

**CENTRO DE INVESTIGACION EN MATERIALES AVANZADOS,  
S.C. POSGRADO.**

**TITULO:**

**IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVO  
NO FERMENTADORES PARA APLICACIÓN EN  
CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS Y EN  
BIOREMEDIACION.**

**“TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS EN  
ENERGIAS RENOVABLES”**

**PRESENTA:**

**LUZ CARMEN CASTILLO MARTINEZ.**

**DIRIGIDA POR:**

**DR. ADRIAN RODRIGUEZ GARCIA**

**San Juan del Rio, Querétaro. 12 de Diciembre del 2012.**

# AGRADECIMIENTOS

*A Dios por hacerme parte de su plan.*

*A mi mamá por ser ese ser indomable, fuerte y mi rosa de viento.*

*A Nahúm por querer tomar el riesgo de compartir su vida conmigo.*

*A mis hijos Tamara y Nahúm porque siempre formaran parte de ser.*

*A Isaac porque es una bendición.*

*Los amo*

# RECONOCIMIENTOS

Mi más sincero reconocimiento a todas las personas que fueron parte de este proyecto.

Al Dr. Adrian Rodríguez por su infinita paciencia y sabiduría que marco el rumbo del proyecto.

Al Dr. José Alberto Duarte porque siempre creyó en mí.

Dr. Marco Zamora porque sé que puedo contar con Usted.

Al Ing Jaime Hernández Director del área de Química y Mantenimiento, siempre dispuesto a ayudarme.

Raúl García, fuiste el encargado de que se llevará a cabo este proyecto.

Zulma Flor por tu ayuda incondicional y por las largas horas de jornada que le invertiste a mi proyecto.

Mis alumnos que con el pretexto de aprender, yo aprendí más de Ustedes.

# INDICE

3. RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
4.- INTRODUCCIÓN .....	3
4.1. Bacteria .....	4
4.2 Taxonomía .....	5
4.3 La respiración.....	6
4.3.1 <i>Respiración aeróbica</i> .....	7
4.3.2 <i>Respiración anaeróbica</i> .....	7
4.4 Etapas de la respiración .....	7
4.4.1 <i>Respiración Aeróbica</i> .....	7
4.4.1.2 <i>Glucólisis</i> .....	7
4.4.1.3 <i>Descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico</i> .....	8
4.4.1.4 <i>Ciclo de Krebs</i> .....	9
4.4.1.5 <i>Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa</i> .....	9
4.4.2 <i>Respiración anaeróbica</i> .....	9
4.5 Nutrición microbiana.....	11
4.6 Medios de cultivo .....	12
4.6.1 Concepto de cultivo puro.....	12
4.6.2 Crecimiento microbiano en medio líquido.....	13
4.6.2.1 Fase lag o de adaptación.....	13
4.6.2.2 <i>Fase exponencial o logarítmica</i> .....	13
4.6.2.3 <i>Fase estacionaria</i> .....	13
4.6.2.4 <i>Fase de muerte</i> .....	13
4.6.3 <i>Presentación de los medios de cultivo</i> .....	14
4.7. Bioquímica del crecimiento y metabolismo .....	14
4.8 Bacterias que tienen la capacidad de transferir energía .....	17
4.8.1 <i>Pseudomonas</i> .....	17
4.8.2 <i>Geobacter</i> .....	22

4.8.3 <i>Shewanella</i> .....	22
4.9. Mecanismos de transferencia de electrones.....	24
4.10 Ecología microbiana.....	25
4.11. HIPOTESIS .....	28
4.12. OBJETIVO GENERAL.....	28
4.13. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	28
5 MATERIALES Y EQUIPO.....	29
5.1 Equipos .....	29
5.2 Materiales .....	29
5.3 Reactivos .....	30
5.3.1 Medios de Cultivo .....	30
6. METODOLOGIA .....	35
6.1 Origen de las muestras.....	35
6.2 Preparación de Medios de Cultivo .....	35
6.2 Condiciones ambientales, medidas de seguridad, orden y limpieza.....	36
6.3 Preparación y acondicionamiento de la muestra para microorganismos anaerobios facultativos.....	37
6.4 Morfología. Tinción de Gram .....	38
6.4. Aislamiento en medios selectivos .....	39
6.5. Identificación Bioquímica.....	41
6.6 Métodos de Preservación de las cepas .....	46
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	47
7.1 Resultados obtenidos.....	47
7.2. Medios de Preenriquecimiento.....	47
7.3 Medios selectivos.....	49
7.4 Bioquímicas.....	56
7.5 Conservación.....	57
7.6 Discusión de Resultados .....	58
8. CONCLUSIONES .....	60
10. ANEXOS .....	63



### 3. RESUMEN

La demanda mundial de energía y de acuerdo a los procesos para su obtención, así como los niveles actuales de contaminación ha hecho que científicos, investigadores y los gobiernos, en los últimos años busquen el desarrollo de nuevas formas para generar energía eléctrica de manera alternativa a los procedimientos convencionales, de tal manera que se produzca de manera limpia y sustentable.

Una de ellas son las celdas de combustible microbianas (FCM), las cuales han tomado gran importancia ya que de ellas es posible obtener energía eléctrica y en ciertas condiciones la obtención de hidrógeno para celdas de combustible convencionales y al mismo tiempo dar tratamiento a aguas residuales por medio de la descomposición de la materia orgánica en dichas aguas y de este modo facilitar su tratamiento para su re-uso.

En el presente trabajo se pretende estudiar, identificar, aislar y conservar a los microorganismos que están presentes en lodos activados que pertenecen a Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S. C. (CIDETEQ). Buscamos preferentemente los bacilos gram negativos no fermentadores que constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se ha generalizado denominar a todos los bacilos Gram negativos de flagelación polar como "*Pseudomonas*".

Estudian principalmente a especies de este género, la *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas xtutzeri* y *Esherchia coli* que serán los microorganismos de referencia que fueron adquiridos de colección y con estos microorganismos se podrán a través de una metodología de identificación bioquímica de laboratorio.

Estos microorganismos se entregaran al CIDETEQ a su vez buscaran emplearlos en diferentes proyectos principalmente la biorremediación como bacterias generadoras de energía verde.

## ABSTRACT

The global energy demand and according to processes for their preparation as well as current levels of pollution has caused scientists, researchers and governments, in recent years seeking to develop new ways to generate electricity as an alternative to conventional procedures so that occurs in a clean and sustainable.

One of them is the microbial fuel cells (FCM), which have become very important given that they can get electricity and under certain conditions the production of hydrogen for fuel cells and conventional while giving wastewater treatment through the decomposition of organic matter in the wastewater and thereby facilitate treatment for re-use.

This paper aims to study, identify, isolate and retain microorganisms present in activated sludge belonging to Centre for Research and Technological Development in Electrochemistry, S. C. (CIDETEQ).

Preferentially seek gram negative non fermentative constitute a heterogeneous group of microorganisms, which are widely distributed in nature. It has been widely referred to all Gram negative polar Flagellation as "*Pseudomonas*".

Mainly studied species of this genus, the *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas xtutzeri* and *Esherichia coli* microorganisms be reference collection were acquired and these microorganisms may be through an identification methodology biochemistry laboratory.

These microorganisms are delivered to CIDETEQ turn seek to employ them in different projects mainly bacteria bioremediation as generating green energy.

## 4.- INTRODUCCIÓN

La realización de este trabajo va dirigido a proporcionar el material microbiológico que será de utilidad en diferentes procesos por un lado se obtendrá electricidad por medio de ellos en MFC (celdas de combustible microbianas) y por otro lado se pretende buscar en estos lodos, los microorganismos gram negativos no fermentadores, que se adapten a altas concentraciones de cloruros, para ser utilizadas en purificación de agua con altas concentraciones de sales, ya que se ha visto que los estudios con cultivos puros parecen predominar en eficiencia como inóculos. (Pistonesi et al., 2010). Buscaremos bacterias capaces de convertir la energía química en eléctrica en este género. (Esteve & Núñez., 2008).

Se propone una metodología propia de los microorganismos que son bacilos gram negativos no fermentadores, que constituyen grupo heterogéneo, que en la actualidad han tomado relevancia, debido a la capacidad de transferir extracelular electrones derivados de la oxidación de compuestos orgánicos (Lovley, 2008), en donde se realizara un método para determinar los microorganismos buscados especialmente las de la familia bacilos gram negativos y probaremos la *Pseudomonas putida* y *stutzeri*, *Sherwanella spp* así como *Geobacter sulfurreducens*, tanto en identificación, purificación y conservación de los estos microorganismos, que esperamos encontrarlos en los lodos activados pertenecientes al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S. C. CIDETEQ.

Teóricamente, la mayoría de los microbios son potencialmente utilizados como biocatalizadores en ciertos dispositivos electroquímicos, denominados células de combustible microbiana (Microbial Fuel Cell,

MFC). El primer concepto de MFC fue propuesto y demostrado por Potter en 1990 (Leropoulos, 2005). En las MFC se utilizan microorganismos para oxidar el combustible, materia orgánica, y transferir los electrones a un electrodo (ánodo), que está conectado a un cátodo a través de un material conductor que contiene una resistencia.

La generación de electricidad mediante celdas de combustible microbianas (MFC) es una nueva forma de energía renovable la producción de energía. Las bacterias que se han identificado como capaces de producir electricidad en las pilas de combustible son una riqueza de los géneros de *Geobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas*. (Hong et al., 2005).

#### 4.1. Bacteria

*Bacteria* es un dominio en que se encuentra una enorme variedad de procariontas. La división (Phylum) Proteobacteria es la división más amplia de la *Bacteria* ver figura 2.3.

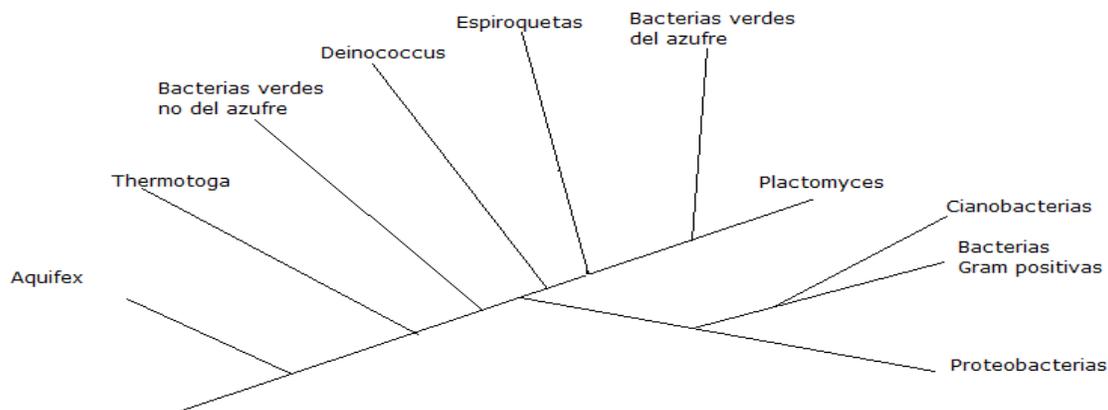


Figura 2.3. Árbol filogenético detallado del dominio *Bacteria*.

Dentro de las Proteobacteria se encuentran muchas bacterias quimiorganotróficas. Muchos de estos grupos usan en sus metabolismo sulfuro de hidrogeno ( $H_2S$ ),

produciendo azufre elemental que se deposita dentro o fuera de la célula. (Madigan, 2004)

Las *Cianobacterias* están filogenéticamente relacionadas con las bacterias Gram positivas y son microorganismos fotógrafos oxigénicos, lo que significa que en su metabolismo producen oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), igual que ocurre en las plantas.

Las *espiroquetas* de morfología helicoidal. Algunas enfermedades son producidas por este tipo, como la sífilis y la enfermedad de Lyme. (Madigan, 2004)

Existen dos líneas importantes dentro del dominio *Bacteria* son fototróficas: Las bacterias verdes del azufre y las bacterias verdes no del azufre (grupo Chloroflexus) (Madigan, 2004).

Otras dos líneas importantes de *Bacteria* son los grupos de las *Clamidias* y de *Deinococcus*. La mayoría de las especies del género Chlamydia son patógenas se les considera parásitos intracelulares estrictos, lo que significa que viven en el interior de las células de los organismos superiores, en concreto del hombre. Las Proteobacterias cuyas especies pueden causar enfermedades como el tifus.

Los grupos termófilas porque pueden crecer a elevadas temperaturas, aunque son grupos filogenéticamente diferentes unos de otros, comparten la propiedad común son *Aquifex* y *Thermotoga* que crecen en estos ambientes.(Madigan, 2004)

## 4.2 Taxonomía

La división o phylum “Preteobacteria” se divide en cinco clases: *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gamaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Espisobacteria*. Como se ve en la tabla 2, están señalados de color amarillo los que utilizaremos en nuestra investigación. Estas clases se definieron en base a los estudios filogenéticos de las secuencias del Gen 16S rARN. La clase *alfaproteobacteria* incluye a bacterias con secuencia 16S rARN relacionadas con miembros del orden *Caulobacterales*, la clase *Betaproteobacteria* reúne bacteria con 16S rARN relacionadas con el orden *Burkholderiales*.

Tabla 2. Géneros más importantes de las *Proteobacterias* (Schelegel, 1997)

<b>Subdivisión</b>	<b>Género</b>
Alfa	<p><i>Acetobacter</i>  <i>Alcaligenes</i>  <i>Brucella</i>  <i>Methylocystis</i>  <i>Nitrobacter</i>  <i>Rickettsia</i>  <i>Zymomonas</i></p>
Beta	<p><i>Bordetella</i>  <i>Neisseria</i>  <i>Nitrosomonas</i>  <i>Oxalobacter</i>  <i>Rhodospirillum rubrum</i>  <i>Spirillum</i>  <i>Zooglea</i></p>
Gama	<p><i>Alcaligenes</i>  <i>Brucella</i>  <i>Methylocystis</i>  <i>Nitrobacter</i>  <i>Rickettsia</i>  <i>Zymomonas</i>  <i>Methylobacter</i>  <i>Salmonella</i>  <i>Geobacter</i>  <i>Vibrio</i></p>
Delta	<p><i>Acinetobacter</i>  <i>Aeromonas</i>  <i>Desulfomonas</i>  <i>Mozarella</i>  <i>Myxococcus</i></p>
Epsilon	<p><i>Campilobacter</i>  <i>Helicobacter</i></p>

### 4.3 La respiración

Por respiración generalmente se entiende al proceso fisiológico indispensable para la vida de los distintos organismos. La respiración celular podría dividirse en dos tipos, según el papel atribuido al oxígeno.

4.3.1 *Respiración aeróbica*: Hace uso del Oxígeno como aceptor último de los electrones desprendidos de las sustancias orgánicas. Es una forma utilizada por algunas bacterias y organismos eucariontes, y se les llama organismos aerobios a los que, necesitan el Oxígeno. El oxígeno que como cualquier gas, atraviesa sin obstáculos las membranas biológicas, es decir, atraviesa primero la membrana plasmática y luego las membranas mitocondriales, siendo en la matriz de la mitocondria donde se une a electrones y protones para formar agua. En esta oxidación final que es compleja, y en procesos anteriores se obtiene la energía necesaria para la fosforilación del ATP.

4.3.2 *Respiración anaeróbica*: No interviene el oxígeno, sino que se emplean otros aceptores finales de electrones, muy variados, generalmente minerales y, a menudo, subproductos del metabolismo de otros organismos. Esta respiración es propia de las procariotas.

## **4.4 Etapas de la respiración**

4.4.1 *Respiración Aeróbica*: De modo tradicional, la respiración aerobia se ha subdividido en las siguientes etapas.

4.4.1.2 *Glucolisis*: La fase primera anaerobia o glucólisis (figura 4.1), es oxidado una molécula de glucosa en dos moléculas de ácido pirúvico (piruvato) En esta etapa se obtienen dos moléculas de ATP y se reducen dos moléculas de  $\text{NAD}^+$ , el número de carbonos se mantiene (6 átomos en la molécula inicial de glucosa, 3 en cada una de las moléculas de ácido pirúvico). Todo este proceso se realiza en el citosol de la célula.

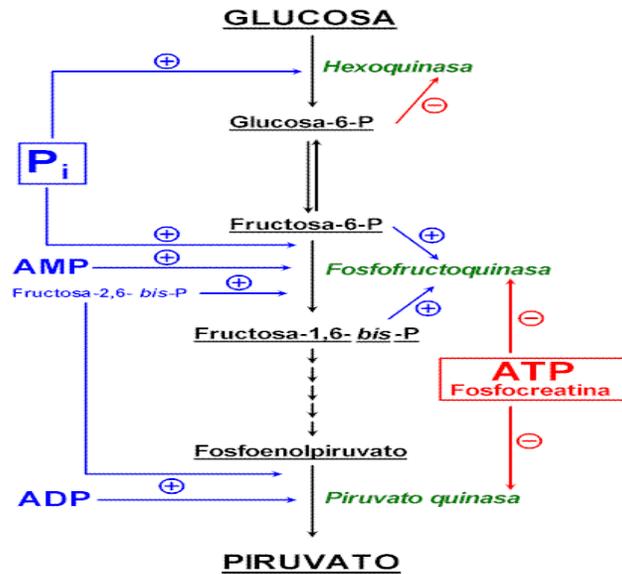


Figura 4.1. Glucólisis

4.4.1.3 *Descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico*: Tanto en los procariotas como en los eucariotas, la conversión de piruvato a acetil-CoA y  $CO_2$  es catalizada por un complejo de enzimas y cofactores que se conoce como complejo piruvato deshidrogenada. El ácido pirúvico pasa a la matriz de la mitocondria por la vía de una proteína transportadora que se incluye en la membrana mitocondrial interna, donde es procesado por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, el cual realiza la descarboxilación oxidativa del piruvato; que se desprende en forma de  $CO_2$  y oxidativa porque, al mismo tiempo se le arrancan dos átomos de hidrogeno ver figura 4.2. (Oxidación por deshidrogenación), que son captados por el  $NAD^+$ , que se reduce a NADH, por tanto; el piruvato se transforma en un radical acetilo ( $-CO-CH_3$ ), ácido acético sin el grupo hidroxilo) que es captado por el coenzima A (que pasa a acetil-CoA), que es el encargado de transportarlo al ciclo de Krebs. Este proceso se repite dos veces, una para cada molécula de piruvato en que se transformo la glucosa.

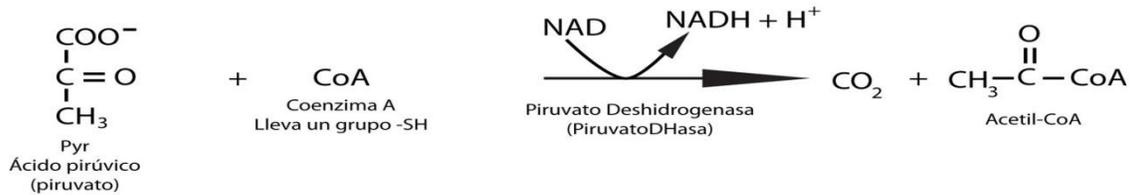


Figura 4.2. Descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico.

4.4.1.4 *Ciclo de Krebs*: Genera moléculas ricas en energía. Es una ruta metabólica cíclica que se lleva a cabo en la matriz de la mitocondria de la célula eucariota y en la cual se realiza la oxidación de los dos acetilos transportados por el acetyl coenzima A, provenientes del piruvato, hasta producir dos moléculas de CO<sub>2</sub>, liberando energía en forma utilizable, es decir poder reductor (NADH, FADH<sub>2</sub>) GTP. Para cada glucosa se producen dos vueltas completas del ciclo de Krebs, dado que se habían producido dos moléculas de Acetil-Co A en el paso anterior: por tanto se ganan 2 GTPs y se liberan 4 moléculas de CO<sub>2</sub>. Estas cuatro moléculas, sumadas a las dos de la descatoxización oxidativa del piruvato, hacen un total de seis, que es el número de moléculas de CO<sub>2</sub> que se producen en la respiración aeróbica.

4.4.1.5 *Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa*: Consiste en dos fenómenos acoplados estrechamente. Reoxidar las coenzimas que se han reducido en las etapas anteriores (NADH Y FADH<sub>2</sub>) con el fin de que estén de nuevo libres para aceptar electrones y protones de nuevos substratos oxidables. Y el gradiente de concentración de protones que sirve como un depósito de energía libre, en forma de ATP.

4.4.2 *Respiración anaeróbica*: Este proceso biológico de oxido- reducción de azúcares y otros compuestos en el que el aceptor terminal de electrones es una molécula, en general inorgánica, distinta del oxígeno. La realizan exclusivamente algunos grupos de bacterias Y arqueas. No se usa el oxígeno, sino que para la misma función se emplea otra sustancia oxidante distinta, como el sulfato o el nitrato. En las bacterias con respiración anaerobia interviene también una cadena transportadora de electrones en la que se reoxidan los coenzimas reducidos

durante la oxidación de los substratos nutrientes; es análoga a la de la respiración aerobia, que se compone de los mismos elementos (citocromos, quinonas, proteínas ferrosulfúricas, etc.). La única diferencia, por tanto radica, en que el acepto último de electrones no es el oxígeno ver la tabla 6, la cual nos muestra algunos ejemplos de estos tipos de microorganismos.

Un pequeño grupo de procariotas anaerobias estrictas, las arqueas productoras de metano, utilizan dióxido de carbono como aceptor de electrones; la reducción de hidrogeno molecular. (Horton, Moran. 1995)

Tabla 2. Ejemplo de algunos microorganismos y su aceptor final.

<b>Aceptor</b>	<b>Producto final</b>	<b>Microorganismo</b>
Nitrato	Nitritos, óxidos de nitrógeno y N <sub>2</sub> .	<i>Pseudomonas, Bacillus</i>
Sulfato	Sulfuros	<i>Desulfovibrio, Clostridium</i>
Azufre	Sulfuros	<i>Thermoplasma</i>
CO <sub>2</sub>	Metano	<i>Methanococcus, Methanosarcina, Methanopyrus</i>
Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	<i>Shewanella, Geobacter, Geopirillum, Geovibrio</i>
Mn <sup>4+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
Selenato	Selenito	
Arsenato	Arsenito	<i>Desulfotomaculum</i>
Fumarato	<u>Succinato</u>	<i>Wolinella succinogenes, Desulfabibrio, E. coli</i>
DMSO	DMS	<i>Campylobacter, Escherichia</i>
Clorobenzoato	Benzoato	Desulfomonile

## 4.5 Nutrición microbiana

Los microorganismos tienen la propiedad de poder realizar un intercambio continuo de sustancias nutritivas con el medio que los rodea. Para llevar a cabo los procesos de multiplicación son necesarias determinadas condiciones de nutrición que requieren la presencia de materiales nutricios a partir de los cuales los microorganismos sintetizan los componentes de su cuerpo y obtienen la energía necesaria, mediante la oxidación de diferentes sustancias además de condiciones determinadas.

El crecimiento de los microorganismos va ligado a la presencia de agua. Las sustancias disueltas en el agua, a partir de las cuales los microorganismos forman su material celular y obtienen energía son los nutrientes. Los requerimientos de los distintos microorganismos en cuanto a la composición del medio de cultivo y a las demás condiciones ambientales son muy variables. Por ello se han descrito muchas recetas de la composición de los medios de cultivo para los microorganismos. Básicamente la disolución ha de cumplir la siguiente condición mínima: han de estar presentes todos los elementos implicados en la constitución del material celular y en forma de compuestos utilizables.

Los requerimientos nutricionales elementales. Desde el punto de vista de la composición química de las células se distinguen 11 macroelementos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro contenidos en todos los microorganismos y los microelementos u oligoelementos: Manganeso, molibdeno, zinc, cobre, níquel, vanadio, boro, cloro, selenio, silicio, wolframio entre otros, que no los necesitan todos los organismos. Los metales pesados son principalmente componentes de las enzimas que transforman elementos o compuestos inorgánicos.

## 4.6 Medios de cultivo

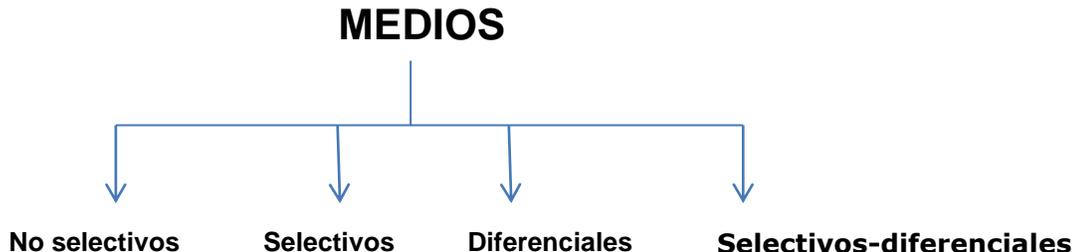


Figura 4.12: Tipos de Medios de Cultivo más comúnmente utilizados

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutriente en el medio. Ver figura 4.12. y se dividen en no selectivos, selectivos, diferenciales o selectivos-diferenciales.

Los no selectivos son ricos en nutrientes y por lo general se emplean para hacer un recuento de la microflora total o para transferir y conservar los microorganismos que se han purificado.

Un medio selectivo le permite crecer al microorganismo de interés y suprime el crecimiento de microorganismos competidores.

Los compuestos selectivos adecuados son componentes fundamentales de este tipo de medio.

Los medios diferenciales cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos es decir, la identificación genérica de los cultivos y la eliminación de cultivos sospechosos falsos. (Yousef, 2006).

Los selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores (por ejemplo, el agar de MacConkey para identificar *Escherichia coli*).

### 4.6.1 Concepto de cultivo puro

Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismos. Los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo tengan la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder identificarlos con seguridad.

## 4.6.2 Crecimiento microbiano en medio líquido

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres.

En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

### 4.6.2.1 Fase lag o de adaptación

Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

### 4.6.2.2 *Fase exponencial o logarítmica*

En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio. La evolución del número de células durante esta fase se explica con los modelos matemáticos que describiremos a continuación.

### 4.6.2.3 *Fase estacionaria*

En ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial.

La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

### 4.6.2.4 *Fase de muerte*

Se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

#### 4.6.3 Presentación de los medios de cultivo

Por regla general los ingredientes de los medios de cultivo se disuelven por agitación y calentamiento ligeramente en agua destilada. Los medios que contienen agente gelificante se suelen ebulir durante 1 minuto para conseguir su dilución. Aunque en la mayor parte de los medios se recomienda calentar, evitado el sobrecalentamiento innecesario.

Algunos medios presentan turbidez inevitable o precipitación, hay que continuar la agitación al distribuir el medio para que quede homogéneo.

Posteriormente a la disolución se procede a la esterilización del medio, en algunos casos existen componentes lábiles que no pueden añadirse en el medio de cultivo deshidratado y que será necesario su esterilización por separado y una posterior incorporación de forma aséptica para obtener el medio completo, o inclusive algunos medios no se pueden esterilizar debido a sus componentes por lo que es importante consultar la etiqueta del fabricante.

El pH de los medios de cultivo se ajuste durante su fabricación a los valores descritos en cada uno de ellos. Sin embargo, la calidad del agua que se utiliza en su hidratación, la utilización de medios en su hidratación, pueden modificar este parámetro por lo que se recomienda verificarlo y reajustarlo si fuera necesario.

En algunos casos se puede ajustar el pH después de la esterilización de forma aséptica y utilizando soluciones ácidas (Acido clorhídrico 1 N) o básicas (Hidróxido de sodio 1 N) estériles. En los medios sólidos la medida se hace a 45°C – 50 °C (el agar todavía no ha gelificado) mientras que en los líquidos se hace a temperatura ambiente. Los medios ácidos (pH < 5) pueden presentar malas gelificaciones debido a la posible hidrólisis del agar con la temperatura. Son medios que no es aconsejable refundirlos, y si es imprescindible, es recomienda añadirles agar.

### 4.7. Bioquímica del crecimiento y metabolismo

La finalidad de un microorganismo es producir otros microorganismos, el crecimiento de los organismos y sus diversos productos están por consiguiente íntimamente unidos en virtud del metabolismo.

El metabolismo es un entrecruzamiento de dos actividades íntimamente interconexionadas pero divergentes. Los *procesos anabólicos* se relacionan con la

construcción de los materiales celulares, no solo de los principales constituyentes de las células (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, etc.), sino también de sus precursores inmediatos, -aminoácidos, purinas y pirimidinas, ácidos grasos, azúcares y azúcares fosforilados, los procesos anabólicos no ocurren espontáneamente; deben ser dirigidos por un flujo energético que en la mayoría de los microorganismos es proporcionado por una serie de *procesos catabólicos* que originan energía. La degradación de los carbohidratos a CO<sub>2</sub> y agua es el más común de dichos procesos catabólicos pero los microorganismos pueden utilizar de esta forma un conjunto mucho más amplio de compuestos carbonados reducidos. (Bu'lock, Kristiansen. 1991)

Los microorganismos que llevan a cabo su metabolismo aeróbicamente, usando oxígeno del aire y los que son capaces de hacerlo anaeróbicamente, es decir, sin oxígeno. La reacción global de los compuestos carbonados con oxígeno para dar agua y CO<sub>2</sub> es un proceso altamente exotérmico; un organismo aeróbico puede por tanto utilizar una cantidad relativamente más pequeña de sus substratos para el catabolismo a fin de mantener un determinado nivel de anabolismo, es decir de crecimiento. A diferencia de los microorganismos anaerobios que tienen una velocidad relativa lenta de crecimiento, que ahora se acopla a una alta conversión de azúcar en productos y CO<sub>2</sub>.

La conexión necesaria entre catabolismo y anabolismo depende de conseguir que los diversos procesos catabólicos dirijan la síntesis de un número bajo de productos reactivos, que a su vez se utilizan para dirigir el conjunto total de las reacciones anabólicas. Estos intermediarios clave, de los que el más importante es el trifosfato de adenosina, ATP (Figuras 4.8.a y 4.8.b.) Denominado comúnmente como "enlaces de alta energía", la unión anhídrido en el residuo pirofosfato, directa o indirectamente el potencial exergónico de la hidrólisis de esta unión se utiliza para superar la endergonicidad de las etapas de formación de enlaces en síntesis anabólica. Las moléculas como el ATP proporcionan sí la moneda de energética" de la célula. (Bu'lock, Kristiansen. 1991)

Cuando el ATP se utiliza en una reacción biosintética, genera ADT (difosfato de adenosina) (ecuación 1) u ocasionalmente AMP (monofosfato de adenosina) (ecuación 2) como productos de la hidrólisis:

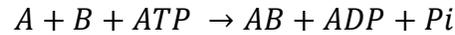


Figura 4.8. a Ecuación 1

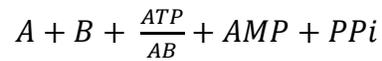


Figura 4.8. b. Ecuación 2

(Pi = Fosfato inorgánico y PPi = pirofosfato inorgánico)

El ADP, que todavía posee un enlace de alta energía (ecuación 3), puede también ser utilizado para producir ATP por la reacción mediada por la adenilato quinasa:

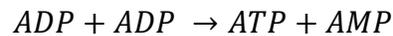


Figura 4.8.c. Ecuación 3

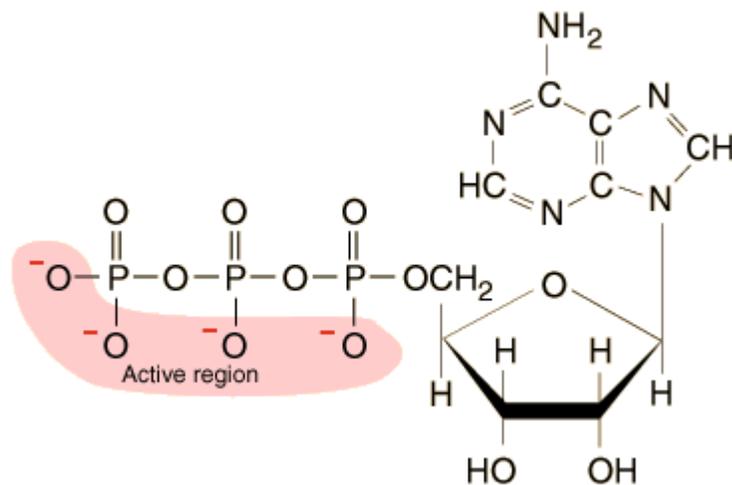


Figura 4.8.d.- Adenosina trifosfato (ATP)

## 4.8 Bacterias que tienen la capacidad de transferir energía

Lo que hace especial por ejemplo al *Geobacter* y algunas *Pseudomonas* incluso algunos cultivos puros de *Escherichia coli*, en condiciones anaerobias, es la presencia de una red de citocromo C ver figura Ct 2.1. multihemo (algunos de ellos albergan hasta 27 grupos hemo) que distribuidos entre la membrana interna, el periplasma y membrana externa, permiten transferir electrones desde el citoplasma hasta el exterior de la célula para respirar sustratos extracelulares como el Fe (111). (Esteve-Núñez, 2008).

A partir de la biomasa orgánica presente en residuos sólidos y líquidos se puede obtener una variedad de biocombustibles y subproductos, siendo la glucosa la principal fuente de carbono (Logan, 2004; Alzate et al., 2007; He & Angenent, 2006). Entre las reacciones estequiometrias principales del metabolismo fermentativo microbiológico están:

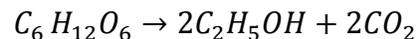


Figura 2.2.a. Bioetanol

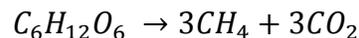
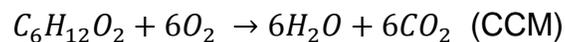


Figura 2.2.b. Biogas



Figura 2.2.c. Hidrógeno gaseoso



### 4.8.1 *Pseudomonas*

En esta familia están incluidos los bacilos rectos o ligeramente curvados. Gram negativos, de flagelación polar, incapaces de formar esporas y que crecen aeróbicamente. La ganancia energética tiene lugar por respiración aeróbica, en algunas especies por respiración anaeróbica (desnitrificación, respiración de nitratos), pero no por fermentación. Las *pseudomonas* son quimiorganotrofos,

aunque algunas crecen quiolitotroficamente de forma facultativa. El género *Pseudomonas* encarna al prototipo de la familia y se caracteriza por los siguientes distintivos de la familia. Desde el punto de vista fisiológico y metabólico los *Pseudomonas* se caracterizan por el amplio espectro de nutrientes orgánicos utilizables. También utilizan un gran número de compuestos heterocíclicos y aromáticos, que no son atacados por otras bacterias. Los azúcares se degradan generalmente por la vía de ENTNER-Doudoroff. Algunas especies de *Pseudomonas* oxidan los azúcares de forma incompleta y excretan los ácidos correspondientes (gluconato, 2-oxogluconato)(Schelegel, 1997)

Debido a su falta de requerimientos los *Pseudomonas* se encuentran en todas partes: tanto en suelos como en aguas, aguas residuales o en el aire. Si un medio de cultivo con sales minerales y ácidos orgánicos o azúcares quedan expuestos al aire, por 10 segundos generalmente los *Pseudomonas* son los primeros en colonizar. Frecuentemente se reconocen por la formación de pigmentos hidrosolubles, como la piocina, derivado azul verdoso de la fenazina y pigmentos amarillo verdosos fluorescentes. Algunos de los pigmentos fluorescentes liberados tienen función de sideroforos. (Schelgel, 1997).

Bacterias quimiolitotrofas: Las bacterias quimiolitotrofas aeróbicas se caracterizan por su capacidad para utilizar iones inorgánicos o compuestos como dadores de hidrogeno o de electrones. Como carbono pueden utilizar anhídrido carbónico y fijarlo a través del ciclo de la ribulosabifosfato. No obstante, la mayoría de estas bacterias son autótrofas facultativas y pueden utilizar también sustratos orgánicos. Entre los autótrofos hay muchos géneros representados, por *Pseudomonas* en la tabla 3 se muestran algunos géneros más importantes de las proteobacterias.

La *Pseudomonas aeruginosa*, y varias especies de *Pseudomonas* en general, se han descrito extensamente para la producción de derivados de fenazina y fenazina derivados. La regulación de estos fenacinas aún no está claro, aunque la evidencia clara ha sido siempre que en parte funcionan como moléculas de quórum. Sin embargo, la característica más interesante de varios derivados producidos fenazina es su papel como mediadores redox. Piocianina (Fig. 4.5.),

uno de los derivados de fenazina más comunes, es capaz de generar radicales de oxígeno dentro de otras bacterias, inducir host-respuesta en plantas y juega un papel importante en la patogenicidad de la bacteria humano (Korneel, 2004).

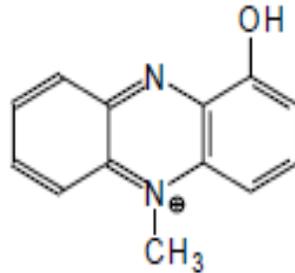


Figura 4.5. Piocianina, un derivado de fenacina producida por *Pseudomonas aeruginosa*, que puede actuar como mediador redox

A continuación se mencionaran las especies de los grupos de las Pseudomonas:

Tabla 3.- Clasificación actual del Género *Pseudomonas*. (Vandanne y Cocrye. 2004)

Grupo de homología rARN	Nomenclatura anterior	Nomenclatura actual
I	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
II	<i>Pseudomonas</i>	<i>Burkholderia, Ralstoia, Wautersia</i>
III	<i>Pseudomonas</i>	<i>Comamonas, Acidovorax, Delftia</i>
IV	<i>Pseudomonas</i>	Brevundimonas

El grupo de homología rARN I que actualmente incluye la familia *Pseudomonadaceae* y el género *Pseudomonas*, puede clasificarse desde el punto de vista fenotípico ver tabla 4 que incluyen a los cuatro grupos nosotros trabajamos con dos de ellos:

- a. Grupo fluorescente
- b. Grupo stutzeri

c. Grupo alcaligenes

d. Grupo pigmentado amarillo

Tabla 4. Clasificación de Pseudomonas por su marcador fenotípico

(Mcdonell y col. 2001)

<b>Grupo</b>	<b>Especies</b>	<b>Marcador fenotípico</b>
Grupo fluorescente	Pseudomonas auroginosa Pseudomonas putida Pseudomonas fluorescens Pseudomonas veonii Pseudomonas monteillii	Producción de fluoresceína
Grupo stutzeri	Pseudomonas stutzeri Pseudomonas mendocina Pseudomonas CDC grupo Vb-3	Producción de gas a partir de nitrito.
Grupo alcaligenes	Pseudomonas alcaligenes Pseudomonas pseudoalcaligenes Pseudomonas CDC grupo 1	Inactividad frente a los hidratos de carbono
Grupo pigmentado amarillo	Pseudomonas luteola Pseudomonas oryzihabitans	Producción de pigmento insoluble amarillo

La clasificación de los bacilos gram negativo no fermentadores (BGNNF) que tienen importancia desde el punto de vista de conversión de energía química en eléctrica (Pistonesi et al 2010). Se enumeran en la siguiente tabla 5, donde se mencionan algunos investigadores que han trabajado con ellas.

Tabla 5. Bacilos Gram Negativo No Fermentadores de importancia en la obtención de energía.

<b>Cultivo</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
<i>Shewanella Oneidensis</i>	Pastonesi Carlos. Energía a partir de las aguas residuales. 2010
<i>Geobacter metallireducens.</i>	Pastonesi Carlos. Energía a partir de las aguas residuales. 2010
<i>Shewanella onidensis.</i>	Pastonesi Carlos. Energía a partir de las aguas residuales. 2010
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Zhuwei. A state of art review on microbial fuel cell. 2007
<i>Scherichia coli</i>	Zhuwei. A state of art review on microbial fuel cell. 2007
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Axel et al. 2009
<i>Geobacter metallireducens</i>	Zhuwei. A state of art review on microbial fuel cell. 2007
<i>Rhodoferax ferireducens</i>	Zhuwei. A state of art review on microbial fuel cell. 2007
<i>Klebsiella peumoniae</i>	Zhuwei. A state of art review on microbial fuel cell. 2007
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Zhuwei. A state of art review on microbial fuel cell. 2007
<i>Pseudomonas spp</i>	Hong. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. 2005

#### **4.8.2 Geobacter**

Es una bacteria Gamma-proteobacteria anaerobia ver tabla 2, que tiene más de cien citocromos. Su capacidad para ensamblar *pili* con características conductivas, los cuales son capaces de transferir los electrones de su metabolismo central hacia electrodos. Además, estas bacterias forman biofilms, que son muy importantes para la colonización de electrodos y producción de electricidad a partir, es un organismo con capacidad de usar óxidos de hierro como aceptor final de electrones había sido descrito. Las especies de *Geobacter* dependen de una cadena de transporte de electrones para la producción de energía, pero en lugar de usar oxígeno como el aceptor final, usan compuestos químicos de hierro oxidados. (Lovley, 1998).

Este grupo de microorganismos capaces de acoplar la respiración anaeróbica a la reducción de metales en el ambiente. Debido a su metabolismo son capaces de biorremediar varios metales pesados incluyendo Uranio (VI), Vanadio (VI), Cromo (VI), así como biodegradar varios contaminantes orgánicos como por ejemplo los hidrocarburos monoaromáticos. Recientemente dicha especie se ha usado para generar eléctrica partir desechos orgánicos, ya que su metabolismo único la hace sobresaliente en este campo. (Lovley, 2008).

*Geobacter* pertenecen a los microorganismos reductores de metales, los cuales producen energía útil biológicamente en forma de ATP durante la reducción de óxidos de metales bajo condiciones.

#### **4.8.3 Shewanella**

Es un microorganismos pertenece a las proteobacterias ver tabla 2, Gram Negativa su crecimiento es anaeróbico al acabarse el oxígeno en el ambiente la bacteria empieza a consumir metales depende del Fe (111) tiene lugar con varios donadores orgánicos de electrones. Este microorganismo ha sido ampliamente estudiado como un microorganismo con un potencial reductor alto por ejemplo en el par  $Mn^{4+} / Mn^{2+}$  Ver (Figura 4.6.), por lo tanto, varios compuestos tendrían que

ser capaces de ceder electrones para la reducción de  $Mn^{4+}$ . Éste es el caso también de del clorato, ya que su potencial de reducción es incluso más positivo que le del par  $O_2/H_2O$  (Madigan et al 2004). Además cuando no hay oxígeno *S. oneidensis* forma largos filamentos de proteínas con la capacidad de conducir electricidad, es decir estos filamentos de proteínas transportan electrones. Esta corriente eléctrica se propaga de bacteria a bacteria y tiene que ver principalmente con su metabolismo, se ha llamado entonces como una especie de “respiración colectiva” (Ortega, 2010).

Aceptor	Reacción	$E_0'$ del par (V)	Producto
Clorato	$ClO_3^- \xrightarrow[6 H^+]{6 e^-} Cl^- + 3 H_2O$	+ 1,03	Cloruro
Ion mangánico	$Mn^{2+} \xrightarrow{2 e^-} Mn^{2+}$	+ 0,798	Ion manganoso
Selenato	$\begin{array}{c} O \\    \\ ^-O-Se-O^- \\    \\ O \end{array} \xrightarrow[2 H^+]{2 e^-} \begin{array}{c} O^- \\   \\ Se=O \\   \\ O^- \end{array} + H_2O$	+ 0,475	Selenito
Ion férrico	$Fe^{3+} \xrightarrow{e^-} Fe^{2+}$	+ 0,2	Ion ferroso
Dimetil sulfóxido (DMSO)	$\begin{array}{c} H_3C-S-CH_3 \\   \\ O \end{array} \xrightarrow[2 H^+]{2 e^-} (CH_3)_2S + H_2O$	+ 0,16	Dimetil sulfuro (DMS)
Arsenato	$\begin{array}{c} O \\   \\ ^-O-As=O \\   \\ O \end{array} \xrightarrow[2 H^+]{2 e^-} \begin{array}{c} O \\   \\ As-O^- \\   \\ O^- \end{array} + H_2O$	+ 0,139	Arsenito
Óxido de N-Tremetilamina (TMAO)	$\begin{array}{c} CH_3 \\   \\ H_3C-N-CH_3 \\   \\ O \end{array} \xrightarrow[2 H^+]{2 e^-} (CH_3)_3N + H_2O$	+ 0,13	Trimetilamina (TMA)
Fumarato	$\begin{array}{c} O & H & & O & & O \\    &   & &    & &    \\ ^-O-C & =C & -C & -C-CH_2-CH_2-C \\   & &   & &   \\ O^- & & O^- & & O^- \end{array} \xrightarrow[2 H^+]{2 e^-}$	+ 0,03	Succinato

Figura 4.6. Algunos aceptores alternativos en las respiraciones anaeróbicas. (Madigan – 2004)

## 4.9. Mecanismos de transferencia de electrones

Se han planteado diferentes mecanismos para explicar cómo los microorganismos liberan los electrones al electrodo:

- a) Transferencia directa de electrones al electrodo con la participación de citocromos:

Los electrigenos o anodofilicos son microorganismos que conservan la energía permitiendo, el crecimiento por la oxidación de compuestos orgánicos a dióxido de carbono y con la transferencia directa de electrones a los ánodos de las MFC (Lovley & Kevin, 2008). Con la completa oxidación de la materia orgánica a dióxido de carbono se produce una alta eficiencia coulombica en el proceso (Lovley & Nekin, 2008).

- b) Transferencia con ayuda de mediadores externos o producidos por el mismo organismo:

Un mediador es un compuesto que puede entrar en la célula, aceptar electrones de varios acarreadores intracelulares de electrones, salir de la célula en estado reducido y entonces donar los electrones al ánodo.

Transferir electrones fuera de la célula (flujo exocelular) ha sido siempre relacionado en el organismo secuencias con mayor número de genes codificantes de estos transportadores de electrones (más de 100). (Esteve-Núñez, 2008).

Se ha estimado que la red de grupos hemo fig. 2.1. Podría albergar hasta 20 millones de electrones, lo que le permitiría consumir el poder reductor del citoplasma (como ve de una respiración) al tiempo que mantendría el gradiente protón-matriz. (Esteve-Núñez, 2008).



incluye los efectos de los factores bióticos y abióticos sobre el microorganismo, incluyendo su actividad y el crecimiento, es decir, la eficiencia del tratamiento de aguas residuales. Las unidades de tratamiento biológico son amplificadores – es decir, eliminación o degradación de residuos resulta en el aumento de número de organismos (lodos). Por lo tanto es aceptable la actividad y crecimiento de los organismos o biomasa en el tratamiento de aguas residuales. (Arellano, 2002)

En conjunto, todos los organismos y las condiciones de operación están relacionados entre sí por la transferencia del carbono y de energía por la cadena alimenticia (figura 4.11.) o más apropiadamente red alimenticia. Dentro de la red alimenticia hay numerosos habitantes, nichos y relación (simbiótica y presa-depredadora) que determinan el éxito o fracaso en el tratamiento de aguas residuales.

Los factores abióticos son los componentes no vivientes o las condiciones de operación en el agente biológico unidad de tratamiento que afecta la actividad y crecimiento de la biomasa (Gerardi, 2006). Por ejemplo, la disminución de pH de la actividad de los lodos activados favorece la proliferación de hongos filamentosos y desfavorece el crecimiento de bacterias, y el decrecimiento en pH en la digestión anaerobia favorece el crecimiento de bacterias fermentativas y desfavorece el crecimiento de bacterias metano-formicas. Los factores bióticos son los componentes vivos los organismos en una unidad de tratamiento biológica. Cada organismo tiene un efecto sobre otros microorganismos (predador-presa y relaciones simbióticas) y factores abióticos en la unidad de tratamiento biológico. Por ejemplo, el que nadan libremente incrementa número de los protozoos ciliados incrementa en presencia un gran número células bacterianas dispersas. Sin embargo, durante la formación de flóculos el número de células bacterianas dispersas disminuyen y por consecuencia, el número de libres-nadadoras protozoos ciliados decrece en número (Gerardi,2006).

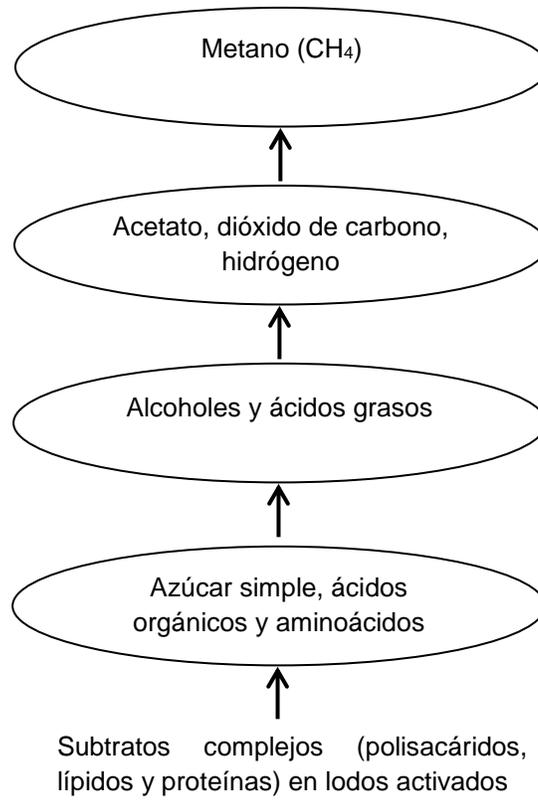


Figura 4.11. Cadena alimenticia

#### **4.11. HIPOTESIS**

Los microorganismos bacilos gram negativos no fermentadores pueden ser utilizados como bioremediadores en una planta de agua residual de harina de pescado con microorganismos halófilos

Los microorganismos gram negativo no fermentadores pueden ser utilizados como generadores de electricidad a través de las celdas microbianas (MFC).

#### **4.12. OBJETIVO GENERAL**

Identificar, aislar y purificar a los microorganismos bacilos gram negativo no fermentadores, provenientes de lodos activados propiedad del CIDETEQ.

#### **4.13. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Identificar los microorganismos bacilos gram negativo no fermentadores y el papel que desarrollan dentro del proceso.
- Aislar los diferentes microorganismos bacilos gram negativo no fermentadores en los lodos activados, con medios de cultivo selectivos utilizando las técnicas de aislamiento.
- Identificar los diferentes microorganismos por medio de pruebas bioquímicas para buscar la especie y el género.
- Obtener cepas puras identificadas, para su reproducción.
- Utilizar técnicas de conservación a corto y mediano plazo.

## 5 MATERIALES Y EQUIPO

### 5.1 Equipos

- Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de +/- 1°C y termómetro.
- Baño maría con termostato y termómetro.
- Mecheros Bunsen o Fisher
- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.
- Microscopio óptico con objetivo de inmersión en aceite (100X).

### 5.2 Materiales

- Matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de rosca.
- Abatelenguas
- Aplicadores de madera
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubos para serología de 13X100 mm con tapón de rosca.
- Pipetas de 10 y 5 mL graduadas en 0.1 mL y de 1 mL con graduaciones de 0.01 mL, protegidas con tapón de algodón
- Cajas de petri estériles de vidrio o desechables
- Gradillas para tubos de ensaye
- Asas de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

## 5.3 Reactivos

### 5.3.1 Medios de Cultivo

#### 5.3.1.1. Medio de Líquidos (caldos)

##### 1.- Caldo Soya Tryptona (CST)

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Tryptona	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Dipotasio hidrogeno fosfato	2.5
Dextrosa	2.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

##### 2.- Caldo Urea

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Dipotasio hidrogeno fosfato	2.5
Dextrosa	2.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

#### 4.3.1.2. Medios sólidos:

##### 1.- Agar Extracto glucosa y tripticaseina (AGT)

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona de casína	5.0
Extracto de carne	3.0
Dextrosa	1.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml
pH	7.0 ± 0.2

2.- Agar CASO (ASC):

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona de caseína	15.0
Peptona de harina de soja	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

3.- Agar Soya Triticaseína (AST):

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona de caseína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

4.- Agar MacConkey:

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona	17.0
Proteasa peptona	3.0
Lactosa	10.0
Sales biliares No. 3	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	1.001
Agua destilada	1000 ml
pH	7.1 ± 0.2

5.- Agar cetrimida:

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona de gelatina	20.0
Cloruro de Magnesio	1.4
Sulfato de Potasio	10.0
Cetrimida	0.3
Agar	13.6
pH	7.2 ± 0.2

6.- Movilidad:

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Extracto de carne	3.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	4.0
pH	7.2 ± 0.2

7.- Agar *Salmonella Shigella* (SS):

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Extracto de carne	5.0
Proteosa peptona	5.0
Lactosa	10.0
Sales biliares No. 3	8.5
Citrato de sodio	8.5
Tiosulfato de sodio	8.5
Verde brillante	0.0003
Rojo neutro	0.025
Agar	13.5
Agua destilada	1000
pH	7.0 ± 0.2

8.- Citrato de Simmons agar:

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Fosfato Dihidrogenado deamonio	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Cloruro de Sodio	5.0
Citrato de Sodio	2.0
Sulfato de Magnesio	0.2
Azul de Bromotimol	0.08
Agar	15.0
Agua destilada	1000
pH	6.9 ± 0.2

9.- Agar Verde brillante

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Base caldo rojo de fenol	15.0
Carbohidrato	10.0
Agar	15.0

Agua destilada	1000 ml
pH	7.7 ± 0.2

10.- Agar de Hierro y Lisina (LIA):

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona de gelatina	5.0
Extracto de levadura	3.0
Dextrosa	1.0
L-Lisina	10.0
Citrato de Hierro y Amonio	0.50
Purpura de Bromocresol	0.02
Agar	13.50
Agua	1000 ml
pH	6.7 ± 0.2

11.-Agar Hiero y Triple Azúcar (TSI):

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona de caseína.	10.0
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa	1.0
Sulfato de Hierro y Amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo de Fenol	0.025
Agar	13.0
pH	7.3 ± 0.2

12.- Movilidad Indol Ornitina (MIO):

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad g</b>
Dextrosa	1.0
Extracto de levadura	3.0
L-ornitina	5.0
Peptona de caseina	10.0
Agar	13.0
Peptona de gelatina	10.0
Púrpura de bromocresol	0.02
Agua destilada	1000
pH	6.5 ± 0.2

13.- Agar Citrato de Simmons:

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad g</b>
Fosfato Dihidrogenado de Amonio	1.0
Fosfato Dipotásico	1.0
Cloruro de Sodio	5.0
Citrato de Sodio	2.0
Agar	15.0
Azul de bromocresol	0.08
Agua destilada	1000
pH	6.9 ± 0.2

14.- Urea de Christensen

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona	1.0
Fosfato monopotásico	2.0
Cloruro de Sodio	5.0
Glucosa	1.0
Agar	15.0
Rojo de Fenol	0.012
Agua destilada	1000
pH	6.9 ± 0.2

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 Origen de las muestras

Las muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislamientos bacterianos estudiados en la presente tesis de maestría proceden de los lodos pertenecientes y muestreados por el Centro de Investigación CIDETEQ, tomada de sus birreactores de la parte superior, inferior y del centro con el fin de tener una muestra representativa y homogénea del birreactor. Colocada en un recipiente estéril y de manera escéptica.

El método de investigación escogido es cualitativo ya que se pretende solo identificar a los microorganismos anaerobios facultativos presentes en estos lodos.

Es una metodología tradicional de identificación por medio de bioquímicas, ver figura 5.1.

### 6.2 Preparación de Medios de Cultivo

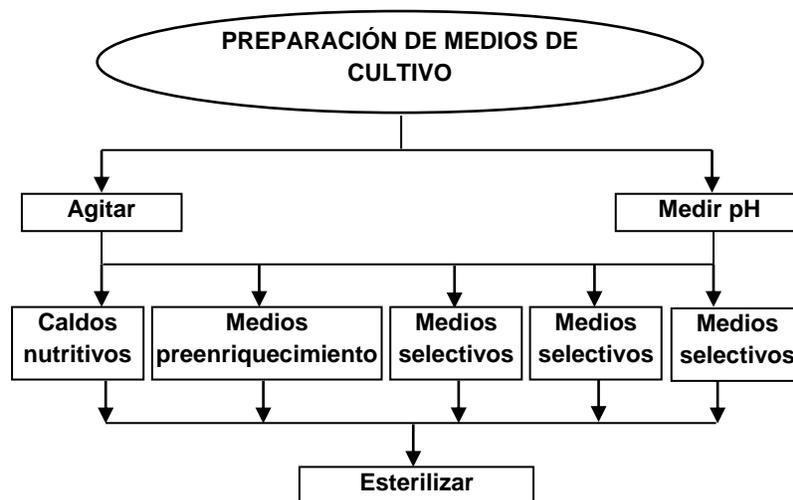


FIGURA 6.1. ESQUEMA DE LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Por lo general los ingredientes de los medios de cultivo se disuelven por agitación y calentando ligeramente en agua destilada. Los medios que contienen agente gelificante se suelen hervir durante 1 minuto para conseguir su disolución. Aunque en la mayor parte de los medios hay que calentar, hay que evitar sobrecalentamientos innecesarios.

El pH de los medios de cultivo se ajusta durante su fabricación a los valores descritos en cada uno de sus etiquetas. Sin embargo, la calidad del agua que se utiliza en su hidratación, la utilización de medios no recientes etc., pueden modificar este parámetro por lo que es aconsejable verificarlo y reajustarlo si fuera necesario. En algunos casos se puede ajustar el pH después de la esterilización de forma aséptica y utilizando soluciones ácidas (Acido Clorhídrico 1N) o básicas (Sodio Hidróxido 1N) estériles.

El método más comúnmente utilizado para la esterilización es el Autoclavado ver figura 6.1. Sin embargo, hay ingredientes en algunos medios que no mantienen sus propiedades si se someten a altas temperaturas. Para ellos existen diferentes procesos de esterilización. Verificar siempre la etiqueta del producto.

## **6.2 Condiciones ambientales, medidas de seguridad, orden y limpieza.**

Durante el análisis de las muestras las puertas del laboratorio permanecerán cerradas y diariamente se hará el control ambiental.

Los resultados serán registrados minuciosamente en la bitácora de resultados.

El material de desechos de residuos peligrosos biológico infecciosos serán desechados según la norma NOM-087-SSA-1- 2002

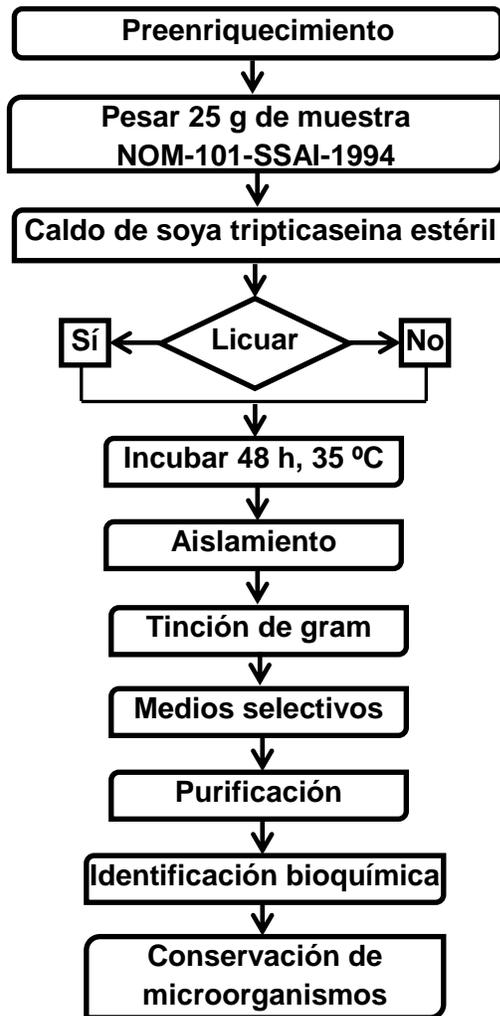


Figura 6.2. Metodología empleada en la obtención de los Bacilos Gram Negativos No Fermentadores.

### 6.3 Preparación y acondicionamiento de la muestra para microorganismos anaerobios facultativos.

La preparación se basa en el análisis de 25 g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra: caldo soya tripticaseina.

Pesar asépticamente 25 g de la muestra, según la norma NOM-101 SSA1-1994. Para diluciones ver figura 5.1. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL (con tapón de rosca) con 225 mL de Caldo soya tripticaseina estéril y licuar si es necesario durante un min. Incubar por 48 h a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Realizar una resiembra por estría cruzada en medios de cultivo agar de soya tripticaseina Incubar por 48 h a 30°C.

Realizar tinción de Gram para trabajar solo aquellas colonias que se han identificado como Gram Negativas.

#### **6.4 Morfología. Tinción de Gram**

1.- Transfiera una pequeña porción de una colonia bien definida del cultivo en estría de cultivo puro a una gota de agua sobre un portaobjetos.

2.- Mezcle y disperse la masa bacteriana en la gota de agua utilizando el asa.

3.- Deje el frotis secar al aire.

4.- Fije al calor haciendo pasar el portaobjetos rápidamente sobre la flama del mechero.

5.- Realice la tinción:

- Cubra los frotis con solución de cristal violeta.

- Enjuague el frotis suavemente con agua utilizando una piceta.

- Cubra el frotis con una solución yodada de Gram y enjague con agua.

- Enjuague con el decolorante (mezcla de acetona y alcohol) por 2 – 3 segundos.

- Cubra el frotis con safranina (segundo colorante).

- Enjuague con agua.

6.- Secar al aire.

7.- Leer al microscopio, con aceite mineral a 100 X.

## 6.4. Aislamiento en medios selectivos

Resembrar por estría cruzada en los medios selectivos Cetrimida, MacConkey, Salmonella Shigella, Verde brillante, Sulfito bismuto, ver figura 5.2.

Incubar las placas del medio  $35 \pm 1$  °C por 24 a 48 h .

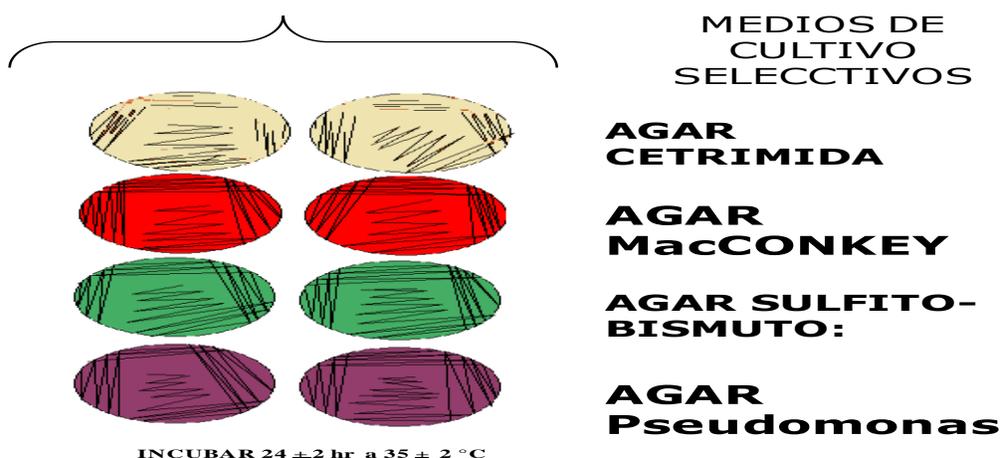


Figura 6.1. Medios de cultivo selectivos.

Examinar las placas para observar si hay crecimiento de colonias describirlas.

### 1.- Agar Cetrimida:

Se utiliza para evaluar la deaminación de acetamida por acción de la enzima acilamidasa resultado en la alcalinización del medio por liberación de amonio.

Reacción positiva: Viraje al color osa del medio.

Reacción negativa: Medio sin cambio.

### 2.- Agar Mac Conkey

Este medio evalúa la capacidad de un microorganismo de desarrollar en concentraciones moderadas de sales biliares. Las sales y el cristal violeta inhiben considerablemente la flora gram positiva. La lactosa junto con el indicador de pH rojo neutro, sirven para comprobación de la degradación de dicho azúcar.

Sembrar la placa con un cultivo de 18 a 24 horas. Incubar a  $35$  °C.

Las colonias lactosa negativas son incoloras y las lactosa positiva son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácido biliares.

### 3.- Agar SS (Salmonella Shigella)

Este medio fue diseñado para el aislamiento selectivo de *Salmonella* y *Shigella*. El verde brillante, la bilis de buey, la elevada concentración de tiosulfato y citrato inhiben considerablemente muchos microorganismos. Con el tiosulfato y los iones de hierro se evidencia la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias. La lactosa junto con el indicador de pH rojo neutro, sirven para comprobación de la degradación de dicho azúcar.

Sembrar la placa con un cultivo de 18 a 24 horas. Incubar a 35 °C.

Efectuar luego de 18 a 24 horas de incubación. Las colonias de microorganismos lactosa negativo son incoloras y las lactosa positiva son rosadas a rojas. Las colonias de microorganismos formadores de ácido sulfhídrico presentan un centro negro.

### 4.- Verde Brillante.

La presencia conjunta del verde brillante y de la bilis hacen que el medio sea selectivo para bacilos Gram-negativos, los cuales al fermentar la lactosa dan lugar a colonias intensamente rojas rodeadas de un halo rosa, que contrastan con el fondo verde azulado del medio.

Sembrar la placa con un cultivo de 18 a 24 horas. Incubar a 35 °C.

Efectuar luego de 18 a 24 horas de incubación. Las colonias de microorganismos lactosa negativo son verdes y las lactosa positiva son rojo intenso. Y un vire a rosa se considera como satisfactorio.

### 5.- Sulfito Bismuto.

El Bismuto Sulfito y el Verde Brillante inhiben conjuntamente a las bacterias Gram-positivas y Coliformes, no restringiendo en absoluto el crecimiento de las Salmonellas. A su vez por la presencia de azufre en el medio, los microorganismos capaces de producir Hidrógeno Sulfuro precipitan Hierro (II)

Sulfuro, que da lugar a tonalidades marrones más o menos oscuras e incluso negras. También se puede reducir el bismuto a metal dando un brillo metálico alrededor de las colonias correspondientes.

Sembrar por estría el material objeto de estudio. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

## **6.5. Identificación Bioquímica**

Seleccionar del Agar Soya Tripticacina colonias que se encuentren bien aisladas.

1.- Prueba de movilidad en agar.

Inocular por picadura hasta el fondo los tubos que contienen los siguientes agares observar el desarrollo.

Movilidad positiva: Zona difusa de desarrollo alrededor de la siembre.

### 1.1 Agar SIM

Incubar 7 días a temperatura ambiente.

a) Movilidad.

b) Producción de ácido sulfhídrico.

Prueba positiva: desarrollo de color negro a lo largo de la punción.

Prueba negativa: ausencia de color negro.

### 1.2.- Medio MIO

Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos, sin embargo, algunas formas de cocos son móviles.

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos, además su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. Los microorganismos no móviles carecen de flagelos.

Prueba positiva (motilidad): los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad. Pueden mostrar crecimiento en estrías vellosas.

Prueba negativa (sin motilidad): crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra, el medio circundante se mantiene claro.

## 2.- Prueba del indol

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano.

Puede ser en caldo soya tripticasa o en MIO.

Inocular el caldo o el medio con una ansada de un cultivo de 18 horas o una gota de un cultivo de 18 a 24 horas en caldo infusión corazón.

Incubar 35 °C por 48 horas.

Agregar a ese cultivo aproximadamente 1 ml de reactivo de Ehrlich sobre las paredes del tubo. La presencia de indol se evidencia por aparición un anillo.

Reacción positiva: Anillo rojo en la superficie de la capa.

Reacción negativa: Anillo amarillo es decir no se produce ningún color.



Figura 6.2: Pruebas Bioquímicas de la Indol en medio MIO

### 3.- Ornitina descarboxilasa

Reacción positiva: El fondo del tubo con medio MIO cambia a color púrpura.

Reacción negativa: El fondo del tubo cambia a color amarillo. A veces se puede desarrollar un color violáceo en la superficie del medio.

### 4.- Oxidasa

El sistema citocromo actúa transfiriendo electrones hidrogeno al oxígeno con formación de agua. Se encuentra en organismos aerobios y anaerobios facultativos. La prueba de citocromo oxidasa utiliza el diclohidrato de tetrametil-para.fenildiamina que actúa como aceptor terminal de electrones, el compuesto es incoloro en estado reducido. En presencia de oxida y oxígeno atmosférico se oxida formando azul de indofenol.

Reacción Positiva: aparición rápida de coloración azul violácea.

Reacción Negativa: Sin aparición del color.

### 5.- TSI (agar hierro tres azucares)

Determina la capacidad de un microorganismo para fermentar los hidratos de carbono, con producción o no de gas. También permite observa la producción de ácido sulfhídrico.

Realización de la prueba: Con una ansa aguja introducir hasta el fondo y salir inoculando la superficie. Incubar a 35 °C. Efectuar la lectura luego de 18 a 24 horas de incubación.

- a) K/n = pico alcalino (rojo /fondo neutro (sin cambio): No hay hermaentación de azúcares.
- b) K/A= Pico alcalino (rojo/ fondo ácido (amarillo): Glucosa fermentada/Lactosa y sacarosa no fermentadas.
- c) A/A = pico ácido (amarillo/fondo ácido (amarillo)

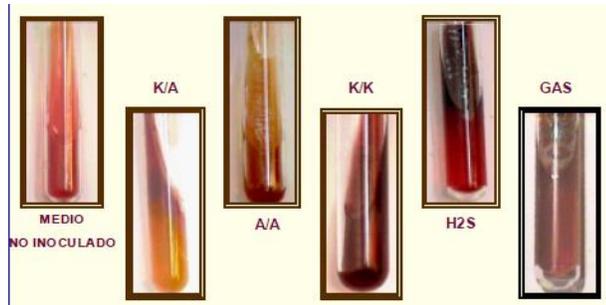


Figura 6.3. Pruebas Bioquímicas de TSI

## 6.- Urea de Cristensen

Detecta la hidrólisis de urea, por acción de la enzima ureasa, dando como producto final amoníaco. Este último alcaliza el medio con viraje del indicador rojo de fenol, del amarillo al rojo.

Reacción Positiva: por alcalización del medio viraje del amarillo al rojo.

Reacción Negativa: No se produce cambio de color.



Figura 6.4. Pruebas Bioquímicas de la Urea.

## 7.- Agar Citrato de Simmons

Las pruebas de asimilación son indispensables para la identificación a nivel de especie.

Inocular por estría con un cultivo de 18 a 24 horas. Incubar a 35 °C. hasta por 7 días.

Reacción Positiva: Vire a color azul (alcalinizado).

Reacción Negativa: Medio verde (sin cambio)



Figura 6.5. Pruebas Bioquímicas del Citrato de Simmons.

#### 8.- LIA (Agar de Hierro y Lisina)

El agar hierro lisina permite determinar los microorganismos capaces de descarboxilar la lisina, produciendo un cambio de color del púrpura de bromocresol. Sin embargo, esta descarboxilación sólo se puede hacer en un medio ligeramente ácido, que se consigue con la fermentación de glucosa, por ello esta prueba está limitada a los microorganismos capaces de utilizar la glucosa. Cuando el pH del medio baja, el indicador vira a amarillo. Al alcalinizar el medio debido a la descarboxilación de la lisina, el indicador (púrpura de bromocresol) vira a rojo púrpura. Los cultivos que contienen microorganismos capaces de formar Hierro (II) Sulfuro presentan un precipitado negro. Además pueden aparecer burbujas de gas, que pueden incluso desplazar el medio.

Incubar a 37 °C de 18 a 24 horas.

Este medio se siembra a partir de un cultivo puro. Debe sembrarse tanto en la superficie inclinada como por picadura en la columna vertical.

Reacción Positiva: Vire capaces de descarboxilar la lisina (LDC) positivos un medio rojo-púrpura.

Reacción Negativo: La LDC negativos la columna vertical de color amarillo.



Figura 6.6. Pruebas Bioquímicas de LIA

## 6.6 Métodos de Preservación de las cepas

### 6.6.1. Cultivo Vaselina.

Sembrar 5 a 10 colonias de aislamiento, en estría de agar nutritivo o en un caldo nutritivo. Incubar y una vez observado el desarrollo añadir vaselina, formado una capa de 1 a 2 cm. La vaselina debe ser de grado medicinal esterilizada por calor seco a 170 °C por 1 a 2 horas.

### 6.6.2. Congelamiento a -20 °C:

En algunos casos, la viabilidad puede mantenerse por 1 a 2 años.

En un cultivo joven se suspende en un medio con Clado Soya Tripticaseina, con extracto de levadura y glicerol al 20 %. Esterilizar a 15 lb por 20 min.

Sembrar 5 a 10 colonias en el caldo nutritivo. Incubar y una vez observado el desarrollo.

Se recomienda y congelamiento lento y controlado, con una velocidad de enfriamiento de 1 °C por minuto hasta que el vial llegue a la temperatura de -20°C.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Resultados obtenidos.

Los aislamientos proceden de toda la muestra representativa obtenida. El grupo bacteriano buscado son los bacilos facultativos Gram Negativo No Fermentadores, en la siguiente tabla 7. se muestran las colonias obtenidas de los diferentes caldos utilizados:

### 7.2. Medios de Preenriquecimiento.

La producción de este material biológico fue obtenida después de sembrar en los diferentes caldos de preenriquecimiento los lodos, a 35 °C por 48 horas.

7.2.1. Caldo lactosado:

7.2.2. Caldo Casoy:

7.3.3. Caldo Métodos estándar:

Después fue sembrado ver figura 7.1 y 7.2 por triplicado cada uno de los caldos de preenriquecimiento por estría cruzada en Agar soya Trypticaseína para aislar e identificar colonias a 35 °C por 48 horas.

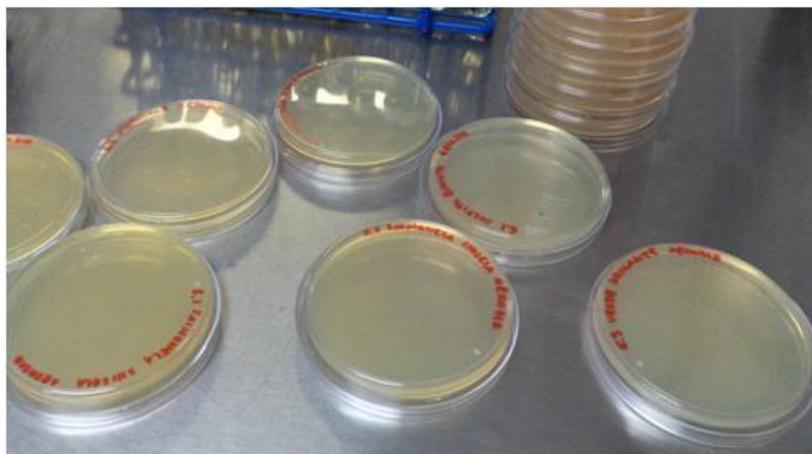


Figura 7.1. Agar Soya Trypticaseína antes de ser sembrados por los caldos de preenriquecimiento.

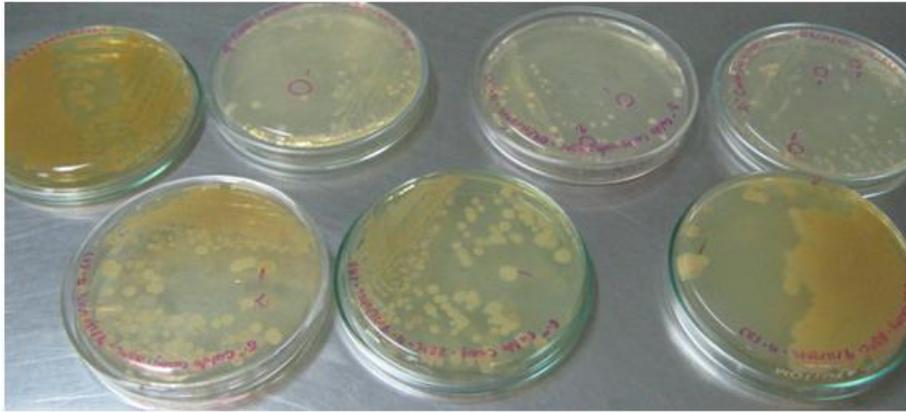


Figura 7.2. Agar Soya Tripticasina después de sembrados de los diferentes medios de preenriquecimiento.

Tabla 7. Descripción de los diferentes grupos bacterianos que crecieron medios bacteriológicos de preenriquecimiento

Medio de cultivo	Identificación de la colonia	Descripción	Tinción de Gram
7.2.1. Caldo lactosado	CL-1	Colonias circulares de contorno perfectamente definido de 1 – 2 mm de diámetro, mucosas, blancas.	Cocos +
	CL-2		
	CL-3		
	CL-4		
	CL-5		
	CL-6		
7.2.2. Caldo Casoy	CC-1	Colonias circulares, contorno perfectamente definido de 1 – 2 mm de diámetro, planas, translucidas	Bacilos -
	CC-2		
	CC-3		
	CC-4	Colonias puntiformes, cóncavas, de color blancas	Bacilos -
	CC-5	Colonias de forma irregular, plana, de 2 – 3 mm, de aspecto seco.	Bacilos -
7.2.3. Métodos Estándar	MS-1	Colonias circulares de contorno definido de diferentes tamaños, ligeramente mucosas y de color marrón.	Bacilos -
	MS-2		
	MS-3		
	MS-4		
	MS-5		

### 7.3 Medios selectivos.

Las colonias obtenidas del medio de cultivo Caldo Lactosado fueron desechadas ya que no cumplían con los requerimientos que fueran Gram Negativas.

Mediante microscopia óptica se ha podido observar la morfología bacilar de los diferentes tipos, detectándose una variabilidad en cuanto a la longitud de los bacilos, a partir de las 24 horas de incubación de los microorganismos obtenidos por el medio de cultivo caldo Casoy (CC) referidos en las tablas 8 a 12 y por el caldo Métodos Estándar MS que se encuentran en la tabla 13 a la 17.

Tabla 8. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia CC-1.

Muestra	CC- 1				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Observaciones				Color verde fluorescente	

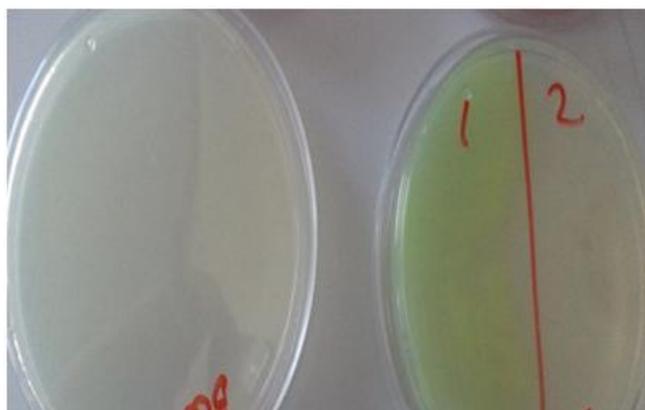


Figura 7.3. Medio cetrimida.

Tabla 9. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia CC-2.

Muestra	CC- 2				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Observaciones			Lactosa positivo		

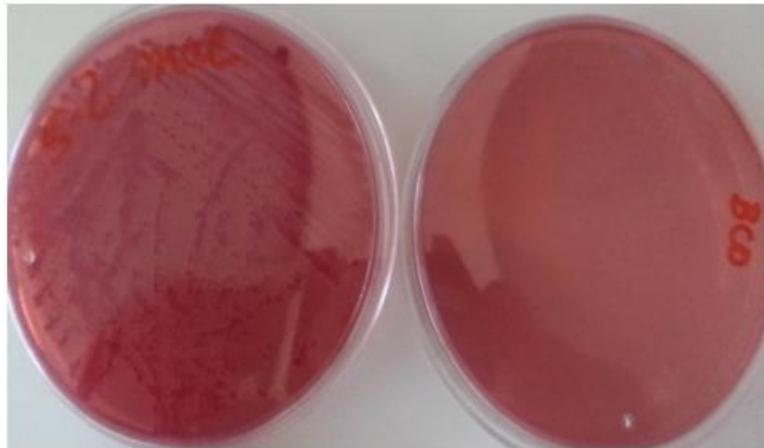


Figura 7.4. Agar Mac Conkey

Tabla 10. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia CC-3.

Muestra	CC- 3				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Observaciones			Lactosa positivo		

Tabla 11. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia CC-4.

Muestra	CC- 4				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Observaciones			Lactosa positivo		Crecimiento de color negro



Figura 7.5: Sulfito Bismuto.

Tabla 12. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia CC-5.

Muestra	CC- 5				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Observaciones			Lactosa positivo		

Tabla 13. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia MS-1.

Muestra	MS-1				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Observaciones				Sin coloración fluorescente	

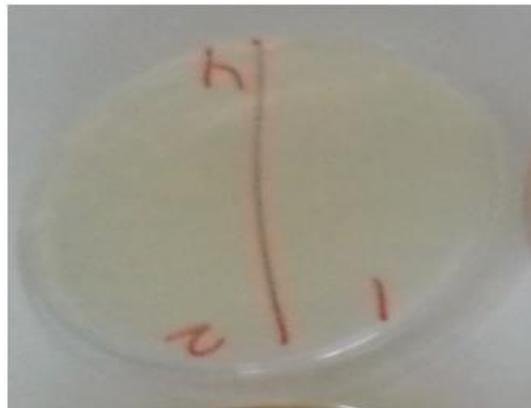


Figura 7.6. Agar Cetrimida sin color fluorescente.

Tabla 14. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia MS-2.

Muestra	MS- 2				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Observaciones				Lactosa negativo	



Figura 7.7. Agar Sulfito Bismuto.

Tabla 15. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia MS-3.

Muestra	MS-3				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Observaciones			Lactosa positivo		

Tabla 16. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia MS-4.

Muestra	MS-4				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Observaciones			Lactosa positivo		

Tabla 17. Resultados de crecimiento de microorganismos de la colonia MS-5.

Muestra	MS-5				
Medio	Verde Brillante	Cetrimida	MacConkey	Salmonella Shigella	Sulfito Bismuto
Condiciones					
Tiempo	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Temperatura	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Resultado	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Observaciones			Lactosa positivo		

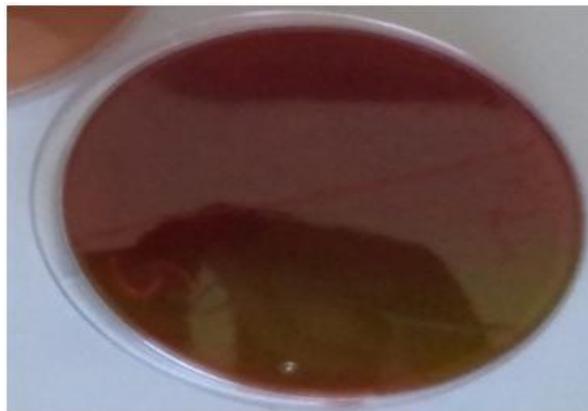


Figura 7.8. Agar Verde Brillante.

## 7.4 Bioquímicas.

Resultados de identificación bioquímica para los microorganismos desarrollados en los lodos del CIDETEQ. Sembrados en los diferentes medios, a 35 °C por 24 horas.

Tabla 18: Bioquímicas para las colonias CC

IDENTIFICACIÓN	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5
MICROORGANISMO	<i>Pseudomona auroginosa.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Citrobacter spp</i>	<i>Klebsiella spp</i>	<i>E. coli</i>
SIM	-	+	+	+	+
UREA	-	+	+	+	+
MOV	-	+	+	+	+
IND	-	+	-	-	+
ORN	+	-	-	-	-
LIA	K/A	K/A	K/K	K/K	K/A
OXIDASA	-	-	-	-	-
TSI:Superficie inclinada	A	A	A	A	A
TSI Fondo	A	A	A	A	A
Gas	-	+	-	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
CIT	+	+	-	-	-
Gram	-	-	-	-	-

K= Alcalino. A= Ácido. + Crecimiento positivo. – Crecimiento negativo

Tabla 19: Bioquímicas para las colonias MS

IDENTIFICACIÓN	MS-1	MS-2	MS-3	MS-4	MS-5
MICROORGANISMO	<i>Pseudomonas mallei</i>	<i>Klebsiella spp</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter spp</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
SIM	+	+	+	+	-
UREA	-	+	+	+	+
MOV	-	-	+	+	+
IND	-	+	+	-	+
ORN	+	-	-	-	-
LIA	K/K	K/K	K/A	K/A	K/A
OXIDASA	-	-	-	-	-
TSI:Superficie inclinada	A	K	A	A	R
TSI Fondo	A	A	A	A	A
Gas	-	-	+	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
CIT	+	+	-	-	-
Gram	-	-	-	-	-

K= Alcalino. A= Ácido. + Crecimiento positivo. – Crecimiento negativo

## 7.5 Conservación

Después de obtenida la información tablas 18 y 19. En donde se identificaron las diferentes cepas de los microorganismos que se hallaron en los lodos

Se volvieron a purificar y a cosechar en el Agar Soya Trypticaseina de los diferentes microorganismos, se colocaron en viales con nutrientes como sugiere en el punto 6.6.2.

## 7.6 Discusión de Resultados

Durante el desarrollo de esta investigación se presentaron varias situaciones que es necesario resaltar:

7.6.1. Las bacterias obtenidas originalmente que se presumía trabajar eran de 2 tipos; los Bacilos Gram Negativos No Fermentadores anaerobios facultativos y los anaerobios estrictos.

En el proceso se encontró que no era posible realizar los anaerobios estrictos, ya que no se contó con la tecnología adecuada, es decir, medios de cultivo, jarras anaerobias y control ambiental para que ellas puedan desarrollarse, con ello el punto principal que era detectar con estas muestras son las bacterias que se presumen importantes (*Shewanella* y *Geobacter*) para las Celdas Microbianas en la producción de electricidad.

7.6.2. El desarrollo de una metodología adecuada fue la importante ya que nos permitió no divagar entre tanto medio de cultivo y por lo tanto en la identificación de colonias importantes en tan poco tiempo.

Fue de vital importante el solo darle seguimiento a un determinado número colonias de bacterias, ya que morfológicamente eran muy idénticas y fue muy interesante descubrir que se identificaron a un número de importante y todas serán probadas en diferentes procesos.

7.6.3. Se adquirieron cepas de referencia en el CINVESTAV del estado de México, con ellas se probaron primero los diferentes medios de cultivo de trabajo, por lo que el aislamiento e identificación de bioquímicas fue comparativo para algunas cepas.

Estos microorganismos son *Pseudomonas putida*, la *Pseudomonas stutzeri*, y la *Escherichia coli*.

A continuación se presentan los resultados visuales y de control para sustentar la investigación desarrollada.



Figura 7.8. Los medios de cultivo en las cepas de referencia.



Figura 7.9. Identificación Bioquímica, con cepas de referencia.

## 8. CONCLUSIONES

Se descarta el método anaerobios estrictos, porque no se obtuvieron los medios de cultivo, instrumentos e instalaciones para realizar la metodología.

Se cumplió ampliamente el objetivo principal al identificar, aislar y purificar a los diferentes microorganismos encontrados en la muestra que fueran Gram Negativo No Fermentadores, sin embargo fue muy limitado ya que solo se logro identificar a microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*.

Dentro de los microorganismos que se lograron de la familia *Enterobacteriaceae*, es importante destacar que se identificaron ampliamente a géneros: *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae* e incluso en algunos se logro identificar las especies como *Pseudomonas aureginosa* *Pseudomonas mallei* y *Proteus vulgaris*.

Se aplicaron diferentes medios de cultivos desde preenriquecimiento, nutritivos, selectivos y se termino con las bioquímicas, que aunque es una metodología que esta por quedarse atrás y dar paso a la identificación por medio de otra tecnología, es sin duda la pionera y la más utilizada.

Los microorganismos encontrados por los métodos tradicionales, son la conclusión de este trabajo de tesis, los que posteriormente serán entregados al Centro de Investigación CIDETEQ para que ellos determinen si procede realizar los algunos proyectos o investigación adicional que requiera según su perspectiva de material biológico identificado.

## 9. BIBLIOGRAFIA

### Artículos de investigación

- 1.- Falcon, A, Lozano JE, Juarez K, 2009, "Bioelectricidad", *Biotecnología*, Vol 13,
- 2.- Esteve-Núñez, A, 2008, "Bacterias productoras de electricidad", *Laboratorio de Ecología Molecular Centro de Astrobiología*, Madrid.
- 3.- Hong Liu, Shaoan Cheng. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as function of ionic strength, temperature and reactor configuration. 2005.
- 4.- Jorgensen, J, 2009, "Proceso • Diseño • Suministro de energía para el Medio Ambiente", *Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Aarhus*.
- 5.- Korneel Rabaey, Boon Nico. Bacteria Produce and use redox mediators for electron transfer in microbial fuel cells. Ghent University. 2004.
- 6- Liu H, Logan B. E. (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Env. Sci. Technol.* 38: 4040-4046.
- 7.- Logan B.E. (2008). *Microbial fuel cell*. 1st Edition. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- 8.- Lovley DR. Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early earth. *Nature* 1998;395: 65–70.
- 9.- Ortega, O. Ciencia. De las redes eléctricas de las bacterias. Q. Diario. 2010.
- 10.- Pistonesi, C, Haure JL, 2010, "Energía a partir de las aguas residuales", *Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional*, Argentina.
- 11.- Signorin, M, 2006, "Evaluación de riesgos de los mataderos y rastros municipales", México. D.F.

### 9.2. Capítulos de libros.

- 1.-Alzate-Gaviria L, Sebastian P, Pérez-Hernández A (2007) Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal

- solid waste and synthetic wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy* 32: 3141-3146
- 2.- Bu`locl Jonh, Kristiansen Bjorn. *Biología básica*. Edt. Acribia. Zaragoza, España.
  - 3.- Cheng S., Liu H., Logan B. E. *Electrochem Commun.* 8, 489 (2006).
  - 4.-Deublein, D, Steinhauer A. 2008, "Biogas from waste and renewable resources and Introduction", Edt. Wiley-Vch.
  - 5.-Fernández, EE, 2000, "Microbiología e Inocuidad de los alimentos", *UAQ*.  
Gallardo, R, 1993, "Mantenimiento y preservación de cepas microbianas", *SSA*, México. D.F
  - 6.- Gerardi, MH, 2003, "The microbiology of anaerobic digesters". *Wiley-interscience*, Canada.
  - 7.- Gerardi, MH, 2006, "Wastewater Bacteria", *Wiley-interscience*, Canadá.
  - 8.- Granados, RI, Villaverde MC, 2003, *Microbiología*, 2da ed, México, D.F.
  - 9.- Horton, R, Moran, LA, 1995, "Bioquímica", *Pearson Educación*, México
  - 10.- Jorgensen, J, 2009, "Proceso • Diseño • Suministro de energía para el Medio Ambiente", *Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Aarhus*.
  - 11.- Korneel Rabaey, Boon Nico. *Bacteria Produce and use redox mediators for electron transfer in microbial fuel cells*. Ghent University. 2004.
  - 12.- Logan B.E. (2008). *Microbial fuel cell*. 1st Edition. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
  - 13.- Lokshina, LY, Vavilin, VA, Salminen, E, Rintala, J, 2003, "Modeling of anaerobic degradation of solid slaughter house waste", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 109, pp 15-32.
  - 14.- MacFaddin, JF, 2003, "Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica", Madrid, España.
  - 15.- Madigan, TM, Pearson JM, 2004, "Biología de los microorganismos", *Prentice Hall*. 10ª Edición. 2004.
  - 16.- Schdegel H, 1997, *Microbiología General*, Barcelona.
  - 17.- Signorin, M, 2006, "Evaluación de riesgos de los mataderos y rastros municipales", México. D.F.
  - 18.- Yousef, Ahmed. *Food Microbiology; A Laboratory manual*. Limusa. 2006

## 10. ANEXOS

Tabla 20. Aplicaciones del medios SIM

Bacterias	Producción de H <sub>2</sub> S	Producción de indol	Movilidad
<i>Salmonella typhi</i>	+ 0 -	-	+
<i>Salmonella</i>	+ 0 -	-	+
<i>E. Coli</i>	-	+	+ 0 -
<i>Klebsiella</i>	-	+ 0 -	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+	-	+
<i>Shigella</i>	-	+ 0 -	+ 0 -

Tabla 21. Aplicaciones del medio LIA

Especie bacteriana	Superficie inclinada	Fondo	Gas	H <sub>2</sub> S
<i>Enterobacter</i>	A	K	++	-
<i>Hafnia</i>	K	A	+	-
<i>Klebsiella</i>	A	A	++	-
<i>E. coli</i>	A	A	+	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	K	A	-	+
<i>S. paratyphi</i>	K	A	+	-
<i>S. Choleraesuis</i>	K	A	+	-
<i>Otras salmonellas</i>	K	A	+	+++
<i>Citrobacter</i>	K	A	+	+++
<i>Edwardsiella</i>	K	A	+	+++
<i>Serratia</i>	K	A	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	K	A	+	+++
<i>P. mirabilis</i>	K	A	+	+++
<i>P. morgani</i>	K	A	-	-
<i>P. rettgeri</i>	K	A	-	-
<i>Providencia</i>	K	A	+ 0 -	-

Tabla 22. Aplicaciones para TSI

<b>Especie bacteriana</b>	<b>Superficie inclinada</b>	<b>Fondo</b>	<b>Gas</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>
<i>E. Coli</i>	K	K o N	- o +	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	K	K	-	+ o -
<i>S. paratyphi</i>	K	A	+ o -	- o +
<i>Otras salmonellas</i>	K	K o N	-	+
<i>Arizona</i>	K	K o N	-	+
<i>Citrobacter</i>	K	A	- o +	+ o -
<i>Edwarsiella</i>	K	K	- o +	+
<i>Klebsiella</i>	K	K o N	+ o -	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	K	A	+ o -	-
<i>E. aerogenes</i>	K	K o N	+	-
<i>E. hafniac</i>	K	K o N	- o +	-
<i>Proteus vulgaris</i>	R	A	-	-
<i>P. mirabilis</i>	R	A	-	-
<i>P. morgarnii</i>	K o R	A	-	-
<i>P. rettgeri</i>	R	A	-	-
<i>Providencia</i>	R	A	-	-

Tabla 23. Aplicaciones de la Prueba Bioquímica MIO

<b>Bacterias</b>	<b>Producción de indol</b>	<b>Movilidad</b>	<b>Producción de H<sub>2</sub>S</b>
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+ o -
<i>Otras salmonellas</i>	-	+	+ o -
<i>E. coli</i>	+	+ o -	-
<i>Klebsiella</i>	+ o -	-	-
<i>Enterobacter</i>	-	+	-
<i>Citrobacter</i>	-	+	+
<i>Shigella</i>	+ o -	+ o -	-

