

**Aislamiento e identificación de microorganismos lignocelulósicos a partir de  
suelos de cultivo de caña de Finca Balsora y Judea y compost del Ingenio  
Mayagüez**

**Daniela Ruiz Silva**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
2017**

**Aislamiento e identificación de microorganismos lignocelulósicos a partir  
de suelos de cultivo de caña Finca Balsora y Judea y compost del Ingenio  
Mayagüez**

**Daniela Ruiz Silva**

**Trabajo de grado para optar por el título de pregrado en Química  
Farmacéutica**

**María Francisca Villegas Torres Ph.D  
Licelly Canizales González**

**Santiago de Cali**

**2017**



APROBADO POR:

**Andrés Felipe Dávalos MSc**  
**Evaluador**

**María Francisca Villegas Ph.D**  
**Tutor del proyecto**

**Licelly Canizales**  
**Co-Tutor del proyecto**

**Santiago de Cali, 6, Diciembre 2017**

## **Agradecimientos**

Gracias a Dios por concederme el don de la vida, por sostenerme en su amor y alentarme en silencio.

Gracias a mi Mamá y mi Papá por su apoyo, su esfuerzo, su ternura y su comprensión.

Gracias a cada miembro de mi familia por su compañía, sus oraciones y sus palabras de aliento.

Gracias a la Doctora María Francisca Villegas Torres por su paciencia, su orientación y su experiencia en este proceso investigativo.

Gracias a la Bióloga Licelly Canizales González por su mansedumbre, su constante compañía y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Gracias a cada una de las personas que de una u otra manera hicieron posible esta investigación.

A mis compañeros y Amigos: por su aguante.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	3
LISTA DE FIGURAS .....	4
LISTA DE ANEXOS .....	5
RESUMEN DEL PROYECTO .....	6
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	9
2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia .....	9
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	10
2.2.1 Residuos lignocelulósicos .....	10
2.2.2 Material Lignocelulósico .....	10
2.2.2.1 Celulosa .....	10
2.2.2.2 Hemicelulosa .....	11
2.2.2.3 Lignina .....	12
2.2.2 Proceso biológico de la degradación y los microorganismos involucrados .....	13
2.2.4 Identificación de Microorganismos degradadores de material lignocelulósico .....	15
2.3 OBJETIVOS .....	17
2.3.1 Objetivo General .....	17
2.3.2. Objetivos Específicos .....	17
2.4 METODOLOGÍA .....	18
2.4.1 Recolección de Muestras .....	18
2.4.2 Elección del Medio de cultivo para aislamiento de microorganismos lignocelulósicos .....	18
2.4.3 Aislamiento de microorganismos lignocelulósicos .....	18
2.4.4 Aislamiento Primario .....	19
2.4.5 Aislamiento secundario .....	19
2.4.6 Caracterización morfológica de Hongos y de cepas bacterianas .....	19
2.4.7 Caracterización fenotípica de cepas bacterianas .....	19
2.4.9 Estandarización de protocolo de PCR para amplificación del gen 16SADNr .....	20
2.4.10 Identificación molecular de cepas lignocelulósicas mediante Secuenciación ADNr 16S .....	20
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
2.5.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS .....	21
2.5.2 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE DEGRADADORES DE CELULOSA .....	23
2.5.2.1 Estandarización de condiciones de PCR para amplificación del gen 16s 24 .....	24
2.5.2.2 Identificación taxonómica mediante secuenciación del gen 16S .....	26
CONCLUSIONES .....	33
RECOMENDACIONES .....	34

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....35  
ANEXOS 1 .....38

## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1:** Microorganismos degradadores de Celulosa.

**Tabla 2:** Composición del medios M9.

**Tabla 3:** Recuento de Cepas bacterianas.

**Tabla 4:** Caracterización Macro y Microscópicas de las cepas Aisladas.

**Tabla 5:** Identificación bioquímica y secuenciación ADNr 16S.

**Tabla 6:** Recuento de Cepas de Hongo.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Estructura molecular Celulosa.

**Figura 2** Estructura molecular de la hemicelulosa.

**Figura 3** Estructura molecular de la lignina.

**Figura 4** Árbol de la vida de microorganismos degradadores de lignocelulosa o celulosa.

**Figura 5** Esquema de mecanismo microbiano que degraden material lignocelulósico

**Figura 6:** Diagrama circular de Recuento de bacterias.

**Figura 7:** PCR gradiente.

**Figura 8:** PCR de colonia.

**Figura 9:** PCR de colonia.

**Figura 10:** Aislamiento secundario de bacterias.

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 1:** Fichas Técnicas de los microorganismos potencialmente degradadores de celulosa

**Anexo 2:** Secuenciación ADNr 16S.

## RESUMEN DEL PROYECTO:

El material lignocelulósico constituye una de las fuentes renovables abundantes y ricas en celulosa, hemicelulosa y lignina; éstos son utilizados para la producción de resinas, la elaboración de xilosa, oligosacáridos, etanol celulósico, carbón activado, entre otros productos de alto valor agregado. El material lignocelulósico es de gran interés puesto que tiene un bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, pese a esto, uno de los principales inconvenientes para su utilización es la falta de tecnologías eficientes y de bajo costo para degradar su fracción recalcitrante. Debido a la ineficiencia de las estrategias para la disposición y aprovechamiento de este tipo de material, se requiere la búsqueda de alternativas más eficientes para el mejoramiento de los procesos de pretratado (físicoquímicos o biológicos) de la lignocelulosa. Aunque existen métodos físicoquímicos los cuales permiten el uso del material lignocelulósico como materia prima para la producción de biocombustibles, una de las alternativas prometedoras es el uso de métodos biológicos que permitan el uso de organismos celulolíticos para la obtención de azúcares fermentables (Lynd et al., 2002).

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar microorganismos lignocelulósicos a partir de suelos de caña obtenidos de la finca Balsora y Judea, así como del compost adquirido del ingenio Mayagüez. El muestreo se realizó por triplicado de tres fuentes ubicadas en Cali-Colombia las cuales ofrecían características ambientales para su desarrollo. El procedimiento incluyó la toma de muestra, el aislamiento en el medio selectivo e identificación por características microscópicas como coloración de Gram para bacterias, así como secuenciación ADN<sub>r</sub>16S para estas mismas.

En el estudio, se lograron identificar 7 especies bacterianas entre las que se encuentran *Pseudomonas nitroreducens*, *Dyadobacter fermentans*, *Chitinophaga cymbidii*, *Shinella sp*, *Paraccocus sp*, *Pseudomonas sp* y *Rhizobium sp*. Como conclusión son cepas que posiblemente degraden celulosa debido a su uso de celulosa como fuente de carbono para el aislamiento.

**Palabras claves:** Aislamiento, identificación, material lignocelulósico, caña de azúcar, suelos de caña de azúcar.

## ABSTRACT

The lignocellulosic material is one of the renewable sources abundant and rich in cellulose, hemicellulose, and lignin; these are used for the production of resins, the elaboration of xylose, oligosaccharides, cellulosic ethanol, activated charcoal, among other products of high added value. The lignocellulosic material has a high attractive since it has a low cost and high availability in various climates and locations, in spite of this, one of the main drawbacks to their use it is the lack of efficient technologies, low-cost way to degrade their recalcitrant fraction. Due to the inefficiency of the strategies for the provision and use of this type of material, it requires the search for more efficient alternatives for the improvement of the processes of pretreatment (physico-chemical or biological) of the lignocellulose. Although, there are physical and chemical methods which allow the use of lignocellulosic material as raw material for the production of biofuels, one of the promising alternatives is the use of biological methods which enable the use of celulolíticos agents to obtain fermentable sugars (Mcintosh et al., 2002).

The present work had as objective to isolate and identify organisms lignocellulosic from sugarcane soils obtained from the farm stutterheim and Judea, as well as compost purchased from the Mayagüez. The sampling was carried out in triplicate from three sources located in Cali-Colombia which offered environmental characteristics for their development. The procedure included the portion of the sample, the insulation in the selective medium and identification by microscopic features as Gram staining for bacteria, as well as sequencing rDNA16S for these same.

In the study, it was possible to identify 7 bacterial species including *Pseudomonas Nitroreducens*, *Cymbidii Dyadobacter Fermentans*, *Chitinophaga Paraccocus Shinella*, *sp, ps, Pseudomonas and Rhizobium*. In conclusion there are strains that may degrade cellulose due to its use of cellulose as a carbon source for insulation.

**Keywords:** Isolation, identification, lignocellulosic material

## 1. INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, al año la agroindustria genera 200,000 millones de toneladas en el mundo. (Ragauskas et al., 2006) Para analizar esta problemática es necesario mencionar algunas de sus causas, uno de ellas es que la alta producción provoca un impacto negativo al medio ambiente debido a la liberación de gases de efecto invernadero. Esto se da, porque los residuos lignocelulósicos quedan en el suelo y realizan una degradación *In situ*.

La composición estructural de la pared celular de los tejidos vegetales de la lignocelulosa consiste en 3 polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se encuentran asociados formando una matriz sólida que dependiendo de las proporciones de cada polímero le confiere al material propiedades especiales de dureza, flexibilidad y rigidez (Cardona, 2009). Esta característica se presenta como un problema debido a que hace más lenta la degradación principalmente porque presentan un alto grado de resistencia al ataque microbiano (Moore, 2001), y si a eso se le suma un alto volumen de estos residuos lignocelulósicos se genera un problema de alto impacto ambiental, ya que dificulta su manejo, causando pérdida de espacio paisajístico así como la generación de plagas. Una alternativa para disminuir el impacto causado por estos residuos que en el Valle del Cauca provienen principalmente de la industria azucarera: es aislar e identificar microorganismos que cuenten con la maquinaria enzimática para acelerar la degradación de estos residuos y así disminuir el impacto paisajístico.

De esta manera se proporciona un importante recurso para contribuir a mitigar la contaminación ambiental causada principalmente por estos residuos.

## **2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO:**

### **2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:**

En la actualidad la producción de toneladas de estos residuos lignocelulósicos se han convertido en un problema medioambiental, debido a su compleja estructura de degradación. Estos residuos están compuestos por celulosa, lignina y hemicelulosa los cuales forman una barrera física y bioquímica impidiendo la mayoría de los procesos de conversión de biomasa a bioenergía además la degradación *in situ* de los residuos lignocelulósicos en el ambiente genera liberación de gases de efecto invernadero contribuyendo al aumento de los problemas actuales de cambio climático. Estos residuos juegan un papel muy importante debido a la enorme disponibilidad y a las diferentes fuentes agroindustriales que lo generan, pueden ser aprovechados en diversos procesos que demanden una utilidad económica e industrial; por ejemplo, obtención de biocombustibles de segunda generación, diferentes usos en la industria del papel, textilera, alimenticia entre otras. Pese al gran potencial que tiene el uso de este tipo de desechos naturales, para su aprovechamiento es necesario aislar microorganismos lignocelulósicos nativos que permitan implementar estrategias de hidrólisis más efectivas y de esa manera facilitar su disposición y aprovechamiento. En el presente proyecto se pretende aislar e identificar microorganismos capaces de degradar material lignocelulósico con la finalidad de generar una colección microbiana como punto de partida para posteriores estudios moleculares y de aplicación a nivel industrial.

## **2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE:**

### **2.2.1 Residuos lignocelulósicos**

Actualmente los residuos lignocelulósicos representan 5 millones de toneladas por año, equivalentes a 23,1 ton/ha, y constituyen el 25% del peso de la caña, incluyendo hojas verdes (13,3%), hojas secas (64,2%), cogollos (7,5%) y caña remanente (15%). Estos residuos considerados como biomasa, se dejan sobre el suelo como material de abono y en su mayoría se queman incrementando la contaminación ambiental con diseminación de cenizas, humos y gases tóxicos (Rodríguez, 2009). Esta biomasa, que dependiendo de la variedad, posee un estimado promedio en peso de 42% de celulosa, 26% de hemicelulosa y 22% de lignina en base seca (Gómez, 2007) apta para obtener azúcares fermentables, genera una alternativa para obtener etanol deshidratado (anhidro) como combustible, a partir de estos residuos. Así, al usar alcohol carburante, se puede disminuir el consumo de combustibles fósiles e impactos ambientales reduciendo en un 74% la emisión de gases de efecto invernadero.

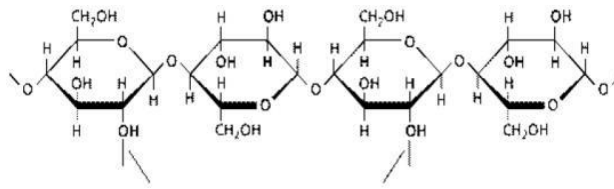
De igual modo, utilizando los subproductos del azúcar -Bagazo, Cachaza, Melaza- se puede también obtener oligosacáridos como materia prima que a escala de laboratorio puede generar dextrano de grado técnico para su uso como espesante en la industrialización de alimentos y en el área de procesamiento de aguas residuales como floculante. (RODRÍGUEZ y HANSEN, 2007).

### **2.2.2 Material Lignocelulósico**

#### **2.2.2.1 Celulosa**

La celulosa (**Figura 1**) consiste en cadenas lineales de celobiosa (D-glucopiranosil- $\beta$ -1,4-D-glucopiranososa) de aproximadamente 10.000 unidades glucosídicas. En la célula vegetal gran parte de la celulosa está presente como microfibrillas empaquetadas muy densamente y dispuestas en haces paralelos, las cuales rodean a la célula, y frecuentemente están formando capas cruzadas. Estas fibrillas se hallan aglutinadas por una matriz de otros tres materiales poliméricos: hemicelulosa, pectina y extensina. (Lehninger 1987).

Debido a la estructura de la celulosa, su degradación representa un desafío para los sistemas de celulasas, razón por la cual estos sistemas poseen una estructura modular, que incluye un módulo de unión a carbohidrato y un módulo catalítico, permitiéndole unirse a la superficie de la celulosa, lo que se presume facilita la hidrólisis de este compuesto al acercar el dominio catalítico a la celulosa insoluble (Lynd et al.,2002).

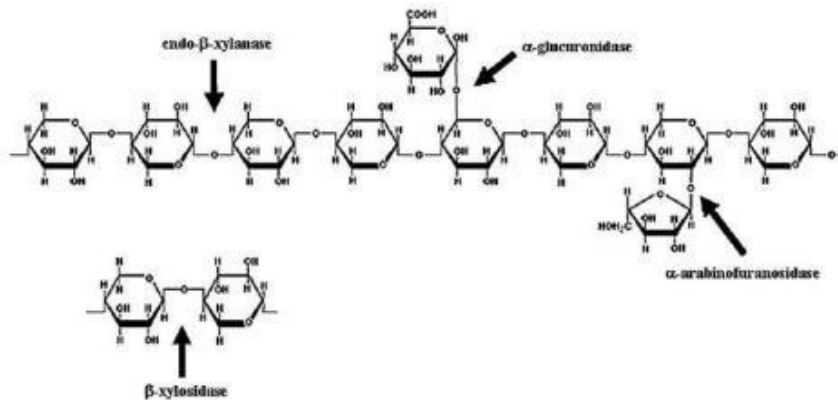


**Figura 1.** Estructura molecular de la celulosa

### 2.2.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (**Figura 2**) (Pérez, et al., 2002).

Son polisacáridos con grupos heterogéneos. Tienen un grado de polimerización entre 100 y 200 en fibras madereras. Son insolubles en agua, pero en medio alcalino se disuelven. La función principal de la hemicelulosa es proporcionar rigidez a la pared celular interactuando con las microfibrillas de celulosa y lignina mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando & Waliszewski, 2005; Béguin & Aubert, 1994).

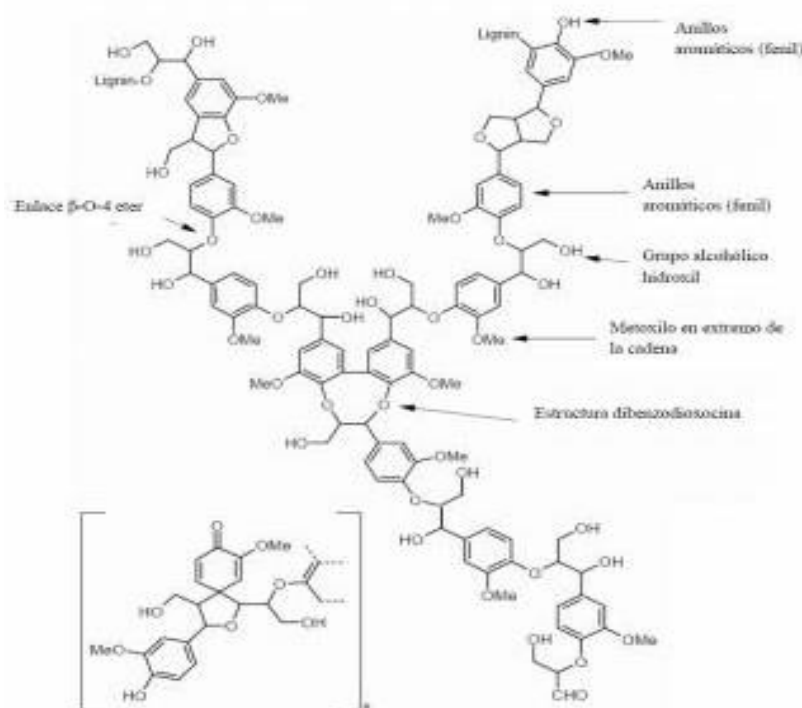


**Figura 2.** Estructura molecular de la Hemicelulosa

### 2.2.2.3 Lignina

La lignina es un compuesto difícil de degradar debido a la recalcitrancia química y a la baja porosidad, cualidades que le permiten cubrir la hemicelulosa y celulosa de la pared celular de las plantas vasculares. La lignina es un polímero natural amorfo que actúa como agente aglutinante entre los componentes del vegetal y está constituido por unidades del tipo p-hidroxifenil propano. Por ejemplo, Las maderas suaves o gimnospermas están constituidas fundamentalmente por unidades guayacílica (G), mientras que las maderas duras (angiospermas dicotiledóneas) por unidades guayacílica (G) y siringílica (S) y las plantas anuales (angiospermas monocotiledóneas) tienen los tres precursores: guayacílica (G), siringílica (S) y p-hidroxibencílica (H) (Sabatier, 1992). La lignina es el segundo constituyente en peso (15-30%) y en importancia del reino vegetal (Sabatier, 1992, Mäkelä et al, 2002).

La lignina químicamente es heterogénea y tiene una estructura muy compleja (**Figura 3**). Los monómeros son todos derivados del fenilpropano y su complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. Las diferencias en la composición de las ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi; por ejemplo: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto y 14% en gramíneas (Olvera, 2003).

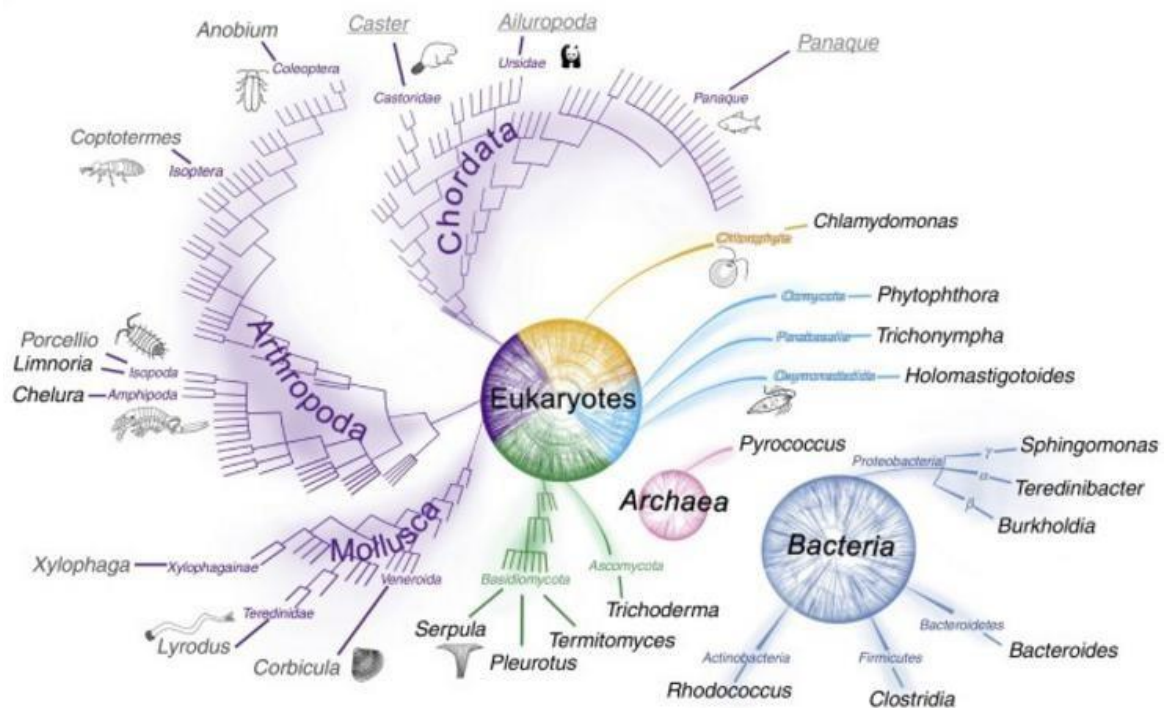


**Figura 3.** Estructura de lignina (Bommarius & Riebel, 2004)

Como se mencionó anteriormente éste es un material de difícil degradación, debido a sus componentes; sin embargo, se han reportado microorganismos capaces de degradar por diferentes mecanismos. En uno de los estudios realizados se evaluaron microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad santa clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (*Ricinus communis*).

### 2.2.2 Proceso biológico de la degradación y los microorganismos involucrados

La distribución dispersa y localizada de microorganismos capaces de degradar lignocelulosa o celulosa se muestran en el Árbol de la Vida **figura 4**. En la **Tabla 1** que se encuentra en los anexos se muestra una lista de bacterias que, según se informa, crecen en celulosa cristalina como fuente de carbono y la degradan sustancialmente. Se indica el material o el hábitat para el aislamiento y la posición filogenética, así como la disponibilidad de la secuencia genómica indicando con el número de acceso de NCBI, y N = ninguno disponible.

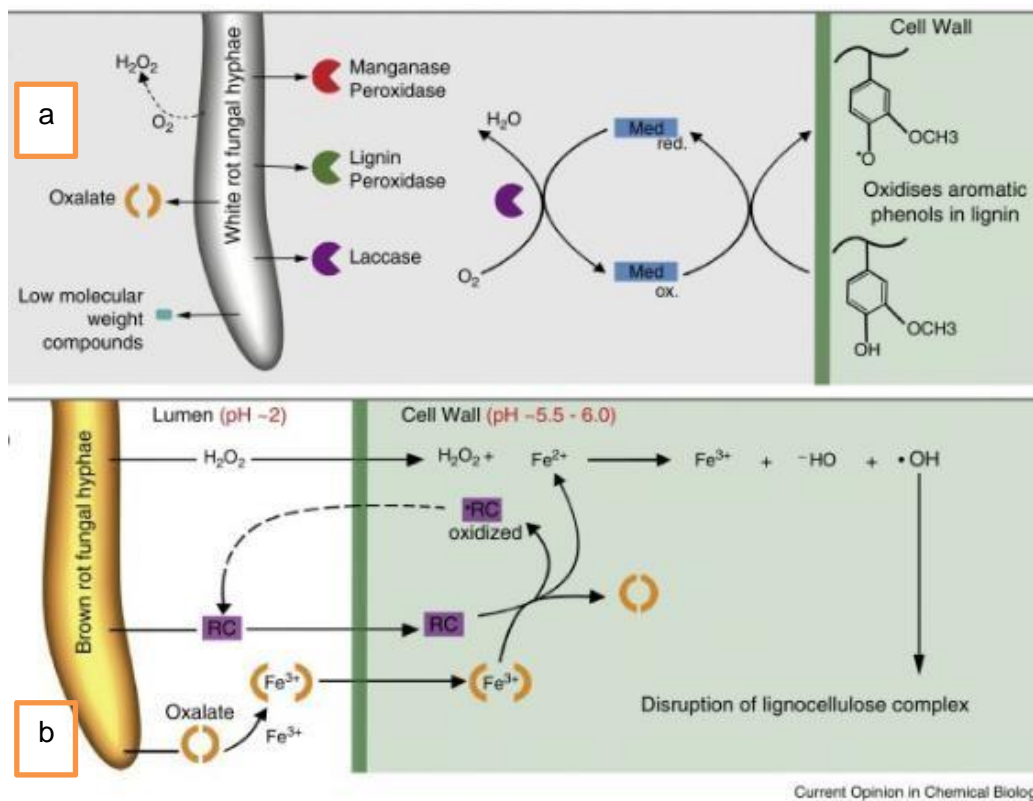


**Figura 4.** Árbol de la vida de microorganismos degradadores de lignocelulosa o celulosa

Entre los microorganismos que son capaces de degradar material lignocelulósicos se encuentra un número de bacterias del suelo que son capaces de oxidar la lignina mediante un sistema enzimático de peroxidasas y/o lacasas que generan especies de radicales oxidantes que catalizan la oxidación de lignocelulosa. La lignina peroxidasa oxida restos aromáticos no fenólicos mientras manganeso peroxidasa y lacasas oxidan subunidades fenólicas. La lacasa puede actuar sobre subunidades no fenólicas de la lignina mediante la inclusión de un mediador (Med). La mayoría de estos microorganismos han sido reportados en el Filum *Actinobacteria* y en las clases  $\alpha$  y  $\gamma$  *Proteobacteria* los cuales se encuentran en el intestino de las termitas e insectos que mediante una acción mutualista puede digerir la madera. La degradación de la lignina es un paso clave para el reciclamiento de carbono en los ecosistemas terrestres, donde los basidiomicetos conocidos comúnmente como hongos de podredumbre blanca degradan los polímeros de la madera facilitando el uso de la celulosa por poblaciones microbianas. Lo mencionado anteriormente que es mecanismo microbiano de degradación se presenta en la **figura 5, parte a.** (Ahmad M, 2010)

Los microorganismos aerobios producen celulasas con diferentes especificidades y modos de acción, actuando en sinergia para llevar a cabo el proceso de hidrólisis de la celulosa (Henrissat, 1991). Hay tres tipos de celulasas ampliamente conocidas entre las que se encuentran: las endoglucanasas (EGs), que cortan ocasionalmente en regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, esto causa la disminución en el largo de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores; las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs), actúan sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa y por último, las  $\beta$ -glucosidasas que hidroliza la celobiosa y las celodextrinas para liberar dos moléculas de glucosa (Lynd et al., 2002).

Por otra parte, algunos ejemplos de microorganismos con sistemas de celulasas, xilanasas y peroxidasas bien identificados son las siguientes cepas mesofílicas: *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporium*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium echinulatum*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger* y *A.fumigatus*; el género *Aspergillus* tiene características que hacen que sea ideal para aplicaciones industriales tales como alta capacidad de fermentación y alto nivel de secreción de proteínas (DeVries y Visser, 2001)



Current Opinion in Chemical Biology

**Figura 5.** Esquemas de mecanismos microbianos de la degradación de la lignocelulosa. **b)** La alteración del complejo lignocelulosa por hongos de pudrición marrón utilizando el sistema de Fenton quelante mediada (CMF). Hifas de los hongos en el lumen de las células vegetales producen compuestos de hierro de reducción (RC), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y ácido oxálico. El ácido oxálico se une a  $Fe^{3+}$  como un complejo que se difunde en la pared celular junto con peróxido de hidrógeno y RC. Con el cambio de pH, RC secuestra  $Fe^{3+}$  desde el complejo de  $Fe$ -oxalato y lo reduce a  $Fe^{2+}$ .  $Fe^{2+}$  reacciona entonces con  $H_2O_2$  (reacción de Fenton) y produce radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ), que interrumpen la lignocelulosa. (Simon M Cragg 1, 2015)

## 2.2.4 Identificación de Microorganismos degradadores de material lignocelulósico

Los procedimientos microscópicos que utilizan tinciones estándar y/o anticuerpos fluorescentes para detectar microorganismos específicos se consideran métodos rápidos y se utilizan para la diferenciación inicial o la identificación presuntiva de ciertos grupos de microorganismos. Uno de los métodos de coloración utilizados es la tinción de Gram que es de gran importancia en Microbiología, ya que permite hacer diferenciaciones taxonómicas, separando dos grandes grupos de bacterias (gram-positivas, de color violeta azulado, y Gram-negativas, de color granate o rojo-rosado), según se comporten ante esta tinción. (López-Hontangas) Pero, para poder decir a qué género y/o especie pertenece es necesario utilizar otros medios de identificación, entre ellos se encuentra:

La secuenciación y comparación del gen 16S rDNA en especies bacterianas esta ha surgido como una estrategia para la identificación genética de microorganismos debido a que este gen puede identificar mejor cepas mal descritas, raramente aisladas o fenotípicamente aberrantes, puede usarse rutinariamente para la identificación de micobacterias, también puede realizar el reconocimiento de nuevos patógenos y bacterias no cultivadas. (Ill, 2004). La identificación por medio del gen 16S ha permitido reportar alrededor de 2500 diferentes especies bacterianas nuevas (Olsen et al., 1991). Estos genes son similares en longitud (aproximadamente 1,5 kb) a lo largo de todo el reino bacteriano y contiene regiones muy conservadas, así como otros que varían según la especie y la familia; también son generados productos de ARN con una estructura secundaria similar (Neefs et al., 1990; Woese, 1987). Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo intraespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas. El ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación.

Por otra parte, para la identificación taxonómica de hongos se utiliza la secuencia de las regiones ITS (Internal Target Spacer). Utilizando cebadores que hibridan en las zonas conservadas se puede amplificar por PCR la región que incluye ITS1, el gen del ARN 5,8S e ITS2 y mediante la comparación de la secuencia obtenida con las bases de datos disponibles se le puede asignar la especie o al menos el género.

## **2.3 OBJETIVOS:**

### **2.3.1 Objetivo General**

Aislar e Identificar microorganismos lignocelulósicos a partir de suelos de cultivo de caña de la finca Balsora y Judea; y compost del Ingenio Mayagüez.

### **2.3.2. Objetivos Específicos**

- Estandarizar la técnica de PCR para la identificación de aislamientos de microorganismos lignocelulósicos a partir de cultivo microbiano.
- Identificar microorganismos cultivados mediante secuenciación ARNr 16S.

## 2.4 METODOLOGÍA

### 2.4.1 Recolección de Muestras

Para el aislamiento e identificación de microorganismos lignocelulósicos fueron recolectadas muestras de suelos de fincas especializadas en el sembrado de caña: Finca Balsora y finca Judea; a su vez se recolectó una muestra de compost proveniente del ingenio Mayagüez. Se colocaron en bolsas plásticas debidamente marcadas y selladas. Fueron almacenadas a una temperatura de 35°C. No se utilizó cadena de frío.

### 2.4.2 Elección del Medio de cultivo para aislamiento de microorganismos lignocelulósicos.

El medio M9 fue elegido porque contiene elementos esenciales para el crecimiento de los microorganismos. Además tiene una fuente de carbono que también permite seleccionar microorganismos que utilizan esa fuente. Tiene 2 sales; Fosfato de potasio y fosfato de sodio, que están presentes como agentes tampones. El cloruro de amonio proporciona la fuente de nitrógeno para las células. El cloruro de sodio genera los iones esenciales y apoya osmóticamente. Como fuente de carbono se empleó celulosa o RAC, para seleccionar aquellos microorganismos que hidrolicen la celulosa y/o lignocelulosa para su asimilación metabólica.

**Tabla 2.** Composición del Medio M9

Composición	Cantidad para 1L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3g
NH <sub>4</sub> CL	1g
NaCl	0,5g
CaCl <sub>2</sub>	0,003g
Celulosa o RAC	1g

Fuente: (HOS.UFL, 2017)

### 2.4.3 Aislamiento de microorganismos lignocelulósicos

Fueron pesados 5g de cada uno de las muestras de suelo y posteriormente fueron depositadas en frascos Erlenmeyer los cuales contenían el medio de cultivo líquido

necesario para la recuperación de las especies microbianas. Las seis muestras se rotularon como Judea + celulosa, Guido+celulosa, compost+celulosa, Judea+RAC, Guido+RAC, compost+RAC. Después se pesó 1g de Celulosa para cada uno de las tres muestras, y lo mismo se hizo para los que tienen RAC. Consecutivamente, se adicionó a cada muestra 100mL del medio M9, se dejó en agitación y sin temperatura durante una semana.

#### **2.4.4 Aislamiento Primario**

Se realizaron las diluciones respectivas, de mayor a menor concentración, comenzando con el stock que tiene una concentración  $10^{-1}$ , seguidamente  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . El stock se realizó de la siguiente forma: se adicionó 900µl de agua peptonada y 100 µl de la muestra. Para realizar las diluciones se tomó 100 µl del stock y se adicionó a 900 µl de agua peptonada; de este primer paso se obtuvo la dilución de concentración  $10^{-2}$ , después se tomó 100 µl de la dilución  $10^{-2}$  y se le adicionó 900 µl de agua peptonada para obtener la dilución con una concentración de  $10^{-3}$ , y así seguidamente para las otras diluciones. Cada dilución se hizo por triplicado para obtener un total de 76 diluciones. Posteriormente, se realizó la siembra de estas muestras en cajas Petri que contenían agar +M9, las cuales se dejaron incubando durante 8 días a 35°C. Se estableció estas condiciones apoyados en la literatura, ya que los microorganismos que se esperan obtener son hongos y bacterias, aerobios, mesófilos. Cuyo crecimiento óptimo es entre 30°C y 40°C. Además se tuvo en cuenta las fuentes donde provienen que son los suelos de caña de azúcar los cuales tienen un rango óptimo de temperatura que es de 14 a 35°C.

#### **2.4.5 Aislamiento secundario**

De los microorganismos recuperados en el primer aislamiento se realizaron repiques de las colonias presentes en placas Petri con medios de cultivo M9 y en agar, las cuales se dejaron incubando 8 días a 35°C, después de ese tiempo, se refrigeró a 4°C.

#### **2.4.6 Caracterización morfológica de Hongos y de cepas bacterianas**

Se realizó la caracterización morfológica para bacterias y hongos con la ayuda de un estereoscopio donde se observó: homogeneidad, tamaño, forma, color, opacidad y textura.

#### **2.4.7 Caracterización fenotípica de cepas bacterianas**

Se procedió a realizar la tinción de Gram en bacterias, para ello se colocó una gota de agua destilada en el portaobjetos y con un asa de siembra se llevó una pequeña cantidad de la cepa de bacterias y se hizo el extendido. Después se fijó calentando

suavemente. Posterior a eso, se agregó sobre la preparación cristal violeta dejándolo 30 segundos, se lavó con agua destilada; luego se añadió lugol durante 30 segundos: se lavó con agua destilada. Se procedió a decolorar con etanol-cetona por 10 segundos: se lavó con agua destilada. Finalmente, se agregó safranina durante 30 segundos, se lavó; se secó y se observó al microscopio con aceite de inmersión y con el objetivo 100X. (ANTIOQUIA)

#### **2.4.9 Estandarización de protocolo de PCR para amplificación del gen 16SADNr**

La selección de los cebadores para la amplificación de distintos fragmentos del gen 16S, se basó en la búsqueda bibliográfica de estudios similares donde emplearon cebadores universales, específicos para bacterias y que amplificaran regiones hipervariables del gen (Galkiewicz & Kellogg 2008; Pedersen 2008). Para el PCR se usó el primer ribosomal correspondiente al gen 16SADNr 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT), debido a que este par de cebadores amplifica desde la región V1 a la región V9, casi la totalidad del gen, el tamaño del fragmento esperado es aproximadamente de 1500pb. Principalmente se realizó PCR gradiente para encontrar la temperatura óptima de anillamiento, se utilizó el siguiente gradiente: 63°C, 62.3°C, 61.1°C, 59.3°C, 57.0°C, 55.3°C, 54°C, 53°C. Se estandarizó por reacción (buffer de PCR 1X, dNTPs 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, primers 0,2 µM, taq ADN polimerasa recombinante 1.25U y 100 ng de ADN bacteriano). Se utilizó el termociclador y el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 92 °C por 1 min, 57 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con un marcador molecular Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder

#### **2.4.10 Identificación molecular de cepas lignocelulósicas mediante Secuenciación ADNr 16S**

Para la identificación molecular se realizó PCR de colonia, de esta se obtuvo los amplicones 16S los cuales se purificaron con un kit comercial SV Wizard. Para ello se amplificó mediante la reacción en cadena de Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos universales del gen 16S, 27F y 1492R para bacterias. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la purificación de la muestra se procedió a cortar un pedazo de la banda y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5mL. Se agregó 10 µl de la solución Binding Membrana. Se dejó incubando a 50°C – 65°C hasta que el gel estaba completamente disuelto. Para el procesamiento de amplificaciones de PCR, se agregó un equivalente de la solución Binding membrana. Luego se realizó la unión de ADN, el primer paso fue Insertar VS Minicolumna en tubo de recolección, seguidamente se transfirió y se incubó a temperatura ambiente por un minuto. Posterior, se centrifugó a 16.000 x g durante 1 minuto. Se descartó el líquido y se insertó dentro del tubo. En el cuarto paso se añadió 700 µl de solución y se

centrifugó a 16.000 x g durante 1 minuto. Se descartó y se reinsertó en una minicolumna en un tubo de recolección. Se repitió el paso 4 con 500 µl de solución de lavado de membrana. Se Centrifugó a 16.000 x g durante 5 minutos. Después se vació el tubo de recolección y se recentrifugó durante 1 minuto, se abrió la tapa para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol cuidadosamente se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio y se añadió 50 µl de agua al Nuclease-Free Minicolumna. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Durante 1 minuto y centrifugar a 16.000 x g durante 1 minuto. Finalmente se desechó Minicolumna y se almacenó el ADN en 4°C o -20°C. **Ver anexo 3** Lo obtenido del procedimiento anterior, se mandó a secuenciar al laboratorio de medicina genómica de la Universidad Icesi.

Se realizó la limpieza de la secuencia con el programa MEGA al cual se le suministró la información sobre la secuencia, por ejemplo que el tipo de secuencia que se está utilizando es nucleótidos, luego se procedió a hacer la limpieza para ello se inició eliminando los extremos en la que la identificación de base no es fiable, y luego se guardó con un nombre distinto para identificarla como la secuencia corregida. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa BLAST comparándolas contra la base de datos nt del NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Los resultados obtenidos fueron filtrados con el 80% de similitud y 80% de cobertura de la región amplificada.

## **2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.5.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS**

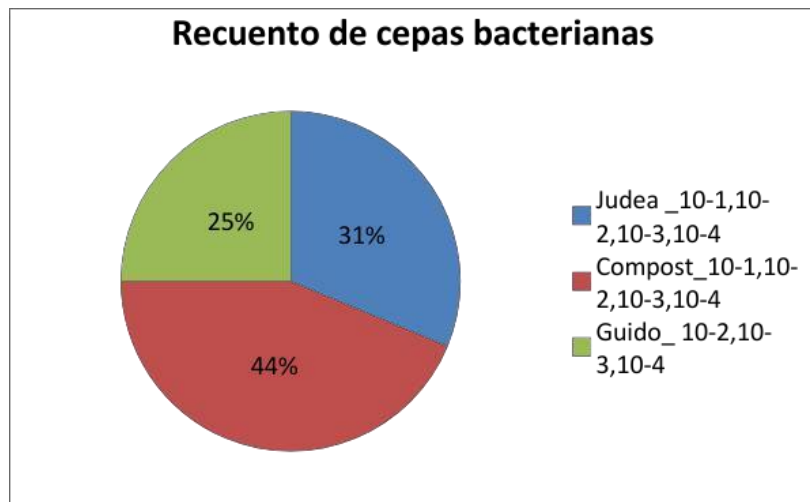
A partir de las diluciones realizadas se aislaron las colonias que pueden ser posibles degradadores de Celulosa obteniendo un total de 19 Cepas bacterianas. Se considera que son posiblemente degradadores ya que utilizan como fuente de carbono la celulosa, pero para saber si tienen actividad celulolítica es necesario realizar pruebas de revelado utilizando rojo congo a 1% (p/v) y dependiendo del diámetro del halo se ve la intensidad de la actividad de la cepas.

**La tabla 3** presenta el número de cepas de bacterias aisladas por tipo de muestra y medio de cultivo empleado. Cabe destacar que se utilizó 2 medios de cultivo celulosa y RAC, sin embargo para el segundo no se reportó crecimiento de los microorganismos.

**Tabla 3. Recuento de cepas bacterianas**

Fuente	Medio de Cultivo	Cepas Encontradas	Cepas Recuperadas <sup>1</sup>
Judea_10-1	M9+Celulosa	2	2
Judea_10-2	M9+Celulosa	2	2
Judea_10-3	M9+Celulosa	1	1
Judea_10-4	M9+Celulosa	1	0
Compost_10-1	M9+Celulosa	2	2
Compost_10-2	M9+Celulosa	1	1
compost_10-3	M9+Celulosa	5	3
compost_10-4	M9+Celulosa	1	1
Guido_10-2	M9+Celulosa	2	2
Guido_10-3	M9+Celulosa	1	1
Guido_10-4	M9+Celulosa	1	1
<b>Total</b>		<b>19</b>	<b>16</b>

**Fuente:** Autor



**Figura 6. Diagrama circular de recuento de cepas bacterianas.**

<sup>1</sup> La diferencia entre las cepas encontradas con las recuperadas, principalmente es que 3 de las 19 cepas encontradas presentaron contaminación cruzada, es decir, en la misma caja Petri donde estaba las bacterias también crecieron hongos que cubrían toda la bacteria, por tal razón no se pudieron recuperar.

En los resultados obtenidos se evidencia que la fuente que presenta mayor cantidad de cepas recuperadas es Compost (44%) que proviene del ingenio Mayagüez, durante este proceso de transformación orgánica la actividad metabólica microbiana se incrementa debido al tiempo de degradación transcurrido, la temperatura de incubación y el pH del medio. Estas condiciones facilitan que bacterias esporógenas y actinomicetos incrementen su actividad y por ende su población (Granados y Valderrama, 2003). El proceso de compostaje está gobernado por la acción de microorganismos aerobios facultativos y obligados, mesófilos y termófilos, según la temperatura dominante. Hasta ahora, han sido estudiadas más de 70 especies de microorganismo destacándose los grupos de actinomicetos termófilos, bacterias mesófilas y termófilas, y hongos mesófilos y termófilos, degradando compuestos como hemicelulosa, celulosa. (Barreto, 2008)

## 2.5.2 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE DEGRADADORES DE CELULOSA

Para la caracterización e identificación de microorganismo inicialmente se realizó un reislamiento que adicionalmente contenía Nistatina: un antimicótico para garantizar que lo único que crecieran fueran bacterias. Posterior a esto, se realizó la identificación por coloración que permite conocer los detalles morfológicos de las bacterias, existen varias técnicas empleadas, pero la coloración de Gram permite distinguir entre bacterias Gram positivas (tinción violeta) y Gram negativas (tinción rosado) debido a la estructura química que se presenta en la pared celular ya que las bacterias Gram negativas están constituidas por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales. (López, 2014)

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante este procedimiento.

**Tabla 4. Caracterización de las Cepas Macro y Micro Aisladas.**

<b>Cepa</b>	<b>Morfología</b>	<b>Gram</b>	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Textura</b>
<b>C4BB</b>	Bacilos	Negativa	irregular	traslucido	cremosa
<b>C2M1A</b>	Cocoides	Negativa	irregular	Blanco	Cremoso
<b>C10B</b>	Varillas	Negativa	irregular	blanco	Cremoso
<b>C4BBL</b>	Bacilos	Negativa	irregular	Blanca	Cremosa
<b>C5A</b>	Bacilos	Positiva-Negativa	irregular	incolora	Cremosa
<b>C1M1</b>	Varillas	Negativa	Liso	blanco	Cremosa
<b>C6BBR</b>	Cocoides	Negativa	Liso	Blanco	Cremosa
<b>C2BB</b>	Bacilos rectos	Negativa	Liso	blanco	Cremosa

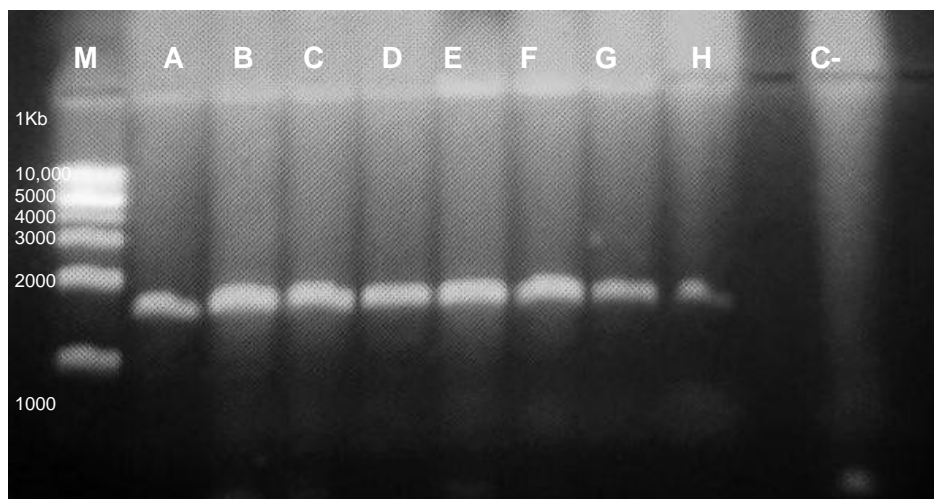
<b>C6BB</b>	Cocoides	Negativa	Liso	blanco	Cre moso
<b>C3M1</b>	Bacilos rectos	Negativa	Liso	blanco	cremoso
<b>C9M1</b>	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó
<b>C1M4</b>	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó
<b>C3M2</b>	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó
<b>C8M1</b>	bacilos	Negativo	Liso	Blanco	Cre moso
<b>C10B</b>	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó	No se observó
<b>C4B</b>	Bacilos	Negativo	irregular	Blanca	Cre moso

**Fuente:** Autor

Se pudo notar que la mayoría de bacterias aisladas resultaron ser Gram negativas. Aunque esta prueba no es definitiva por lo cual es necesario la realización de la secuenciación ADNr 16S.

### **2.5.2.1 Estandarización de condiciones de PCR para amplificación del gen 16s**

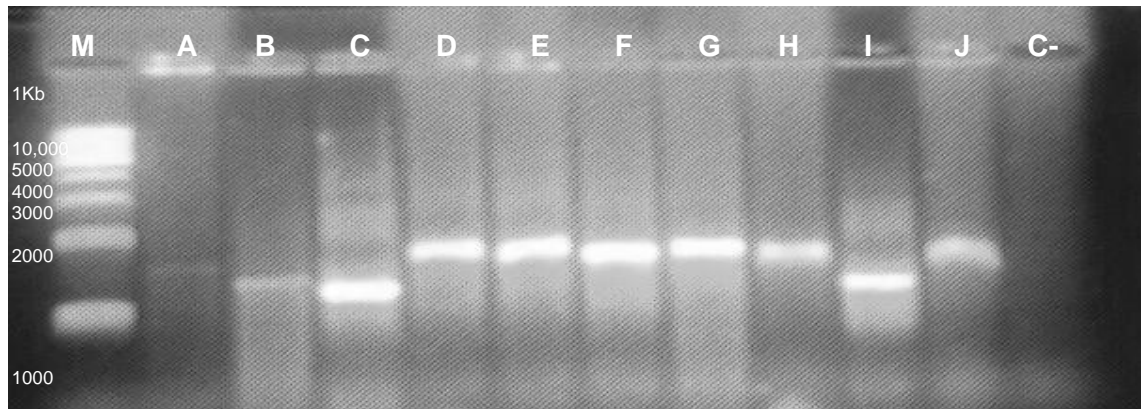
Para estandarizar el protocolo de PCR para la amplificación del gen 16S se realizó PCR gradiente la cual permite determinar la temperatura óptima de anillamiento de los primers utilizados. Principalmente se amplificó un fragmento de 1500pb de un cultivo de células de origen **C4B**. Se estableció un gradiente de 53 a 63 ° C. Esto se logró implantando un gradiente de 14 ° C y estableciendo la temperatura de anillamiento a 60 ° C. Se seleccionaron los siguientes parámetros de prueba: desnaturalización 95°C a 30 s, hibridación 53 ° C -63 ° C durante 30 s, elongación 72 ° C, 2min, Taq-Polimerasa 0,2 unidades. En la **Figura 7** se presentan los resultados obtenidos de la PCR gradiente utilizando un marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. A partir de esto se determinó que la temperatura que mejor se ajusta para la amplificación del amplicón es el pozo E, el cual tiene una temperatura de 57°C.



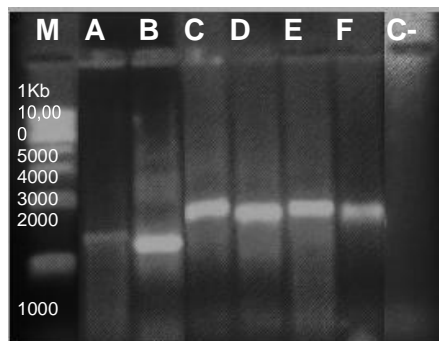
**Figura 7.** Amplificación del gen 16S bajo un gradiente de temperatura de anillaje. M: corresponde al marcador molecular se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder. **A:** 63°C, **B:** 62.3°C, **C:** 61.1°C, **D:** 59.3°C, **E:** 57°C, **F:** 55.3°C, **G:** 54°C, **H:** 53°C.

El Protocolo de la PCR estandarizado por reacción fue: (buffer de PCR 1X, dNTPs 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, primers 0,2 µM, taq ADN polimerasa recombinante 1.25U y 100 ng de ADN bacteriano). Se utilizó el termociclador y el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 92 °C por 1 min, 57 °C por 30 s, y 72 °C por 1 min. Los productos de PCR se analizarán por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Con el fin de aplicar y evaluar la estandarización realizada se reprodujo el protocolo de la PCR utilizando el ADN de diferentes cepas aisladas **C<sub>1</sub>M<sub>4</sub> perteneciente a la fuente Judea<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>3</sub>M<sub>2</sub> de Guido<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>4</sub> compost<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>1</sub>M<sub>1</sub> Judea<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>3</sub>M<sub>1</sub> Guido<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>8</sub>M<sub>1</sub> Guido<sub>10</sub><sup>-3</sup>, C<sub>2</sub>BB compost<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>4</sub>B compost<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>10</sub> Judea<sub>10</sub><sup>-1</sup>, C<sub>6</sub>BB Guido<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>1</sub>M<sub>4</sub> Judea<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>3</sub>M<sub>2</sub> Guido<sub>10</sub><sup>-2</sup>, C<sub>4</sub>BB compost<sub>10</sub><sup>-3</sup>, C<sub>1</sub>M<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>M<sub>1</sub>, C<sub>8</sub>M<sub>1</sub> Guido<sub>10</sub><sup>-3</sup>, C<sub>2</sub>BB compost<sub>10</sub><sup>-3</sup>, C<sub>4</sub>BBL compost<sub>10</sub><sup>-3</sup>, C<sub>10</sub> Judea<sub>10</sub><sup>-1</sup>, C<sub>6</sub>BB compost<sub>10</sub><sup>-1</sup>.** En la figura 8 y 9 se muestran las bandas obtenidas para cada una de las cepas aisladas, las cuales presentan una intensidad muy similar entre ellas y un peso de aproximadamente 1500pb, como se esperaba.



**Figura 8. PCR de colonia** donde **M** corresponde al marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, **A:** C<sub>1</sub>M<sub>4</sub>, **B:** C<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, **C:** C<sub>4</sub>BB, **D:** C<sub>1</sub>M<sub>1</sub>, **E:** C<sub>3</sub>M<sub>1</sub>, **F:** C<sub>8</sub>M<sub>1</sub>, **G:** C<sub>2</sub>BB, **H:** C<sub>4</sub>BBL, **I:** C<sub>10</sub>, **J:** C<sub>6</sub>BB. Se puede observar que las bandas se encuentran entre 1kb y 2kb.



**Figura 9. PCR de colonia** donde **M** corresponde al marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, **A:** C<sub>2</sub>M<sub>1</sub>, **B:** C<sub>10</sub>B, **C:** C<sub>5</sub>, **D:** C<sub>6</sub>BBL, **E:** C<sub>9</sub>M<sub>1</sub>, **F:** C<sub>4</sub>B, **C-**

### 2.5.2.2 Identificación taxonómica mediante secuenciación del gen 16S

La identificación taxonómica se realizó mediante secuenciación ADNr 16S. Se eligió esta técnica porque es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos o género. Las diferencias en las regiones conservadas proporcionan así mismo secuencias para el diagnóstico de grupos de organismos relacionados y pueden ser usadas como dianas para sondas específicas de oligonucleótidos. Además es un poderoso marcador universal debido a que se encuentra en todos los organismos conocidos. Su estructura parece mantenerse por largos periodos de tiempo y, como su función no ha cambiado, los cambios en la secuencia probablemente son aleatorios. **(Valenzuela-González, 2015)**

En los resultados obtenidos de la secuenciación, la mayoría de amplicones –en total 12- contienen más de una secuencia, las posibles causas del ruido o de las secuencias superpuestas es porque el ADN pudo presentar contaminación, el fragmento de PCR está mal purificado, no hay cebador o la concentración es inferior

a la necesaria. Con relación a los productos de PCR las impurezas más habituales son los fragmentos que copurifican con el molde por ejemplo primer-dimers, que contienen sitios de unión para los cebadores de secuenciación. sin embargo, se analizó y se limpió las secuencias con el programa MEGA, y después se utilizó la herramienta BLAST que permite buscar secuencias biológicas en las bases de datos de NCBI. Esta herramienta encontró algunas regiones similares, comparó las secuencias de nucleótidos y calculó la significancia estadística, obteniendo 12 de 16 bacterias identificadas, las 4 restantes no se lograron identificar mediante esta herramienta y no se realizó de nuevo la purificación.

Con relación a las 12 bacterias identificadas éstas presentaron 7 microorganismos distintos y 5 repetidos. Donde 3 de 5 bacterias pertenecen al género *Shinella sp* y 2 de 5 bacterias pertenecen al género *Paraccocus sp*. Esto pudo deberse principalmente a un aislamiento secundario erróneo, ya que se eligió dividir una caja Petri en 2 partes iguales y sembrar dos microorganismos en la misma caja **figura 10**, para el caso de las 3 bacterias de género *Shinella sp* el aislamiento provenía de la misma caja Petri (C4) y de la misma dilución –Compost<sub>10</sub><sup>-3</sup> además 2 de las 3 bacterias presentaron similitud en la descripción macro y microscópica, para *Paraccocus sp* sucedió lo mismo (C6, compost<sub>10</sub><sup>-1</sup>). En general los resultados obtenidos de la identificación no son confiables por lo que es necesario volver a purificar el producto de PCR, considerar un cambio de Primers-cebadores o realizar el aislamiento desde las diluciones, todo esto para garantizar que no se presenten más de un microorganismos en la secuenciación y de esa manera realizar un análisis bioinformático correcto.



**Figura 10.** Aislamiento secundario de bacterias.

Es importante resaltar que los microorganismos identificados utilizan como sustrato la Celulosa, ya que, el medio en el que ellos crecieron su fuente de carbono era esta. En el medio en el cual los microorganismos utilizaban RAC no se observó crecimiento, esto se sustenta con la literatura, ya que para poder degradar el material lignocelulósico debe hacerse un trabajo sinérgico, es decir, debe existir la participación simultánea de diferentes microorganismos, principalmente porque los hongos son los primeros en romper el material para que las bacterias puedan entrar a la fuente de carbono. Hay una conjunto de enzimas participando para poder degradar el material, lo que probablemente no pasó en el medio de cultivo M9+RAC. Los resultados obtenidos mediante BLAST que incluye el género y/o especie

posiblemente celulolíticas, así como los valores de similitud se describen a continuación. Cabe aclarar que poder analizar los resultados obtenidos por BLAST fue necesario tener en cuenta que BLAST sólo muestra información de los alineamientos que tengan un valor esperado (en inglés e-value) igual o menor que un límite predefinido (parámetro -e), que por defecto vale 10. Este valor es el número de secuencias, respecto al tamaño de la base de datos que se está buscando, que obtendrían la misma puntuación por azar al ser alineadas. Por tanto, cuanto mayor sea el tamaño de la biblioteca de secuencias que se está explorando, más significativos serán los valores esperados y si se obtiene un porcentaje de similitud del 100% esto indica una homología significativa.

En la siguiente **tabla 5** se muestran los resultados de la identificación taxonómica. Información como condiciones de crecimiento, fuente y origen, conservación de los microorganismos entre otras características, se encuentra detalladamente en los **Anexos 1**.

**Tabla 5. Identificación por secuenciación ADNr 16S –ver Anexos 1-**

Bacterias Gram -	<i>Shinella sp</i>
	<i>Paraccocus sp</i>
	<i>Pseudomonas sp</i>
	<i>Rhizobium sp</i>
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
	<i>Dyadobacter fermentans</i>
	<i>Chitinophaga cymbidii</i>

### ***Pseudomonas sp***

*Pseudomonas sp* es una cepa obtenida de la fuente Compost del ingenio Mayagüez. Respecto a su caracterización macro y micro, mostró forma de bacilo y coloración rosada indicando tinción de Gram negativa, presentó colonias de color blanco con borde liso, textura cremosa. Al ser comparado con la literatura concuerda su identificación Macro y micro. Añadiendo a la información obtenida, se dice que este género puede presentar algunos bacilos pigmentados, y su movimiento es a través de flagelos. Por otra parte, el género *Pseudomonas sp* representa un grupo grande e importante de bacterias el cual incluye especies de gran versatilidad metabólica; de ahí su importancia ambiental.

Según un estudio realizado en 2014 sobre *Isolation of amycolytic, cellulolytic and ligninolytic microorganisms from Bogotá's wetland soils*, reportan a este grupo bacteriano como celulolítico y lignolítico. Además, según Kaplan y Hardenstein (2014), un pequeño porcentaje de sustratos de lignina son degradadas por

*Pseudomonas* sp. Sin embargo, un cultivo mixto de *Pseudomonas* sp degrada el 39% de lignina, lo que contribuye a fortalecer la hipótesis del trabajo sinérgico entre microorganismos. Con relación al proyecto el que haya crecido en un medio tan selectivo como el medio M9 indica la importancia de evaluar su capacidad para degradar y por ende para producir celulasas.

Por otro lado, se identificó el microorganismo *P.nitroduences* perteneciente al género *Pseudomonas* sp aunque esta cepa no se obtuvo de la fuente compost que es un abono orgánico, resultante de la mezcla de los subproductos de la molienda de caña y la producción de etanol (vinaza + cachaza) sino que esta cepa se encontró en la fuente Judea que utiliza residuos de cultivo de caña para fertilización de sus tierras. Con relación a sus características macro y micro también es una bacteria Gram negativa, ya que presentó coloración rosa, al igual presenta la misma morfología que el género *Pseudomonas* sp.

En cuanto a los resultados obtenidos por BLATS, *P.nitroduences* presentó una identidad alta del 98% y un e-value de 0.0 lo que indica que hay una coincidencia exacta de la secuencia mientras que *Pseudomonas* sp presentó una identidad del 83% y un e-value 1e-45 valores con baja significancia; esto no significa que no haya homología, solo que en la búsqueda se espera encontrar mejores candidatos; este resultado se le puede atribuir principalmente a una PCR mal purificada, o a un aislamiento erróneo, o a alguno de los diferentes factores ya mencionados con anterioridad.

### ***Shinella* sp**

*Shinella* s.p es una cepa obtenida de la fuente Compost del ingenio Mayagüez. En cuanto a su caracterización Macro y micro, presentaron colonias brillantes-traslucidas con borde irregular y textura viscosa, por coloración de Gram se obtuvo que es un bacilo Gram negativo, comparado con la literatura existe concordancia adicionalmente se menciona que no forma cápsulas ni es esporulado. No se ha reportado como posible microorganismo degradador de celulosa, hemicelulosa o lignina; sin embargo, su crecimiento en el medio indica que utiliza como fuente de carbono la celulosa.

Las Cepas de *Shinella* sp sólo se presentaron en la fuente proveniente del Compost del Ingenio Mayagüez, lo que puede indicar que el compost le proporciona una concentración más alta de elementos que favorezcan el crecimiento de estas bacterias. Según la literatura su crecimiento óptimo es a pH 7-8; y puede crecer en medios que tengan un 3 % de NaCl. Respecto a los resultados obtenidos por BLAST presentó un e-value de 0.0 y una identidad del 98% valores significativos ya que tiene una valor e muy bueno, y una identidad alta. (An DS, 2006)

### ***Dyadobacter fermentans* y *Paraccocus* sp**

Otros de los microorganismos identificados es *Dyadobacter fermentans* y *Paraccocus* p.s, el primero presentó en sus características microscópicas y macroscópicas respectivamente forma de varillas Gram-negativos con bordes liso y textura cremoso. Estas características obtenidas muestran similitud a las mencionadas en la literatura. Este microorganismo usa N<sub>2</sub>O originario de otros organismos, quimiodenitrificación u otras fuentes. Su amplia distribución indica que la capacidad de reducir N<sub>2</sub>O es un rasgo ecológicamente relevante; sin embargo, en la literatura no se ha reportado como microorganismo degradador de celulosa, pero al crecer en el medio selectivo M9 durante esta investigación es conveniente evaluar su capacidad de degradar celulosa. El segundo presentó es forma coloración rosada indicando bacteria Gram negativa en forma de coco, según la literatura son coccus-bacilos y presenta colonias blancas lisas. Éste ha sido reportado en la tripa del trabajador *M. gilvus* como microorganismo que degrada la celulosa, no obstante en esta investigación este microorganismo proviene de la fuente de Compostaje del ingenio Mayagüez con características diferentes lo que indica que este microorganismo puede encontrarse en otras fuentes y en concentraciones distintas de nutrientes. Por otra parte, este microorganismo no se encontró ni en la fuente Judea ni Balsora, indicador de que las condiciones que él necesita para crecer se encuentran potenciadas en el fuente de compostaje. **(QiaoLin, 2010)**

El primer microorganismo tuvo un e-value 0.0 y una identidad del 96%, mientras que el segundo microorganismo tuvo un e-value 0.0 y una identidad del 100%, a pesar de tener unas identidad del 100% su cromatograma presenta mucho ruido, puede ser porque la cantidad de muestra no fue suficiente, no se puede decir que hay más de una secuencia, porque se obtuvo un valor de identidad del 100%.

### ***Rhizobium* y *Chitinophaga cymbidii***

*Rhizobium* es una cepa aislada de la fuente de guido de la finca Balsora presentó características de coloración rosada perteneciente a bacterias Gram-negativas, además mostró colonias blancas con bordes lisos y un poco viscosa. Muestra relación con la literatura, además son bacterias del suelo que fijan nitrógeno atmosférico. En cuanto a su crecimiento en el medio selectivo indica que es un posible degradador de celulosa, además estudios revelan que es una bacteria celulolítica capaz de hidrolizar la celulosa, a través de enzimas exoglucanasa. **(Pérez, 2013)** Para confirmar esto es necesario evaluar su capacidad celulolítica. Finalmente, se identificó *Chitinophaga cymbidii* como bacteria Gram-negativa que presentó colonias de color amarillos, adicionalmente en la literatura se reporta como bacteria aeróbica que no forma esporas, no móviles. No se ha reportado, como posible microorganismo degradador de material lignocelulósico.

Rhizobium mostró un e-value de  $9e-63$  y una identidad del 91% mientras que *Chitinophaga Ccymbidii* presentó un e-value de 0.0 y una identidad del 94%. Presentan valores de identidad muy bajos, así como cromatogramas con mucho ruido.

## **AISLAMIENTO DE HONGOS**

A partir de las diluciones realizadas se logró el aislamiento de hongos posiblemente degradadores de Celulosa obteniendo un total de 14 cepas. Después del proceso de aislamiento primario se hizo el aislamiento secundario con el objetivo separar los hongos de las bacterias. La tabla presenta el número de cepas de hongos aisladas por tipo de muestra y medio de cultivo empleado.

<b>Fuente</b>	<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Cepas Encontradas</b>
Judea_-1PR2_M9+celulosa	M9+Celulosa	3
Judea_-2PR_M9+celulosa	M9+Celulosa	3
Compost_-1PR_M9+Celulosa	M9+Celulosa	1
Compost_-2SR_M9+celulosa	M9+Celulosa	1
Compost_-4SR_M9+celulosa	M9+Celulosa	1
Guido_-1PR_M9+celulosa	M9+Celulosa	2
Gudo_-3PR4_M9+Cell	M9+Celulosa	2
Guido_-4PR_M9+celulosa	M9+Celulosa	1

**Tabla 6. Recuento de Cepas de Hongos**

A diferencia de las bacterias, el mayor aislamiento se obtuvo de la fuente Judea y de la fuente Guido, probablemente en esas fuentes encontraron mayor concentración de macronutrientes y micronutrientes para proliferarse. Por otra parte, el papel del pH es fundamental para el desarrollo de los hongos, a un pH alto se ve afectado la solubilidad de los metales y a pH bajo se afectan los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales y ácidos orgánicos y la toma de minerales, puede que en estas fuentes estos microorganismos hayan encontrado el pH óptimo para crecer. En cuanto a los hongos sólo se logró hacer la descripción macroscópica, en la que se notaron 14 morfotipos diferentes, apoyándose en la teoría estos hongos posibles degradadores de celulosas y/o lignocelulosa recaen en el género basidiomiceto y ascomycota, las características principales de los basidiomicetos es que presentan micelio septado, en cada septo se presentan fíbulas prominentes,

producen cuerpos fructíferos denominadas basidiocarpos, las esporas sexuales son las Basidiosporas (cuatro esporas, producidas externamente en basidios o probasidios), las Basidiosporas se forman por plasmogamia, cariogamia y meiosis. **(Marcela, 2014)**

En cuanto a Ascomycota este grupo de hongos posee un micelio conformado por hifas tabicadas (con excepción de las levaduras que son unicelulares) y se caracteriza por poseer un esporangio en forma de saco llamado asco en cuyo interior se alojan las ascosporas. Este esporangio se forma como producto de una reproducción sexual, la cual puede efectuarse mediante somatogamia o por gametangiogamia y puede originarse en cuerpos fructíferos complejos o Ascocarpos que son característicos pudiendo tener diversas formas, pero su función es la de proteger los esporangios con las esporas que garantizarán la reproducción de la especie. La reproducción asexual se realiza por conidiosporas cuya formación no requiere una fusión sexual previa y que se desarrollan en estructuras llamadas conidióforos, formando cadenas de esporas o conidios. **(Izco, 1997)**

Algunas descripciones macroscópicas que son de rescatar, por ejemplo se encuentra un hongo obtenido de la fuente Judea identificado con código C10HV, se notó la presencia de un micelio blanco, algodonoso y posteriormente una esporulación verde oliva de apariencia aterciopelada. En esa misma fuente se observó un hongo con contextura amarilla crema, como globoso identificado con código C10AC. También se logró observar un hongo Amarillo-café, en forma de coral –C10ACA-. Todas estas descripciones se encuentran en los anexos con sus respectivas fotos. Se intentó realizar la identificación morfológica de sus estructuras asexuales, sin embargo, con el procedimiento utilizado donde se realizaba un corte del agar que contenía el hongo y se le adiciona una gota de azul de lactofenol no se lograron ver al microscopio y no se pudo hacer una descripción ni identificación de sus estructuras.

## **CONCLUSIONES**

Se logró el aislamiento e identificación de 7 cepas bacterianas posiblemente degradadoras de celulosa y/o lignocelulosa debido a su uso de celulosa como fuente de carbono para el aislamiento.

En los residuos de suelo y de compost existe una gran diversidad de microorganismos que pueden ser empleados en la industria y en diferentes bioprocesos, como materia prima en la producción de azúcares, alimentos concentrados para animales, biomasa microbiana, producción de ácidos orgánicos, entre otros usos. Contribuyendo de esta manera a mitigar el impacto ambiental.

Se logró estandarizar la técnica de PCR para los microorganismos potencialmente degradadores de celulosa.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar de nuevo tinción de Gram o utilizar la tinción de Ziehl-Neelsen que es una técnica diferencial rápida y económica y que permite observar aquellas que no tiñen con tinción de Gram

Se recomienda continuar con la evaluación de las regiones V1-V9 y el análisis de las muestras.

Efectuar estudios enzimáticos para evaluar el potencial de degradación de compuestos lignocelulósicos de los microorganismos aislados.

Es importante considerar a futuro la amplificación de las regiones ITS para identificar molecularmente los hongos que se aislaron.

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

An DS, I. W. (FEBRERO de 2006). NCBI. Recuperado el 17 de OCTUBRE de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449455>

ANTIOQUIA, U. D. (s.f.). Aprende en Linea . Recuperado el 27 de 10 de 2017, de [http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/231237/mod\\_resource/content/0/2.\\_PRACTICA\\_TINCIONES\\_ESPECIALES\\_EN\\_MICROBIOLOGIA.pdf](http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/231237/mod_resource/content/0/2._PRACTICA_TINCIONES_ESPECIALES_EN_MICROBIOLOGIA.pdf)

BIOLAB. (s.f.). COLONY PCR . Recuperado el 17 de Octubre de 2017, de <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-analysis/colony-pcr>

Bommarius, A. S., & Riebel, B. (2004). *Biocatalysis*. Atlanta, USA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Biblioedu. (s.f.). Recuperado el 4 de 11 de 2017, de <http://biblio3.url.edu.gt/Libros/2011/bot/19.pdf>

Camp HJ (2003) *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83: 135-48.

Devries R.; Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of Fan,L.T.; Lee, Y-H & Beardmore, D.H. 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. XXII, 177-199

Doi RH (2008) *Cellulases of mesophilic microorganisms: Cellulosome & NonCellulosome Producers*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1125: 267-279.

Gómez D., R. B. (2007). Determinación de la viabilidad comercial de exportación de alcohol carburante de Colombia hacia Estados Unidos. Bogotá: Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Administración Ambiental.

Henrissat, B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309–316.

HSchwarz, D. E. (2014). *Genomics of cellulolytic bacteria*. ELSEVIER, 20.

HOS.UFL. (7 de 11 de 2017). Obtenido de [www.hos.ufl.edu/meteng/M9%20Minimal%20Medium.doc](http://www.hos.ufl.edu/meteng/M9%20Minimal%20Medium.doc)

- III, J. E. (Octubre de 2004). *Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Pathology and Laboratory Medicine Service, Veterans Affairs Medical Center, Seattle, Washington. Recuperado el 20 de Octubre de 2017, de <http://cmr.asm.org/content/17/4/840.short>*
- Izco, J. E. (1997). *Ciens. Recuperado el 4 de 11 de 2017, de <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/labbiolvegetal/archivos/11%20hongs%20II.pdf>*
- Lehninger, A.L. 1987. *Bioquímica. Ediciones Omega, S.A 2ª .ed. Barcelona.*
- López-Hontangas, J. L. (s.f.). *Recuperado el 4 de 11 de 2017, de Tecnicas de identificación : <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>*
- Lynd, L.; Weimer, P.; Van Zyl, W.; Pretorius, I. 2002. *Microbial cellulose*
- Marcela, S. (23 de Mayo de 2014). *Isolation of amylolytic, cellulolytic and ligninolytic. Obtenido de [revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/download/89/101](http://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/download/89/101)*
- Montaño, L. (2010). *Blogspot. Recuperado el 20 de OCTUBRE de 2017, de <http://tirsomestre.blogspot.com.co/2010/05/subproductos-de-la-industria-azucarera.html>*
- Olvera P. 2003. *Aislamiento de levaduras que tengan la capacidad para degradar lignina y búsqueda de algunos genes implicados en dicha degradación. Tesis Profesional presentada para obtener el título en maestría en biotecnología. Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas. Puebla-México.*
- Pérez, J., & Jeffries, T. W. (2002). *Roles of Manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by Phanerochaete plant cell wall polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65(4): 497-522.*
- Pérez, R. A. (Agosto de 2013). *Colibrí . Recuperado el 21 de Octubre de 2017, de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1568/1/uy24-16513.pdf>*
- QiaoLin, W. W. (Julio de 2010). *SCIENCEDIRECT . Recuperado el 17 de Octubre de 2017, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410003706>*
- Rodríguez, C. H. (2009). *Caracterización de los polisacáridos presentes en los residuos de cosecha (hoja y cogollos) de tres variedades (CC8475, CC8592, V715) de caña de azúcar. Cali: Universidad del Valle.*
- Sánchez Riaño, A.M.; Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C. A. *Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales*

*lignocelulósicos. Revista Tumbaga (2010), 5, 61-91*

*SAYA.Y.C. (27 de Agosto de 2013). Recuperado el 05 de Mayo de 2017, de Estudio de la bioquímica de enzimas Lignocelulolíticas: <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/954/Yasneira%20Castro>*

*Simon M Cragg 1, ,. G. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. ScienceDirect, 8.*

*TDH Bugg, Ahmad M. Hardiman EM, Rahmanpour R. Caminos para la degradación de la lignina en bacterias y hongos Nat Prod Rep, 28 (2011), pp. 1883-1896*

*Valenzuela-González, F. (Diciembre de 2015). Scielo. Recuperado el 26 de Octubre de 2017, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-38802015000400297](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802015000400297)*

## ANEXOS 1

**Tabla 1.** Microorganismos degradadores de Celulosa

Filogenia	Especies	Fuente	Número de acceso al genoma
<b>Phylum Firmicutes</b>			
Clase <i>Clostridia</i> Orden <i>Thermoanaerobacterales</i>	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>		NC_012034
Family <i>Incertae Sedis</i>	<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i>	Primavera calurosa	NC_014652
	<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i>	Primavera calurosa	NC_014721
	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i>	Primavera calurosa	NC_014720
	<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i>		NC_015949
	<i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i>	Primavera calurosa	NC_014392
	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Primavera calurosa	NC_009437
	<i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i>	Primavera calurosa	norte
	<i>Thermoanaerobacter thermocopriae</i>	Primavera calurosa	PRJNA224116
Clase <i>Clostridia</i> Orden <i>Clostridiales</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Panza	NC_021031
Familia <i>Lachnospiraceae</i>	<i>Cellulosilyticum lentocellum</i>	Panza	NC_015275
	<i>Cellulosilyticum ruminicola</i>	Panza	norte
Clase <i>Clostridia</i> Orden <i>Clostridiales</i> Familia <i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	Panza	NZ_CM001487
Clase <i>Clostridia</i>	<i>Clostridium aldrichii</i>	Fermentador de madera	norte
Orden <i>Clostridiales</i>	<i>Clostridium alkalicellulosi</i>	Lago de soda	PRJNA65293
<i>Clostridiaceae</i> familiar	<i>Clostridium caenicola</i>	Lodo	norte
	<i>Clostridium celerescens</i>	Estiércol	norte
	<i>Clostridium cellobioparum</i>	Panza	norte
	<i>Clostridium</i>	Estiércol	norte

	<i>celulofermentans</i>		
	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Compost	NC_011898
	<i>Clostridium cellulosi</i>	Estiércol	PRJNA212730
	<i>Clostridium cellulovorans</i>	Fermentador de madera	NC_014393
	<i>Clostridium chartatabidum</i>	Panza	norte
	<i>Clostridium clariflavum</i>	Lodo	NC_016627
	<i>Clostridium herbivorans</i>	Intestino de cerdo	norte
	<i>Clostridium hungatei</i>	Suelo	norte
	<i>Clostridium josui</i>	Compost	PRJNA195880
	<i>Clostridium longisporum</i>	Panza	norte
	<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Fábrica de papel	PRJNA55815
	<i>Clostridium phytofermentans</i>	Suelo	NC_010001
	<i>Clostridium populeti</i>	Fermentador de madera	norte
	<i>Clostridium sp. C7</i>	Barro	norte
	<i>Clostridium stercorarium</i>	Compost	NC_020134
	<i>Clostridium straminisolvens</i>	Paja de arroz	PRJDB821
	<i>Clostridium sufflavum</i>	Residuos de ganado	norte
	<i>Clostridium termitidis</i>	Termita	PRJNA196409
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Aguas residuales + suelo	NC_009012
	<i>Clostridium thermopapyrolyticum</i>	Barro	norte
Clase <i>Clostridia</i>	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Aguas residuales	PRJNA51533
Orden <i>Clostridiales</i>	<i>Acetivibrio cellulosolvens</i>	Aguas residuales	norte
Familia <i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	Panza	NC_014833
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Panza	PRJNA224116
Clase <i>Clostridia</i> Orden <i>Haloanaerobiales</i> Familia <i>Haloanaerobiaceae</i>	<i>Hallocella cellulolytica</i>	Lago salino	norte


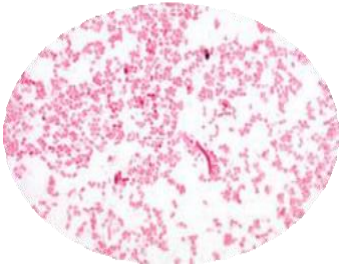
Clase <i>Bacilos</i> Solicitar <i>Ba</i> <i>cillales</i> familia <i>Thermoacti</i> <i>nomycetaceae</i>	<i>Thermoactinomyces</i> <i>sp. YX</i>		norte
Clase <i>Bacilli</i> Orden <i>Bacilla</i> <i>les</i> Familia <i>Alicyclobacillac</i> <i>eae</i>	<i>Caldibacillus cellulovorans</i>		norte
Clase <i>Bacilli</i> Orden <i>Bacilla</i> <i>les</i> Familia <i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus pumilis</i>		PRJDB1314N C_00984

**Fuente: (HSchwarz, 2014)**

HSchwarz, D. E. (2014). Genomics of cellulolytic bacteria. *ELSEVIER*, 20.


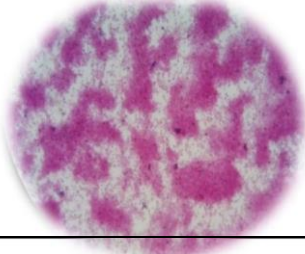
III, J. E. (Octubre de 2004). *Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Pathology and Laboratory Medicine Service, Veterans Affairs Medical Center, Seattle, Washington*. Recuperado el 20 de Octubre de 2017, de <http://cmr.asm.org/content/17/4/840.short>

FICHA TÉCNICA *Pseudomonas nitroreducens*

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
		<b>C1M1</b>	
Microorganismo	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>		
Fuente	Judea 10 <sup>-2</sup>	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento	Crioviales	Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad	2	Conservación	M9: glicerol 40% 4°C Suelo: -8°C
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 20 días.	
<p>Clasificación:</p> <p>Reino: <i>Bacterias</i>            Filo: <i>Proteobacteria</i>            Clase: <i>Gammaproteobacteria</i>            Orden: <i>Pseudomonadales</i>            Familia:  <i>Pseudomonadaceae</i>            Género: <i>Pseudomonas</i>            Especies: <i>P. nitroreducens</i></p>		<p>Características morfológicas</p> <p>Características Macroscópicas:            AGAR +M9: Colonias de color blanco, son bacterias lisas, cremoso.</p>  <p>Características Microscópicas: presentó coloración rosada, en debido a su coloración y su forma son Varillas gram-negativas, algunas se encuentran solas y otras en parejas.</p> 	


Reacciones atípicas		No Presenta
Identificación de peligro	Enfermedad es que produce.	Es común que esta bacteria cause infecciones nosocomiales como neumonía, infecciones del tracto urinario y bacteriemia; las infecciones causadas por esta bacteria pueden llegar a ser complicadas e incluso pueden ser fatales. Es invasivo y toxigénico.
Tratamiento		
Medidas de Protección / Manipulación		El riesgo de contraer <i>pseudomonas nitroreducens</i> se puede reducir evitando piscinas, bañeras calientes y otros cuerpos de agua estancada. El uso de inhibidores de $\beta$ -lactamasas tales como sulbactam en combinación con antibióticos para mejorar la acción antimicrobiana incluso en presencia de cierto nivel de resistencia.
Conservación del microorganismo		Método de vitrificación consta de una solución de medio M9 que contiene fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y celulosa al cual se le adiciona glicerol al 40%, posterior a eso se le adiciona 1,5ml de la cepa. Se lleva a una nevera de -8°C. La preparación se realiza en un criovial.

## FICHA TÉCNICA DE *Shinella s.p*

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código	<b>C4B</b>		
Microorganismo		<i>Shinella s.p</i>	
Fuente	Comp ost 10 <sup>-3</sup>	Origen: Ingenio Mayaguez	
Almacenamiento	Crioviales	Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad		Conservación	M9: glicerol 40%4°C Suelo: T a-8°C
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 20días	
Clasificación		Características morfológicas	
<p>Dominio: Bacteria Filo: Proteobacteria Clase: Gammaproteobacteria Orden: Enterobacteriales Familia: Enterobacteriaceae Género: <i>Shinella</i></p>		<p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: bacteria traslucida, brillante, húmeda.</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Características Microscópicas: presentó coloración rosada, debido a su coloración y su forma son bacilos Gram-negativas, no forma capsulas ni endosporas.</p> <div style="text-align: center;">  </div>	


Reacciones atípicas		No Presenta
Identificación de peligro	Enfermedades que produce.	Es común que la familia de esta bacteria cause fiebre de Malta. La infección se transmite por a hombre por infección de lacticios contaminados, o por contacto con materiales biológicos contaminados.
Tratamiento		
Medidas de Protección / Manipulación		<p>El personal debe usar equipo de protección normal (uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro)</p> <p>Eliminación y tratamiento apropiado de desechos</p> <p>Higiene personal: lavado de manos</p> <p>Intervención sólo por personal, capacitado y consciente de los peligros del microorganismo.</p>
Conservación del microorganismo		Método de vitrificación consta de una solución de medio M9 que contiene fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y celulosa al cual se le adiciona glicerol al 40%, posterior a eso se le adiciona 1,5ml de la cepa. Se lleva a una nevera de -8°C. La preparación se realiza en un criovial.

**FICHA TÉCNICA DE *Dyadobacter fermentans***

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código	<b>C10B</b>		
Microorganismo	<i>Dyadobacter fermentans</i>		
Fuente	Judea 10 <sup>-1</sup>	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento	Crioviales	Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad		Conservación	M9: glicerol 40% 4°C Suelo: T a -8°C
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 20 días	
<b>Clasificación</b>  Reino: Bacterias Filo: Bacteroidetes Clase: <i>Esfingobacterias</i> Orden: Sphingobacteriales Familia: <i>Cytophagaceae</i> Género: <i>Dyadobacter</i>		<b>Características morfológicas</b>  <b>Características Macroscópicas:</b> AGAR +M9: Bacteria blanca lisa.    <b>Características Microscópicas:</b> presentó coloración rosada, debido a su coloración y su forma son: Varillas Gram-negativas, no forma capsulas ni endosporas; Sin embargo, no se logró capturar la imagen.	


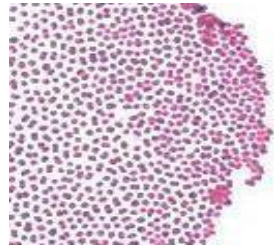
Reacciones atípicas		No Presenta
Identificación de peligro	Enfermedades que produce.	No se identificó
Tratamiento		
Medidas de Protección / Manipulación		No se identificó
Conservación del microorganismo		Método de vitrificación consta de una solución de medio M9 que contiene fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y celulosa al cual se le adiciona glicerol al 40%, posterior a eso se le adiciona 1,5ml de la cepa. Se lleva a una nevera de -8°C. La preparación se realiza en un criovial.

**FICHA TÉCNICA DE *Paraccocus* sp**  
**COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA –**  
**UNIVERSIDAD ICESI**

Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código	<b>C6B</b>		
Microorganismo		<i>Paraccocus</i> sp	
Fuente	Comp ost 10-1	Origen: Ingenio Mayaguez	
Almacenamiento	Crioviales	Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad		Conservación	M9: glicerol 40%4°C Suelo: T a-8°C
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 20 días	
<b>Clasificación</b>  Domain: Bacteria Phylum: Proteobacteria Class: Alphaproteobacteria Order: Rhodobacterales Family: Rhodobacteraceae Genus: Paracoccus		<b>Características morfológicas</b>  Características Macroscópicas:  AGAR +M9: Bacteria blanca lisa.    Características Microscópicas: presentó coloración rosada, debido a su coloración y su forma son: cocoides Gram-negativas. No se logró capturar la imagen.	


Reacciones atípicas		No Presenta
Identificación de peligro	Enfermedades que produce.	No se identificó
Tratamiento		
Medidas de Protección / Manipulación		No se identificó
Conservación del microorganismo		Método de vitrificación consta de una solución de medio M9 que contiene fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y celulosa al cual se le adiciona glicerol al 40%, posterior a eso se le adiciona 1,5ml de la cepa. Se lleva a una nevera de -8°C. La preparación se realiza en un criovial.

**FICHA TÉCNICA DE Pseudomonas  
S.P**

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código	<b>C2BB</b>		
Microorganismo	<i>Pseudomonas sp</i>		
Fuente	Com post	Origen: Ingenio Mayaguez	
Almacenamiento	Crioviales	Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad		Conservación	M9: glicerol 40% 4°C Suelo: T a-8°C
Condiciones de crecimiento	Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días		
<p align="center">Clasificación</p> <p>Dominio: Bacteria            Filo: Proteobacteria            Clase: Gammaproteobacteria            Orden: Pseudomonadales            Familia: Pseudomonadaceae            Género: Pseudomonas</p>	<p>Características morfológicas</p> <p>Características Macroscópicas:            AGAR +M9: Bacteria blanca lisa.</p>  <p>Características Microscópicas: presentó coloración rosada, debido a su coloración y su forma son: bacilos rectos Gram-negativos.</p> 		

Reacciones atípicas		No Presenta
Identificación de peligro	Enfermedades que produce.	Las infecciones pueden ser externas y leves (que afectan el oído o los folículos pilosos) o bien infecciones internas graves (que afectan los pulmones, el torrente sanguíneo o las válvulas cardíacas).  Los síntomas varían según cuál sea la zona del organismo infectada.
Tratamiento		
Medidas de Protección y/o medicamentos / Manipulación		Los antibióticos se aplican por vía tópica para las infecciones externas, o por vía intravenosa para las infecciones internas más graves.
Conservación del microorganismo		Método de vitrificación consta de una solución de medio M9 que contiene fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y celulosa al cual se le adiciona glicerol al 40%, posterior a eso se le adiciona 1,5ml de la cepa. Se lleva a una nevera de -8°C. La preparación se realiza en un criovial.

## FICHA TÉCNICA DE *Rhizobium*

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código	<b>C3M1</b>		
Microorganismo		<i>Rhizobium</i>	
Fuente	Guido 10 <sup>-4</sup>	Origen: Finca Balsora	
Almacenamiento	Crioviales	Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad		Conservación	M9: glicerol 40% 4°C Suelo: T a-8°C
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días.	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		<p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: Bacteria blanca lisa.</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Características Microscópicas: presentó coloración rosada, debido a su coloración y su forma son: bacilos rectos Gram-negativos.</p>	

Reacciones atípicas		No Presenta
Identificación de peligro	Enfermedades que produce.	En plantas causa la enfermedad de las agallas de cuello, denominada así porque produce agallas o tumores, a menudo en la zona donde se une la raíz al tallo (cuello, o también llamado corona). Los tumores son producidos por la transferencia de un segmento de ADN (ADN-T) del plásmido bacteriano Ti (abreviatura de tumor-inductor).
Tratamiento		
Medidas de Protección y/o medicamentos / Manipulación		No se identificó
Conservación del microorganismo		Método de vitrificación consta de una solución de medio M9 que contiene fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y celulosa al cual se le adiciona glicerol al 40%, posterior a eso se le adiciona 1,5ml de la cepa. Se lleva a una nevera de -8°C. La preparación se realiza en un criovial.

**FICHA TÉCNICA DE *Chitinophaga cymbidii***

**COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA –**

**UNIVERSIDAD ICESI**


Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código	<b>C1M4</b>		
Microorganismo	<i>Chitinophaga Cymbidii</i>		
Fuente	Judea 10 <sup>-2</sup>	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento	Crioviales	Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad		Conservación	M9: glicerol 40% 4°C Suelo: T a-8°C
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 20 días	
Clasificación:		<p>Características morfológicas</p> <p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: Bacteria amarilla rugosa.</p> <p>Características Microscópicas: No se pudo realizar la fotografía apta de esta cepa.</p>	

Reacciones atípicas		No Presenta
Identificación de peligro	Enfermedades que produce.	
Tratamiento		
Medidas de Protección y/o medicamentos / Manipulación		No se identificó
Conservación del microorganismo		Método de vitrificación consta de una solución de medio M9 que contiene fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y celulosa al cual se le adiciona glicerol al 40%, posterior a eso se le adiciona 1,5ml de la cepa. Se lleva a una nevera de -8°C. La preparación se realiza en un criovial.


## FICHA TÉCNICA

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C10HV	
Microorganismo			
Fuente	Judea	Origen: Finca Judea	
Historial Universidad Icesi			Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		<p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: Macroscópicamente presentó un micelio blanco, algodonoso y posteriormente una esporulación verde oliva de apariencia aterciopelada. Se puede encontrar dentro del género Ascomycota.</p>	
			


**FICHA TÉCNICA**

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C10CC	
Fuente	Judea	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento	Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días		
Pruebas biológicas	Características morfológicas		
Ninguna	Características Macroscópicas: AGAR +M9: Café claro, raices.		
			


**FICHA TÉCNICA**

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C10B	
Fuente	Judea	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas: AGAR +M9: Blanco, telaraña, no es esponjoso	
			


## FICHA TÉCNICA

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C10AC	
Fuente	Judea	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		<p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: Contextura amarilla crema, como globoso , están incluido entre el género Basidiomycota</p>	
			


**FICHA TÉCNICA**

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C1C	
Fuente	Judea concentrac ión 10 <sup>-2</sup>	Origen:	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas: AGAR +M9: Rosado claro, esporulado	
			

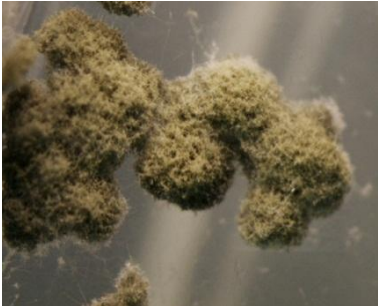
**FICHA TÉCNICA**

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C1AC	
Microorganismo			
Fuente	Judea concentrac ión 10 <sup>-2</sup>	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Nivel de seguridad		Conservación	
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		<p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: Amarillo-café, presenta forma de coral, se puede incluir dentro de los basidiomicetos.</p>	
			


### FICHA TÉCNICA

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C2B	
Fuente	Judea concentrac ión 10 <sup>-3</sup>	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas:  AGAR +M9: Blanco, pero más agrupado, es algodonoso se encuentra dentro del genero Asomycota	
			


**FICHA TÉCNICA**

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C2VA	
Fuente	Judea concentrac ión 10 <sup>-3</sup>	Origen: Finca Judea	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		<p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: verde amarillento, y está rodeado por el hongo blanco, presenta una forma de coral, es globoso; se encuentra dentro del genero Basidiomycota.</p>	
			

## FICHA TÉCNICA


<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C2AC	
Fuente	Judea concentrac ión 10 <sup>-3</sup>	Origen:	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas: AGAR +M9: parece una esponja amarilla.	
			

**FICHA TÉCNICA**


<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C4C	
Fuente	Compost concentrac ión 10 <sup>-1</sup>	Origen: Ingenio Mayaguez	
		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas:  AGAR +M9: Poroso, en el centro tiene algo café, parece una lechuga, puede incluirse dentro del género de Ascomycota.	
			

**FICHA TÉCNICA**


**COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA –  
UNIVERSIDAD ICESI**

Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C4N	
Fuente	Compost concentrac ión 10 <sup>-2</sup>	Origen: Ingenio Mayaguez	
		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		<p>Características Macroscópicas:</p> <p>AGAR +M9: se une como un puente entre dos cositas naranjas y el puente es blanco. Muy duro de capturar.</p>	
			


### FICHA TÉCNICA

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C4V	
Fuente	Compost concentración 10-4	Origen: Ingenio Mayaguez	
		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas:  AGAR +M9: Presenta una esporulación verdosa.	
			

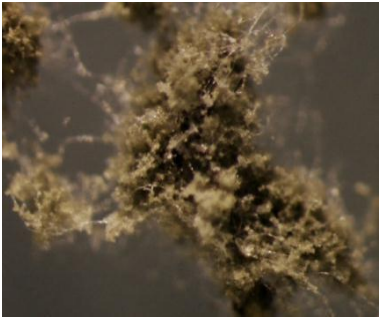
**FICHA TÉCNICA**

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		G3HC	
Microorganismo			
Fuente	Compost concentrac ión 10-4	Origen: Ingenio Mayaguez	
		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas: AGAR +M9: Es uno hongo, pero tiene esperas. La organización es diferente. Es cómo un halo	
			


## FICHA TÉCNICA

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		G3C	
Fuente	Guido concentrac ión 10-1	Origen: Finca balsora	
		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas:  AGAR +M9: Color salmon, en el centro presenta puntos de color café oscuro  <div style="text-align: center;">  </div>	

## FICHA TÉCNICA

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		G3NA	
Fuente	Guido concentrac ión 10-3	Origen: Finca balsora	
		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas: AGAR +M9: Amarillo con cositas negras, el amarillo cubre a lo negro	
			

## FICHA TÉCNICA

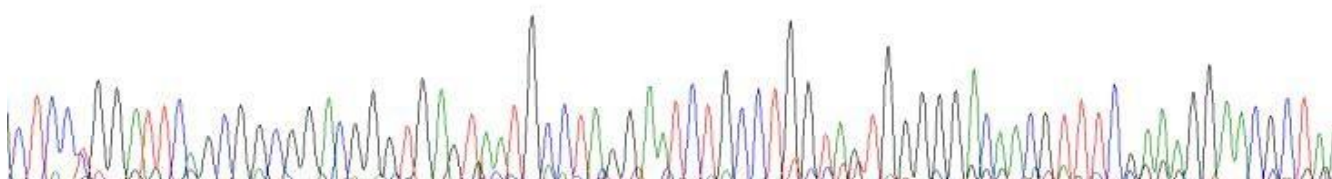
<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		G8BN	
Fuente	Guido concentrac ión 10-33	Origen: Finca Balsora	
Almacenamiento		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas: AGAR +M9: blanco y alrededor tiene un aro naranja	
			

## FICHA TÉCNICA

<b>COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS MICROBIOLOGÍA – UNIVERSIDAD ICESI</b>			
Responsable: Daniela Ruiz Silva			
Código		C3NA	
Microorganismo			
Fuente	Guido concentrac ión 10-4	Origen: Finca balsora	
		Historial Universidad Icesi	Cepario desde Mayo 2017
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura: 35°C durante 5 – 14 días	
Pruebas biológicas		Características morfológicas	
Ninguna		Características Macroscópicas:  AGAR +M9: Negro, dos unidades pegadas, una que sobresale del agar y la otra que está dentro del agar	
			

## ANEXOS DE SECUENCIACIÓN MEDIANTE ADNr 16S

C T C C Y G G A T T C A G C G G G C G G A C G G G T G A G T A A T G C C T A G G A A T C T G C C T G T A K T G G G G G A C A A C G T T T T C S A A A G G A A C G C T A A



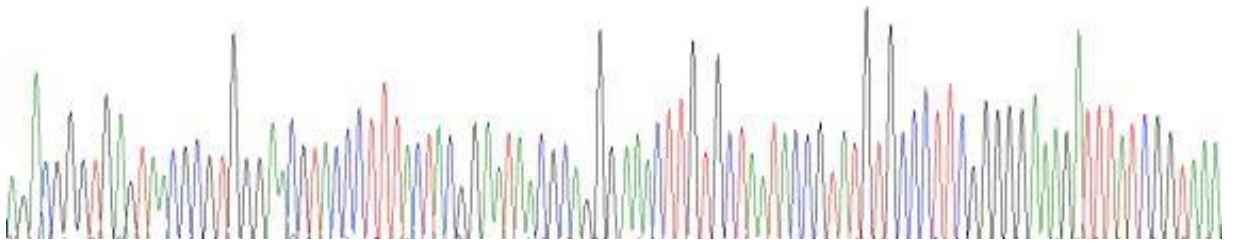
**Pseudomonas nitroreducens strain B30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**  
 Sequence ID: [MF627712.1](#) Length: 1467 Number of Matches: 1

Range 1: 61 to 510 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
802 bits(434)	0.0	442/450(98%)	0/450(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCTCCYGGATT	CAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAKTGGGGG	60	
Sbjct 61	GCTCCC	GGATT CAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGG	120	
Query 61	ACAACGTTTCSAAAGGAACGC	TAATACCGCATACGTCCACGGGAGAAAAGCAGGGGACCT	120	
Sbjct 121	ACAACGTTT	CGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCACGGGAGAAAAGCAGGGGACCT	180	
Query 121	TCGGGCTT	GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAKCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	180	
Sbjct 181	TCGGGCTT	GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	240	
Query 181	TACCAAGGCGACGATCCGTAAC	TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC TGAGAC	240	
Sbjct 241	TACCAAGGCGACGATCCGTAAC	TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC TGAGAC	300	
Query 241	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGARAGCCTG	300	
Sbjct 301	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTG	360	
Query 301	ATCCAGCCATGCCGCGKGTGT	GAAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAAGCACITTTAWKTTGGGA	360	
Sbjct 361	ATCCAGCCATGCCGCGTGTGT	GAAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAAGCACITTTAAGTTGGGA	420	
Query 361	GGAAGGGCAGTAAGTTAATAC	TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCCGGCT	420	
Sbjct 421	GGAAGGGCAGTAAGTTAATAC	TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCCGGCT	480	
Query 421	AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG	TAATACGA	450	
Sbjct 481	AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG	TAATACGA	510	

AGACGGGGTGAGTAACGGCGTGGGAACGTAGCCCTTTACTACGGGAATAACGCAGCGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCCTTCGGGGGAAAAGATTTATCGGTAAA



**Shinella sp. sRF-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

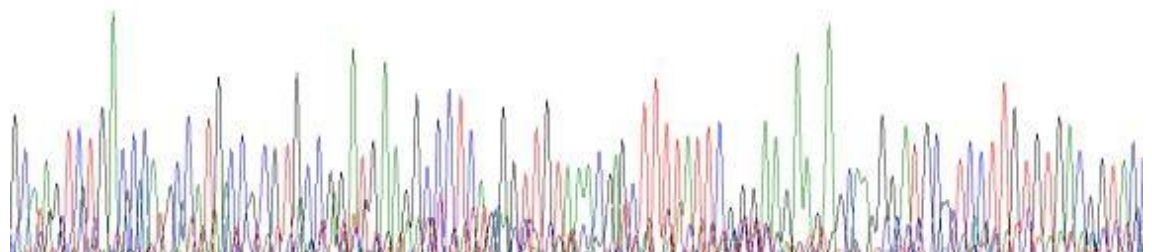
Sequence ID: [KU363016.1](#) Length: 1424 Number of Matches: 1

Range 1: 33 to 569 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
933 bits(505)	0.0	528/537(98%)	9/537(1%)	Plus/Plus
Query 1	CACCTTTTCGGGGTGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCCTTTACTACG	60		
Sbjct 33	CACCTTTTCGGGGTGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCCTTTACTACG	92		
Query 61	GAATAACGCAGGGAAAAC TTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAAGATTTATCG	120		
Sbjct 93	GAATAACGCAGGGAAAAC TTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAAGATTTATCG	152		
Query 121	GTAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC TACCAAGGC GAC	180		
Sbjct 153	GTAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC TACCAAGGC GAC	212		
Query 181	-----CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC T	231		
Sbjct 213	GATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC T	272		
Query 232	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC	291		
Sbjct 273	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC	332		
Query 292	CGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTTTTACCAGATGAAGATAATGACGG	351		
Sbjct 333	CGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTTTTACCAGATGAAGATAATGACGG	392		
Query 352	TAGTCGGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGC	411		
Sbjct 393	TAGTCGGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGC	452		
Query 412	TAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGGTATTTAAGTCAGGGGT	471		
Sbjct 453	TAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGGTATTTAAGTCAGGGGT	512		
Query 472	GAAATCCCGGAGCTCAACTCCGGAAC TGCCTTTGATACTGGGTACCTAGAGTATGGA	528		
Sbjct 513	GAAATCCCGGAGCTCAACTCCGGAAC TGCCTTTGATACTGGGTACCTAGAGTATGGA	569		

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340  
GCAAGTCTGACCCAGCCATGCCCGTGCCGGATGAAGGCCCTCA SGGTGTAAACGGCTTTTATTCGGKAAGAAKAGC A GGATGGGTCC TTG TGTGACGGTACI



10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 TAGC GCGC GACGGG TG AGT AACGCG TGGG AATAT GCCCT TTGCTACG G AATAG CCCC G G AACTG GG AGTAATACC GTATACGCCCT TTG GGG AAAAGATT

Dy

Sei

Rai

Sc

7E

Previous M

S

Que

Sbj

Que

Sbj

Que

Sbj

Que

Sbj

Que

Sbjct

Query

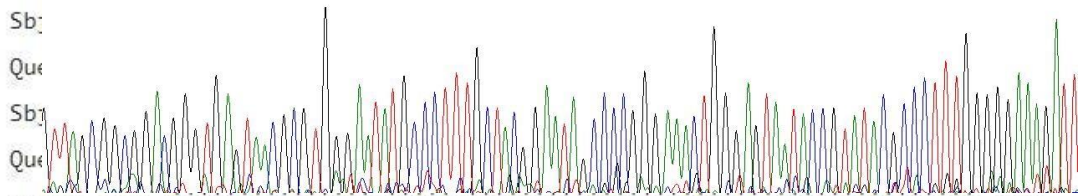
Sbjct

Query

Sbjct

Query

Sbjct



Sbjct 279 GCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATATTGGGCAATGGATGCAAGTCGACCC 338  
 Query 307 AGCCATGCCGCGTGCCGGATGAAGGCCCTCASGGTTGTAACCGGCTTTTATTCCGKAAGA 366  
 Sbjct 339 AGCCATGCCGCGTGCCGGATGAAGGCCCTCAGGGTTGTAACCGGCTTTTATTCCGGAAGA 398  
 Query 367 AKAGCA-GGATGCGTCCTTGTGTGACGGTACCSAATGAATAASCACCGGCTAACTCCGTG 425  
 Sbjct 399 AGAGCAGGGATGCGTCCTTGTGTGACGGTACCGAATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTG 458  
 Query 426 CCMGCARCCGCKGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATT 473  
 Sbjct 459 CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATT 506

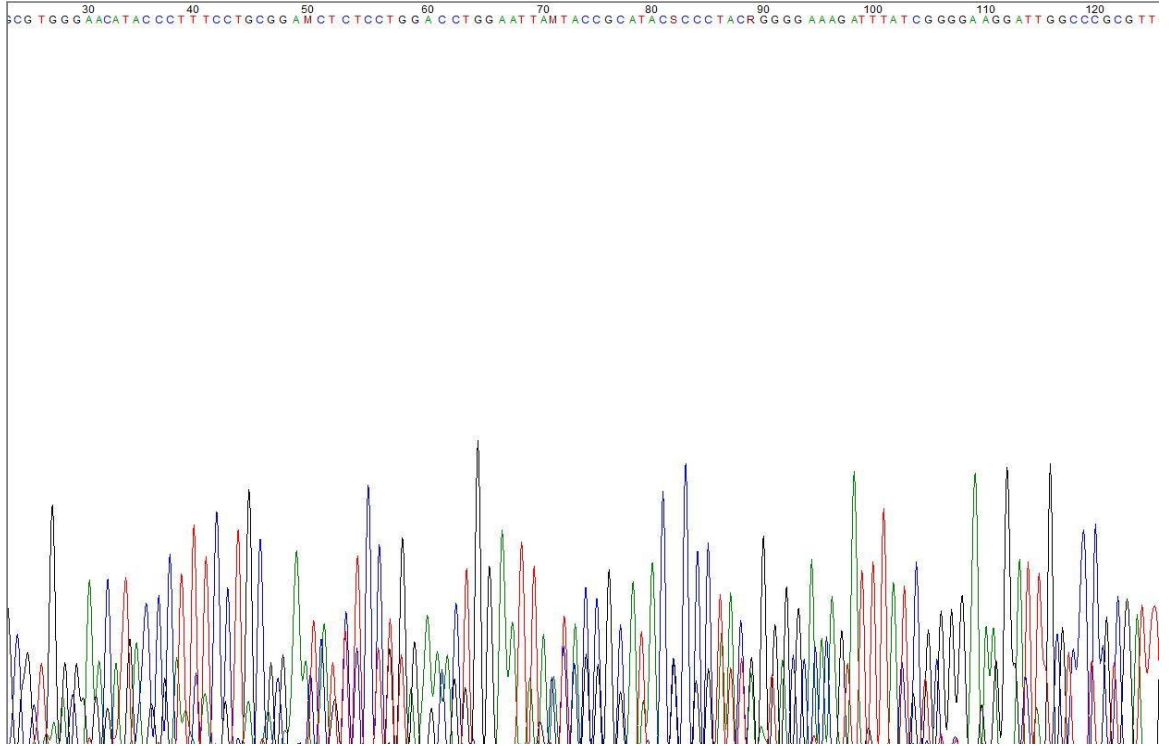
**Paracoccus sp. strain qiqihaer 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Sequence ID: [KX702234.1](#) Length: 1294 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 456 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
839 bits(454)	0.0	454/454(100%)	0/454(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATATGCCCTTTGCTACGGAATAGCCCCGG	60		
Sbjct 3	TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATATGCCCTTTGCTACGGAATAGCCCCGG	62		
Query 61	GAAACTGGGAGTAATACCGTATACGCCCTTTGGGGGAAAAGATTTATCGGCAAAGGATTAG	120		
Sbjct 63	GAAACTGGGAGTAATACCGTATACGCCCTTTGGGGGAAAAGATTTATCGGCAAAGGATTAG	122		
Query 121	CCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTG	180		
Sbjct 123	CCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTG	182		
Query 181	GTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC	240		
Sbjct 183	GTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC	242		
Query 241	AGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGCAACCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGAT	300		
Sbjct 243	AGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGCAACCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGAT	302		
Query 301	GAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAG	360		
Sbjct 303	GAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAG	362		
Query 361	AAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCC	420		
Sbjct 363	AAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCC	422		
Query 421	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACC	454		
Sbjct 423	GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACC	456		





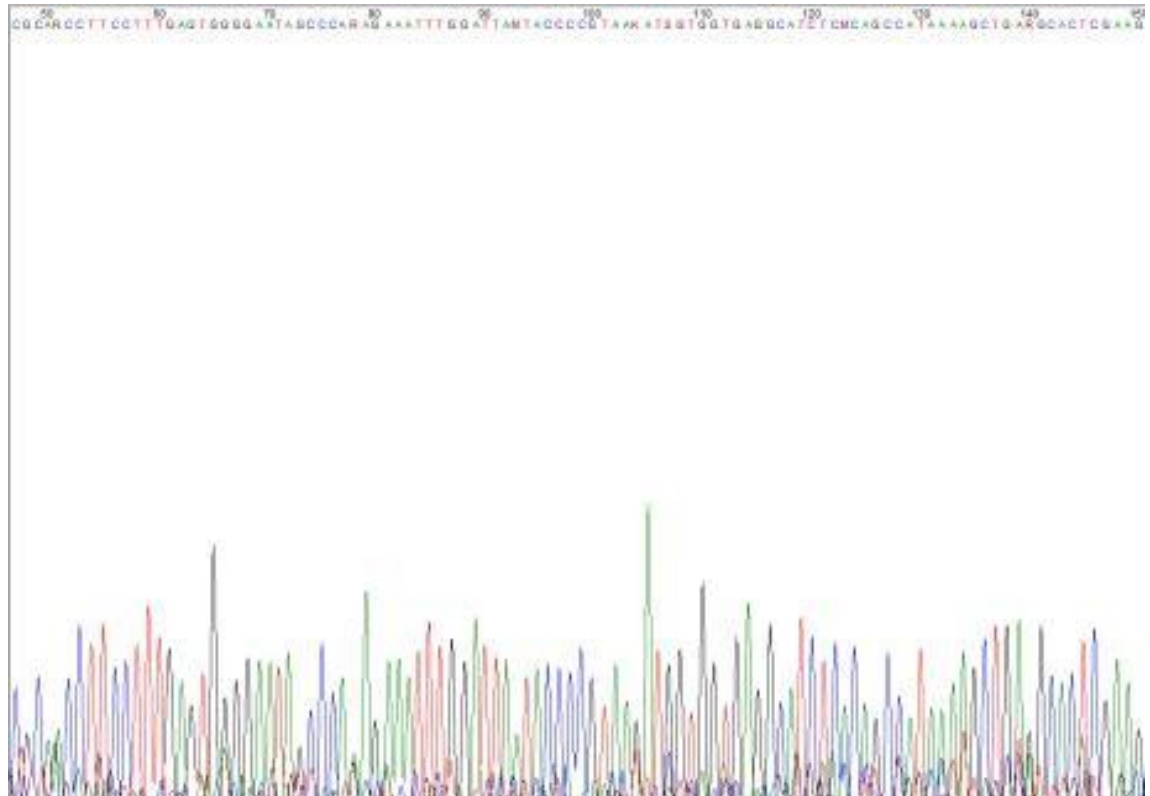
Uncultured *Pseudomonas* sp. partial 16S rRNA gene, isolate 45T\_24531

Sequence ID: [LT699113.1](#) Length: 753 Number of Matches: 1

Range 1: 355 to 523 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
195 bits(105)	1e-45	141/169(83%)	0/169(0%)	Plus/Plus
Query 197	GATCCWGCCCTGCCCCGGGTGTGAGGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTTCYYTTGGG			256
Sbjct 355	GATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAGGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG			414
Query 257	AKGAAGGRCaawaaryTAATACCTTGCTGTTTTGACSTTACCsayakaaTAARCACCGGC			316
Sbjct 415	AGGAAGGACAGTAAATTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGC			474
Query 317	TAACTCTGTGCCMRCMRCSCGGTAATACMGARGGKGMAGCGTTAATC			365
Sbjct 475	TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATC			523



**Chitinophaga cymbidii strain T58-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**  
 Sequence ID: [JN680879.1](#) Length: 1490 Number of Matches: 1

Range 1: 69 to 478 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
669 bits(362)	0.0	387/410(94%)	0/410(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGTGTAKSAATACACTGGCGGCGACCGGCAAACGGGTGCKGAACACGTACGCARCCTTCC			60
Sbjct 69	GGTGTAGCAATACACTGGCGGCGACCGGCAAACGGGTGCGGAACACGTACGC AACCTTCC			128
Query 61	TTTGAGTGGGGAATAGCCCARAGAAATTTGGATTAMTACCCCGTA AKATS SGTGGTGAGGC			120
Sbjct 129	TTTGAGTGGGGAATAGCC CAGAGAAATTTGGATTAATACCCCGTAAGATCGTGGTGAGGC			188
Query 121	ATCTCMCAGCCATAAAAAGCTGARGCACTCGAAGATGGGCGTGMGCCTGATTAKGTAGTTG			180
Sbjct 189	ATCTCACAGCGATAAAAAGCTGCGGCACCTCGAAGATGGGCGTGCCTGATTAGGTAGTTG			248
Query 181	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGCCSACGATCAGTAMCTGGMGTGAGAGCGGAC CAGT CAC			240
Sbjct 249	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGCCGACGATCAGTAACTGGCGTGAGAGCGGAC CAGT CAC			308
Query 241	ACGGGCACTGAGACACGGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCARTAAAGGAATATTGGTCAA			300
Sbjct 309	ACGGGCACTGAGACACGGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATATTGGTCAA			368
Query 301	TGGACGCAAGTCTGAMCCAGCCATGCCGCGTGGAGGATGAAGGTCTCTGGATTGTAWAC			360
Sbjct 369	TGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGGAGGATGAAGGTCTCTGGATTGTAAAC			428
Query 361	TTCTTTTATCTGGGAARAAATGTGCRTTTTCTAMTGTATTTGACGGTACC			410
Sbjct 429	TTCTTTTATCTGGGAAGAAATGTGCATTTTCTAATGTATTTGACGGTACC			478

## Anexo 3 Protocolo de purificación

### Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1330, A1340, A1460, A1465 AND A1470.

**Quick  
PROTOCOL**

#### Centrifugation Protocol

##### Production of Cleared Lysate

1. Pellet 1–10ml of overnight culture for 5 minutes.
2. Thoroughly resuspend pellet with 250µl of Cell Resuspension Solution.
3. Add 250µl of Cell Lysis Solution to each sample; invert 4 times to mix.
4. Add 10µl of Alkaline Protease Solution; invert 4 times to mix. Incubate 5 minutes at room temperature.
5. Add 350µl of Neutralization Solution; invert 4 times to mix.
6. Centrifuge at top speed for 10 minutes at room temperature.

##### Binding of Plasmid DNA

7. Insert Spin Column into Collection Tube.
8. Decant cleared lysate into Spin Column.
9. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature. Discard flowthrough, and reinsert Column into Collection Tube.

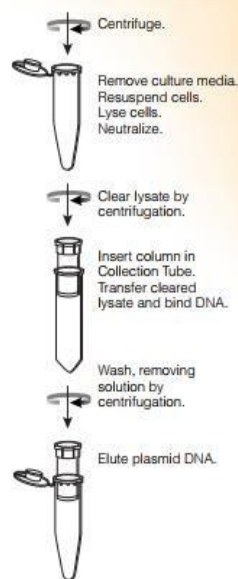
##### Washing

10. Add 750µl of Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at top speed for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert column into Collection Tube.
11. Repeat Step 10 with 250µl of Wash Solution.
12. Centrifuge at top speed for 2 minutes at room temperature.

##### Elution

13. Transfer Spin Column to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube, being careful not to transfer any of the Column Wash Solution with the Spin Column. If the Spin Column has Column Wash Solution associated with it, centrifuge again for 1 minute at top speed, then transfer the Spin Column to a new, sterile 1.5ml microcentrifuge tube.
14. Add 100µl of Nuclease-Free Water to the Spin Column. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature.
15. Discard column, and store DNA at –20°C or below.

##### Overnight culture



1581MB09\_9A

Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB225, available online at: [www.promega.com](http://www.promega.com)

#### ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

[www.promega.com](http://www.promega.com) • Phone 608-274-4330 • Fax 608-277-2601

©1999, 2001, 2002, 2005, 2009 Promega Corporation. All Rights Reserved.



**Promega**

Printed in USA. Revised 12/09  
Part #9FB004