada dilución y sembrar con la ayuda de un asa en las cajas Petri con agar Nutritivo.

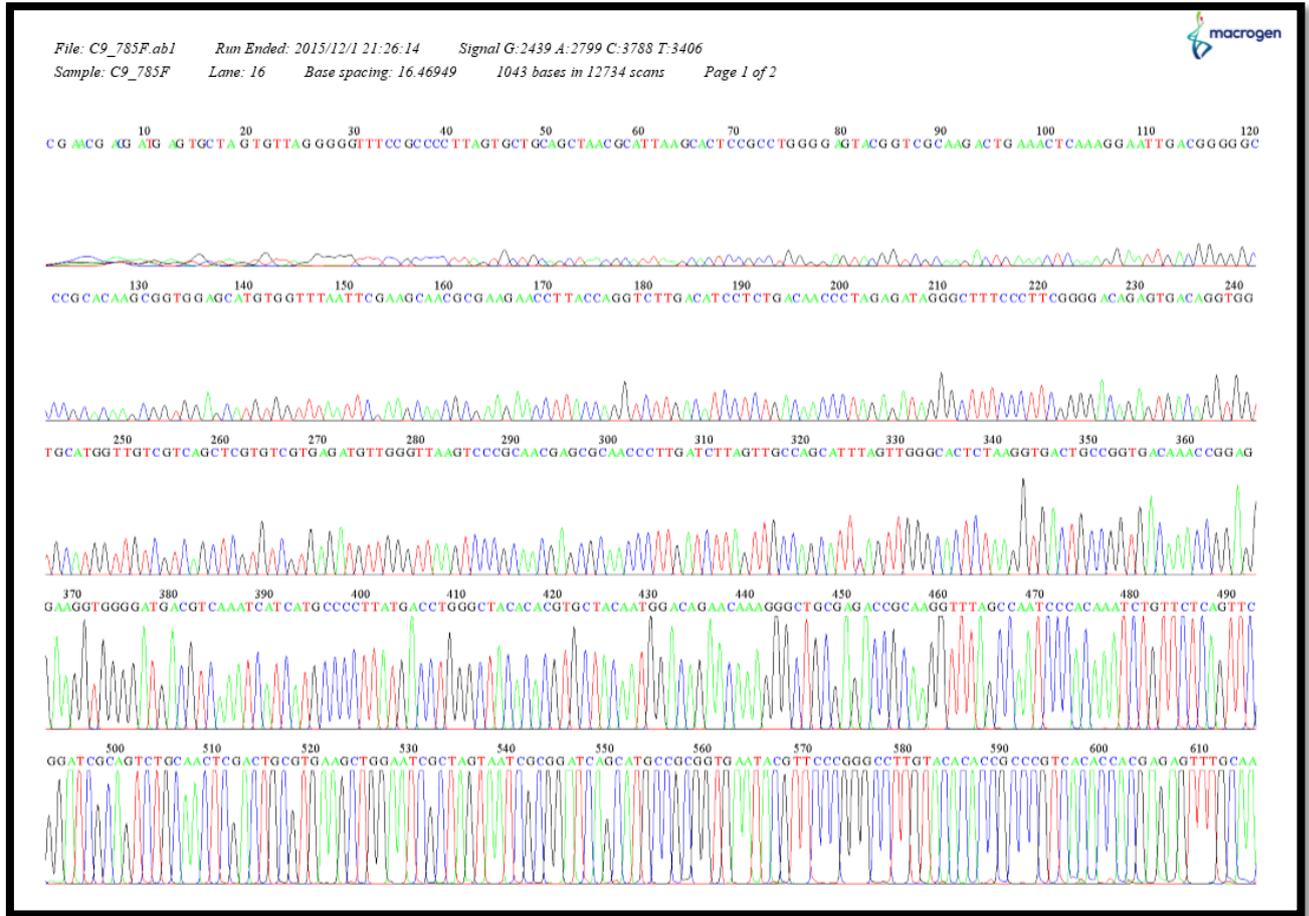
Tomar 0.1mL de caldo BHI y sembrar con la ayuda de un asa en las cajas Petri con agar Eosin.

Realizar siembras en la hora 0, hora 1, hora 8, 24 horas y 48 horas

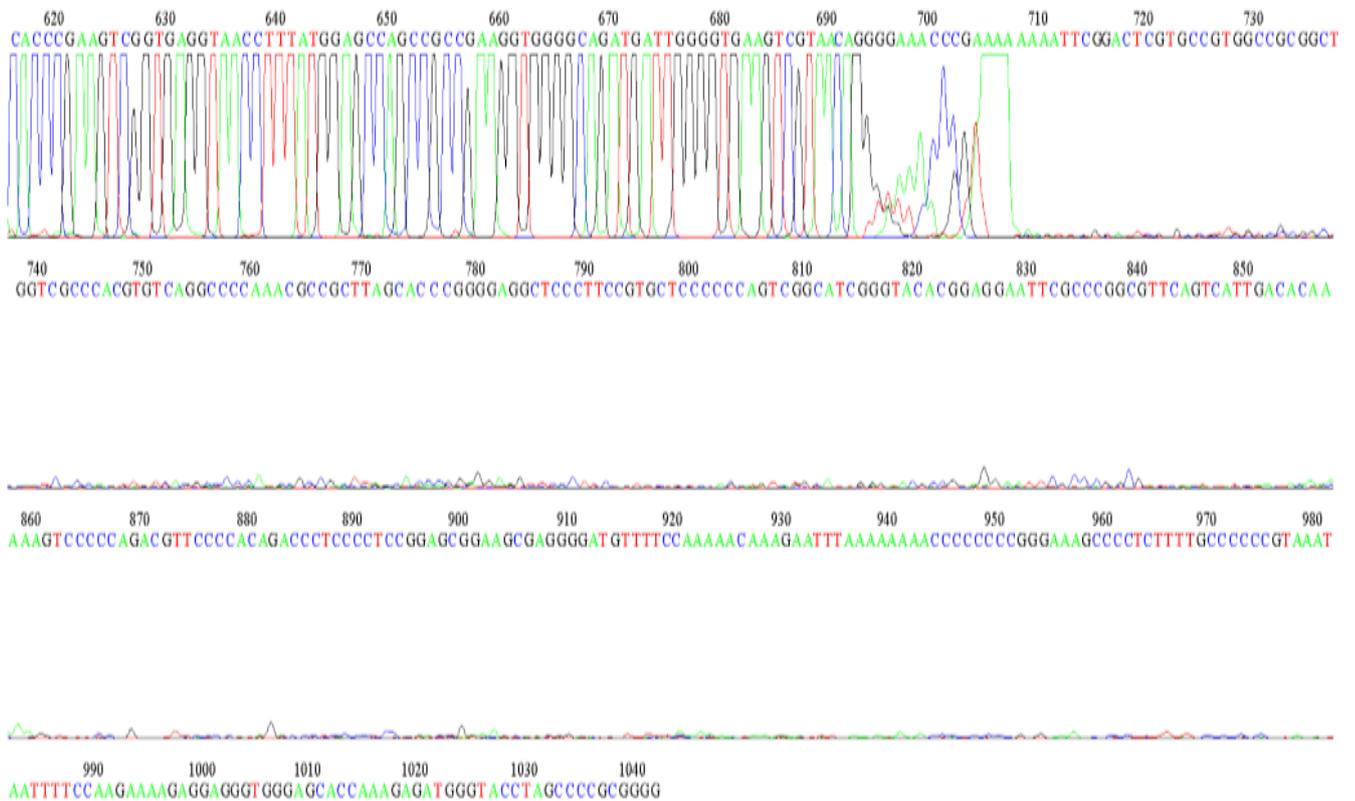
Incubar por 72h a 35.5°C y 44 °C



# Anexo K: Resultados de la secuenciación de la bacteria objeto de estudio



File: C9\_785F.ab1    Run Ended: 2015/12/1 21:26:14    Signal G:2439 A:2799 C:3788 T:3406  
Sample: C9\_785F    Lane: 16    Base spacing: 16.46949    1043 bases in 12734 scans    Page 2 of 2







## Anexo L: Estudio de la bacteria *B. pumilus*

### Crecimiento de *Bacillus pumilus* Productor de la Auxina Ácido Indolacético, Como Base para Formular un Biofertilizante en Polvo

Memoria presentada  
para optar al título de  
Ingeniero en Alimentos

#### RESUMEN

La finalidad de esta investigación fue estudiar las cinética de crecimiento y la producción de la auxina ácido indol acético (AIA) de la cepa C26 *Bacillus pumilus* promotora del crecimiento vegetal, en medio de cultivo caldo soya tripticasa ( CST) a temperaturas de 25°C y 30°C con 6 pHs diferentes, para luego remplazar la fuente de carbono y nitrógeno del medio, por concentraciones de melaza u combinaciones melaza/sacarosa, y proteína de lupino hidrolizada y sin hidrolizar respectivamente, con el propósito de obtener un medio de cultivo en el cual se obtenga una gran cantidad de biomasa y producción AIA. Se elaboraron 6 medios diferentes en los cuales se estudio el crecimiento de la cepa y la liberación de la auxina, escogiendo el medio en donde se obtuvieron los mayores niveles de AIA y los mayores recuentos de unidades formadoras de colonias al cabo de 24 horas.

Se realizo en duplicado un cultivo batch en fermentador con capacidad de 5 litros controlando temperatura, pH, agitación y aireación, para finalmente someter el concentrado celular a deshidratación en un proceso de secado *Spray*. Se realizaron recuentos microbiológicos en placa para determinar la viabilidad del biofertilizante al cabo de 90 días del proceso de secado. Los resultados obtenidos en cada etapa fueron analizados estadísticamente aplicándose análisis de varianza y test de rangos múltiples, en la elección de los parámetros de crecimiento (pH y T°), en el estudio de la liberación de AIA y en la elección del medio modificado en su fuente de C y N.

## MATERIALES Y REACTIVOS

- Caldo soya tripticasa
- Medios modificados en su fuente de carbono y nitrógeno
- Agar de dextrosa
- Agua de peptona
- Incubadora
- cajas petri
- microscopio
- reactivos para tinción Gram

## METODOLOGÍA

- Se tomó una colonia aislada de una cepa pura de *Bacillus pumilus* sembrada por estrías por agotamiento en placa de agar de dextrosa a 30° C por 24h
- cambiar las fuentes de carbono por melaza y/o sacarosa u combinaciones de ésta y la fuente de nitrógeno por extracto de proteína de lupino al 10% con y sin hidrólisis utilizando para ello enzima papaína
- se realiza un cultivo Batch durante la fermentación de tomaron muestras a los tiempos 0 y 24 horas determinando pureza mediante tinción de Gram y recuento de unidades formadoras de colonias
- Una vez terminada la fermentación se utilizaron frascos de litros estériles, para recibir el formulado de *Bacillus pumilus*, los que se mantuvieron durante 18 horas a 5° C, para su posterior deshidratación mediante secado Spray.

## RESULTADOS

- durante el crecimiento de *B. pumilus* se tomaron muestras a los tiempos 0-6-12 y 24h para así poder determinar que medio modificado es el óptimo para el crecimiento de la bacteria
- una vez elegido el medio comienza la producción de auxina por medio de la bacteria lo que fue analizado mediante análisis de varianza
- en el cultivo batch la producción de *B. pumilus* se realizó en fermentador con un pH de 8 y T° 30°C con la finalidad de producir gran cantidad de biomasa de un cultivo puro
- los recuentos del cultivo se dieron en buenas condiciones de fermentación por lo que se obtuvo gran biomasa
- después del secado se realiza un recuento en placa de un concentrado celular en polvo para determinar la viabilidad de *B. pumilus*, una vez realizado el conteo no fue posible obtener resultados lógicos y confiables debido a que se observaron colonias en diferentes estados de crecimiento

## Anexo M: Estudio de la bacteria *B. altitudinis*

### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE *Bacillus sp.* DEGRADADORA DE PLUMAS DE AVES DE CORRAL

Isolation and Characterization of a Poultry Feather-Degrading *Bacillus spp* Strain

Judith Piñero Bonilla<sup>1</sup>, Luis Vidal<sup>2</sup> y Nereida Coello<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ingeniería de Alimentos, Núcleo Canoabo, Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez" Edo. Carabobo, Venezuela.

<sup>2</sup>Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina; Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

<sup>3</sup>Laboratorio de Procesos Biotecnológicos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. E-mail: mcoello@reacciun.ve

#### RESUMEN

Se inocularon muestras de suelo de una granja avícola en un medio de enriquecimiento conteniendo plumas como principal fuente de carbono y energía, con la finalidad de favorecer el desarrollo de microorganismos con capacidad queratinolítica. Aislamientos del medio de enriquecimiento en placas con agar nutritivo mostraron la presencia de diferentes tipos de colonias. Estas se inocularon en tubos con medio salino y plumas enteras y se incubaron a 40°C para escoger posteriormente las cepas degradadoras de plumas. Se seleccionó la cepa LPB-2, la cual produjo la mayor degradación en el menor tiempo (3 días). El microorganismo fue identificado como un bacilo Gram positivo (2,4 x 0,64 µm) del género *Bacillus* sp. Los cultivos de la cepa LPB-2 en Erlenmeyers de 500 mL conteniendo medio salino y plumas molidas (20 g/L), demostraron que la máxima degradación de plumas, medida como grupos amino libres (GAL), fue en el intervalo comprendido entre 35 y 40°C. La velocidad de crecimiento fue de 0,205 h<sup>-1</sup>, alcanzando 1,6 g/L de biomasa en 24 horas a 40°C y 75 rpm. Bajo estas condiciones la capacidad proteolítica en los caldos de fermentación fue de 0,25 U/mL y se observó un patrón de secreción asociado al crecimiento bacteriano. La concentración de GAL y la magnitud de la digestión de las plumas siguieron una tendencia similar durante la fermentación, obteniéndose en 32 horas de incubación 22 mmol/L y 35% respectivamente. La cepa LPB-2 produjo trazas de los ácidos: cítrico, glucónico, málico, propiónico, láctico y butírico.

#### ABSTRACT

Sample soils from a poultry plant were inoculated in enrichment medium with feathers as the major source of carbon and energy with the purpose of favoring the development of microorganisms with keratinolytic capacity. Colonies grown in nutrient agar plates streaked from enrichment medium were inoculated in tubes with saline medium with whole feathers and incubated at 40°C in order to isolate feather degrading strains. Selected the strain LPB-2 which produced highest feather degradation (3 days). The microorganism was a Gram positive rod (2.4 x 0.64 µm) and was identified as *Bacillus* sp. Cultures of LPB-2 in 500 mL Erlenmeyer baffled flasks containing 20 g/L feather medium showed optimum feather degradation, measured as free amino groups (GAL), in the range of 35-40°C. Growth rate was estimated in 0.205 h<sup>-1</sup> with a maximum biomass of 1.6 g/L in 24 hours at 40°C and 75 rpm. Under these conditions, proteolysis activity in fermentation broths attained 0.28 U/mL, and it was associated to microbial growth. GAL concentration and the amount of feather digestion followed similar trends, obtaining in 32 hours of cultivation 22 mmol/L and 35% respectively. The strain produced traces of citric, gluconic, malic, lactic, propionic and butyric C acids.

**Key words:** Keratinolytic *Bacillus*, feather-degrading, isolation and fermentation.

#### INTRODUCCIÓN

## MATERIALES Y REACTIVOS

## METODOLOGÍA

## RESULTADOS

- Muestras de suelo
- Caldo nutritivo
- Medio basal que se describe en la investigación
- Agua de peptona
- Incubadora
- cajas petri
- microscopio
- plumas blancas de pollo
- agar nutritivo
- tubos de propileno

- todo el contenido de cultivo en un erlenmeyer con medio de plumas troceadas, se filtro y con la suspencion obtenida, se prepararon disoluciones seriadas
- cada una de estas disoluciones se puso en tubos de propileno y se centrifugó a 6000rpm durante 20 min
- el porcentaje de plumas digeridas PPD se llevó a cabo mediante un método gravimétrico se filtra todo el contenido y lo que queda retenido en el papel se secó a 100°C por 24h .
- la diferencia de pesos corresponde a la cantidad de plumas no digeridas.

- durante el aislamiento en agar nutritivo se seleccionaron siete colonias morfológicamente diferentes que tenían la capacidad de degradar plumas.
- la cepa en 32h de incubación logra una degradación de 35%
- las condiciones óptimas para determinar las cinéticas de crecimiento microbiano y degradación del sustrato fueron 20g/l de plumas 75rpm y 40°C bajo estas condiciones se observó que la actividad proteolítica está asociada al crecimiento bacteriano, alcanzando su máximo valor a las 24h