



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
DESLIZANTES COMO ALTERNATIVA
BIOTECNOLÓGICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
PRESENTA:
PATRICIA GODÍNEZ ALEMÁN**



MÉXICO, D.F. CIUDAD UNIVERSITARIA, 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ

VOCAL: AURORA IRMA ORTEGÓN AVILA

SECRETARIO: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

1ER SUPLENTE: MARTHA GILES GOMEZ

2º. SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PARAMO RAMIREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE QUÍMICA

Asesor del Tema:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz _____

Supervisor técnico:

Dr. Fernando Montiel Aguirre _____

Sustentante:

Patricia Godínez Alemán _____

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-----------|
| 1. Resumen..... | 7 |
| 2. Generalidades..... | 11 |
| 2.1 Residuos Orgánicos, tratamiento y aplicaciones | 12 |
| 2.2 Polisacáridos de residuos orgánicos | 13 |
| 2.2.1 Celulosa | 13 |
| 2.2.1.1 Carboximetilcelulosa | 14 |
| 2.2.2 Almidón | 15 |
| 2.2.3 Pectina | 16 |
| 2.3 Enzimas hidrolíticas de polisacáridos | 16 |
| 2.3.1 Celulasas | 16 |
| 2.3.2 Amilasas | 17 |
| 2.4. Aplicaciones biotecnológicas de enzimas | 19 |
| 2.4.1 Producción de vino | 19 |
| 2.4.2 Textiles y lavandería | 20 |
| 2.5 Bagazos de desechos industriales de interés biotecnológico | 20 |
| 2.5.1 Manzana (<i>Malus pumila</i>) | 20 |
| 2.5.2 Pera (<i>Pyrus</i>) | 21 |
| 2.5.3 Papa (<i>Solanum tuberosum</i>) | 22 |
| 2.6 Biocombustibles | 22 |
| 2.6.1 Perspectiva de los biocombustibles | 24 |
| 2.6.2 Fermentación | 24 |
| 2.6.3 Sustratos más utilizados en la producción de etanol | 25 |
| 2.6.5 Tratamientos previos a la fermentación | 26 |
| 2.7 Microbiología del suelo e importancia de bacterias productoras de enzimas | 27 |
| 2.7.1 Bacterias deslizantes: Mixobacterias y Citofagas | 28 |
| 2.7.2 <i>Myxobacteriales</i> | 28 |
| 2.7.2.1 Comunicación y señalización (Quorum sensign) | 30 |
| 2.7.2.2 Formación de cuerpo fructífero | 32 |
| 2.7.3 <i>Cytophagales</i> | 34 |
| 2.7.4 Microorganismos productores de bioetanol | 35 |
| 3. Experimentación previa a esta tesis..... | 38 |
| 4. Objetivos..... | 40 |
| 5. Metodología..... | 42 |
| Diagrama General | 43 |
| 5.1 Cepas aisladas anteriores a este estudio | 44 |
| 5.2 Selección | 44 |
| 5.3 Determinación de crecimiento en medio rico en azúcares | 47 |

| | |
|---|------------|
| 5.4 Determinación de crecimiento en medios con CMC, almidón y pectina | 47 |
| 5.5 Producción de etanol (Método de microdifusión) | 47 |
| 5.6 Determinación de producción de etanol en sustratos complejos | 49 |
| 5.7 Determinación de condiciones de producción de etanol | 49 |
| 6. Capítulo 6. Resultados y discusión..... | 52 |
| 6.1 Selección e Identificación | 52 |
| 6.2 Tolerancia y producción de etanol, utilizando glucosa | 62 |
| 6.3 Determinación de crecimiento utilizando como sustrato polímeros puros | 67 |
| 6.4 Estudio de producción de etanol utilizando como sustrato los polisacáridos CMC, pectina y almidón y modificando condiciones de oxigenación | 68 |
| 6.5 Ensayos utilizando bagazos de pera, manzana y papa | 73 |
| 6.6 Estudio de producción de etanol utilizando bagazos de pera, manzana y papa, realizando la fermentación en condiciones de 28°C y microaefilia | 77 |
| 6.7 Estudio de producción de etanol utilizando bagazos de pera, manzana y papa y ajustando pH a 7 | 81 |
| 7. Conclusiones..... | 87 |
| 8. Perspectivas..... | 90 |
| 9. Referencias..... | 93 |
| 10. Anexos..... | 105 |

RESUMEN

RESUMEN

El incremento de la demanda energética por parte, sobre todo, del Primer Mundo es una realidad ineludible. Ante esta situación hay otra preocupación que está en boga en todo el planeta: el cambio climático. Sin embargo, al día de hoy, las energías no renovables continúan siendo las más utilizadas para generar tanto electricidad como en transporte. (García, C. 2008).

En el mundo se llevan gran cantidad de estudios para desarrollar la producción de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica, tales como, papel reciclado, residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hierba, fruta, etc.) así como residuos sólidos urbanos (Cardona, C. et al. 2005).

El principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima. El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente de una matriz de carbohidratos compuesta de celulosa y lignina enlazada por cadenas de hemicelulosa. El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca de grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. (Cardona, C. et al. 2005).

No obstante, durante largo tiempo se han estudiado cierto tipo de bacterias que juegan un papel importante en la degradación de macromoléculas insolubles, tales como, proteína, celulosa, almidón, peptidoglicanos, lípidos y ácidos nucleicos y aun poseen una gran batería de enzimas hidrolíticas. (Reichenbach, H. 2006).

Las mixobacterias y citofagas pertenecen al grupo de bacterias deslizantes y fructificantes de los suelos que generalmente se les detecta por la formación de cuerpos fructíferos sobre sustratos sólidos y se ha encontrado que son capaces de secretar enzimas y degradar macromoléculas orgánicas. (Wolfgang, D. 2000.)

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de este grupo de bacterias como posibles productoras de bioetanol, encontrar nuevas alternativas para dicha producción, ya que el microorganismo más utilizado para esta producción son las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y éstas, no poseen los enzimas necesarios para la degradación de carbohidratos complejos (como celulosa y/o almidón). Para la producción de bioetanol a partir de materias ricas en estos materiales se tiene que dar un tratamiento previo, lo cual, puede provocar degradación de los hidratos de carbono.

Lo que se intenta es determinar si las bacterias deslizantes obtenidas de muestras ambientales, y que posean una maquinaria enzimática que sea capaz de degradar hidratos de carbono complejos son posibles productoras de bioetanol, primeramente utilizando carbohidratos fácilmente fermentables (glucosa) y posteriormente determinar si pueden lograr producir etanol utilizando como fuentes de carbono fermentables, desechos de frutas. El cultivo *in vitro* de estos microorganismos podría servir como una fuente productora de bioetanol, llevando a cabo inicialmente la degradación de los polímeros, manteniendo presente que posean actividad celulolítica. El uso de sustratos complejos permitirá observar la posible capacidad degradativa de los polisacáridos presentes en la pared celular vegetal y posteriormente determinar si a partir de ellos pueden producir bioetanol.

Las mixobacterias y citofagas utilizadas en este trabajo fueron aisladas previamente en el laboratorio con base a su probable degradación de celulosa. Las cepas aisladas fueron clasificadas de acuerdo a criterios morfológicos. De las cepas seleccionadas seis corresponden al orden de las Cytophagales y nueve al orden de las Myxobacterales.

Se determinó el crecimiento variando las concentraciones de sustrato, glucosa (1, 2, 3, 10 y 15%) para poder determinar las mejores condiciones de crecimiento y/o producción de bioetanol *in vitro*.

Posteriormente se evaluó si estas cepas eran capaces de crecer en carboximetilcelulosa y almidón como única fuente de carbono.

Por último, con el fin de dar un tratamiento a los residuos generados por la industria alimentaria, se analizó el crecimiento, utilizando bagazo de manzana, pera y piel o cáscara de papa, como única fuente de carbono y posteriormente evaluando si había producción de bioetanol.

Con los bagazos de manzana, pera y papa) se modificaron las condiciones de aireación, pH y temperatura de fermentación, con la finalidad de determinar en qué condiciones se ve favorecida la producción de etanol.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

Anualmente, millones de toneladas de cereales y frutos son dañados por el clima, durante su transporte, durante su almacenaje o bien durante su procesado, lo que ocasiona que se conviertan en material de desecho no aceptable para su consumo o proceso directo (Godon, 1993). Sin embargo. Todo este desperdicio agrícola constituye una fuente potencial de energía renovable en alta abundancia y de muy bajo costo (Domínguez E.R.M., Wang R., Pacheco C.J.D. 2002).

Más de cinco millones de toneladas de residuos sólidos, gran parte de los cuales tienen su origen urbano, son anualmente aprovechados por la industria y la agricultura españolas gracias a una actividad recuperadora y recicladora que alcanza muchas veces su máxima eficacia cuando es llevada a cabo por los sectores más marginados de nuestra sociedad (del Val, Alfonso. 1996).

En la mayoría de las regiones de nuestro país, el desarrollo industrial y de las ciudades, trae consigo la generación de enormes volúmenes de desperdicios de calidad y composición muy variada, los cuales al ser mezclados, o por su descomposición, poseen un potencial de contaminación. Según el origen de la basura o residuos estos pueden ser calificados como residuos industriales o domiciliarios (Berent, Mario R. - Vedoya, Daniel E. 2005).

En España la cantidad de RSU generada por habitante y día es de alrededor de 1 kilogramo en las ciudades grandes y medianas, y algo menor en ciudades pequeñas y pueblos (Domínguez E.R.M., Wang R., Pacheco C.J.D. 2002).

Con relación a los residuos industriales en México, el mayor volumen se genera en las zonas industriales de Celaya, Salamanca, Irapuato y León. Se estima que en todo el estado se genera un volumen de 260,000 toneladas anuales, que corresponde al 3.25% del total nacional (Soto C. Ricardo. 2005).

2.1 Residuos Orgánicos, tratamiento y aplicaciones.

Residuos Sólido Urbano (RSU) es todo material que sea desechado por la población, pudiendo ser este de origen domestico, comercial, industrial, desechos de la vía publica, y que no sea considerado peligroso. (Berent, Mario R. - Vedoya, Daniel E. 2005).

Dentro de la industria alimentaria los residuos se clasifican en peligrosos o inertes atendiendo a su composición física. Los parámetros que definen la composición y la importancia del residuo son, entre otros: (Mundo Alimentario, 2009).

Es posible producir diferentes productos químicos de interés industrial en cantidades significativas a través de la biodegradación de productos y desechos agrícolas. Anualmente, millones de toneladas de cereales y frutos son dañados por el clima y durante su procesado, lo que ocasiona que se conviertan en material de desecho no aceptable para su consumo o proceso directo. Los cereales, sus derivados y los efluentes provenientes de su industrialización son considerados especialmente atractivos como materia adecuada para las *biorrefinerías* debido a su alto contenido energético, su abundancia y la disponibilidad de estos materiales todo el año (Domínguez E.R.M., Wang R., Pacheco C.J.D. 2002).

Los desechos orgánicos se componen principalmente de los residuos del procesamiento de frutas y vegetales. Los problemas del tratamiento de desechos son altos en la lista de problemas ambientales de la sociedad (Altadill C.R., Andrés P.A.M., 2009). Una posible respuesta sería el uso de microorganismos efectivos para detoxificar la tierra, descontaminar el ambiente y promover métodos altamente sustentables de tratamiento de desechos (Freitag David G. 2000).

Los materiales que en la actualidad pueden recuperarse para el reciclaje o reutilización son: materia orgánica (alimentos, poda y jardín), plásticos, metales, papel y cartón, etc. (Berent, Mario R. - Vedoya, Daniel E. 2005).

Los subproductos lignocelulósicos agrícolas son una buena y barata opción para las fibras de celulosa. Así mismo las biofibras también pueden utilizarse para producir combustible y productos químicos. Las fibras procedentes de fuentes lignocelulósicas se utilizan en varias aplicaciones tales como materiales de construcción, alimentación humana y animal. Productos químicos como metanol, etanol, carbón vegetal, ácido acético, por mencionar algunos, son también producidos a partir de la hidrólisis y fermentación de lignocelulosa (Reddy, N., Yang, Y. 2005).

2.2 Polisacáridos de residuos orgánicos

Los polisacáridos son polímeros de monosacáridos. Están compuestos de unidades glicosílicas en disposición lineal o ramificada (Fennema, O. 2000).

Se dividen principalmente en los siguientes grupos: celulosa, almidón, pectina. Los polisacáridos constituyen del 80 al 90% de los polímeros estructurales de la pared celular de plantas, los cuales son los componentes orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza y por consiguiente se encuentran en diferentes tipos de desechos principalmente generados por el procesamiento de frutas y verduras. (Álvarez V., Vázquez, A. 2003).

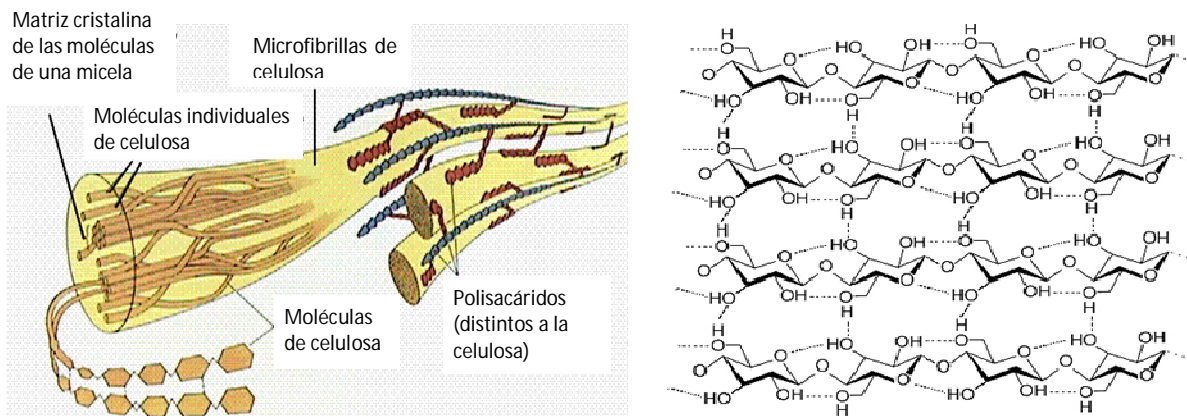
2.2.1 Celulosa

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la Tierra, y por tanto el carbohidrato más abundante. La razón para ello es que es el componente mayoritario de las paredes celulares de las plantas superiores.

La celulosa es un homopolímero de alto peso molecular, lineal, insoluble, de unidades β -D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos. Debido a su

linealidad y a su naturaleza estereorregular, las moléculas de celulosa se asocian entre sí a lo largo de grandes regiones, formando haces de fibras policristalinos. Es una hexosana que por hidrólisis da glucosa. Es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n= 200$.

Figura 1. Estructura de la celulosa y las fibras que formas en los vegetales



2.2.1.1 Carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa (CMC) es utilizada en la industria alimentaria en grandes cantidades y es una gran variedad de aplicaciones. Las moléculas de CMC son largas y bastantes rígidas, con carga negativa debido a los numerosos grupos carboxílicos ionizados que contienen (Fennema, O. 2000).

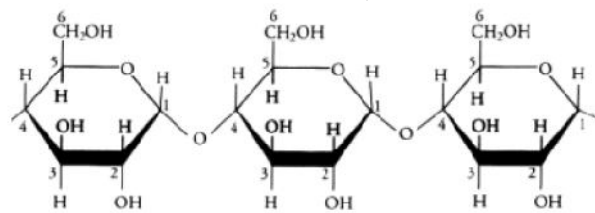
La CMC es utilizada en alimentos como agente auxiliar en el batido de helados, cremas y natas, como auxiliar para formar geles en gelatinas y pudines, como espesante en aderezos y rellenos, como agente suspensor en jugos de frutas, como coloide protector en emulsiones y mayonesas, como agente protector para cubrir la superficie de las frutas y estabilizador en productos listos para hornear. Debido a que la CMC no es metabolizada por el cuerpo humano ha sido aprobada su utilización en alimentos bajos en calorías (cita electrónica).

2.2.2 Almidón

El almidón es el principal polisacárido de reserva de los vegetales, se encuentra, principalmente, en semillas, frutos, legumbres, tubérculos y cereales. Está compuesto por la mezcla de dos polímeros: un polisacárido esencialmente lineal denominado amilosa y otro muy ramificado llamado amilopectina (Fennema, O. 2000).

Es un polímero de elevado peso molecular formado por una sucesión de moléculas de α -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y que se ramifica en determinados puntos de la cadena mediante enlaces α -1,6 (Latorre, L. 2008).

Figura 2. Estructura de la amilosa, polímero lineal de α -D-glucosa unidos por enlaces α -1,4.



En la mayoría de las aplicaciones, el almidón debe ser hidrolizado a glucosa, maltosa o maltodextrinas. Tradicionalmente, el almidón era procesado mediante hidrólisis ácida, pero este método presentaba numerosas desventajas (problemas de corrosión de los equipos, formación de numerosos subproductos por ser una hidrólisis no específica, procesos de purificación más complejos, etc.) que provocaban aumentos en los costes de elaboración. En la actualidad, debido al desarrollo biotecnológico, el procesado industrial del almidón a gran escala se basa totalmente en la utilización de enzimas (Van der Maarel et al., 2002, Crabb y Shetty, 1999).

2.2.3 Pectina

Las sustancias pécticas son polisacáridos de alto peso molecular, cargadas negativamente y ácidas. La cadena principal la componen residuos de ácido α -D-galacturónico unido por enlaces 1,4 (Fennema, O. 2000).

Las pectinas nativas que se encuentran en las paredes celulares y en los espacios intercelulares de todas las plantas terrestres son moléculas más complejas, que se convierten en los productos comerciales por extracción con ácidos. La pectina comercial se obtiene de las peladuras de los cítricos y de las manzanas (Ranveer Singh Jayani, et al. 2005).

2.3 Enzimas hidrolíticas de polisacáridos.

Los polisacáridos son más susceptibles a hidrólisis que las proteínas, y pueden por tanto en ocasiones sufrir despolimerización durante el procesado y/o almacenamiento de los alimentos. La hidrólisis de los enlaces glicosídicos que unen las unidades de monosacárido (glicosil) en los oligo- y polisacáridos puede ser catalizada tanto por ácidos (H^+) como por enzimas (Cardona Carlos, 2005). El grado de despolimerización, que tiene el efecto de reducir la viscosidad, viene determinado por la fuerza del ácido, el tiempo, la temperatura y la estructura del polisacárido. Los polisacáridos también están sujetos a la hidrólisis catalizada por enzimas. La velocidad y los productos de este proceso son controlados por la especificidad del enzima, el pH, el tiempo y la temperatura (Sánchez Oscar J. y Cardona Carlos A., 2005).

2.3.1 Celulasas

La investigación activa de celulasas y polisacaridasas comenzó en la década de 1950, debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en una fuente

más abundante y renovable, obteniendo glucosa y azúcares solubles (Bhat, M. 2000). Las celulasas tienen una amplia gama de aplicaciones potenciales en la biotecnología alimentaria. Al hidrolizarse la molécula de celulosa quedan disponibles las moléculas de glucosa que pueden emplearse como fuente de energía (M.K. Bhat, 2000).

Las enzimas que actúan sobre la celulosa y sobre los intermediarios de su degradación pueden dividirse en cuatro grupos (Fennema, O. 2000):

- Las endoglucanasas, hidrolizan las regiones amorfas de los sustratos. Hidrólisis al azar de enlaces β -glucosídicos, provocando rápida disminución de la viscosidad.
- Las celobiohidrolasas, son enzimas del tipo *exo*, degradan la celulosa amorfa por eliminación cuantitativa de celobiosa de los extremos no reductores de la celulosa.
- Las exoglucohidrolasas, hidroliza consecutivamente unidades de glucosa del extremo no reductor de las celodextrinas.
- β -glucosidasas, escinden la celobiosa hasta glucosa y eliminan la glucosa del extremo no reductor (Fennema, O. 2000).

2.3.2 Amilasas

El surgimiento de plantas de alcohol carburante de primera generación a partir de almidón, implica la transformación de la materia prima por procesos de hidrólisis mediante la acción de un complejo de amilasas capaces de degradarlo en azúcares (Ballesteros, M. 2008).

Las enzimas amilolíticas pueden clasificarse de diversas formas, por ejemplo, según el tipo de sustrato y el producto que originan se dividen en α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasas, pululanasas, isoamilasas, α -glucosidasas y

ciclodextringlicosiltransferasas (Keni Vidilaseris et al.,2009). Las endoamilasas degradan los enlaces glicosídicos α -1,4 que se encuentran en el interior de la molécula de amilosa y amilopectina, en este grupo destacan las α -amilasas que degradan el almidón de forma aleatoria generando oligosacáridos de longitud variable (Keni Vidilaseris et al.,2009). Las exoamilasas hidrolizan enlaces α -1,4 desde el extremo no reductor de la molécula, generando productos de bajo peso molecular, en este grupo se incluyen las β -amilasas que generan disacáridos de glucosa (maltosa), las α -glucosidasas y las glucoamilasas que generan residuos de glucosa. Las enzimas desramificantes, que engloban a pululanasa y isoamilasa, son enzimas que hidrolizan exclusivamente los enlaces α -1,6 (Okada S., Yokobayashi K., Sakano Y. y Kitahata S., 1988).

Las pululanasas, degradan los enlaces α -1,6 de glucógeno, amilopectina y pululano. Las isoamilasas degradan completamente el glucógeno y se distinguen de las pululanasas en que no tienen capacidad para degradar el pululano. Por último, las ciclodextringlicosiltransferasas degradan enlaces α -1,4 y son capaces de formar nuevos enlaces glicosídicos generando ciclodextrinas (Van der Maarel et al., 2002).

Las α -amilasas son proteínas multidominio que consisten en tres ámbitos principales, el dominio A, B y C. Unas pocas α -amilasas contienen el dominio adicional nombrado dominio de unión a almidón (SBD), que tiene la función de ligar a los gránulos de almidón. Las α -amilasas SBD se encuentran en bacterias y hongos (Keni Vidilaseris et al.,2009). Este dominio se localiza generalmente en el extremo C-terminal de las enzimas. Por otra parte, cabe señalar que hay pocas enzimas aminolíticas capaces de unirse y degradar el almidón en bruto sin un dominio funcional especializado. Las propiedades de las α -amilasas varían y reflejan el ambiente de crecimiento del organismo productor (Keni Vidilaseris et al.,2009).

2.4. Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas.

La producción de frutas y hortalizas requiere de métodos de extracción, clarificación y estabilización. Durante la década de 1930, cuando las industrias de frutas comenzaron a producir jugo, los rendimientos fueron bajos, y muchos encontraron dificultades en la filtración de los jugos de una claridad aceptable. Posteriormente, gracias a la investigación industrial sobre pectinasas, celulasas y hemicelulasas se obtuvieron enzimas de grado alimenticio de microorganismos tales como *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.*, lo cual ayudó a superar estas dificultades. (M. K. Bhat, M. 2000).

2.4.1 Producción de vino

En este proceso biotecnológico tanto las células de levadura como las enzimas desempeñan un papel clave. Tres enzimas exógenas son utilizadas en la producción de vino: pectinasas, β -glucanasas y hemicelulasas. Lo anterior trae como beneficios, mejorar la maceración y extracción de color, fácil clarificación y filtración, así como mejorar la calidad del vino. (M. K. Bhat, M. 2000).

El proceso de fermentación es llevado a cabo por medio de las levaduras cuando están vivas sin aire, son las responsables de descomponer el azúcar de la uva en alcohol y gas carbónico. Así pues las levaduras son los agentes de la fermentación y existe una gran cantidad de especies que se diferencian por su aspecto, propiedades y por la forma en que transforman el azúcar. Las especies más extendidas que se encuentran en casi todos los mostos son *Saccharomyces ellipsoideus*, *Kloeckera apiculata* y *Hanseniaspora uvarum*, las cuales representan por sí solas el 90% de las levaduras utilizadas para la fermentación del vino. Van adheridas al hollejo del grano de uva, las levaduras naturales (llamadas indígenas), hoy en bodega se agregan cepas de levaduras seleccionadas, para asegurar la fermentación óptima. Una vez que las levaduras han degradado el

azúcar y lo han transformado en alcohol y demás sustancias, mueren y forman un sedimento en el fondo (Hidalgo T. José, 2003).

2.4.2 Textiles y lavandería

Las celulasas han logrado su éxito a nivel mundial en productos textiles y ropa, debido a su capacidad de modificar las fibras de celulosa en una forma controlada y deseada, a fin de mejorar la calidad de los tejidos. Se introdujeron hace apenas una década y ahora se han convertido en el tercer grupo más grande de enzimas utilizadas en estas aplicaciones. Eliminan pequeñas fibras y dan mejor apariencia de brillo y color. (M. K. Bhat, M. 2000).

2.5 Bagazos.

Los materias primas para la producción de etanol fueron residuos orgánicos generados en el procesamiento de la elaboración de jugos de frutas, así como desechos de frutas a los cuales no se les da otra utilidad. Los bagazos utilizados fueron:

2.5.1 Manzana (*Malus pumila*)

Es el fruto del manzano, árbol de las rosáceas. Varios tipos de manzanos crecen en todo el mundo, pero se concentran principalmente en el hemisferio norte. La manzana es el fruto más ampliamente cultivado en EEUU. Las especies de *Malus pumila* las cuales desarrollaron las manzanas modernas, fueron originadas en el suroeste de Asia. Actualmente el principal proceso que se lleva a cabo con los cultivos de manzana, es la producción de sidra. (Root, W.H., 2005).

La producción anual de manzanas fue de alrededor de 45 millones de toneladas entre 2002-2003. Los países del hemisferio norte, particularmente China, EEUU,

Turquía y Polonia dominan el mercado de manzanas en el mundo. Las manzanas para entrar a procesamiento, deben de ser sanas, maduras, de tamaño razonable, y forma uniforme durante el pelado. Estas manzanas peladas son transformadas en trozos de manzana (cubos) en conserva, congelados y deshidratados, además de varios estilos de salsas de manzana (Root, W.H., 2005).

Existen más de mil variedades de manzanas en todo el mundo. La composición química de la manzana es aproximadamente: 85% agua, 10.5% carbohidratos, 2.3% fibra, 0.3% proteínas, 0.4% grasa y 0.2% cenizas (Root, W.H., 2005).

2.5.2 Pera (*Pyrus*)

La variedad más popular es la Bartlett. Poseen una buena textura y sabor, con un color brillante y una forma y tamaño uniformes. Se permite que los frutos lleguen a un buen tamaño pero mientras aún tienen una coloración verde y, posteriormente, se da la maduración en las cajas con un almacenaje con buena ventilación (Arthey, D.; Ashurst, P. 1998).

Las peras son clasificadas mecánicamente y antes de entrar al enlatado los trozos son sumergidos en una salmuera al 1.5% para prevenir oscurecimiento enzimático y posteriormente se debe aplicar un buen lavado para retirar el exceso de sal. Las peras contienen de 13-16°Brix y tienen un pH de 3.9 - 4.0 (Laszlo P. Somogyi, 1996).

Grados Brix: Es el por ciento de sólidos disueltos en un producto derivado de las frutas o de un líquido azucarado (NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y Derivados. Determinación de Grados Brix).

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en un jugo o pulpa expresados en porcentaje de sacarosa. Los sólidos solubles están compuestos por los azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en

agua presentes en los jugos de las células de una fruta. Se determinan empleando un refractómetro calibrado y a 20 °C (cita electrónica).

2.5.3 Papa (*Solanum tuberosum*)

Pertenece a la familia *Solanaceae*, cuyo nombre científico es *Solanum tuberosum*. Hoy en día la papa constituye un alimento fundamental en la dieta del hombre, además se emplea como planta forrajera e industrial suministradora de alimento para el ganado y de materia prima para la industria del almidón y del alcohol (Información agropecuaria 2010-cita electrónica).

La papa es una de las muchas fuentes para producir etanol. El problema, a nivel mundial, es que las materias primas que se usan como biocombustibles no son las ideales (Colegio de Ingenieros Agrónomos de Chile, 2010 - cita electrónica).

Los tubérculos de la papa, son ricos en almidón, el cual es el responsable de la mayor parte de la ingesta calórica de las personas. La papa tiene dentro de su composición sales minerales, se destacan el potasio, el sodio, magnesio y calcio, los cuales se encuentran en una proporción de 300, 5, 20 y 10 mg, por cada 100 gramos de tubérculo respectivamente, tiene fibra dentro de sus componentes, estas sustancias se encuentran entre el 1% y 3% (Colegio de Ingenieros Agrónomos de Chile, 2011).

2.6 Biocombustibles

El interés por el uso de materiales lignocelulósicos como materia prima en procesos de transformación por microorganismos es importante desde hace ya varias décadas (Hernández Nodarse M.T. 2001)

La alternativa de emplear residuos lignocelulósicos en la producción de etanol, constituye hoy día una posibilidad altamente prometedora por su amplia disponibilidad en el mundo. En este grupo de materias primas se ubica el bagazo

como residuo agroindustrial. La idea de producir etanol a partir de esta vía data de las décadas de 1940 y 1950 (Hernández M.T. 2007; García Camús, García Loborda, 2006).

Los biocarburantes son combustibles que pueden aplicarse a los motores de combustión interna utilizados por los vehículos actuales. Proceden de materias primas vegetales, razón por la que se les considera una energía renovable (Agroenergética-Vida Rural, 2006).

La biotecnología ofrece diversas opciones para la generación de energías renovables. Una de ellas es el bioetanol, producto de fermentación alcohólica de diversos materiales orgánicos a través de la acción de microorganismos, está siendo de nuevo seriamente considerada luego de la elevación de los precios del petróleo (Hernández M.T. 2007).

Una de las fuentes de energía que poco se menciona en los proyectos nacionales y que ha demostrado su factibilidad en otras regiones del mundo, es la producción de etanol. Desde el punto de vista industrial, trabajar en la producción de dicho producto es fundamental, pues el etanol no sólo es una fuente de energía sino una materia prima importante en la industria química, farmacéutica, agroalimentaria, etc. (H.J. Vázquez y O. Dacosta 2007).

El etanol además de poder mezclarse directamente con la gasolina o ser utilizado como combustible de automoción en estado puro, también puede incorporarse (como mejorador del índice de octano) a la gasolina tras haber sido transformado en ETBE (metil ter-butil éter, producto oxigenante con el que se reformulan las gasolinas en México desde 1989, y que ha permitido reducir las emisiones de CO₂, así como permitir la reducción de compuestos aromáticos como benceno, tolueno, etilbencenos y xilenos (Sánchez O.J., Cardona C.A. 2005.)) mediante su síntesis con el isobutileno (subproducto de la destilación del petróleo). La producción mundial de etanol como combustible fue, en el 2006, de cerca de

40.000 millones de litros. De esa cantidad, casi el 90% fue producido en Brasil y en Estados Unidos. (Ballesteros M.T. 2008; H.J. Vázquez y O. Dacosta 2007).

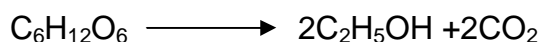
2.6.1 Perspectiva de los biocombustibles

Parece haber acuerdo entre los especialistas de que el actual modelo energético de nuestro mundo, basado en el uso de combustibles fósiles, tendrá que ser transformado en profundidad y en que el salto hacia fuentes energéticas menos contaminantes y descentralizadas va a exigir una gran movilización tecnológica y empresarial (Calcedo O.V. 2006).

La producción de bioetanol perdió importancia a finales de la primera mitad del siglo XX, al ser sustituida por la producción de etanol por vía sintética, a partir de derivados del petróleo, que resulta más barata, pero no puede ser utilizado en la preparación de alimentos, bebidas alcohólicas, ni medicamentos. La vía fermentativa de producción de etanol, es hoy competitiva porque es sostenible y se trabaja fundamentalmente en la búsqueda de materias primas baratas, que sustituyan a las tradicionales materias azucaradas, como melazas, productos intermedios de la producción de azúcar y jugos de frutas. El costo de producción del etanol esta íntimamente relacionado y es dependiente del costo de la materia prima puesta en fábrica, del volumen y de la composición de la misma (Hernández, M.T. 2007).

2.6.2 Fermentación

La fermentación alcohólica es una reacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de

alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues por ejemplo la levadura al mismo tiempo utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (H.J. Vázquez y O. Dacosta 2007).

Principales productos de la fermentación (Hernández M.T. 2007):

- Alcoholes: etanol, metanol, alcoholes alifáticos con más de 2 átomos de C, y alcoholes superiores (isobutanol, alcohol isoamílico, amílico, llamados genéricamente aceite de fusel).
- Aldehidos: primordialmente acetaldehido, ésteres, acetato de isobutilo y acetato de isoamilo.
- Ácidos orgánicos: Ácidos volátiles, fórmico, acético, propiónico, butírico y láctico y trazas de otros ácidos grasos. Ácidos tartárico y málico.
- Dióxido de Carbono.

2.6.3 Sustratos más utilizados en la producción de etanol

El bioetanol puede producirse a partir de cualquier materia prima orgánica que contenga cantidades significativas de azúcares (caña de azúcar y remolacha) o compuestos que puedan ser transformados en azúcares como el almidón (cereales) o la celulosa (Hernández M.T. 2007).

Una de las opciones para producir etanol es por fermentación a partir de materias primas ricas en carbohidratos (azúcar, almidón, celulosa, etcétera). Por tal razón, es común designar al etanol obtenido por esta vía “bioetanol”. Entre estas materias primas se encuentran las frutas y vegetales como la caña de azúcar y la remolacha, los cereales (trigo, maíz, sorgo), los tubérculos (papas, yuca) y en general, materias provenientes de lignocelulosas o de residuos orgánicos (H.J. Vázquez y O. Dacosta 2007).

Se definen 3 tipos de materias primas para la producción de etanol (Hernández, M.T. 2007):

- a) Materiales portadores de azúcares simples (como jugo de caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc.)
- b) Materiales amiláceos (como la yuca, maíz, papa, etc.)
- c) Materiales celulósicos (como el bagazo, la madera, residuos de industrias agrícolas y agroalimentarias, como elaboración de frutos secos o industria vinícola).

2.6.5 Tratamientos previos a la fermentación

Los materiales que más se han investigado como fuentes lignocelulósicas son madera, residuos forestales, papel reciclado, residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hierbas, frutas y paja), etc. Lo anterior hace a esta materia prima muy atractiva. No obstante, el principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima (Sánchez O.J., Cardona C.A. 2005). Tiene como objetivo desintegrar la matriz formada por celulosa, hemicelulosa y lignina. Se han propuesto varias formas de pretratamiento, sin embargo, ninguno de los métodos se puede aplicar en formas genéricas a las diferentes materias primas. Durante el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se forman, junto con los azúcares fermentables, gran cantidad de compuestos que pueden inhibir la fermentación subsiguiente (Ballesteros M., 2008). Las sustancias inhibitorias se originan como resultado de la hidrólisis de los diferentes componentes, de los ácidos orgánicos esterificados a la hemicelulosa, y de los derivados fenólicos solubilizados de la lignina. Así mismo, los inhibidores se forman a partir de productos de degradación de los azúcares solubles y de la lignina, por lo cual, dependiendo del tipo de pretratamiento e hidrólisis utilizado, es necesario llevar a cabo la destoxificación de las corrientes que van a ser sometidas a fermentación (Sánchez O.J., Cardona C.A. 2005).

2.7 Microbiología del suelo e importancia de bacterias productoras de enzimas.

La microbiología del suelo tradicionalmente ha estudiado los microorganismos y procesos en el suelo y de la interacción de los organismos con su entorno y la ecología del suelo. La bioquímica del suelo se refiere a las características y la dinámica de la materia orgánica y las transformaciones bioquímicas provocadas por las enzimas y microorganismos presentes en el suelo (Eldor A.P. 2007).

El suelo representa un complejo ecosistema en el cual las relaciones y las interacciones entre los microorganismos también son complejas. La diversidad microbiana es crítica para el funcionamiento del ecosistema debido a la diversidad de procesos como la descomposición, los ciclos de nutrientes, agregaciones en el suelo y la patogenicidad (Dubey, K.S. et al. 2006).

La materia orgánica en el suelo es reconocida como crucial para la calidad del suelo y para la regulación de muchas funciones. Existen tres clases de mecanismos que son considerados para estabilizar la materia orgánica del suelo: 1) la degradación de macromoléculas orgánicas específicas por microorganismos y enzimas, 2) estabilización química debido a varias interacciones de moléculas orgánicas, 3) protección física de sustratos orgánicos en contra del acceso de agentes degradadores (Ekscmitt, K. et al. 2005).

Los microorganismos necesitan producir exoenzimas que conviertan compuestos poliméricos, como la celulosa, lignina, pectina y hemicelulosa, en pequeñas moléculas que pueden ser asimiladas. Las enzimas más relevantes son las que rompen fibras de las plantas como celulasas, hemicelulasas, etc.

En varios grupos de bacterias se ha observado un quórum de detección (quórum sensing) que es un mecanismo de comunicación célula-célula en las bacterias y se refiere a que ciertos rasgos que solo son expresados cuando las bacterias se encuentran juntas (Von Bodman, S.B., et al 2003).

Un grupo de bacterias heterotróficas del suelo son las bacterias deslizantes como las mixobacterias y las citofagas; las mixobacterias, a diferencia de las citofagas, se distinguen por la formación de cuerpos fructíferos que pueden ser observados a simple vista; la formación de dichos cuerpos la llevan a cabo bajo estados de inanición para poder sobrevivir a condiciones extremas del ambiente (Reichenbach, H. 2001).

2.7.1 Bacterias deslizantes: Mixobacterias y Citofagas.

Las bacterias deslizantes son un grupo filogenéticamente heterogéneo, la característica que las define es que su movilidad es por deslizamiento. Principalmente existen dos tipos de bacterias deslizantes: el orden de los *Myxobacterales* y el orden de las *Cytophagales*, compartiendo ciertas características (Reichenbach, H., Dworkin, M. 1981).

Para el caso de las mixobacterias es importante la comunicación entre ellas en momentos de estrés (hambre o peligro por la presencia de otros microorganismos), al mantenerse comunicadas forman el quorum sensing, en el cual censan cuantas células deslizantes se encuentran para entonces empezar a señalizarse, formando el swarm y swarming para finalizar en la formación del cuerpo fructífero. Esto es de vital importancia, pues al encontrar cuerpos fructíferos las células que los forman poseen una gran maquinaria enzimática que posteriormente nos puede ser útil en el presente trabajo.

2.7.2 *Myxobacterales*

Las mixobacterias son bacterias Gram-negativas, que viven en el suelo y son famosas por tres capacidades: i) movimiento por deslizamiento, formando una película denominada enjambre o “swarm”; ii) tienen un sistema sofisticado de comunicación intercelular y alto desarrollo de vida social; iii) presentan una morfogénesis cooperativa inducida por condiciones de hambre y también

pueden producir cuerpos fructíferos (Wolfgang Dawid, 2000). Durante la maduración del cuerpo fructífero, las células vegetativas se convierten en mixosporas como forma de resistencia a la desecación. También presentan largos genomas (9500-10000 kpb) y su DNA contiene aproximadamente 66-73 mol% de G+C (Reichenbach, H. 1999).

Los principales hábitats de las mixobacterias son: suelo, estiércol, plantas en descomposición y corteza de arboles vivos y muertos. Las mixobacterias durante mucho tiempo han desempeñado un papel importante en la degradación de macromoléculas insolubles, tales como, proteínas, celulosa, peptidoglicano, lípidos y ácidos nucleicos, esto lo realizan mediante la excreción de una potente batería de enzimas hidrolíticas. Las mixobacterias producen una asombrosa cantidad de sustancias bioactivas, celulolítica, etc. (Shimkets L., Dworkin M. and Reichenbach, H. 2006).

El rango de pH de crecimiento es muy amplio, de 6.5-8.5. Solamente las mixobacterias celulolíticas pueden crecer a pH's ≤ 5.0 . La temperatura óptima es entre 32 y 37° C. El tiempo de generación se encuentran entre las 4 y 12 horas (Shimkets, L. 1990; Wolfgang, D. 2000).

Mixobacteria ha sido dividida en dos diferentes grupos basados en una exanimación morfológica de las células, esporas y colonias. En los miembros de las familias *Myxococcaceae*, *Archangiaceae* y *Cystobacteraceae*, sus células vegetativas son alargadas, delgadas y con los extremos afilados que cambian de forma durante la formación de las mixosporas; sus colonias absorben el colorante rojo Congo. Los miembros de la familia *Sorangiaceae*, también llamados *Polyangiaceae* son bacilos cortos, con extremos romos y la diferencia es mínima con respecto a sus mixosporas; los miembros de esta familia no absorben el rojo Congo (Shimkets, L. 1990).

2.7.2.1 Comunicación y señalización (Quorum sensign).

Existen diferentes formas de comunicación entre bacterias, básicamente estas se agrupan en dos: una es la comunicación vía péptidos y la otra es la comunicación a través de acil homoserina lactonas, lenguajes usados por bacterias Grampositivas y proteobacterias respectivamente (Lazazzera y Grossman, 1998), ambas moléculas son llamadas autoinductores.

En 1994, Fuqua y colaboradores usaron el término “quorum sensing” para describir un fenómeno dependiente de densidad celular. Este proceso está basado en la producción de moléculas que sirven como señales cuya concentración depende de la densidad del organismo que la produce (Waters C.M. and Bassler B.L. 2005). El quorum-sensing es producido por las bacterias liberando moléculas de señalización química, llamadas autoinductores, que son pequeñas moléculas secretadas por las bacterias y que son utilizadas para medir la densidad de población (Dale Kaiser, 2004). Las bacterias detectan una mínima concentración de dichos autoinductores y como respuesta al uso de estos sistemas de señalización, las bacterias sincronizan su comportamiento particular para generar la función de organismos multicelulares. Ahora puede empezar a entenderse que las bacterias se someten a complejos programas para generar un desarrollo análogo a los aspectos de los organismos eucariotas (Waters C.M. and Bassler B.L. 2005).

Existen al menos 5 señales de intercambio extracelulares denominadas ASG, BSG, CSG, DSG, y ESG, dos de estas señales, ASG y CSG, han sido químicamente caracterizadas y se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la agregación de fructificación temprana y en la morfogénesis del cuerpo (Dworkin, M. 1996). La señal A, parece ser la primera de las cinco señales que se ponen en juego, se produce en respuesta a una baja de nutrientes y luego funciona como monitor para difundir la densidad celular. La serie de eventos subsiguientes estarán permitidos sólo si se logra la densidad celular necesaria (Shimkets L., Dworkin M. and Reichenbach H., 2006).

Después de un periodo de hambruna, el comportamiento de “swarming” de las células vegetativas se ve limitado, y las células comienzan a congregarse en los centros de agregación. La agregación culmina 24 horas después del inicio de la inanición, con la formación del pajar en forma de cuerpos fructíferos multicelulares (Jelsbak L. and Søgaard-Andersen L., 1999).

El “swarm” a menudo presenta venas visibles, anillos, crestas o depresiones. Estos patrones pueden ser características para determinados grupos taxonómicos. El borde del swarm puede consistir en una sola capa de células, pero como regla general se compone de muchas capas que se acumulan rápidamente. El swarm de *Myxococcus* y *Corallocooccus* se desarrolla típicamente como venas serpenteantes, y generalmente permanece suave y viscoso (Shimkets L., Dworkin M. and Reichenbach H., 2006).

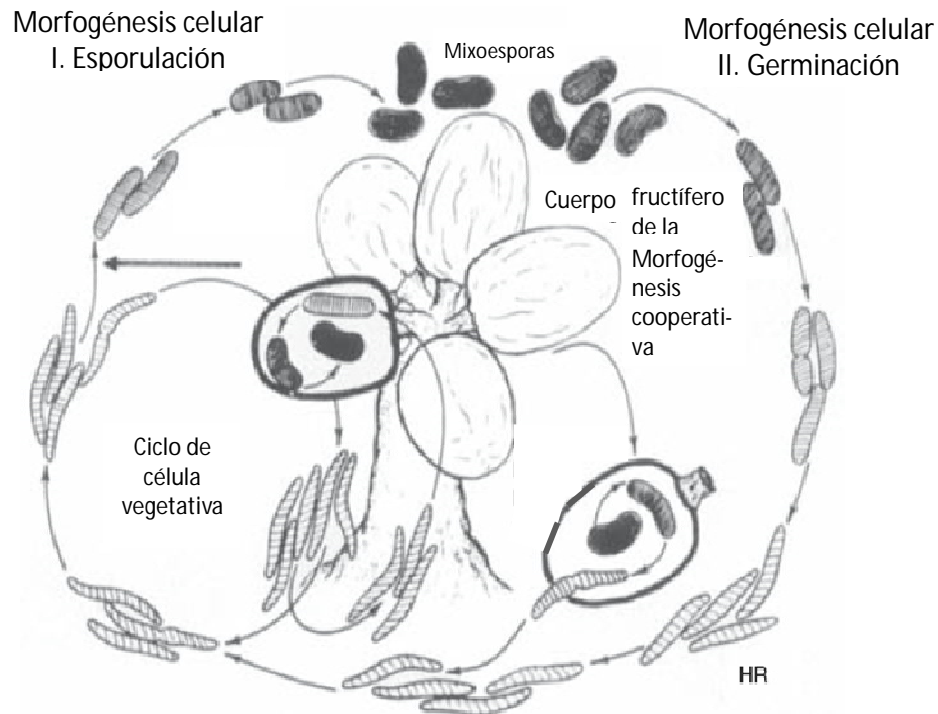
Un rasgo característico de las colonias mixobacteriales es su conducta de agregación, esto es, una difusión multicelular de mixobacterias en una zona no ocupada. Esta difusión se conoce como swarming y a la colonia se le llama swarm. La tasa de difusión depende del deslizamiento de las células; la motilidad de las mixobacterias está determinada por la temperatura, concentración de nutrientes y la densidad de células originales (Wolfgang D., 2000).

Estas bacterias se desplazan en la superficie sin tener flagelos, a dicha capacidad se le conoce como, *gliding*. La velocidad de deslizamiento de las células varía en función del sustrato y la temperatura, normalmente es entre 3 y 13 mm/min a 32°C. Las células de *Myxococcus xanthus* se deslizan sobre superficies sólidas a un ritmo de 1-2 mm/min (Shimkets L., Dworkin M. and Reichenbach H.,2006).

2.7.2.2 Formación de cuerpo fructífero

El cuerpo fructífero mixobacterial es la culminación del desarrollo de una serie de acontecimientos desencadenados por el cambio de nutrición y el medio ambiente físico (Dworkin, M. 1996). Los cuerpos de fructificación mixobacteriales incluyen varias formas, tales como, montículos, esferas, cilindros, y sus combinaciones (Dale Kaiser, 2004).

Figura 3. Morfogénesis celular en mixobacterias, tomando como ejemplo *Stigmatella aurantiaca*. (L. J. Shimkets, M. Dworkin and H. Reichenbach, 2006).

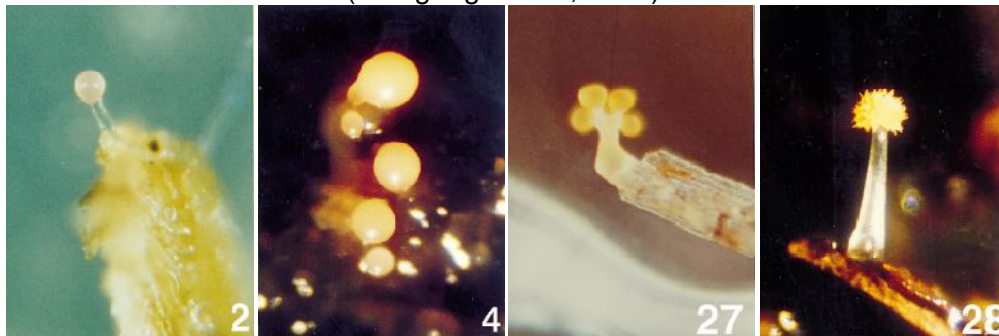


La morfogénesis del cuerpo fructífero es iniciada por la privación de nutrientes, y decenas de miles de células moviéndose directamente hacia una agregación discreta, donde se apilan una sobre otra hasta formar un montículo (Shimkets L.J. 1990).

Para la formación del cuerpo fructífero se requieren aproximadamente 10^5 células y la superficie de dicho cuerpo es sólida. Ya en el cuerpo fructífero, las células

toman forma de esporas como forma de resistencia al medio y son metabólicamente inactivas. Para la formación de cuerpo fructífero se requiere señalización química extracelular entre célula-célula (Garza A.G., Pollack J.S., Harris B.Z.,1998).

Figura 4. Ejemplificación de cuerpos fructíferos (foto 2: *Mx. stipitatus*; foto 4: *Mx. xanthus*; foto 27: *Sg. Aurantiaca*; foto 28: *Cm. Apiculatus*). (Wolfgang Dawid, 2000)



Dentro del cuerpo fructífero, se lleva a cabo una morfogénesis celular, donde los bacilos serán más cortos hasta formar esferas pequeñas, denominadas mixosporas. Y estas se encuentran rodeadas por una cápsula, alrededor del 75% de la cápsula es un polisacárido que consiste enteramente de galactosamina y glucosa, no obstante la pared celular se mantiene intacta durante la esporulación (Dworkin M., 2006). La función de las mixosporas es la resistencia a la desecación, temperaturas extremas, a la luz UV, permiten al organismo resistir condiciones ambientales extremas y persistir durante largos periodos en condiciones que pueden no ser óptimos para el crecimiento (Shimkets, L. 2006).

Se ha observado que algunas especies como las células vegetativas de *M. xanthus* contienen trehalosa, un carbohidrato de almacenamiento, que desempeña un papel importante en la resistencia al calor y la desecación. La trehalosa se metaboliza rápidamente en la germinación de la mixospora y por lo tanto puede servir a uno o ambos de dos funciones-como un protector del estrés en las esporas o como fuente de energía durante la germinación (Wolfgang D., 2000).

2.7.3 *Cytophagales*

Son bacterias deslizantes, unicelulares, Gram-negativas, aerobias, caracterizadas por una extrema flexibilidad; a diferencia de las mixobacterias, no llevan a cabo la formación de cuerpos fructíferos (Reichenbach H., Dworkin M. 1981). El movimiento característico de este tipo de células sobre las superficies sin la ayuda de flagelos, es un rasgo compartido por un gran número de bacterias que pertenecen a diferentes ramas del árbol filogenético (Mcbride M. J. and Kempf M.J, 1996). No hay formación de esporas (Stanier, R. 1940).

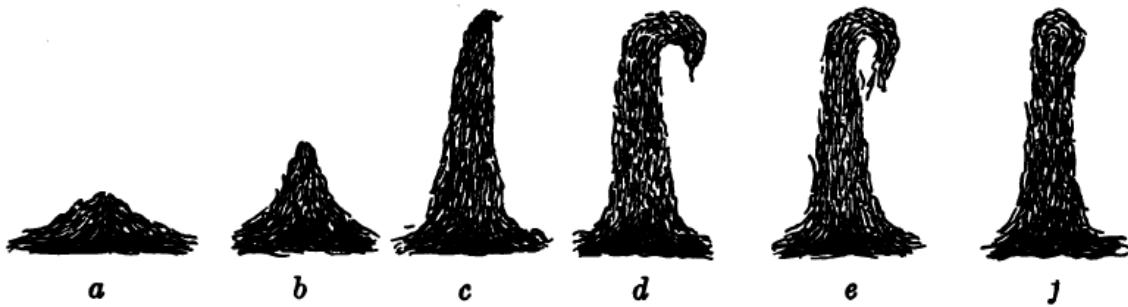
Winogradsky en 1929, en una amplia investigación de la descomposición aeróbica de celulosa en el suelo, aisló y estudió una serie de organismos que se asemejan morfológicamente a las células vegetativas de *Spirochaeta cytophaga* (Stanier, R. 1940).

El primero en demostrar la descomposición aeróbica de la celulosa por las bacterias fue Van Iterson en 1904 (Stainer, R. 1940). Las Cytophagas se han clasificado en tres ordenes: *Spirochaetales* (Hutchinson y Clayton), *Actinomycetales* (Bokor) y *Myxobacterales* (Krzemieniewska) (Stainer, R. 1940).

El tipo de movimiento es completamente diferente a la motilidad por flagelos en los *Eubacteriales*. Se trata de un proceso lento, incluso de deslizamiento en una dirección. La tasa de movimiento varía considerablemente (Lapidust I.R. and Howard C. B., 1982).

Un punto interesante es la coordinación aparente entre las diferentes células durante el movimiento, aunque no hay conexión física entre las células es evidente, la dirección y velocidad del movimiento. La ausencia de cuerpos fructíferos no se puede considerar un motivo suficiente para la exclusión de la *Cytophagas* de la *Myxobacterales* (Stanier, R. 1940).

Figura 5. Movimiento típico de la masa celular. a) muestra como se lleva a cabo la concentración de células en la periferia de la microcolonia. b-f) estados subsecuentes en la formación, movimiento migratorio y dirección de la masa celular (Stanier R. Y., 1940).



2.7.4 Microorganismos productores de bioetanol

El microorganismo más utilizado para la obtención de EtOH es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que convierte las hexosas en EtOH en condiciones anaeróbicas, generando 2 moles de compuesto portador de energía en los seres vivos, el adenosin trifosfato, por cada mol de hexosa consumida, además de 2 moles de EtOH. Este microorganismo tiene también la capacidad de convertir las hexosas en CO₂ aeróbicamente, por lo que en dependencia de las concentraciones de O₂ en el medio de cultivo y de la fuente de carbono, se puede favorecer uno de los dos procesos.

Entre las bacterias se encuentra *Zymomonas mobilis*, la cual convierte un mol de hexosa en 1 mol de EtOH, sin embargo, solo si el rango de sustratos fermentables es reducido solo a glucosa, fructosa y sacarosa. Se han evaluado otros microorganismos con capacidad de hidrolizar celulosa, entre los cuales se encuentran *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus*, pero su tasa de producción de EtOH a partir de glucosa es por lo menos 5 veces menor a la observada para *S. cerevisiae*. Por otro lado, se ha probado a *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. thermosacchatolyticum* y *C. thermocellum*, los cuales sintetizan hasta 2 moles de EtOH por mol de hexosa. No obstante, su tolerancia al alcohol es muy baja (Sánchez O. y Cardona C., 2005).

Características de los cultivos microbianos utilizados para producción de etanol, evaluando varios aspectos tales como (Hernández M. 2007): tolerancia al etanol, tolerancia a las altas temperaturas, tolerancia a altas concentraciones de azúcar, rendimiento alcohólico, eficiencia en la fermentación y productividad.

Experimentación Previa a esta tesis

EXPERIMENTACIÓN PREVIA

En el laboratorio donde se realizó el estudio de esta tesis (Laboratorio de Biología Molecular) entre los años 2007-2008, se realizó el estudio de bacterias deslizantes.

El primer estudio fue llevado a cabo por la QA. Ibeth Orozco, en el cual se realizó la selección e identificación de este tipo de bacterias.

El segundo estudio fue realizado por la QA. Sandra Chirinos, donde se lleva a cabo la caracterización inicial de actividad pectinolítica de mixobacterias y citofagas.

Con estos dos estudios se ha basado esta tesis, ya que a partir de la identificación y selección y posterior análisis de hidrólisis de sustratos poliméricos, se procedió a determinar la producción de etanol a partir de los hidrolizados de hidratos de carbono poliméricos, únicamente se partió de la idea de que las bacterias deslizantes pueden poseer la capacidad de romper enlaces poliméricos y a partir de estos llevar a cabo su alimentación y metabolismo.

Una vez determinado que poseen dicha capacidad (hidrolítica-celulolítica, aminolítica y/o pectinolítica) ahora se intenta determinar y cuantificar posibles metabolitos (en este caso específico es la cuantificación de etanol) desprendidos del metabolismo de hidratos de carbono poliméricos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- ★ Determinar si las bacterias deslizantes aisladas de muestras de suelo (tierra del bosque de tlalpan y mixquic) son capaces de producir etanol, utilizando como fuentes fermentables bagazos de frutas y/o verduras.

4.2 Objetivos Particulares

- ★ Aislar e Identificar bacterias deslizantes de diversas muestras ambientales.
- ★ Purificar las cepas aisladas.
- ★ Determinar las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias deslizantes aisladas.
- ★ Determinar presuntiva de cepas productoras de etanol utilizando glucosa.
- ★ Determinar la producción de etanol utilizando carboximetilcelulosa, pectina y almidón.
- ★ Determinar las condiciones óptimas para que las bacterias produzcan etanol.
- ★ Evaluar si las bacterias son productoras de etanol a partir de bagazos de manzana, pera y papa.
- ★ Cuantificar la producción de etanol con el método de microdifusión.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

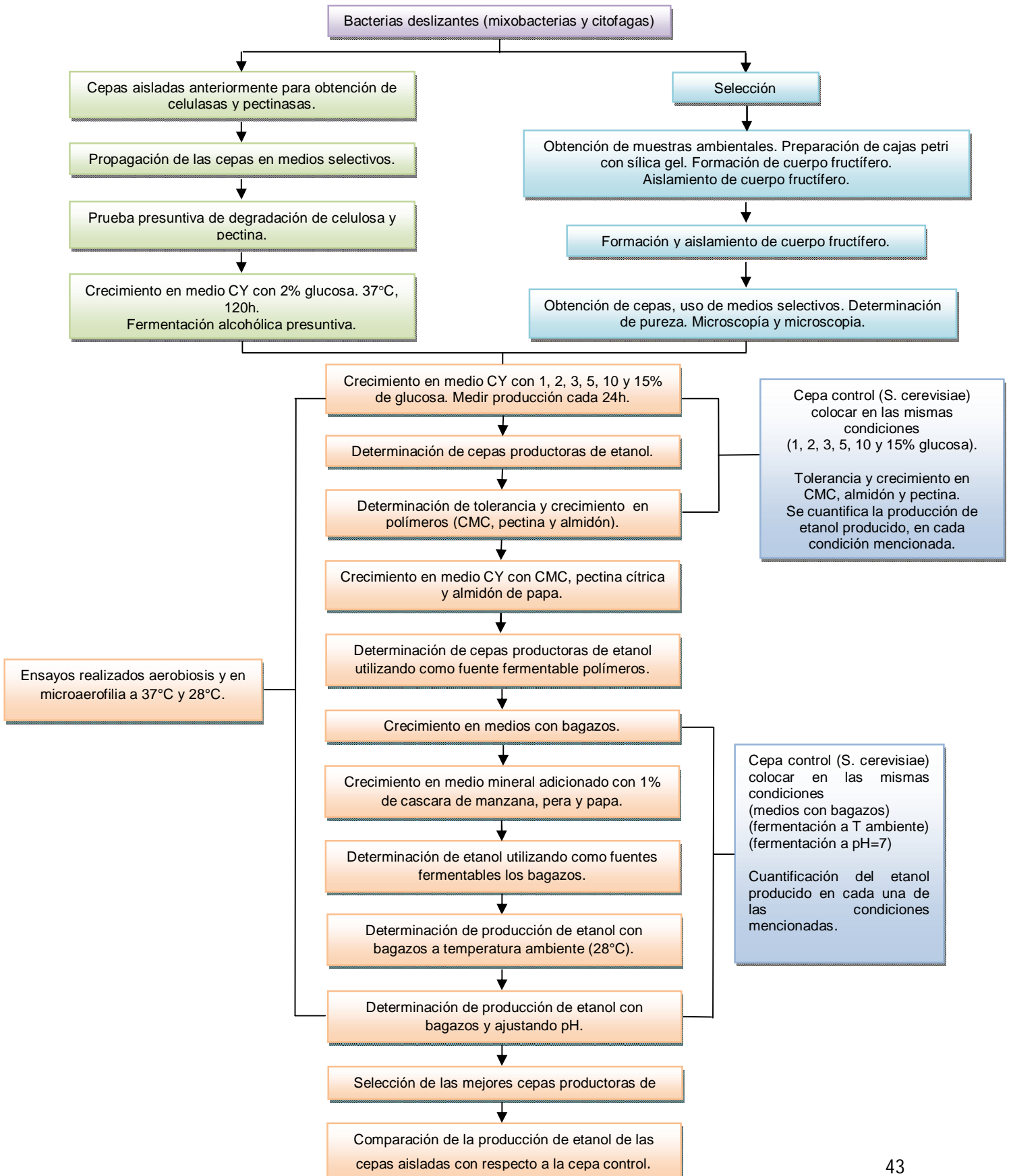
Se utilizaron cepas previamente aisladas en el laboratorio de suelos urbanos y semiurbanos y también se realizó el aislamiento de otras. Se decidió probar las cepas aisladas con anterioridad, porque éstas habían sido analizadas para degradación de celulosa, esto es que se analizaron para determinar actividad celulolítica y pectinolítica, lo cual sería de gran utilidad para los fines de esta tesis.

El aislamiento de cepas para los objetivos de esta tesis se realizó de diferentes muestras de suelos urbanos y semi-urbanos de la Cd. De México.

Se estudió primeramente el crecimiento de las bacterias en glucosa para después determinar si a partir de este sustrato eran capaces de producir etanol.

Posteriormente, se colocaron en sustratos como celulosa, pectina y almidón, y se determinó la capacidad de producción de etanol, así como la modificación de pH, y temperatura; los ensayos antes mencionados se realizaron tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, con la finalidad de determinar las mejores condiciones donde podrían ser capaces de producir etanol.

Diagrama general



5.1 Cepas aisladas anteriores a este estudio

Las cepas aisladas con anterioridad consideradas para el estudio actual (posible actividad productora de etanol) fueron tomadas en cuenta por la actividad pectinolítica que posiblemente llevan a cabo. Los análisis para la determinación de dicha actividad fueron: determinación de crecimiento en pectina como única fuente de carbono, evaluación de actividad pectinolítica (actividad exopectinolítica, endopectinolítica, evaluación cualitativa), evaluación de crecimiento en sustratos complejos, evaluación de actividad enzimática en sustratos complejos (actividad exopectinolítica y endopectinolítica). La actividad exopectinolítica fue cuantificada por el método de DNS, en tanto que la actividad endopectinolítica fue cuantificada por reducción de viscosidad. Estos mismos ensayos se realizaron para la determinación de actividad celulolítica, variando a carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.

De este estudio se rescataron las siguientes cepas con capacidad pectinolítica y celulolítica: γ a-1, 30, A2, T2', A3N, T21'. Se dan más detalles del suelo donde fueron aisladas, características del cuerpo fructífero y microscopía en el capítulo 5 Resultados y Discusión en la Tabla 2.

5.2 Selección

El aislamiento se realizó de diferentes muestras de suelos urbanos y semi-urbanos de la Cd. De México; dichas muestras fueron tratadas con Benomil (fungicida) y posteriormente se dejaron secar en estufa a 27°C durante 7 días. Una vez secas las muestras se guardaron en bolsas estériles a temperatura ambiente dentro del laboratorio hasta su uso.

Se colocan las muestras en cajas Petri con sílica gel como soporte y papel filtro como única fuente de carbono; se les agregó medio mineral adicionado con cicloheximida, para evitar el desarrollo de hongos. Se incubaron a temperatura

ambiente en cámaras húmedas durante 3 semanas. Se observaron con un microscopio de disección con un aumento de 10x cada 5 días para identificar la aparición de los cuerpos fructíferos. El criterio de aislamiento se basó en la búsqueda de cuerpos fructíferos y de las características macroscópicas con la ayuda de identificación de Reinchenbach (Reinchenbach, H. 1990). Se tomaron muestras de los cuerpos fructíferos para el caso de la mixobacterias y en las zonas donde se presentaba la presunta degradación de celulosa (del papel filtro) en el caso de la citofagas. Se sembraron hasta la obtención de colonias puras y aisladas.

La clasificación de las mixobacterias se basó principalmente en criterios morfológicos debido a que la información fisiológica está restringida a pocas cepas de mixobacterias. Por esta razón, para una clasificación inicial se evaluaron las características generales de los cuerpos fructíferos presentes color, tamaño y forma.

Las citofagas se identificaron según "The Shorter Bergy's Manual of Determinative Bacteriology".

Una vez aisladas se evaluó su morfología macroscópica y microscópica con ayuda de los siguientes criterios:

a) Morfología colonial.

Aislado el cuerpo fructífero se sembró en placas de agar McConkey para asegurar que se trataba de bacilos Gram negativos y se incubaron durante 24hrs. a 37°C, para posteriormente determinar la morfología colonial en medio selectivo para mixobacterias y citofagas.

Para determinar la morfología colonial se sembraron en medio agar CY (ver anexos); las características generales estudiadas fueron: forma de la colonia, del borde, aspecto, color y consistencia.

Se incubaron las placas del medio CY durante 24hrs. a 37°C. Para su conservación, se resembraron (una vez por semana) y posteriormente se mantuvieron en refrigeración.

b) Características microscópicas.

Con la finalidad de asegurar la pureza de las colonias aisladas y comprobar sus características microscópicas como mixobacterias se realizó una tinción de Gram. Las características micromorfológicas estudiadas fueron: forma de célula vegetativa y reacción a la tinción de Gram.

c) Identificación con ayuda de pruebas bioquímicas.

Se efectuaron diversas pruebas bioquímicas para caracterizar a las cepas aisladas, las pruebas bioquímicas se enfocaron en obtener información para bacilos Gram negativos como el uso de fuentes de carbono, degradación de polisacáridos. Además de determinar la resistencia a antibióticos.

Las pruebas bioquímicas realizadas son las sugeridas para los bacilos Gram negativos por McCurdy (1994) y el manual de Bergy's: fuente de carbono (manitol, sacarosa, citrato, glucosa, lactosa y galactosa), producción de H₂S, indol, urea, fenilalanina y reducción de nitratos, así como degradación de macromoléculas (agar, almidón, gelatina y celulosa) (ver anexos).

La resistencia a antibióticos se realizó con ayuda de antibiogramas (BioRad) por la técnica de difusión en agar con el método de Bauer-Kirby para bacilos Gram negativos. Se observaron halos de inhibición producidos tras la incubación de 24h

a 37°C en agar Mueller Hilton, el cual fue inoculado a partir de muestras procedentes del medio CY por extensión en placa; los antibióticos utilizados fueron: amikacina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, cloranfenicol, decloxacilina, enoxacina, eritromicina, gentamicina, netilmicina, penicilina y trimetoprim-sulfametoxazol.

5.3 Determinación de crecimiento con alta concentración de glucosa.

Para determinar el crecimiento en medio CY adicionado con diferentes concentraciones de glucosa, se inocularon las cepas en 25mL de medio CY más la concentración de glucosa correspondiente en matraces Erlenmeyer de 50mL, se incubaron a 37°C por 24h con agitación; el inóculo inicial fue de 1×10^5 cel/mL obtenidas de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, cuantificadas indirectamente por densidad óptica a $\lambda = 660\text{nm}$ en espectrofotómetro modelo Pharmacia LKB Ultrospec III UV/visible.

5.4 Determinación de crecimiento en medios con CMC, almidón y pectina.

Para determinar el crecimiento en medios con polímeros, se aplicó 1% del sustrato. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 50mL, inoculando en 25mL de medio y utilizando como inóculo inicial 1×10^5 cel/mL obtenidas de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, cuantificadas indirectamente por densidad óptica a $\lambda = 660\text{nm}$ en espectrofotómetro modelo Pharmacia LKB Ultrospec III UV/visible.

5.5 Producción de etanol (Método de microdifusión).

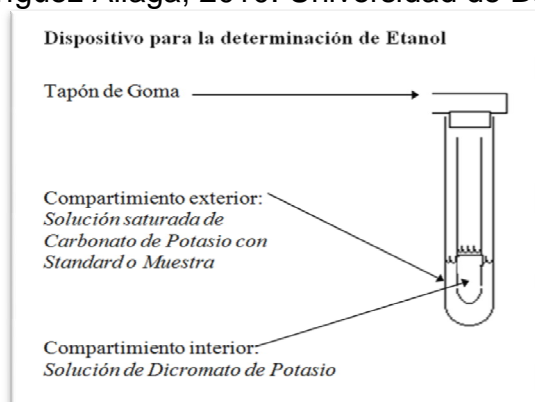
Para determinar la producción de etanol se llevó a cabo por el método de microdifusión establecido en la Técnica de Rodríguez Aliaga, 2010. Universidad de Bolivia.

Este método se basa en que si una sustancia volátil y un solvente puro se mantienen en compartimientos separados pero en contacto con la misma atmósfera, el soluto volátil tenderá a disolverse en el solvente puro.

El soluto volátil pasará de la solución original hacia la atmósfera para luego disolverse en el solvente originalmente puro. Finalmente, esto implicará una difusión del soluto desde la solución original al solvente. Este proceso ocurrirá hasta alcanzar el equilibrio pero, si en lugar del solvente puro utilizamos una sustancia que convierta al soluto volátil en no volátil, la difusión ocurrirá hasta que la presión de vapor en la atmósfera compartida tienda a cero.

Se cuantificó el etanol producido en las fermentaciones por el método de microdifusión. El ensayo se realizó en dos tubos colocados uno dentro del otro. En el compartimiento exterior (cámara de Conway) se colocó 0.5 ml de solución saturada de carbonato de potasio. Por otro lado se preparó el compartimiento interior (tubo de ensayo 13 x 100) que contenía 1.0 ml de solución de dicromato de potasio 0.145 % en ácido sulfúrico 10 N y se colocó dentro de la cámara de Conway con la ayuda de una pinza. Una vez preparado el dispositivo se agregó al compartimiento exterior 0.1 ml de solución standard o muestra y se tapó. Se incubó 60 min a 45°C, se sacó el tubo de ensayo y se le agregó 0.5 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 450 nm.

Figura 6. Esquema de realización del método de Microdifusión (Rodríguez Aliaga, 2010. Universidad de Bolivia).



5.6 Determinación de producción de etanol en bagazos de manzana, pera y papa.

Primeramente los bagazos se obtuvieron de la siguiente manera: se visitaron juguerías de algunos mercados localizados al sur de la Ciudad de México, de aquí se obtuvieron los bagazos obtenidos de manzana y pera. Únicamente hacían pasar los frutos por el extractor y el jugo obtenido era para el consumidor y el bagazo sería utilizado para este estudio. Se colocaron los bagazos en bolsas estériles, se colocaron en hieleras y a continuación se colocaron en el refrigerador para su posterior uso, el cual jamás sobrepasó las 24 horas.

En cuanto al bagazo de papa, se visitaron locales donde el punto de venta fueran papas fritas, de esta manera los desechos para estos vendedores serían las cáscaras de las papas, se recolectaron en bolsas estériles, se colocaron en hieleras y se llevaron inmediatamente al laboratorio. Para la obtención del bagazo de papa, las cáscaras obtenidas en el mercado, se hicieron pasar por una licuadora (en la cual el vaso fue esterilizado) y se le adicionó 100mL de medio mineral por cada 5 gramos de cáscaras.

Posteriormente para llevar a cabo las fermentaciones se inocularon las cepas en medio mineral adicionando 1% del sustrato complejo (bagazo), en este caso, bagazo de manzana, pera y papa, el inóculo inicial fue de 1×10^5 cel/ml; la continuación se incubaron a 37°C por 24h. Para cuantificar la producción de etanol, se utilizó el método de microdifusión.

5.7 Determinación de condiciones óptimas para la producción de etanol.

Para determinar en qué condiciones se llevaba a cabo mayor producción de etanol, se realizaron los ensayos en aerobiosis y manteniendo agitación (450 rpm) y para el caso de los ensayos en microaerofilia a los matraces inoculados con las

respectivas cepas se les extrajo el aire por medio de un dispositivo conectado a vacío y se dejó estático. Ambos ensayos se realizaron a 37°C y 28°C y manteniendo monitoreo cada 24h hasta completar 72h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Selección

La selección de las cepas aisladas se basó en las características presentadas desde la aparición de cuerpos fructíferos o lugares degradados de celulosa en las Cajas Petri con sílica gel. Se tomaron en cuenta las características macroscópicas y microscópicas siguiendo los criterios morfológicos de Reinchbach (1990) para identificar el género al que pertenecen las cepas. De las cepas aisladas 6 provenían de la degradación del papel filtro sin formación de cuerpo fructífero y 9 con formación de cuerpo fructífero.

Figura 7. Representación del porcentaje de mixobacterias y citofagas aisladas.

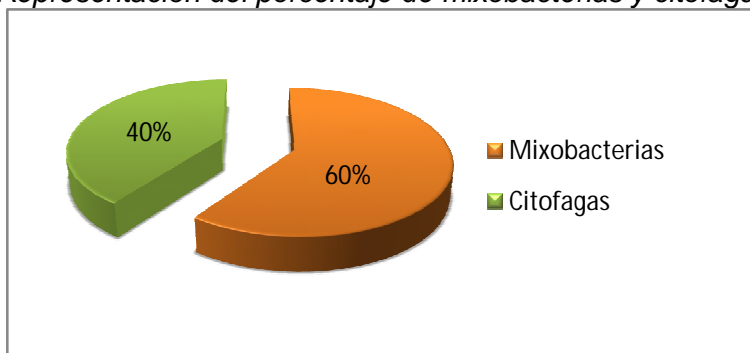


Figura 7. Representación del porcentaje de bacterias deslizantes aisladas de suelos urbanos y semiurbanos.

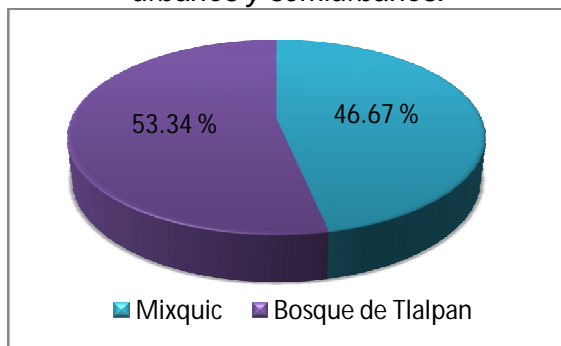


Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas.

| Origen muestra ambiental | Características del cuerpo fructífero | Posible grupo deslizante | Morfología y Tinción de Gram | Clave asignada |
|---------------------------------|---|---------------------------------|---|-----------------------|
| Mixquic | Esferillas de color beige opaco. | Citofaga | Bacilos largos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | 2 |
| Mixquic | Degradación de papel filtro (no se observó cuerpo fructífero). | Citofaga | Bacilos medianos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | γa-1 |
| Mixquic | Esferillas muy pequeñas de color beige opaco. Con volumen deficiente. | Citofaga | Bacilos largos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | 30 |
| Tlalpan | Formación de esferillas con tallo pequeño y delgado, color anaranjado claro, con brillo muy ligero. | Mixobacteria | Bacilos largos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | Benc |
| Tlalpan | Degradación de papel filtro (no se observó cuerpo fructífero). | Citofaga | Bacilos medianos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | A3N |
| Mixquic | Esferas con volumen bien definido, color amarillo cremoso, sin brillo. Abundantes. | Mixobacteria | Bacilos medianos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | 4 |
| Tlalpan | Esferillas color amarillo transparente, brillosas, en forma de hongo. | Mixobacteria | Bacilos largos, y delgados, puntas redondas, formando largas cadenas. Gram negativos. | T21' |
| Tlalpan | Degradación de papel filtro y coloración ligera café, acentuándose en el borde (no se observó cuerpo fructífero). | Citofaga | Bacilos medianos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | 32 |
| Mixquic | Formación de esferas con tallos ligeramente gruesos, color café claro, opaco. | Mixobacteria | Bacilos medianos, y delgados. Gram negativos. | H11 |

| | | | | |
|---------|--|---------------|--|-----|
| Tlalpan | Esferas blanquizas, con brillo. | Mixobacteria | Bacilos medianos, y delgados, puntas redondas. Gram negativos. | A2 |
| Mixquic | Degradación de papel filtro y coloración ligera amarillenta, acentuándose en el borde (no se observó cuerpo fructífero). | Citofaga | Bacilos medianos, y delgados. Gram negativos. | H2 |
| Tlalpan | Cuerpos en forma ovoide, anaranjados, muy brillantes y apilados entre ellos. | Mixobacteria | Bacilos medianos, y delgado. Gram negativos. | Ai |
| Mixquic | Forma amorfa, color negro, opaco. | Mixobacteria | Bacilos muy largos, y delgados, formando largas cadenas. Gram negativos. | T2' |
| Tlalpan | Varias esferillas ligadas por filamentos a un tallo en común, color amarillo-anaranjado. | Mixobacteria | Bacilos muy largos, y delgados, puntas redondas, formando largas cadenas. Gram negativos. | B |
| Tlalpan | Esferas ligeramente amarilla-anaranjada, brillo ligero. | Mixobacterias | Bacilos medianos, y delgados, puntas redondas, forman cadenas largas y otras agrupaciones. Gram negativos. | 1a1 |

La evaluación de las características microscópicas se realizó por medio de la tinción de Gram.

De las cepas antes mencionadas, se realizó una prueba inicial de producción de etanol, para seleccionar y así utilizar aquellas que produjeran una mayor cantidad por lo cual únicamente se trabajó con las siguientes cepas: B, 4, T2', 1a1, Ai, A2, Benc, T21' y 2. De estas cepas, menciono a continuación las características morfológicas y bioquímicas.

a) Morfología colonial.

La tabla 3 muestra las características de las colonias puras de mixobacterias y citofagas aisladas en el agar CY, tales como textura, bordes, elevación, forma y color de las colonias desarrolladas por cada cepa sembrada.

Tabla 2. Características morfológicas coloniales de las cepas seleccionadas.

| Cepa | Textura | Bordes | Elevación | Forma | Color |
|-------------|----------------|---------------|------------------|-------------------|--------------------------------|
| Benc | Butirosa | Entero | Plana | Circular | Beige claro, concentro blanco |
| B | Cremosa | Entero | Convexa | Puntiforme | Beige transparente |
| 1a1 | Butirosa | Ondulado | Elevada | Circular | Beige claro opaco |
| T21' | Butirosa | Entero | Convexa | Puntiforme | Blanco brillante |
| T2' | Cremosa | Ondulado | Plana | Circular pequeñas | Blanco opaco |
| Ai | Butirosa | Ondulado | Elevada | Circular medianas | Blanco transparente con brillo |
| 4 | Butirosa | Ondulado | Convexa | Circular pequeña | Blanco transparente opaco |
| A2 | Butirosa | Ondulado | Plana | Circular grande | Beige claro opaco |
| 2 | Cremosa | Ondulado | Elevada | Circular mediana | Blanco transparente con brillo |

b) Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas

La tabla 4 muestra los resultados de las 9 cepas en las pruebas bioquímicas que se les realizaron, ya que a las mixobacterias y citofagas no se les clasifica de acuerdo a la obtención de resultados bioquímicos, únicamente se realizaron para poder determinar algunas características de las cepas aisladas y así poder mantener la información para posibles estudios posteriores, así como caracterización de las bacterias.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas asiladas.

| Prueba bioquímica | Cepa | | | | | | | | |
|-----------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|----|------|------|-------|
| | B | 4 | T21 | 1a1 | Ai | A2 | Benc | T21' | 2 |
| Producción H ₂ S | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Indol | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Movilidad | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Urea | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Citrato | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fenilalanina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| O/F | O/F | O/F | O | O/F | O/F | O | O | O | O |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fuente de Carbono | | | | | | | | | |
| Manitol | + Gas | - | - | - | - | - | + | - | + Gas |
| Sacarosa | + Gas | + | + | + | + | + | + | + | + Gas |
| Sorbitol | + Gas | - | - | - | - | - | - | - | + Gas |
| Galactosa | + Gas | + | + | + | + | + | + | + | + Gas |
| Glucosa | + Gas | + | + | + | + | + | + | + | + Gas |
| Lactosa | - | - | - | - | - | - | - | - | + Gas |
| Degradación de: | | | | | | | | | |
| Gelatina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Agar | + | - | + | - | - | + | + | - | + |
| Almidón | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| CMC | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

De los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas, tenemos que la mayoría fue incapaz de crecer utilizando sorbitol y lactosa como fuente de carbono, en tanto que lograron un mejor crecimiento en sacarosa, galactosa y glucosa.

Ninguna de las cepas fue capaz de la hidrolizar gelatina, en cambio el almidón y la celulosa si fueron degradados.

c) Prueba de resistencia a antibióticos

Como nos indica la literatura, las bacterias analizadas en este estudio (mixobacterias y citofagas) presentan resistencia a diferentes antibióticos, por tal motivo se realizaron estas pruebas, para confirmar la presencia de resistencia a antibióticos.

Tabla 5. Prueba de sensibilidad a antibióticos realizadas a las cepas aisladas.

| Antibiótico | Cepa | | | | | | | | |
|-------------|------|---|-----|-----|----|----|------|------|---|
| | B | 4 | T21 | 1a1 | Ai | A2 | Benc | T21' | 2 |
| AM | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| AK | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| CB | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CF | + | - | - | + | - | - | + | - | + |
| CFX | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| NET | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| CPF | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| NOF | + | - | + | + | - | - | + | + | + |
| CL | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| GE | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| SXT | + | + | - | + | + | - | + | + | + |

Notas: (+) en la prueba de sensibilidad a antibióticos significa inhibición del crecimiento.

AM = Ampicilina; AK=Amikacina; CB = Carbenicilina; CF = Cefalotina; CFX = Cefotaxima;

NET = Netilmicina; CPF = Ciprofloxacina; NOF = Norfloxacina; CL = Cloranfenicol;

GE = Gentamicina; SXT = Sulfametoxazol/Trimetoprim.

En cuanto a la sensibilidad a antibióticos, notamos que las cepas aisladas son resistentes en promedio a 5 antibióticos, por lo cual, ya son consideradas multiresistentes, esta característica es muy importante en caracterización, clasificación y posibles aplicaciones futuras. Y también con estas pruebas confirmamos que se trata de mixobacterias y citofagas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere la siguiente clasificación para las nueve cepas aisladas de suelos urbanos y semiurbanos:

Las cepas nombradas “Benc” y “T₂₁” son bacilos Gram negativos, largos (~1.5µm), formaron cuerpos fructíferos en forma globular con tallo, simulando un hongo, presentando coloraciones amarillo-anaranjado con brillo, las diferencias en la coloración del cuerpo fructífero se deben a la diferencia a la exposición a la luz durante el desarrollo. Estas características y tomando en cuenta las pruebas bioquímicas sugieren que estas cepas posiblemente se traten de **Melittangium lichenicola** o **Melittangium boletus**. Cabe mencionar que la cepa denominada “Benc” presentó fermentación en las características bioquímicas, por lo cual especulo que se trate de una productora de etanol.

La cepa nombrada “T21” presentaba cuerpo fructífero de forma amorfa, color negro, opaco, u al realizar tinción de Gram son bacilos Gram negativos largos y delgados, formando largas cadenas, por las características del cuerpo fructífero se sugiere que esta cepa de trate de **Cystobacter fuscus**.

La cepa que se nombró “B” presentó un cuerpo fructífero formado por varias esferillas ligadas por filamentos a un tallo en común, color amarillo-anaranjado, dicha característica muy propia de **Stigmatella aurantiaca**, por lo cual se hace la sugerencia de que se trate de este tipo, en cuanto a las características bioquímicas es importante destacar que presentó fermentación, por lo cual especulo que podría ser una productora de etanol.

Las cepas nombradas “1a1”, “4” y “A2” presentaron cuerpo fructífero de esfera con coloración anaranjada y con brillo ligero para el primer caso y amarillo cremoso y sin brillo para el segundo, en el tercer caso la coloración fue blanquizca y con brillo, en estas tres cepas la especulación es comparativa entre ellas, ya que la característica predominante es la diferencia en coloración, brillo y forma de las esferas, por lo cual se podría tratar de **Myxococcus xanthus**, **Myxococcus**

virescens y **Myxococcus fulvus** para cada caso respectivamente. Finalmente se trata del mismo género.

La cepa que se nombró "Ai" presentó cuerpos en forma ovoide, anaranjados, muy brillantes y apilados entre ellos; esta característica en la cual parecen apiladas y con dicha coloración da una posibilidad a que se trate de **Polyangium aureum**.

Las cepas aisladas que no presentaron cuerpo fructífero ("2") pertenece a las bacterias deslizantes, pertenecientes al orden de las Cytophagales, que son bacilos largos o filamentosos, Gram negativos de ~2µm de largo, observándose la degradación de las fibras de celulosa del papel filtro de donde fueron aisladas, por lo cual presuntivamente se identifica como: Orden; **Cytophagales**, Familia **Cystophagaceae**, Género: **Citofaga**.

En las siguientes imágenes, las primeras 2 pertenecen a las bacterias deslizantes aisladas del suelo de Mixquic, la primera imagen pertenece a una citofaga y la segunda al cuerpo fructífero de una mixobacteria. La figura 9 representa posiblemente a **Myxococcus virescens**.

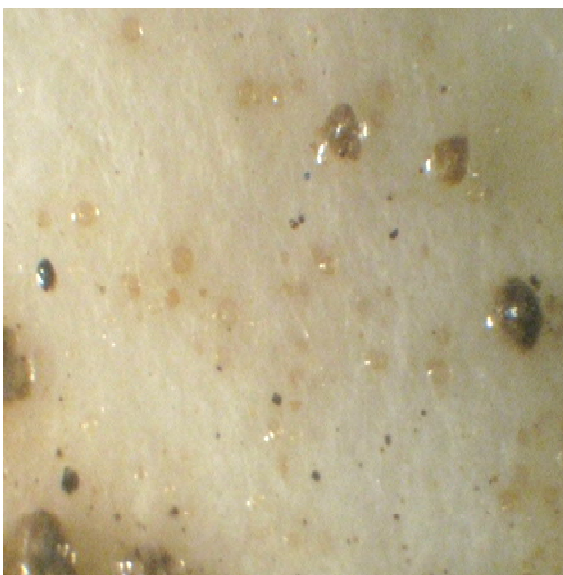


Figura 8. Formación del cuerpo fructífero correspondiente a la cepa "2".

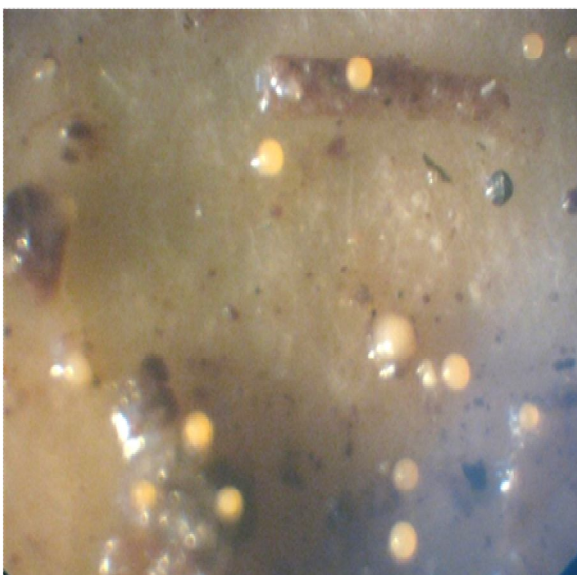


Figura 9. Formación del cuerpo fructífero correspondiente a la cepa "4".

A continuación, a partir de la figura 10 se trata de ejemplares de cuerpos fructíferos de mixobacterias aisladas del suelo del Bosque de Tlalpan. También se presentan microscopías con las cuales se confirmó que se trataban de mixobacterias, por tratarse de bacilos largos Gram negativos.



Figura 10. Formación del cuerpo fructífero correspondiente a la cepa "1a1".

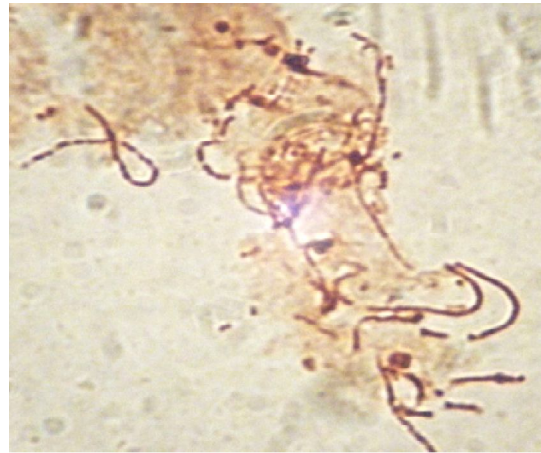


Figura 11. Microscopía con tinción de Gram, a las 72h, cepa 1a1.



Figura 12. Formación del cuerpo fructífero correspondiente a la cepa "Benc".

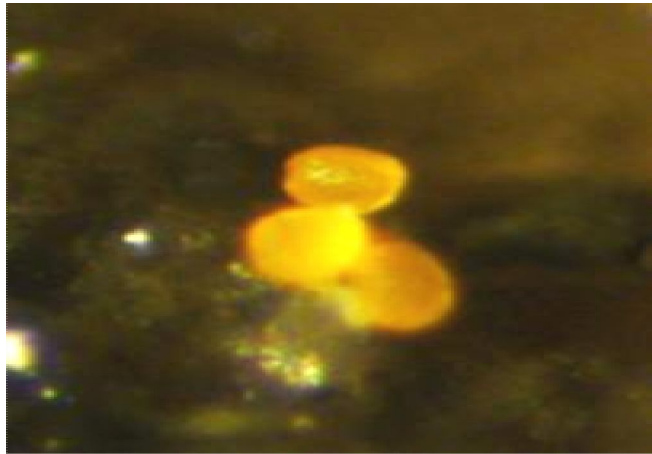


Figura13. Formación de cuerpo fructífero correspondiente a la cepa "Ai".

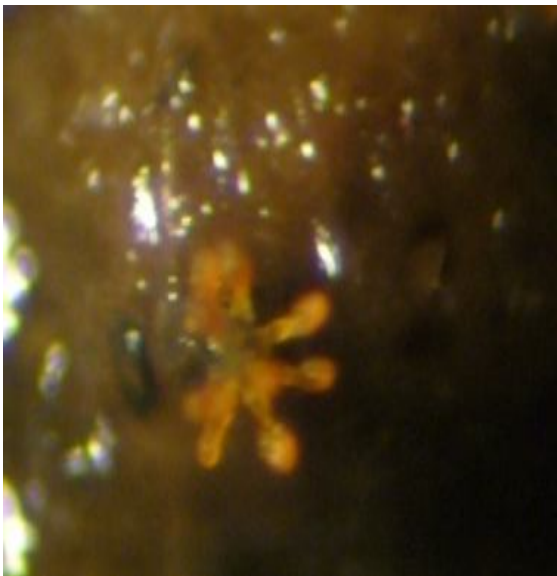


Figura 14. Formación del cuerpo fructífero de la cepa "B".



Figura 15. Microscopía con tinción de Gram, a las 72h, cepa B



Figura 16. Cepa T21.



Figura 17. Cepa T21'.

Fotografías tomadas directas del microscopio, realizando tinción de Gram utilizando cultivo de 72horas.

6.2 Tolerancia y producción de etanol, utilizando glucosa.

En la tabla 7 se observa que todas las cepas pueden desarrollarse perfectamente en concentraciones bajas de glucosa, y a partir de una concentración del 3% y hasta el 15% disminuye la cantidad de cepas capaces de desarrollarse. Así, a la concentración de 15% de glucosa solo algunas cepas tienen la capacidad de mantener su metabolismo con dicha concentración de sustrato.

Tabla 6. Presentación de resultados de crecimiento y tolerancia, utilizando medio CY y variando las concentraciones de glucosa.

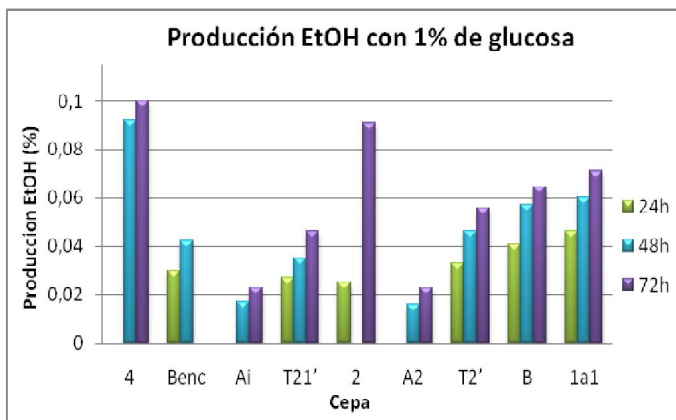
| Cepa | [% Glucosa] | | | | |
|------------------|-------------|------|------|-------|-------|
| | (1%) | (2%) | (3%) | (10%) | (15%) |
| 4 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| γa-1 | ✓ | ✓ | ✓ | X | X |
| B _{enc} | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 30 | ✓ | ✓ | X | X | X |
| A _i | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| A _{3N} | ✓ | ✓ | X | X | X |
| T _{21'} | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 32 | ✓ | ✓ | X | X | X |
| H ₁₁ | ✓ | ✓ | X | X | X |
| 2 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| A ₂ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| H2 | ✓ | ✓ | ✓ | X | X |
| T _{2'} | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| B | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 1a1 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Con este análisis, solamente se determinó la capacidad de crecimiento de las cepas con las diferentes concentraciones de sustrato. A continuación, a partir de la tabla 8 y gráfica 2 se empieza a determinar la cantidad de etanol que son capaces de producir las diferentes cepas a cada una de las concentraciones de glucosa establecidas.

Tabla 7. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción de Etanol | | |
|------------------|------------------------|-------|-------|
| | 24h | 48h | 72h |
| 4 | x | 0.092 | 0.1 |
| B _{enc} | 0.03 | 0.042 | 0.056 |
| A _i | x | 0.017 | 0.023 |
| T _{21'} | 0.027 | 0.035 | 0.046 |
| 2 | 0.025 | 0.08 | 0.091 |
| A ₂ | x | 0.016 | 0.023 |
| T _{2'} | 0.033 | 0.046 | 0.056 |
| B | 0.041 | 0.057 | 0.065 |
| 1a1 | 0.046 | 0.06 | 0.071 |

Gráfica 1. % Producción de etanol con 1% glucosa

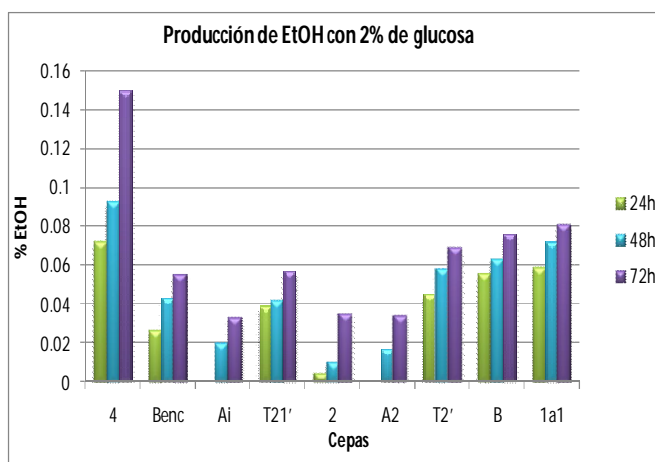


En la tabla 7 se denota que la cepa que llevó a cabo una mayor producción de etanol fue la denominada “4” a las 48 y 72 horas, produciendo 0.092% y 0.1% respectivamente, en tanto que las cepas nombradas “B” y “1a1” también presentan una producción alta con respecto a las otras cepas, sin embargo no logran las concentraciones que produjo la cepa “4”. Cabe mencionar que al ser baja la concentración de azúcares, por consiguiente también es baja la producción de etanol.

Tabla 8. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción de EtOH | | |
|------------------|----------------------|-------|-------|
| | 24h | 48h | 72h |
| 4 | 0.072 | 0.093 | 0.15 |
| B _{enc} | 0.026 | 0.043 | 0.055 |
| Ai | x | 0.02 | 0.033 |
| T _{21'} | 0.039 | 0.042 | 0.057 |
| 2 | 0.0046 | 0.01 | 0.035 |
| A ₂ | x | 0.017 | 0.034 |
| T _{2'} | 0.045 | 0.058 | 0.069 |
| B | 0.056 | 0.063 | 0.076 |
| 1a1 | 0.059 | 0.072 | 0.081 |

Gráfica 2. % Producción de etanol con 2% glucosa

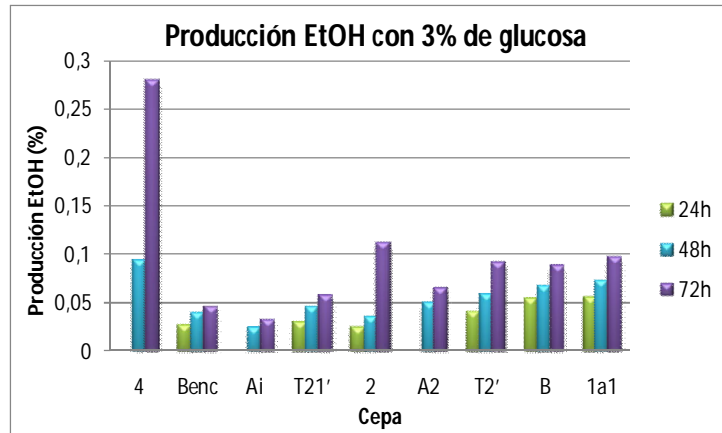


La tabla 8 y gráfica 2, nos muestra que la cepa denominada “4” continua siendo la que produce una mayor cantidad de etanol, con respecto a las demás cepas, presentando a las 48 y 72 horas, una producción de 0.093 y 0.15%. Por otro lado, se destaca que al incrementar la concentración de azúcar simple (glucosa) también incrementó también la cantidad de etanol producido.

Tabla 9. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción de Etanol | | |
|------------------|------------------------|-------|-------|
| | 24h | 48h | 72h |
| 4 | x | 0.094 | 0.28 |
| B _{enc} | 0.027 | 0.039 | 0.046 |
| A _i | x | 0.024 | 0.033 |
| T _{21'} | 0.030 | 0.046 | 0.058 |
| 2 | 0.024 | 0.036 | 0.112 |
| A ₂ | x | 0.05 | 0.065 |
| T _{2'} | 0.041 | 0.059 | 0.091 |
| B | 0.055 | 0.067 | 0.089 |
| 1a1 | 0.056 | 0.073 | 0.097 |

Gráfica 3. % Producción de etanol con 3% glucosa

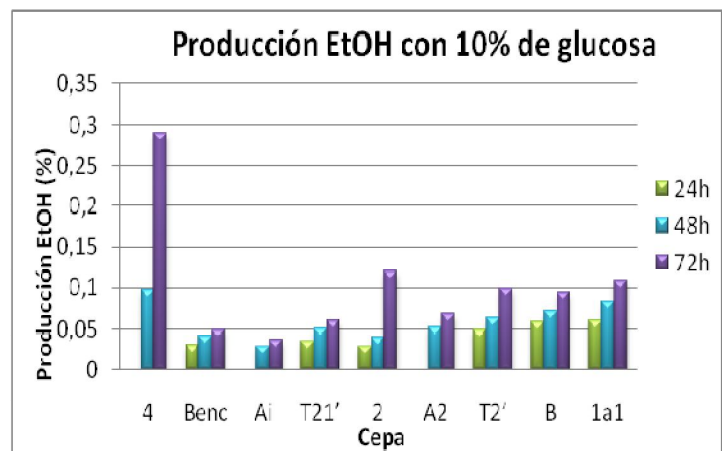


De acuerdo a la tendencia que va mostrando la cepa denominada “4”, nuevamente fue la mejor productora de etanol, presentando a las 48 y 72 horas una producción de 0.094 y 0.28%. También notamos que esta cepa a las 24 horas, presenta una baja concentración o en este caso no fue detectada, por lo cual, posiblemente esto se deba a que la cepa a esa cantidad de tiempo, solo ha logrado cierto quórum, y a partir de las 48 h, cuando considera haber logrado una concentración adecuada de células, y es entonces cuando empiezan a producir el etanol.

Tabla 10. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción de Etanol | | |
|------------------|------------------------|-------|-------|
| | 24h | 48h | 72h |
| 4 | x | 0.097 | 0.29 |
| B _{enc} | 0.03 | 0.041 | 0.049 |
| A _i | x | 0.028 | 0.036 |
| T _{21'} | 0.034 | 0.051 | 0.06 |
| 2 | 0.028 | 0.039 | 0.12 |
| A ₂ | x | 0.053 | 0.069 |
| T _{2'} | 0.049 | 0.063 | 0.099 |
| B | 0.059 | 0.071 | 0.094 |
| 1a1 | 0.061 | 0.083 | 0.109 |

Gráfica 4. % Producción de etanol con 10% glucosa

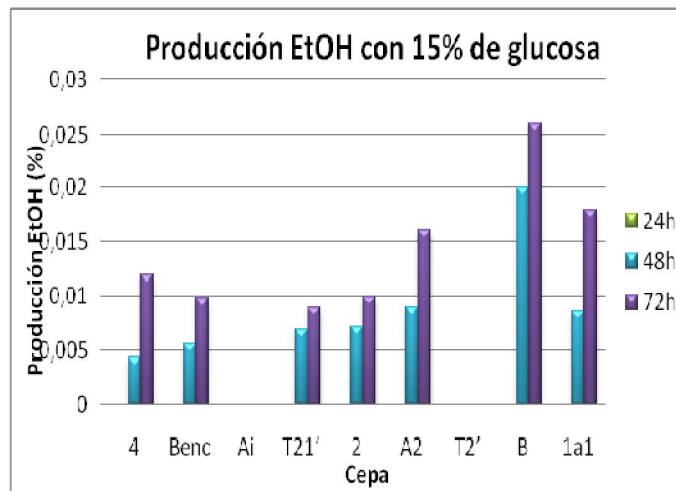


Nuevamente notamos que la cepa llamada “4” es la que llevó a cabo la mayor producción de etanol, produciendo 0.097 y 0.29% a las 48 y 72 horas respectivamente. Y también destaco, que a esta concentración de glucosa (10%) las cepas denominadas “T₂’”, “B” y “1a1” lograron una producción alta, y estas fueron 0.099, 0.094 y 0.109% para cada cepa respectivamente.

Tabla 11. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción de Etanol | | |
|-------------------|------------------------|--------|--------|
| | 24h | 48h | 72h |
| 4 | X | 0.0044 | 0.012 |
| B _{enc} | X | 0.0056 | 0.0098 |
| A _i | X | X | X |
| T ₂₁ ' | X | 0.0069 | 0.0089 |
| 2 | X | 0.0072 | 0.0099 |
| A ₂ | X | 0.0089 | 0.016 |
| T ₂ ' | X | X | X |
| B | X | 0.02 | 0.026 |
| 1a1 | X | 0.0086 | 0.018 |

Gráfica 5. % Producción de etanol con 15% glucosa



En la tabla 11 y gráfico 5, encontramos que la concentración de azúcar simple ya es alta para la producción de etanol, pues muy pocas cepas lograron producirlo y la cantidad producida fueron menores a las concentraciones antes manejadas (1, 2, 3, 10%). Y en estas condiciones las cepas que produjeron una mayor cantidad de etanol, fueron las denominadas “B”, “A₂” y “1a1” produciendo 0.026, 0.0089 y 0.0086% respectivamente.

Para finalizar el análisis preliminar, se determinó que las bacterias aisladas fueron capaces de soportar altas concentraciones de glucosa. No obstante, eso no significó que produjeran altas concentraciones de etanol. Y en estas condiciones al colocar a *Saccharomyces*, si fermenta y produce etanol, aunque en bajas cantidades, posiblemente a que no se le dieron las condiciones necesarias para que llevara a cabo la fermentación alcohólica con altas producciones de etanol.

La mayor producción se llevó a cabo con una concentración del 10% de glucosa y fue la cepa “4” la que produjo 0.29%.

6.3 Determinación de crecimiento utilizando como sustrato polímeros puros.

Una vez determinado si las bacterias deslizantes aisladas lograban producir etanol fermentando a la glucosa, entonces se continuó a determinar si estas mismas bacterias son capaces de degradar y utilizar como fuente fermentable diferentes polisacáridos puros, como son: almidón, pectina y carboximetilcelulosa.

En estos ensayos, no se le dio ningún pretratamiento a los polisacáridos. Para la determinación de crecimiento y degradación, se utilizó caldo CY adicionado con 1% de cada uno de los polisacáridos, se inoculó cada cepa y se incubaron a 37°C por 24 horas, con agitación, 130 rpm.

Para estandarizar, todas las cepas empezaron su crecimiento con una concentración inicial de 0.5×10^8 cel/ml (correspondiente a 0.5 en la escala de MacFarland). Transcurrido el tiempo de incubación se midió la densidad óptica, para determinar crecimiento.

Los resultados del crecimiento en polisacáridos fue el siguiente:

Tabla 12. Degradación y crecimiento en diferentes polisacáridos.

| Cepa | Polímero | | | | | |
|----------|----------|-----|---------|-----|-----|-----|
| | Almidón | DO | Pectina | DO | CMC | DO |
| 4 | ✓ | 4.2 | ✓ | 3.3 | ✓ | 1.9 |
| Benc | ✓ | 3.9 | ✓ | 2.7 | ✓ | 1.3 |
| Ai | ✓ | 4.8 | ✓ | 3.6 | ✓ | 2.2 |
| T21' | ✓ | 4.4 | ✓ | 3.8 | ✓ | 2.9 |
| 2 | ✓ | 3.5 | ✓ | 2.3 | ✓ | 1.4 |
| A2 | ✓ | 4.7 | ✓ | 4.2 | ✓ | 3.6 |
| T2' | ✓ | 4.9 | ✓ | 4.3 | ✓ | 3.5 |
| B | ✓ | 5.0 | ✓ | 4.6 | ✓ | 4.1 |
| 1a1 | ✓ | 4.8 | ✓ | 4.4 | ✓ | 3.8 |
| Levadura | ✓ | 0 | ✓ | 0 | ✓ | 0 |

Nota: DO = Densidad Óptica

Se denota que las cepas aisladas poseen los enzimas necesarios para romper los polisacáridos en los cuales se les colocó (almidón, pectina y CMC). No obstante, este hecho no implica una alta producción de etanol, por lo cual se procedió a realizar los ensayos de cuantificación de la producción de etanol, variando los polisacáridos, la temperatura de incubación, el pH y las condiciones de aireación, realizando el monitoreo de producción de etanol cada 24h por 3 días.

6.4 Estudio de producción de etanol utilizando como sustrato los polisacáridos CMC, pectina y almidón y modificando condiciones de oxigenación.

Una vez que se determinó si las bacterias deslizantes lograban crecer en medios con fuentes de carbono con carbohidratos poliméricos puros, entonces, se realizó el monitoreo para determinar si hay producción de etanol a partir de la fermentación de los compuestos puros aplicados, así como también de primera instancia se determina si las cepas presentan o no la maquinaria enzimática necesaria para hidrolizar dichos polímeros y a partir de ellos desarrollarse y en segunda instancia determinar la capacidad de producción de etanol.

Nuevamente, el monitoreo se realizó midiendo la producción de etanol con el método de microdifusión.

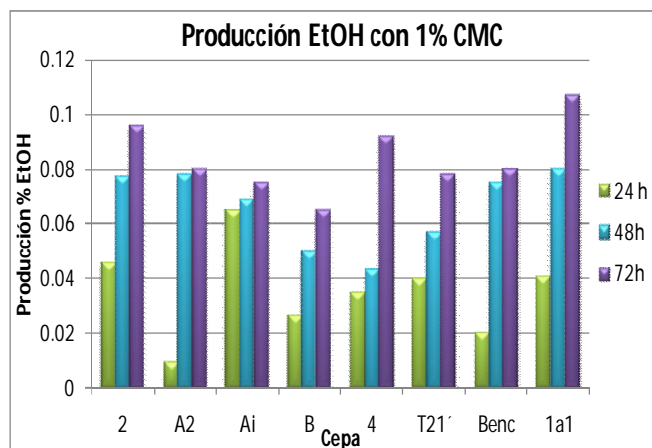
Por otro lado, se realizaron los ensayos en dos tipos de atmósferas, completamente aerofílica y microaerofílica, para determinar, en qué condiciones las cepas presentan una mejor producción de etanol.

El monitoreo se realizó cada 24 horas durante 3 días, y los resultados fueron los siguientes:

Tabla 13. % Producción de etanol

| Producción de Etanol | | | |
|----------------------|--------|--------|-------|
| Cepa | 24 h | 48h | 72h |
| 2 | 0.046 | 0.0773 | 0.096 |
| A2 | 0.0093 | 0.078 | 0.08 |
| Ai | 0.065 | 0.069 | 0.075 |
| B | 0.026 | 0.05 | 0.065 |
| 4 | 0.035 | 0.0434 | 0.092 |
| T21' | 0.0397 | 0.057 | 0.078 |
| Benc | 0.02 | 0.075 | 0.08 |
| 1a1 | 0.0409 | 0.08 | 0.107 |

Gráfica 6. % Producción de etanol con 1% de CMC

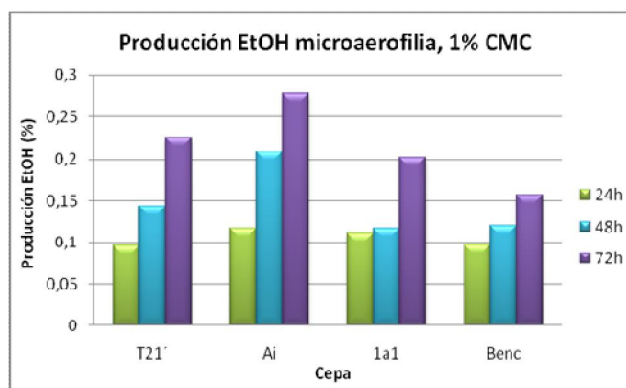


En la tabla 13 y gráfico 6, destaco que a las 24 horas la mayoría de las cepas no presentaron una gran producción de etanol, no obstante, a las 72 horas se presentó mayor producción, esto posiblemente debido a que a las 24 horas apenas están en el proceso de hidrolizar el polímero y formar los azúcares más simples, en tanto, que a las 48 horas y al ya tener azúcares libres pueden llevar a cabo la fermentación y a las 72 horas es cuando se logra obtener dicha producción de etanol. Por otra parte, la cepa que presentó la producción más alta de etanol fue la denominada "1a1", a las 72 horas produjo 0.107%. En estas condiciones la levadura no presentó crecimiento, ya que no posee la capacidad de hidrolizar el polímero utilizado para la fermentación (CMC), esto es, no presenta celulasas.

Tabla 14. % Producción de etanol

| % Producción Etanol | | | |
|---------------------|-------|-------|-------|
| Cepa | 24 h | 48h | 72h |
| T21' | 0,096 | 0,143 | 0,225 |
| Ai | 0,117 | 0,209 | 0,277 |
| 1a1 | 0,111 | 0,117 | 0,202 |
| Benc | 0,097 | 0,12 | 0,157 |

Gráfica 7. % Producción de etanol con 1% de CMC agitación y microaerofilia y 37°C.



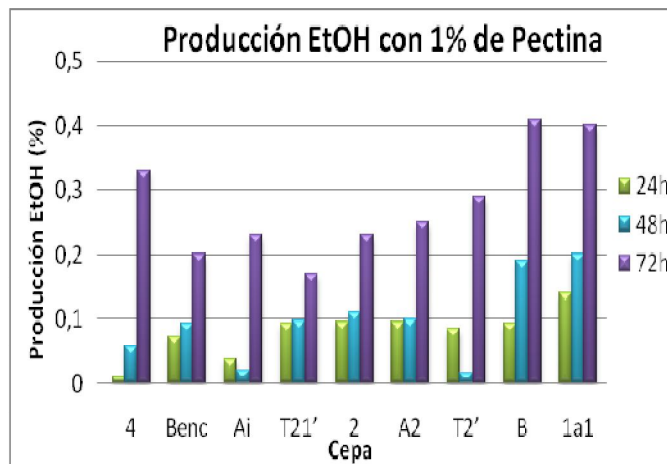
En la tabla 14 y gráfica 7 encontramos nuevamente que las producciones más altas se presentaron a las 72 horas, y en los resultados solo se presentan las cepas que lograron producir etanol en dichas condiciones.

La cepa que llevó a cabo la mayor producción fue la cepa llamada “Ai”, con 0.277%. En condiciones completamente aerofilicas esta misma cepa, lo máximo que logró producir fue 0.075%, por lo cual, las condiciones de microaerofilia favorecieron en este caso la producción de etanol.

Tabla 15. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción EtOH | | |
|------------------|-------------------|-------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 4 | 0.010 | 0.058 | 0.33 |
| B _{enc} | 0.073 | 0.093 | 0.20 |
| A _i | 0.036 | 0.019 | 0.23 |
| T _{21'} | 0,093 | 0.098 | 0.17 |
| 2 | 0.095 | 0.111 | 0.23 |
| A ₂ | 0.096 | 0.099 | 0.25 |
| T _{2'} | 0.085 | 0.015 | 0.29 |
| B | 0.093 | 0.19 | 0.41 |
| 1a1 | 0.14 | 0.2 | 0.40 |

Gráfica 8. % Producción de etanol con 1% de Pectina



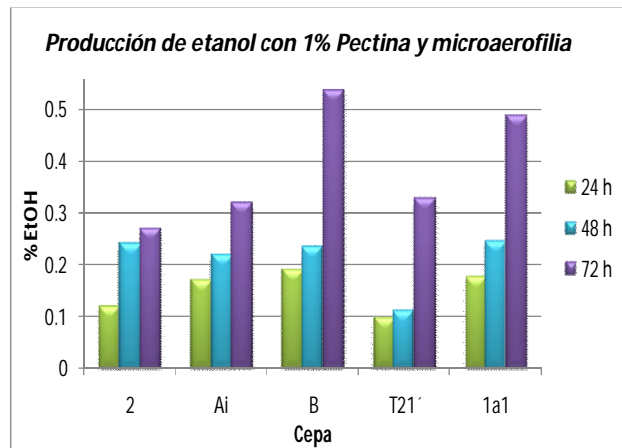
En la tabla 15 y gráfica 8, se expresa que la mayor producción de etanol se llevó a cabo a las 72 horas, esto, posiblemente debido a que a las 24 horas las bacterias apenas están secretando los enzimas necesarios para romper los enlaces de los polímeros y posteriormente poder fermentar los azuceres simples que liberaron.

Para este caso, la cepa que produjo una mayor cantidad de etanol fue la denominada “B” a las 72 horas produjo 0.41%, seguida de la cepa llamada “1a1” que produjo 0.40% a las 72 horas.

Tabla 16. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción EtOH | | |
|------|-------------------|-------|-------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 2 | 0,12 | 0,27 | 0,24 |
| Ai | 0,17 | 0,22 | 0,32 |
| B | 0,191 | 0,236 | 0,54 |
| T21' | 0,099 | 0,112 | 0,328 |
| 1a1 | 0,179 | 0,247 | 0,49 |

Gráfica 9. % Producción de etanol con 1% de Pectina agitación y microaerofilia y 37°C.

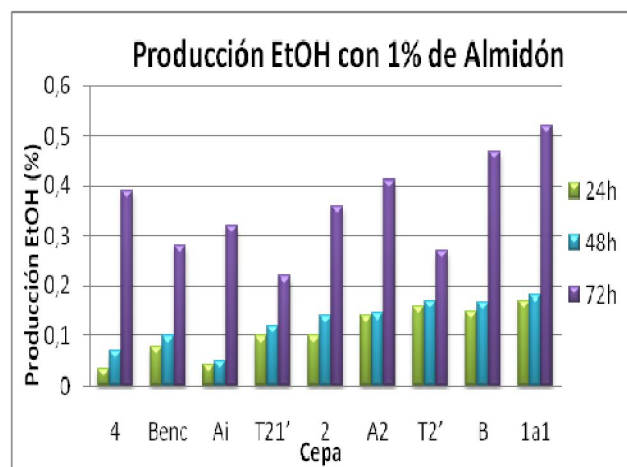


En la tabla 16, gráfica 9 vemos que al realizar el estudio en una atmósfera microaerofílica la producción de etanol se ve favorecida, para las cepas mencionadas (2, Ai, B, T21', 1a1). Para el caso específico de la cepa denominada "B" que en el estudio aeróbico fue la cepa con mayor producción, en este caso (microaeróbico) nuevamente se presentó como la cepa mejor productora, en las condiciones analizadas en la tabla 16 y gráfica 9 produjo 0.54%, en tanto, que la cepa llamada "1a1" produjo 0.49%.

Tabla 17. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción EtOH | | |
|------------------|-------------------|-------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 4 | 0.034 | 0.069 | 0.39 |
| B _{enc} | 0.079 | 0.099 | 0.28 |
| A _i | 0.043 | 0.051 | 0.32 |
| T _{21'} | 0.099 | 0.12 | 0.22 |
| 2 | 0.1 | 0.14 | 0.36 |
| A ₂ | 0.14 | 0.147 | 0.41 |
| T _{2'} | 0.16 | 0.172 | 0.27 |
| B | 0.15 | 0.169 | 0.47 |
| 1a1 | 0.17 | 0.183 | 0.52 |

Gráfica 10. % Producción de etanol con 1% de Almidón

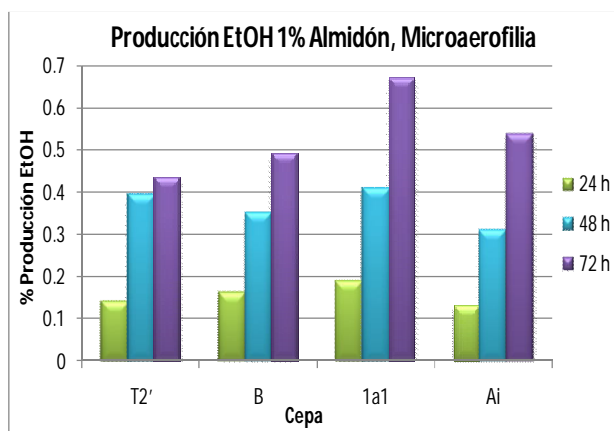


En la tabla 17 así como en la gráfica 10, encontramos representada la producción de etanol utilizando como fuente polimérica almidón. Se determina que las cepas que fueron capaces de llevar a cabo una mayor producción fueron las cepas nombradas “A₂” produciendo 0.41%, en tanto que las cepas llamadas “B” y “1a1” lograron una producción del 0.47 y 0.52% respectivamente.

Tabla 18. % Producción de etanol

| Cepa | % Producción EtOH | | |
|------|-------------------|-------|-------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| T2' | 0.14 | 0.394 | 0.435 |
| B | 0.16 | 0.352 | 0.491 |
| 1a1 | 0.19 | 0.41 | 0.672 |
| Ai | 0.13 | 0.31 | 0.538 |

Gráfica 11. % Producción de etanol con 1% de Almidón agitación y microaerofilia a 37°C.



En la tabla 18 y gráfica 11, vemos la representación de la producción de etanol utilizando 1% de almidón y aplicando microaerofilia, con dichas condiciones se determinó que la cepa que lleva a cabo la mayor producción de etanol es la cepa denominada “1a1” con 0.672% en tanto que las cepas de nombre “Ai” y “B” lograron una producción de 0.538% y 0.491% respectivamente. Por lo cual, se denota que las condiciones de microaerofilia favorecen la producción de etanol utilizando como sustrato polimérico almidón puro.

Ahora, haciendo un análisis general del estudio realizado en el punto 6.4 primeramente se destaca que en el sustrato donde hubo una mayor producción de etanol fue utilizando almidón, logrando producciones mayores a 0.5% tanto en condiciones aerofílicas como microaerofílicas.

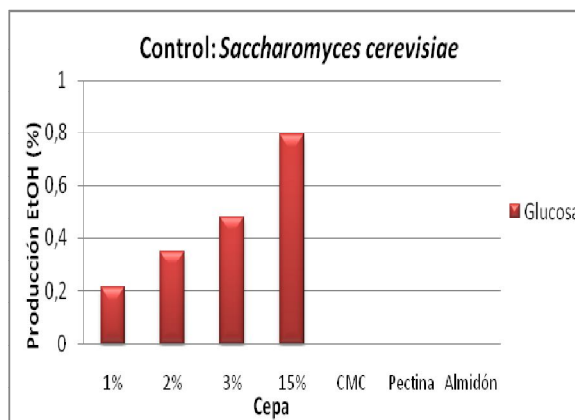
Para todos los casos se utilizó a la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como control de la producción y condiciones de fermentación, manteniendo agitación y generando microaerofilia para provocar la fermentación. Los resultados presentados a continuación en la tabla 19 y gráfico 12, demuestran el comportamiento de la levadura en las diversas condiciones otorgadas a las cepas aisladas, y se determina que la levadura con 15% de glucosa logra una producción de 0.79%, cabe mencionar que estos resultados únicamente son en condiciones microaerofilicas, ya que la levadura no lleva a cabo fermentación en presencia de oxígeno.

Cabe mencionar que se evidencia la ausencia y presencia de enzimas para reducir los polímeros a moléculas más sencillas, en este caso la levadura carece de dichas enzimas al no llevar a cabo fermentación alcohólica en sustratos de CMC, pectina y almidón, a diferencia de las cepas aisladas que sí se desarrollaron y produjeron etanol.

Tabla 19. % Producción de etanol con *S. cerevisiae*.

| [Sustrato] (%) | EtOH (%) |
|----------------|----------|
| 1% Glu | 0.21 |
| 2% Glu | 0.35 |
| 3% Glu | 0.48 |
| 15% Glu | 0.79 |
| 1% CMC | --- |
| 1% Pectina | --- |
| 1% Almidón | --- |

Gráfica 12. % Producción de etanol con *S. cerevisiae* y microaerofilia hasta las 144 horas a 37°C.



6.5 Ensayos utilizando bagazos de pera, manzana y papa.

Después de los ensayos utilizando carbohidratos poliméricos puros, se procedió a la realización de los ensayos utilizando fuentes fermentables complejas obtenidas

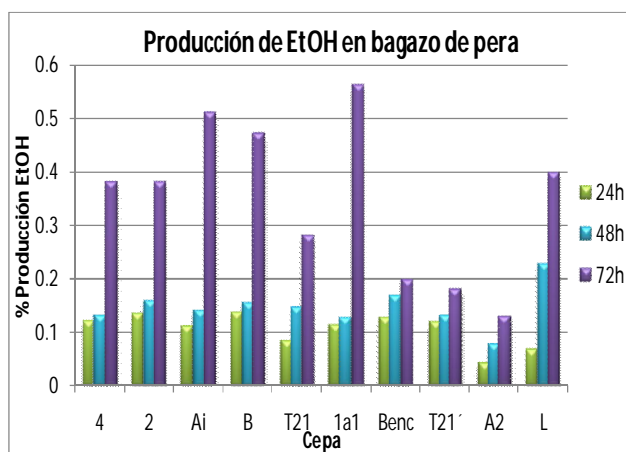
de desechos de frutos, tales como pera, manzana y papa. El bagazo de estos frutos se obtuvo pasando las frutas por un extractor de jugos (previamente lavado y desinfectado), el jugo se descartó, ya que este a nivel industria si se le da un uso específico, por lo tanto, utilizamos solo el residuo, esto es, el bagazo, que contiene fibra (celulosa), pectina, almidón y restos de jugo (monosacáridos).

Después de obtener el bagazo, se colocaron 3g en 100mL de medio mineral, de esta manera, la única fuente fermentable serán los hidratos de carbono provenientes del bagazo y se realizó el monitoreo de producción de etanol cada 24 horas por 3 días, manteniendo la fermentación a 37°C, utilizando el método de microdifusión. Es importante mencionar que al determinar que las mejores condiciones para las cepas aisladas para producir etanol es en microaerofilia, por esta razón el estudio que a continuación se describe se realizó de esta manera. En todos los ensayos se abrevia a la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como “L”. De estos ensayos, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 20. % Producción de etanol

| Cepa | Etanol (%) | | |
|-------------|------------|--------|-------|
| | 24h | 48h | 72h |
| 4 | 0.1202 | 0.1303 | 0.38 |
| 2 | 0.133 | 0.158 | 0.379 |
| Ai | 0.111 | 0.139 | 0.51 |
| B | 0.137 | 0.154 | 0.473 |
| T21 | 0.082 | 0.146 | 0.28 |
| 1a1 | 0.114 | 0.127 | 0.563 |
| Benc | 0.127 | 0.167 | 0.197 |
| T21' | 0.119 | 0.131 | 0.179 |
| A2 | 0.042 | 0.078 | 0.129 |
| L | 0.067 | 0.227 | 0.397 |

Gráfica 13. % Producción de etanol con 1% de bagazo de pera



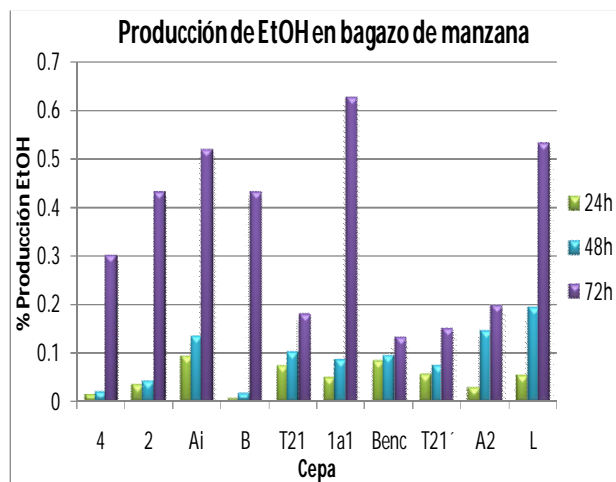
En la gráfica 13 se observa que la cepa que llevó a cabo la mayor producción fue la denominada “1a1” produciendo 0.563%, seguida de las cepas de nombre “Ai” y “B” produciendo 0.51% y 0.473% respectivamente, en tanto que la levadura produjo 0.397%. Como se ha venido viendo desde el estudio con carbohidratos

poliméricos puros, ahora en el bagazo de pera nuevamente las cepas “1a1”, “B” y “Ai” se hacen notar por llevar a cabo las mayores producciones a las 72 horas.

Tabla 21. % Producción de etanol

| % Producción EtOH | | | |
|-------------------|--------|--------|-------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 4 | 0,0138 | 0,02 | 0.3 |
| 2 | 0,033 | 0,0405 | 0.43 |
| Ai | 0,092 | 0,135 | 0.519 |
| B | 0,005 | 0,0156 | 0.432 |
| T21 | 0,073 | 0,101 | 0.179 |
| 1a1 | 0,049 | 0,085 | 0.625 |
| Benc | 0,083 | 0,093 | 0.132 |
| T21´ | 0,0543 | 0,072 | 0.149 |
| A2 | 0,029 | 0,143 | 0.197 |
| L | 0,052 | 0,19 | 0.531 |

Gráfica 14. % Producción de etanol con 1% de bagazo de manzana.

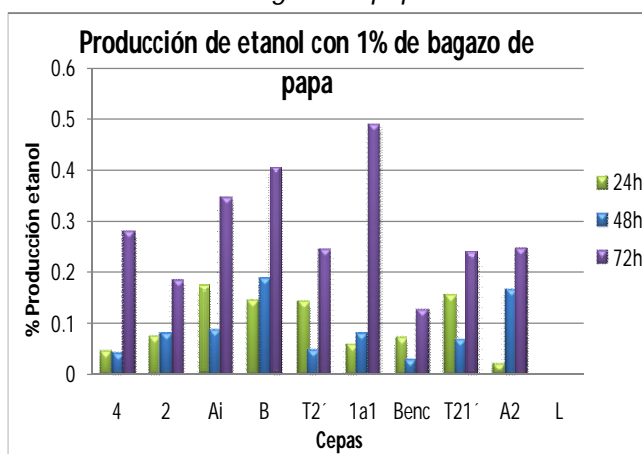


La tabla 21 y gráfica 14 nos muestra que nuevamente las cepas con mayor producción fueron “1a1”, “Ai” y “B” produciendo a las 72 horas 0.625%, 0.519% y 0.432% respectivamente; en tanto que la levadura llevó a cabo una producción de 0.531%, lo cual nos muestra que las producciones de las cepas aisladas no se encuentran tan alejadas de las producciones llevadas a cabo por la levadura, la cual es un microorganismo con gran habilidad para realizar fermentación alcohólica.

Tabla 22. % Producción de etanol

| Etanol (%) | | | |
|------------|-------|-------|-------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 4 | 0.045 | 0.041 | 0.28 |
| 2 | 0,074 | 0,08 | 0.186 |
| Ai | 0,174 | 0,088 | 0.348 |
| B | 0,144 | 0,187 | 0.406 |
| T2´ | 0,143 | 0,048 | 0.244 |
| 1a1 | 0,058 | 0,079 | 0.49 |
| Benc | 0,07 | 0,029 | 0.125 |
| T21´ | 0,154 | 0,069 | 0.24 |
| A2 | 0,020 | 0,167 | 0.247 |
| L | 0 | 0 | 0 |

Gráfica 15. % Producción de etanol con 1% de bagazo de papa



Podemos notar en la gráfica 15 que la cepa que llevó a cabo la mayor producción de etanol fue la denominada “1a1” produciendo 0.49%, seguida de la cepa llamada “B” con 0.406% y enseguida por la cepa de nombre “Ai” llevando a cabo una producción de 0.348%, en tanto que la levadura no llevó a cabo fermentación alcohólica, dado que no tiene las enzimas necesarias para hidrolizar almidón y/o celulosa. Vemos que en este estudio, la producción es ligeramente mas baja a las producciones obtenidas en los bagazos de manzana y pera, y esto posiblemente es debido a que en los bagazos de frutos aun está la presencia de azúcares simples, en tanto que en las cáscaras de papa únicamente hay carbohidratos poliméricos, por lo cual a las cepas aisladas les lleva un poco más de tiempo, primero hidrolizar los polímeros y posteriormente llevar a cabo la producción de etanol.

De los sustratos complejos (bagazo de manzana y pera y cáscaras de papa), el sustrato en el que hay una mejor producción es en el bagazo de pera y manzana, esto posiblemente se deba a que el bagazo de manzana presenta gran cantidad de carbohidratos (poco más del 60%) y fibra (la cual principalmente es celulosa) y las bacterias aisladas poseen las enzimas necesarias para degradar estos hidratos de carbono, ya que pueden crecer en medios que solo poseen celulosa, almidón o pectina como fuente de carbono, los cuales pueden fermentar.

La levadura se colocó también en las mismas condiciones, en los hidratos de carbono complejos puros (CMC, Pectina y Almidón) y también en los medios con bagazos, sin embargo, no se desarrollaron, coincidiendo con lo reportado en la literatura, ya que no poseen las enzimas necesarias para degradar dichos carbohidratos.

La mayor producción de etanol en el bagazo de manzana se llevó a cabo por la cepa “1a1” con 0.625%, en tanto que la levadura produjo 0.531%, por lo cual se hace notar que las producciones de etanol por parte de las cepas aisladas en

dichas condiciones no se encuentran tan lejanas a la fermentación llevada a cabo por las levaduras.

En el caso del bagazo de pera la cepa que mayor produjo etanol fue “1a1” con 0.563%, en tanto que la levadura produjo 0.397%. Posiblemente por las condiciones del bagazo (mayor acidez) la producción de etanol fue ligeramente menor a la producción en bagazo de manzana, y eso se ve bastante reflejado en el caso de la levadura, pues hablando de las bacterias deslizantes aisladas la producción fue casi similar al bagazo de manzana pues estas bacterias tienen la capacidad de soportar condiciones estresantes, tal es el caso de diversos pH's, humedad, hambruna, etc.

Para finalizar, la cepa “1a1” fue la cepa que produjo más etanol en bagazo de papa con una concentración de 0.49%, en este caso, la levadura no produjo etanol.

6.6 Estudio de producción de etanol utilizando bagazo de pera, manzana y papa, realizando la fermentación en condiciones de temperatura ambiente (28°C) y microaerofilia.

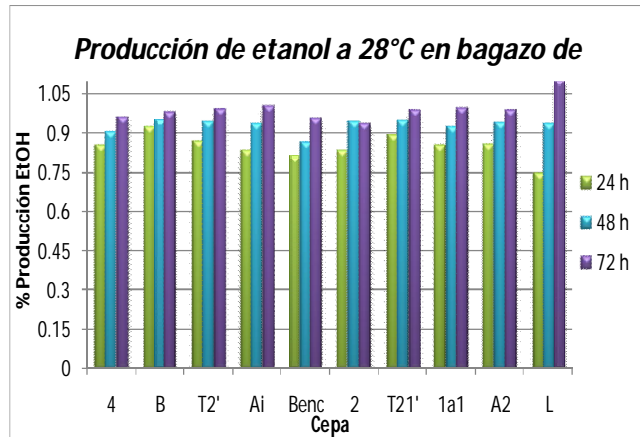
Después de obtener el bagazo (como ya se ha explicado en el ensayo anterior, 5.6), se colocaron 3g de bagazo en 100mL de medio mineral, de esta manera, la única fuente fermentable serían los hidratos de carbono provenientes del bagazo y se realizó el monitoreo de producción de etanol cada 24 horas por 3 días, manteniendo la fermentación a temperatura ambiente, y utilizando como método de cuantificación el método de microdifusión.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 23. % Producción de etanol

| % Producción de etanol en Bagazo de pera a 28°C | | | |
|---|-------|-------|-------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 4 | 0,855 | 0,908 | 0,962 |
| B | 0,925 | 0,95 | 0,981 |
| T2' | 0,869 | 0,949 | 0,995 |
| Ai | 0,833 | 0,935 | 1,002 |
| Benc | 0,811 | 0,865 | 0,957 |
| 2 | 0,832 | 0,946 | 0,938 |
| T21' | 0,895 | 0,953 | 0,989 |
| 1a1 | 0,857 | 0,925 | 0,998 |
| A2 | 0,862 | 0,943 | 0,989 |
| L | 0,745 | 0,938 | 1,105 |

Gráfica 16. % Producción de etanol con 1% de bagazo de pera a 28°C

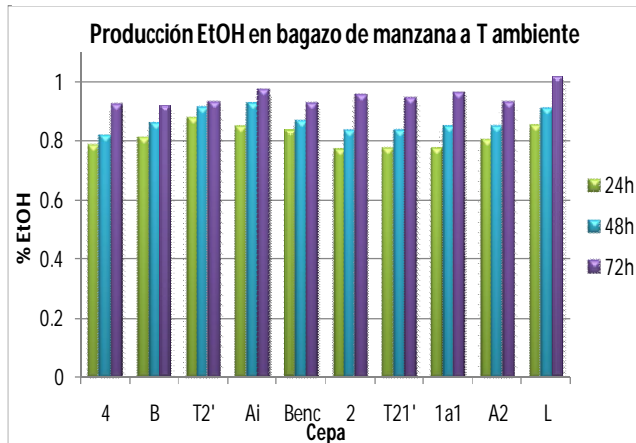


Notamos que en la gráfica 16 se representa la producción de etanol por parte de las bacterias aisladas y la levadura como control, es evidente que se llevó a cabo una mayor producción de etanol, pues en el caso de la levadura logró producir 1.105% y para una de las mejores cepas productoras hubo una producción de 1.002% y 0.998% realizado por las cepas llamadas “Ai” y “1a1” respectivamente. Vemos que al haber azúcares simples en el bagazo se logra una mejor producción y aunado a esto el descenso de temperatura también favorece la producción de etanol, pues al estar a temperaturas superiores como en el caso de los estudios anteriores que se realizaron a 37°C, que es la temperatura óptima de crecimiento de las cepas aisladas hay una menor producción, posiblemente porque a estas temperaturas había una evaporación del etanol producido en tanto que al disminuir la temperatura hay una menor pérdida de etanol y esto es notable al momento de la cuantificación del mismo.

Tabla 24. % Producción de etanol

| % Producción de etanol en Bagazo de manzana a 28°C | | | |
|--|-------|-------|-------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 4 | 0,787 | 0,817 | 0,924 |
| B | 0,811 | 0,859 | 0,919 |
| T2' | 0,878 | 0,915 | 0,934 |
| Ai | 0,848 | 0,929 | 0,975 |
| Benc | 0,837 | 0,867 | 0,930 |
| 2 | 0,773 | 0,838 | 0,956 |
| T21' | 0,777 | 0,834 | 0,947 |
| 1a1 | 0,775 | 0,849 | 0,964 |
| A2 | 0,804 | 0,851 | 0,934 |
| L | 0,856 | 0,910 | 1,022 |

Gráfica 17. % Producción de etanol con 1% de bagazo de manzana a 28°C

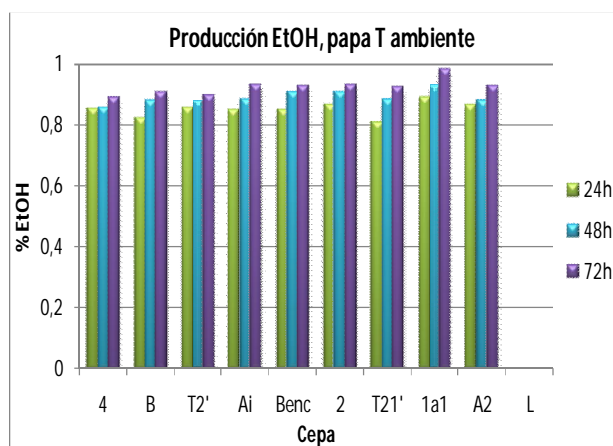


En la tabla 24 y gráfica 17, se observa que nuevamente la producción de etanol se incrementó con el descenso de temperatura, en el caso de la levadura produjo 1.022%, en tanto que las mejor cepas productoras “Ai” con 0.975% y “1a1” con 0.964%. Por otra parte, es importante destacar que en general las cepas presentaron un comportamiento de producción más elevado estas condiciones, produciendo todas las bacterias aisladas mínimo 0.90% a las 72 horas de fermentación en bagazo de manzana a temperatura ambiente y microaerofilia.

Tabla 25. % Producción de etanol

| % Producción de etanol en bagazo de Papa a 28°C | | | |
|---|-------|-------|-------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 4 | 0,854 | 0,860 | 0,890 |
| B | 0,824 | 0,882 | 0,908 |
| T2' | 0,860 | 0,879 | 0,901 |
| Ai | 0,851 | 0,887 | 0,936 |
| Benc | 0,848 | 0,906 | 0,931 |
| 2 | 0,869 | 0,908 | 0,933 |
| T21' | 0,809 | 0,887 | 0,923 |
| 1a1 | 0,891 | 0,930 | 0,982 |
| A2 | 0,865 | 0,881 | 0,931 |
| L | 0 | 0 | 0 |

Gráfica 18. % Producción de etanol con 1% de bagazo de papa a 28°C



Ahora notamos que en la gráfica 18 se representa la producción de etanol cuantificada utilizando cascaras de papa hecha bagazo realizando la fermentación a temperatura ambiente y microaerofilia. Nuevamente se hace notar la cepa denominada “1a1” fue la que llevó a cabo la mayor producción a las 72 horas 0.982%, seguidamente de “Ai” con 0.936%. En estas condiciones, observamos que la levadura no llevó a cabo fermentación alcohólica, pues no tiene la maquinaria enzimática para reducir el almidón y celulosa en azúcares más simples.

Para finalizar el análisis de la realización de estos ensayos, utilizando bagazos de pera, manzana y papa como fuentes fermentables, llevándose a cabo la fermentación a temperatura ambiente (28°C) y microaerofilia, se enfatiza que la producción se incrementó y las mayores producciones se llevaron a cabo a las 72 horas. Posiblemente esto pudo deberse a que a mayor temperatura el etanol producido se evaporaba, en dicho caso al mantener una temperatura menor hay una menor evaporación del etanol y por esta razón al momento de cuantificar obtenemos mayores resultados.

La cepa que llevó a cabo la mayor producción en el bagazo de pera fue “Ai” con 1.002%, y en el caso de la levadura produjo 1.205%.

Para el caso del bagazo de manzana la cepa que llevó a cabo la mayor producción de etanol fue “Ai” 0.975% y para el caso de la levadura, esta produjo 1.022%.

Por último, en el bagazo de papa la mayor producción se llevó a cabo por parte de la cepa “1a1” con 0.982% y la levadura no produjo en estas condiciones, debido a que no posee las enzimas necesarias para hidrolizar los polisacáridos del almidón, por dicha razón no llevó a cabo la fermentación alcohólica.

6.7 Estudio de producción de etanol utilizando como sustratos bagazo de pera, manzana y papa y ajustando pH a 7.

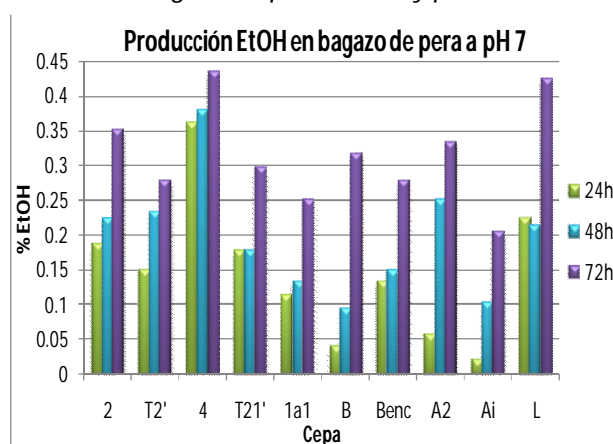
Nuevamente después de obtener el bagazo, se colocaron 3g en 100mL de medio mineral, de esta manera, la única fuente fermentable serían los hidratos de carbono provenientes del bagazo y se realizó el monitoreo de producción de etanol cada 24 horas por 3 días, manteniendo la fermentación a temperatura ambiente y ajustando el pH a 7 y utilizando el método de microdifusión para cuantificar la producción de etanol. Para este estudio se mantuvieron las condiciones de fermentación a temperatura ambiente (28°C), ya que se obtuvo que en dichas condiciones se lleva a cabo una mejor producción, de tal manera que lo único que en este estudio se verá afectado y se determinará como impacta en la producción de etanol es la modificación del pH, pues en estudios anteriores se mantenía el pH inicial de los bagazos, oscilando este entre 4 y 5, dependiendo de la madurez de los frutos, ahora en este estudio, se ajusta el pH a 7 para determinar cómo afecta en la producción de etanol de las cepas aisladas.

Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 26. % Producción de etanol

| % Producción de etanol en bagazo de Pera a pH 7 | | | |
|---|--------|-------|-------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 2 | 0,187 | 0,224 | 0,352 |
| T2' | 0,150 | 0,233 | 0,279 |
| 4 | 0,362 | 0,381 | 0,435 |
| T21' | 0,178 | 0,178 | 0,297 |
| 1a1 | 0,113 | 0,132 | 0,251 |
| B | 0,0396 | 0,095 | 0,316 |
| Benc | 0,132 | 0,150 | 0,279 |
| A2 | 0,058 | 0,251 | 0,334 |
| Ai | 0,0212 | 0,104 | 0,205 |
| L | 0,224 | 0,214 | 0,425 |

Gráfica 19. % Producción de etanol con 1% de bagazo de pera a 28°C y pH 7.



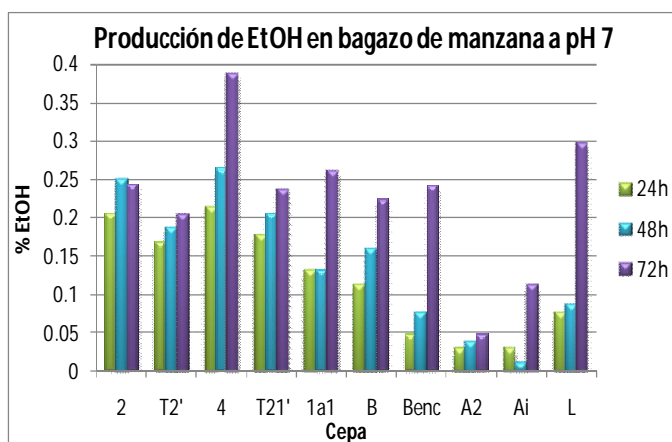
Se evidencia en la gráfica 19 y tabla 26 que las producciones de etanol disminuyeron, de las cepas aisladas solo una logró una producción por encima del 0.40% y esta fue la denominada “4”.

La cepa nombrada “4” produjo 0.435% a las 72 horas de fermentación. Por otra parte, la levadura produjo 0.425%, por lo cual vemos que la cepa aislada de las bacterias deslizantes produjo un poco más que la levadura y esto posiblemente se deba a que tiene enzimas que pueden degradar polímeros, por lo cual además de fermentar los azúcares simples, fermentó una parte de los azúcares obtenidos de los polímeros.

Tabla 27. % Producción de etanol

| Manzana pH 7 | | | |
|--------------|-------|-------|-------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 2 | 0.205 | 0.251 | 0.243 |
| T2' | 0.168 | 0.187 | 0.206 |
| 4 | 0.214 | 0.264 | 0.388 |
| T21' | 0.178 | 0.205 | 0.236 |
| 1a1 | 0.132 | 0.131 | 0.261 |
| B | 0.113 | 0.159 | 0.224 |
| Benc | 0.049 | 0.076 | 0.242 |
| A2 | 0.03 | 0.039 | 0.049 |
| Ai | 0.031 | 0.012 | 0.113 |
| L | 0.076 | 0.086 | 0.297 |

Gráfica 20. % Producción de etanol con 1% de bagazo de manzana a 28°C y pH 7.

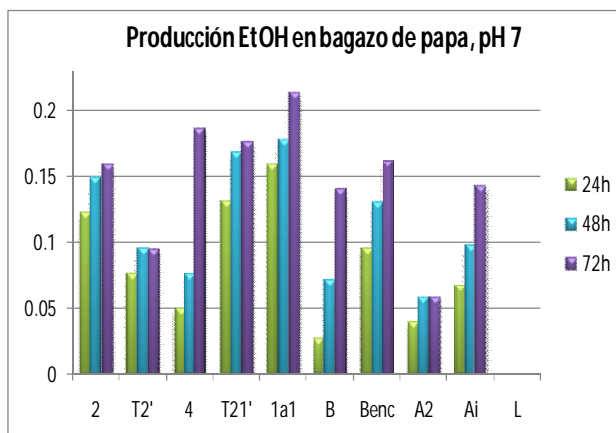


En la gráfica 20 vemos que, la cepa que llevó a cabo la mejor producción fue nuevamente como en el caso del bagazo de pera, la nombrada “4”, produciendo 0.388%, en tanto que la levadura produjo 0.297%. Se vuelve a presentar el comportamiento en el cual la cepa puede utilizar carbohidratos poliméricos que no puede utilizar la levadura, o en dado caso, la cepa aislada se ve favorecida al neutralizar el pH, pues produce más que al realizar la fermentación a temperatura de 37°C.

Tabla 28. % Producción de etanol

| Papa pH7 | | | |
|----------|--------|-------|--------|
| Cepa | 24h | 48h | 72h |
| 2 | 0.122 | 0.15 | 0.16 |
| T2' | 0.076 | 0.095 | 0.0948 |
| 4 | 0.049 | 0.076 | 0.187 |
| T21' | 0.132 | 0.169 | 0.177 |
| 1a1 | 0.16 | 0.178 | 0.214 |
| B | 0.027 | 0.071 | 0.141 |
| Benc | 0.095 | 0.131 | 0.162 |
| A2 | 0.0396 | 0.058 | 0.058 |
| Ai | 0.067 | 0.097 | 0.143 |
| L | 0 | 0 | 0 |

Gráfica 21. % Producción de etanol con 1% de bagazo de papa a 28°C y pH 7.



Vemos en el gráfico 21 la producción llevada a cabo tanto por las cepas aisladas como por la levadura, teniendo las siguientes condiciones de fermentación, microaerofilia, temperatura ambiente y pH neutro (7). Se observa que la cepa que produjo mayor cantidad de etanol fue la denominada “1a1” con 0.214%, seguida de la cepa “4” con 0.187%, y la levadura no llevó a cabo fermentación alcohólica. Haciendo una comparación con el comportamiento que ha seguido la cepa “4” en las condiciones de pH 7, fue la cepa que mayores producciones había realizado, no obstante, en este caso en específico no fue así, y posiblemente esto se deba a que a este pH los enzimas que son necesarios desde el rompimiento de carbohidratos poliméricos hasta los utilizados para producir etanol no se ven favorecidos, por dicha razón, se ve el comparativo en el cual, al mantener el pH original de los frutos hay una mayor producción de etanol. En cuanto a la levadura, no produjo etanol porque no le es posible hidrolizar el almidón.

Para finalizar, la producción de etanol neutralizando el pH, al modificar el pH la producción no fue tan alta, posiblemente porque las mixobacterias están adaptadas al estrés, y por consiguiente de llevar a cabo la hidrólisis de los polisacáridos a pH's más bajos, como cuando se llevó a cabo la fermentación con los bagazos sin modificar el pH, en los cuales los pH's se encontraban entre 4 y 5.

Por otro lado, la levadura no produjo etanol en el bagazo de papa, debido a que no posee las enzimas necesarias para romper los polisacáridos del almidón en moléculas más pequeñas y a partir de ellas llevar a cabo la fermentación, por esta razón la producción fue del cero por ciento, en tanto que en los bagazos de manzana y pera sí llevó a cabo producción de etanol, pues en estos bagazos además de polisacáridos partimos de la idea de que ya contienen azúcares más simples, los cuales fueron fácilmente fermentables, produciendo así en bagazo de pera y manzana 0.425% y 0.297% respectivamente; éstas fueron las mayores producciones que llevó a cabo la levadura.

Para concluir, las cepas que llevaron a cabo las mejores producciones de etanol fueron "Ai", "1a1" y "4" no obstante las demás cepas también realizaron una buena fermentación pero las antes mencionadas fueron las que presentaron los números de producción más altos. Los demás, aunque estuvieran cercanos, no se mencionaron para destacar las mejores cepas productoras. Es importante también destacar que los resultados obtenidos en condiciones de microaerofilia y a temperatura ambiente son las condiciones en las cuales se obtienen mayores producciones, realizando una comparación en condiciones de microaerofilia se colocó únicamente con polisacáridos y se logró un incremento en la producción, en tanto que al realizar los ensayos con bagazos al contener estos azúcares residuales, la producción de alcohol fue aún mayor, pues primeramente utilizaron estos azúcares disponibles, y como segunda opción utilizaron los polisacáridos contenidos en los bagazos (celulosa, almidón y pectina). Por consiguiente, al tercer día de realizar el monitoreo de producción es cuando se obtuvieron los resultados más altos, pues ya se había obtenido la fermentación de los azúcares simples y también de algunos polisacáridos.

Cabe mencionar que, como se denota en las tablas y gráficos líneas atrás, la producción de bioetanol es baja, incluyendo a la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) cuando ésta es el principal y mejor microorganismo productor de bioetanol, y esto podría deberse a que no se le dieron a las levaduras las

condiciones necesarias para la producción de dicho biocombustible, ya que la mejor producción de etanol se lleva a cabo en condiciones completamente anaerobias, sin embargo, las bacterias deslizantes se caracterizan por ser aerobias estrictas, de tal modo que no podría colocarlas en las mismas condiciones en las cuales las levaduras producen el etanol, pues en tal caso, no lograrían desarrollarse, no obstante, intentamos acercarnos a dichas condiciones aplicando microaerofilia y es impresionante ver que dichas bacterias son capaces de producir etanol aún en presencia de oxígeno, aunque realmente las producciones sean bajas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ★ Se lograron aislar 15 cepas diferentes de bacterias deslizantes (citofagas y mixobacterias) e identificar el 60% con la capacidad de producir etanol.
- ★ Las cepas que presentaron una mayor producción de etanol fueron las que pertenecen a las Mixobacterias, y éstas fueron: Ai (*Polyangium aureum*), 1a1 (*Mycococcus xanthus*), T21' (*Melittangium lichenicola* o *M. boletus*) y B (*Stigmatella aurantiaca*).
- ★ La mayor producción de etanol fue a las 72 horas.
- ★ La producción de etanol aumentó en condiciones de microaerofilia y a temperatura ambiente (28°C).
- ★ La producción de etanol no fue favorecida a 37°C y pH7.

- ★ En el bagazo de pera la cepa que llevó a cabo la mayor producción de etanol fue la cepa con clave “Ai” con 1.002%, a las 72 horas de incubación.

- ★ Para el caso del bagazo de manzana las cepas que llevaron a cabo la mayor producción de etanol fueron las claves “Ai” con 0.975% y “1a1” con 0.964%.

- ★ En el bagazo de cáscara de papa la mayor producción se llevó a cabo por la cepa con clave “1a1” con 0.982%.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos se observa que las mixobacterias, principalmente, son capaces de sintetizar exoenzimas hidrolíticas y la maquinaria enzimática para producir etanol. No obstante, las cantidades obtenidas aún son bajas, por lo cual para mejorar las investigaciones posteriores en este tema se sugiere lo siguiente:

Llevar a cabo la identificación filogenética de las cepas aisladas por técnicas de biología molecular para poder tener un mayor y mejor conocimiento acerca de sus características de crecimiento, requerimientos nutricionales y la secreción de los enzimas de interés.

Cantidades menores de oxígeno promovió la producción de etanol, por lo cual sugiero para estudios posteriores determinar si las bacterias deslizantes aisladas pueden resistir en un medio con una atmósfera con menor contenido de oxígeno al otorgado en las condiciones de microaerofilia utilizadas en este estudio, y en dado caso determinar cómo reaccionan las células antes las nuevas condiciones y como impacta esto en la producción de etanol.

En este estudio de producción de etanol, no se lograron altas concentraciones del mismo, entonces se genera la idea que no se está proporcionando a los microorganismos las condiciones necesarias para la producción de etanol, o posiblemente el método de cuantificación de etanol (microdifusión) no es capaz de cuantificar grandes cantidades del mismo, por tanto, una alternativa, sería realizar la cuantificación por medio de HPLC o por cromatografía de gases.

Optimizar las condiciones de fermentación, se puede determinar la producción de etanol a temperaturas más bajas, realizando más variaciones de pH, utilizar

modificar las concentraciones de los bagazos así como probar con bagazos diferentes y cambiar las condiciones de agitación.

Posteriormente de determinar en qué condiciones hay la mayor producción de enzimas hidrolíticas y determinar las enzimas que intervienen en la producción de etanol en condiciones aerobias y/o microaerofilia, así como la caracterización de dichas enzimas, para poder explicar la ruta metabólica por lo cual se lleva a cabo la síntesis de etanol en dichas condiciones.

Por último se sugiere mutar (nitrosoguanidina o radiaciones UV) las células aisladas en este estudio o en el mejor de los casos aislar nuevos cuerpos fructíferos y mutar las células obtenidos de estos para determinar si mediante mutaciones se puede lograr una mayor producción de etanol en las condiciones determinadas en este estudio y/o estableciendo nuevas y mejores condiciones.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Agroenergética. **El biodiesel y bioetanol, cada vez más, una opción rentable.** Asociación de Productores de Energías Renovables. Vida Rural. 2006.
2. Altadill Colominas Ramón, Andrés Payán Ana María, et al. **Reciclaje de Residuos Industriales.** Ediciones Díaz de Santos. 2009.
3. Alterthum Flavio and Ingram L. O. **Efficient Ethanol Production from Glucose, Lactose, and Xylose by Recombinant Escherichia coli.** *Applied And Environmental Microbiology.* Aug. 1989. p. 1943-1948.
4. Álvarez V., Vázquez, A. **Thermal degradation of cellulose derivatives/starch blends and sisal fibre biocomposites.** *Polymer Degradation and Stability.* 2004. 13–21.
5. Arthey David and P. R. Ashurts. **Fruit Processing.** Blackie Academic & Professional. USA. Primera edición, 1996.
6. Ayala Sarmiento A. E.; Escamilla Silva E.M. **Producción de etanol a partir del hidrolizado de sorgo empleando *Saccharomyces Cerevisiae* inmovilizada en Ácido Poligalacturónico.** *Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro y Facultad de Ingeniería Química del Instituto Tecnológico de Celaya,* 2002.
7. Ballesteros Mercedes. **Los biocarburantes.** *Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).* Julio, 2008.

8. Berent, Mario R. - Vedoya, Daniel E. **Tratamiento de Residuos Sólidos Urbanos en Ciudades Intermedias del NEA, Orígenes, Tipos y Composición de Residuos.** *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.* 2005.
9. Calcedo Ordoñez Victoriano. **La Agroenergética, una nueva faceta de la agricultura.** Agroenergética. 2006.
10. Cardona Carlos, Sánchez Oscar. **Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities.** *Bioresource Technology.* 2007. 2415–2457.
11. Castro Martínez Claudia, Valverde María Elena, Paredes López Octavio. **Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción.** *CONCYTEG.* 2009.
12. Crabb W.D y Shetty J.K. **Commodity scale production of sugars from starches.** *Curr. Opin. Microbiol.* 1999. p 252-256.
13. Colón-González Maritrini y Membrillo-Hernández Jorge. **Comunicación entre bacterias.** *Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma De México,* 2003.
14. Dale Kaiser. **Signaling in myxobacteria.** *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. 58:75–98.
15. Das Neves Marcos Antonio. **Bioethanol Production from Wheat Milling.** Tesis para obtener el título de Doctor en la Universidad de Tsukuba, 2006.

16. Das Neves Marcos, Kimura Toshinori, Shimizu Naoto, Nakajima Mitsutoshi. **State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production.** *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology.* 2007.
17. Del Val Alfonso. **Tratamiento de los residuos sólidos urbanos.** Madrid (España), 1996.
18. Demain Arnold, Newcomb Michael, and J. H. David Wu. **Cellulase, Clostridia and Ethanol.** *Microbiology And Molecular Biology Reviews,* Mar. 2005, p. 124–154.
19. Detroy Robert, St. Julian Grant. **Biomass Conversion: Fermentation Chemicals and Fuels.** *Agricultural Research Service Northern Regional Research Center U.S. Department of Agriculture Peoria. Illinois.* Volume 10. Issue 3.
20. De Vries Ronald and Visser Jaap. **Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides.** *Microbiology And Molecular Biology Reviews,* 2001, p. 497–522.
21. Domínguez Espinosa Rosa María, Wang Rouhang, Pacheco Carrillo Juan Daniel. **Residuos Agroindustriales como materias prima para la producción de compuestos químicos finos.** *Tecnología, Ciencia y Educación.* 2002.
22. Dworkin Martin. **Recent Advances in the Social and Developmental Biology of the Myxobacteria.** *Microbiological Reviews,* Mar. 1996, p. 70–102.

23. Ekschmitt K., Liub M., Vettera S., Foxa O. y Woltersa V. **Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter – why is dead organic matter left over in the soil?**. *Geoderma*. 2005. 128 (167-176).
24. Eldor A. Paul. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Third Edition. USA, 2007.
25. Eliécer Carrera Jorge. **Producción Y Aplicación De Enzimas Industriales**. *Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán*. 2003.
26. F. John. Monsalve G., Medina De Pérez Victoria Isabel, Ruiz Colorado Ángela Adriana. **Producción de Etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de Yuca**. 2006.
27. Freitag David G. **The Use of Effective Microorganisms (EM) in Organic Waste Management**. *San Francisco State University*. 2000.
28. García Camús Juan Manuel, García Laborda José Ángel. **Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol**. *Comunidad de Madrid, CIEM, citme*. 2006.
29. García Camus Juan Manuel, García Laborda José Ángel. **Informe de actualización “Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol**. *Universidad Rey Juan Carlos*. 2008.
30. Garza Anthony G., Pollack Jeffrey S., Harris Baruch Z., et al. **SdeK Is Required for Early Fruiting Body Development in *Myxococcus Xanthus***. *Journal of Bacteriology*, 1998, p. 4628–4637
31. Gretz Warren. **Cellulosic Ethanol**. *National Renewable Energy Laboratory. Innovation for Our Energy future, 2007*.

32. González Ramón, Barcenilla José María y Tabera Laura. **Cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol.** *Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC.* 2007.
33. González Vicente. **Producción de Bioetanol a partir de Residuos de Cítricos.** *Ambienta.* Noviembre 2007.
34. H.J. Vázquez y O. Dacosta. **Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas.** *Ingeniería Investigación Y Tecnología.* 2007. 249-259.
35. Hernández Nodarse María Teresa. **Tendencias Actuales en la Producción de Bioetanol.** *Facultad de Ingeniería - Universidad Rafael Landívar.* 2001.
36. Hidalgo Togorres José. **Tratado de Enología.** Tomo 1. España 2003.
37. Ingram L. O., Conway T., Clark D. P., Sewell G. W., And Preston J. F. **Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*.** *Applied And Environmental Microbiology,* 1987, p. 2420-2425.
38. Jelsbak Lars and Søgaaard-Andersen Lotte. **The cell surface-associated intercellular C-signal induces behavioral changes in individual *Myxococcus Xanthus* cells during fruiting body morphogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 96, pp. 5031–5036, April 1999.
39. Keni Vidilaseris, Karina Hidayat, Debbie S. Retnoningrum, et al. **Biochemical characterization of a raw starch degrading α -amylase from the Indonesian marine bacterium *Bacillus* sp.** 2009.
40. Knill Charles, Kennedy John. **Degradation of cellulose under alkaline conditions.** *Carbohydrate Polymers.* 2003. 281–300.

41. Lapidus I. Richard and Howard C. Berg. **Gliding Motility of Cytophaga sp. Strain.** *Journal Of Bacteriology*, 1982, p. 384-398.
42. Latorre García Lorena. Análisis Estructural y Modificación Funcional de la Glucoamilasa de *Saccharomyces Cerevisiae*. Servei de Publicacions 2008.
43. Lawrence J. Shimkets. **Social and Developmental Biology of the Myxobacteria.** *Microbiological Reviews*, 1990. p. 473-501.
44. Laszlo P. Somogyi. **Processing Fruits: Biology, principles, and applications.** Technomic Pub. Co., 1996.
45. Lazazzera Beth A and Grossman Alan D. **The ins and outs of peptide signaling.** Elsevier Science. 1998. 288-294.
46. McBride M. J. and Kempf M.J. **Development of Techniques for the Genetic Manipulation of the Gliding Bacterium *Cytophaga johnsonae*.** *Journal Of Bacteriology*, Feb. 1996, p. 583–590.
47. M.K. Bhat. **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** *Biotechnology Advances*. 2000. 355–383.
48. M. R. Schimer, K. P. Vogel, R. B. Mitchell, and R. K. Perrin. **Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass.** *PNAS*, 2008.
49. Martin Dworkin. **Recent Advances in the Social and Developmental Biology of the Myxobacteria.** *Microbiological Reviews*, Mar. 1996. p. 70–102.
50. Martin Dworkin. **Lingering Puzzles about Myxobacteria.** *Microbe*. 2007.
51. Martínez Jiménez Alfredo y Gosset Lagarda Guillermo. **Ingeniería metabólica de bacterias.** *Biotecnología*. 2007.

52. Mesa Garriga, L., González Suárez, E., González Cortés, M., Agüero Chapín, G. **Estudio de alternativas tecnológicas para la producción de alcohol carburante.** *Centro de Análisis de Procesos. Facultad de Química-Farmacía. Universidad Central Marta Abreu de las Villas, 2006.*
53. Mitsuru Wada, Jyoji Kato, and Ichiro Chibata. **Continuous Production of Ethanol Using Immobilized Growing Yeast Cells.** *European Appl. Microbiol. Biotechnology.* 1980. 275-287.
54. Mundo Alimentario. **Control de Residuos Sólidos en la Industria Alimentaria.** 2009.
55. **NMX-F-103-1982.** Alimentos. Frutas y Derivados. Determinación de Grados Brix.
56. Ohad Itzhak, Friedberg Ilan, Neeman Zvi And Scihramm Michael. **Biogenesis and Degradation of Starch.** *Plant Physiol.* 1971. p 465-477.
57. Okada S., Yokobayashi K., Sakano Y. y Kitahata S. **Debranching Enzymes.** *En Handbook of amylases and related enzymes.* 1988. Editado por Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press plc. Oxford, England. pp. 125-142.
58. Ortiz Marcos Susana. **Buscando combustibles alternativos: el bioetanol.** *Anales de mecánica y electricidad.* 2003.
59. Osanaiye, B.C., Nzelibe, H.C. and Agbaji. **Production of ethanol from Carica papaya (pawpaw) agro waste: effect of saccharification and different treatments on ethanol yield.** *African Journal of Biotechnology.* 2005. pp. 657-659.

60. Pedraza Segura Lorena L., Vásquez Medrano Rubén C. **Producción de Bioetanol: Pretratamiento del Maíz.** *Universidad Iberoamericana.* 2008.
61. Pimentel David and Patzek Tad W. **Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower.** *Natural Resources Research.* 2005.
62. Ranveer Singh Jayani, Shivalika Saxena and Reena Gupta. **Microbial pectinolytic enzymes.** 2005.
63. Reddy Narendra and Yang Yigi. **Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications.** *TRENDS in Biotechnology.* 2005.
64. Reichenbach Hans y Dworkin Martin. **The prokaryotes, the order myxobacterales.** Cap. 20. Col 1. Springer-Verlag. 1981.
65. Reichenbach Hans. **The ecology of the myxobacteria.** *Environmental Microbiology* (1999), 15–21.
66. Reichenbach Hans. **Myxobacteria, producers of novel bioactive substances.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2001) 27, 149–156.
67. Root, W.H. y Barret, D.M. **Apple and Apples Processing.** Processing fruits: Science and Technology. 2a ed. 2005.
68. Rong-Jen Shiau, Yu-Der Wen, Chii-Ling Jeang. **Identification of three proteins up-regulated by raw starch in *Cytophaga* sp.** *Arch Microbiology.* 2008. 651–655.
69. Sánchez Oscar Julián, Cardona Carlos Ariel. **Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas.** *Asociación Interciencia.* Caracas Venezuela. 2005. Pp 671-678.

70. Sánchez-Yáñez Juan Manuel. **Producción de etanol por *Zymomonas* spp.** *Microbiología Ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich, México, 2006.*
71. Sarmiento VC. Vargas DH. Pedroza AM. Matiz A. Poutou RA. **Producción de α -Amilasa con células libres e inmovilizadas.** *Investigación en Medicina Veterinaria, Zootecnia, Acuicultura, Biología y Ciencias Básicas Biomédicas MVZ Córdoba. Córdoba 2003.*
72. Shimkets L. J. **Social and developmental Biology of the Myxobacteria.** *Mixobiological reviews.* 1990. 54:4 (473-501).
73. Shimkets L. J. **Intercellular Signaling During Fruiting-body development of *Myxococcus Xanthus*.** *Annu. Rev. Microbiol.* 1999. 53 (525-549).
74. Shimkets Lawrence, Dworkin Martin and Reichenbach Hans. **The Myxobacteria.** *Prokaryotes* (2006) 7:31–115.
75. Soto Contreras Ricardo. **Plan Estatal de Desarrollo 2000-2025. Recursos Naturales y Medio Ambiente.** 2005.
76. Stanier R. Y. **Studies On The Cytophagas.** Hopkins Marine Station, Pacific Grove, California. 1940.
77. Van der Maarel M., Van der Veen B., Uitdehaag J., Leemhuis H. y Dijkhuizen L. **Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family.** *Journal of Biotechnology.* 2002. 137-155.
78. Vázquez H. J. y Dacosta O. **Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas.** *Ingeniería Investigación y Tecnología.* 2007. 249-259.

79. Van Zyl Carina, Prior Bernard And Du Preez James. **Production of Ethanol from Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolyzate by *Pichia stipitis***. *Department of Microbiology, University of the Orange Free State, South Africa* 1988.
80. Von Bodman S. B., Bauer D. y Coplin D. L. **Quorum Sensing in Plant-Pathogenic Bacteria**. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. 41 (455-482).
81. Waters Christopher M. and Bassler Bonnie L. **Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria**. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005.21:319-346.
82. Wolfgang Dawid. **Biology and global distribution of myxobacteria in soils**. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (2000) 403-427.
83. Zhang-Cai Yan, Bing Wang, Yue-zhong li, Xun Gong, Huai-Qiang Zhang, and Pei-Ji Gao. **Morphologies and Phylogenetic Classification of Cellulolytic Myxobacteria**. *System. Appl. Microbiol.* 2003. p 104-109.
84. I Seminario-Taller. **Biocombustibles. Biodiesel - Bioetanol**. Bogotá – Colombia. 2007.

Referencias electrónicas

85. <http://bioextracto.com.mx/bol70.html>
(Última consulta en 2010).
86. www.andrew.cmu.edu/.../Fermentation%20of%20Ethanol/Fermentation%20of%20Ethanol.ht
(Última consulta en 2010).
87. <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006228/teoria/obpulpfru/p7.htm>
(Última consulta en mayo de 2011).

88. <http://www.infoagro.com/hortalizas/patata.htm>
(Última consulta en mayo de 2011).
89. <http://www.agronomos.cl/2007/sept/HTM/papa.htm>
(Última consulta en mayo de 2011).
90. http://www.quiminet.com/ar7/ar_zgtzgtgthsA-la-carboximetilcelulosa-y-sus-aplicaciones.htm
(Última consulta en mayo de 2011).
91. <http://www.ingenierosagronomos.cl/secciones/articulos.html>
(Última consulta en mayo de 2011).

ANEXOS

ANEXOS

Composición de soluciones y medios empleados.

1. Solución de elementos traza.

Para preparar un litro de medio mineral se disolvieron en agua estéril las siguientes sales:

| Micronutrientes | Peso (g) | Volumen final (mL) | Concentración [g/mL] |
|---|----------|--------------------|----------------------|
| H ₃ BO ₄ | 2.86 | 100 | 0.0286 |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.181 | 100 | 0.0018 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.222 | 100 | 0.0022 |
| NaMoO ₄ · 2H ₂ O | 0.191 | 100 | 0.0019 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.079 | 100 | 0.00079 |
| Co(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O | 0.0494 | 100 | 0.00049 |

| Macronutrientes | Peso (g) | Volumen final (mL) | Concentración [g/mL] |
|---------------------------------------|----------|--------------------|----------------------|
| NH ₄ SO ₄ | 20 | 100 | 0.2 |
| K ₂ HPO ₄ | 3.9 | 100 | 0.039 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 7.5 | 100 | 0.075 |
| Na ₂ CO ₃ | 2.0 | 100 | 0.020 |
| EDTA | 0.1 | 100 | 0.010 |
| Citrato de sodio | 0.6 | 100 | 0.060 |
| FeSO ₄ | 0.3 | 100 | 0.030 |

Debido a que las sales se precipitan al esterilizarse (por calentamiento) su preparación debe llevarse a cabo en condiciones asépticas.

2. Agar CY. Para mantenimiento de mixobacterias.

| Componente | Concentración (%) |
|---------------------------------------|-------------------|
| Peptona de caseína | 0.3 |
| Extracto de levadura | 0.1 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0.1 |
| Agar bacteriológico | 1.5 |

pH ajustado a 7.2 y se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

3. Medio líquido con pectina cítrica 1% (p/v).

| Componente | Concentración (%) |
|-----------------|-------------------|
| Pectina cítrica | 1 |
| Agua destilada | 100 |

La pectina se disuelve primero en agua destilada calentando ligeramente y con agitación constante, se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

4. Medio líquido con almidón de papa 1% (p/v).

| Componente | Concentración (%) |
|-----------------|-------------------|
| Almidón de papa | 1 |
| Agua destilada | 100 |

El almidón se disuelve primero en agua destilada calentando ligeramente y con agitación constante, se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

5. Medio líquido con carboximetilcelulosa (CMC) 1% (p/v)

| Componente | Concentración (%) |
|----------------|-------------------|
| CMC | 1 |
| Agua destilada | 100 |

La CMC se disuelve primero en agua destilada calentando ligeramente y con agitación constante, se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

6. Medio líquido con sustratos complejos 3% (p/v)

| Componente | Concentración (%) |
|------------------------|-------------------|
| Bagazo de pera * | 3 |
| Agua destilada estéril | 100 |
| Cicloheximida | 200µg/mL |

Nota: * Se cambia el sustrato complejo para preparar de medio con bagazo de manzana o papa.

Se realiza en condiciones asépticas, ya que no se esteriliza para no caramelizar componentes del bagazo y se adiciona cicloheximida para evitar el crecimiento de hongos.

7. Reactivos para método de microdifusión.

7.1 Solución saturada de carbonato de potasio.

En 100mL de agua destilada adicionar carbonato de potasio hasta saturar, calentar para aumentar disolución y nuevamente agregar carbonato de potasio hasta obtener solución saturada.

7.2 Solución de dicromato de potasio 0.145% en ácido sulfúrico 10N.

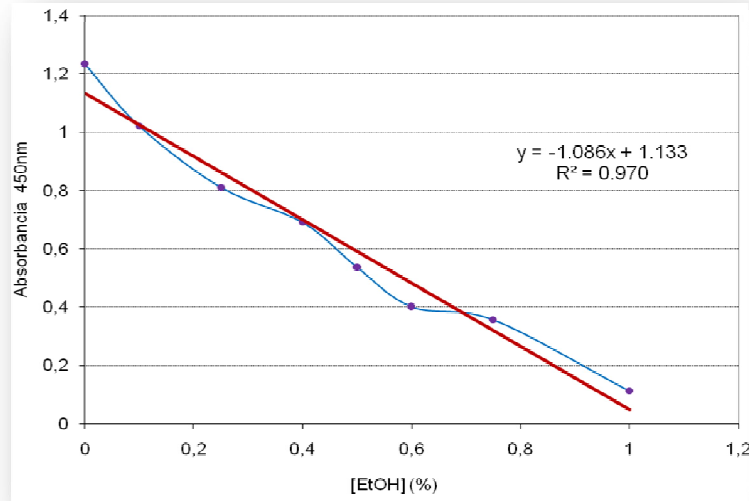
En el laboratorio de contaba con H_2SO_4 18.29M, por lo cual, para preparar 100mL de solución de dicromato de potasio 0.145% en ácido sulfúrico se realiza lo siguiente. Se miden y colocan en matraz aforado 27.34mL de ácido sulfúrico 18.29M, se adicionan hasta disolver 0.145g de dicromato de potasio y aforar a 100mL con agua destilada, mantener el matraz en baño de agua fría, porque la reacción es exotérmica.

8.0 Curva estándar, método microdifusión.

Para iniciar los ensayos, se realizó una curva de calibración de etanol, utilizando el método de microdifusión, para posteriormente de ésta, poder interpolar el valor obtenido de producción de etanol por cada una de las cepas.

Curva estándar, para determinación de etanol.

| Ensayo | [EtOH] (%) | Abs 450nm |
|---------------|------------|-----------|
| Blanco (agua) | 0 | 1.233 |
| 1 | 0.1 | 1.020 |
| 2 | 0.25 | 0.810 |
| 3 | 0.4 | 0.690 |
| 4 | 0.5 | 0.536 |
| 5 | 0.6 | 0.401 |
| 6 | 0.75 | 0.356 |
| 7 | 1.0 | 0.112 |



El comportamiento que presenta el etanol al ser cuantificado por el método de microdifusión, es que a mayor cantidad o concentración de etanol se obtiene menor absorbancia, en tanto que cuando la concentración es menor la absorbancia aumenta. La curva se obtuvo modificando las concentraciones de etanol y posteriormente dichas concentraciones fueron cuantificadas por el método de microdifusión. Por consiguiente, se obtiene la ecuación que ayudará a determinar (cuantitativamente) la cantidad de etanol que produjeron las bacterias.

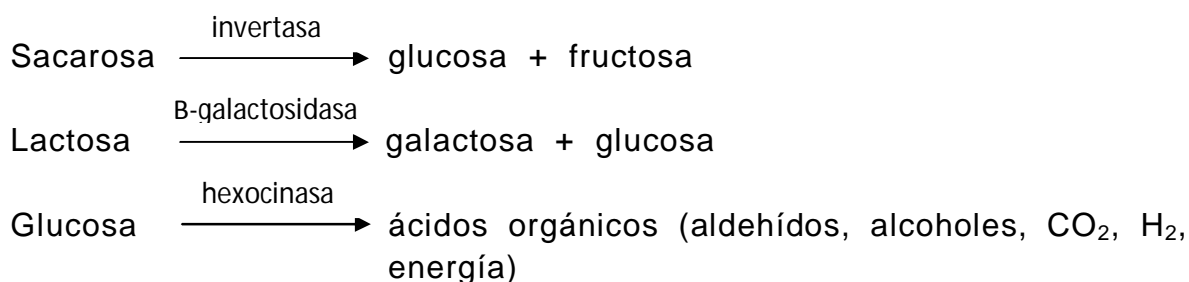
9. Pruebas bioquímicas

9.1 Pruebas de fermentación de carbohidratos

El objetivo de estas pruebas es determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal.

Los polisacáridos son demasiado complejos para penetrar en una célula bacteriana para su degradación. Primero son catabolizados a monosacáridos menos complejos por enzimas exocelulares para que puedan ser incorporados al interior de la célula.

Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son: a) ácido láctico, b) ácidos acético y fórmico, c) ácido láctico y alcohol etílico (etanol), d) etanol, e) acetilmetilcarbinol (acetoína) y CO₂ y h) ácido butírico a alcohol butílico (butanol).



Caldo Rojo de fenol

| Ingredientes | Concentración |
|--------------------------|---------------|
| Peptona | 10g |
| Ext. De carne (optativo) | 1g |
| NaCl | 5g |
| Rojo de fenol | 0.0018g |
| Agua desionizada | 1000mL |
| Carbohidrato | 0.5% (5g/L) |

pH 7.4 ± 0.2

Se esteriliza el medio en el autoclave a 121°C, 15lb, 15 minutos.

Caldo rojo de fenol como indicador de pH:

- a) Ácido: color amarillo, pH 6.8
- b) Alcalino: color rosado rojo, pH 8.4

Las pruebas de fermentación de hidratos de carbono pueden utilizarse para determinar qué productos finales se han formado pero no las vías metabólicas utilizadas.

El indicador de pH utilizado es el rojo de fenol, ya que la mayoría de los productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono son ácidos orgánicos. Con el rojo de fenol, el cambio ocurre cerca del pH original del medio (pH ácido 6.8: medio pH 7.4).

La peptona en el medio también es degradada por las especies bacterianas y produce sustancias alcalinas.

Para realizar esta prueba se necesitan tubos con campanas de Durham. En condiciones de asepsia tomar una asada del microorganismo e inocular cada uno de los tubos. Incubar a 37°C durante 24 horas. Se identifican los siguientes cambios:

A. Producción de ácido por la degradación de carbohidratos, vire del color del medio a color amarillo, pH 6.8

(G). Positivo para producción de gas.

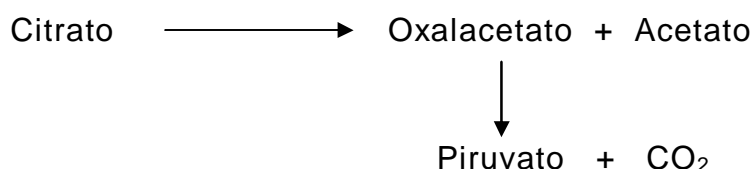
Negativo (-). No se utilizó el carbohidrato, se utilizaron las peptonas y hubo producción de amoníaco y aminas.

SC. Sin cambio en el medio, no se llevó a cabo la utilización de carbohidratos.

9.2 Citrato

En esta prueba se puede determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, por ello se provoca una alcalinización del medio.

Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons, el cual contiene citrato de sodio como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno y azul de bromotimol como indicador de pH. Las bacterias que logran multiplicarse en este medio, con aquellas capaces de metabolizar el citrato, y al hacerlo liberan iones amonio. Esta liberación de iones básicos, junto con la combinación de citrato, generará una fuerte alcalinidad del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul.



| Ingredientes | Concentración |
|--|---------------|
| MgSO ₄ | 0.2g |
| (NH ₄)H ₂ PO ₄ | 1.0g |
| K ₂ HPO ₄ | 1.0g |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O | 2.0g |
| Azul de bromotimol | 0.08g |
| NaCl | 5.0g |
| Agar | 15 – 20g |
| Agua desionizada | 1000mL |

Se esteriliza el medio en el autoclave a 121°C, 15lb, 15 minutos. Dejar que el medio solidifique en posición inclinada.

Se inocula el microorganismo por estría solo en el pico de flauta. Se incuban los tubos a 37°C de 24-48 horas.

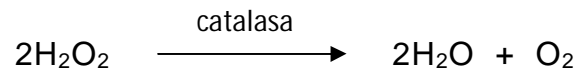
Interpretación:

Positivo (+): crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta.

Negativo (-): ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color verde.

9.3 Catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa, es una enzimas que descompone el peróxido de hidrogeno en oxigeno y agua. El peróxido de hidrogeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos, si se acumula es letal para las células bacterianas.



En una caja petri con agar nutritivo, se siembra por estría recta el microorganismo, se invierten las cajas e incuban a 37°C durante 24 horas. Se agregan unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre el desarrollo microbiano. Una rápida efervescencia indica la producción de oxigeno gaseoso y una prueba positiva.

9.4 Agar Hierro Kliger

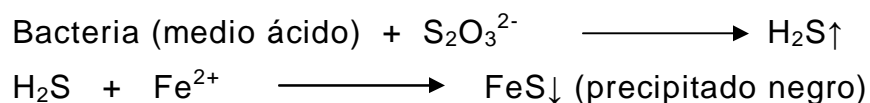
En este medio se pueden determinar varias condiciones enzimáticas de las bacterias. Está compuesto principalmente por dos azucres en distinta proporción, glucosa al 0.1% y lactosa al 1%, además este medio contiene tiosulfato sódico, citrato férrico y rojo de fenol como indicador de pH. Para estudiar el comportamiento de las bacterias en aerobiosis y anaerobiosis, la siembra en este cultivo se deberá realizar tanto en la superficie del agar, como en la profundidad del mismo.

La información que nos proporciona este medio es la siguiente:

- **Fermentación de la glucosa:** se presenta un viraje a color amarillo en el fondo. Si las bacterias fermentan solo la glucosa, en la superficie la utilizará por vía respiratoria, donde la tensión de oxigeno disminuye lo suficiente, empleará una pequeña porción por la vía fermentativa. Esto producirá una pequeña cantidad de ácidos que

serán neutralizados por las aminas derivadas de la descarboxilación oxidativa de las proteínas, por lo que el medio mantendrá su color rojo en la superficie, al no haber cambio de pH. En el caso contrario, las bacterias crecidas en la profundidad emplearán desde el principio la glucosa por la vía fermentativa, produciendo ácidos que no serán neutralizados, provocando un descenso del pH y el color del medio en el fondo del tubo cambiará a amarillo.

- **Fermentación de lactosa:** presencia de viraje a color amarillo en la superficie. Si las bacterias fermentan la lactosa, los ácidos producidos modifican el pH de la superficie del medio. En este caso las aminas no son capaces de neutralizar la cantidad de ácidos producidos en esta fermentación, ya que la lactosa se encuentra en el medio a mayor concentración que la glucosa. Por lo que el color del medio en la superficie cambiará a amarillo.
- **No-fermentación de los azúcares:** Si la bacterias es aerobia estricta, el medio permanecerá de color rojo. En este caso, los azúcares se utilizan en la respiración degradándose completamente hasta CO_2 , que se elimina y no modifica el pH.
- **Producción de gas en la fermentación:** aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo.
- **Producción de ácido sulfhídrico:** ocurre la misma reacción que en la prueba del SIM, la cual es:



9.5 Indol

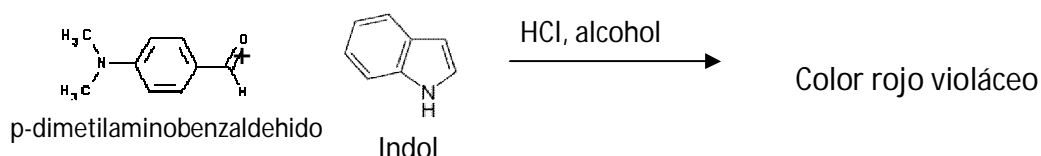
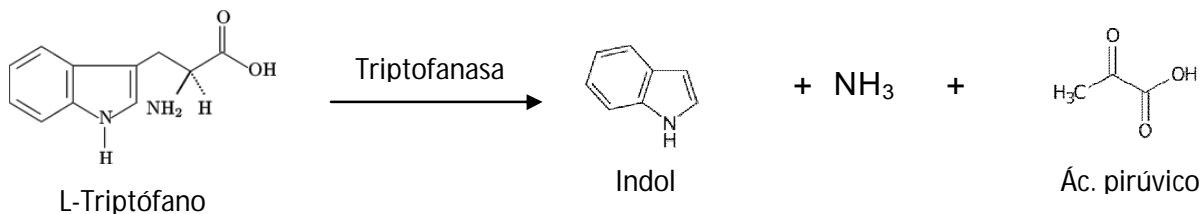
Aquí se puede observar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, la cual es capaz de degradar el aminoácido triptófano a indol, que es el compuesto que se detecta en este ensayo. Para realizar esta

prueba es necesario que la bacteris se cultive durante 24 – 48 horas en un caldo de triptona con NaCl al 0.5% (este digerido de proteínas animales es especialmente rico en triptófano).

Para la posterior detección del indol se utiliza el reactivo de Kovacs que se puede preparar utilizando la siguiente formulación:

| Componente | Concentración |
|--|---------------|
| Alcohol amílico o isoamílico (o alcohol butílico) | 150mL |
| p-dimetilamino-benzaldehído | 10g |
| HCl concentrado | 50mL |

Se disuelve primero el aldehído en el alcohol, agregando después lentamente a esta mezcla el ácido. Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, al añadir al medio 5 gotas del reactivo de Kovacs, se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. Si esto ocurre después de 24 horas, será considerada completa, pero si es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba. Por ello es conveniente hacer siempre la prueba no en el tubo inclinado sino en una porción de unos 2ml que se retira de él asépticamente.



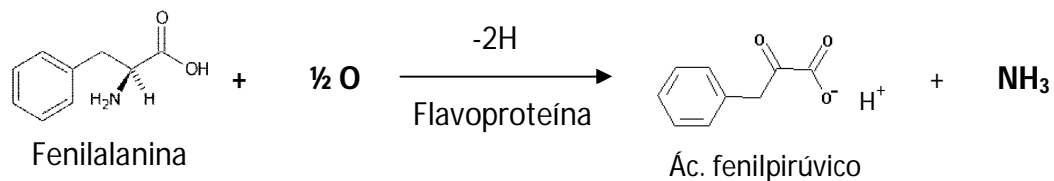
9.6 Urea

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa.

Se cultiva el microorganismo en slant en agar urea de Christensen. Este medio se complementa después del autoclavado con 50mL/L de urea. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir el enzima ureasa. Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa.

9.7 Fenilalanina desaminasa

La fenilalanina es un aminoácido que por desaminación oxidativa forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. La prueba se basa en la detección del ácido fenilpirúvico luego del desarrollo del microorganismo en un medio que contiene fenilalanina. Para esto se agrega cloruro férrico que forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico que indica reacción positiva. El medio de cultivo no puede contener extractos de carne o peptonas por su contenido variable en fenilalanina.



9.8 Medio SIM

Producción de ácido sulfhídrico: En esta prueba se observa un precipitado de color negro en el fondo del tubo. Algunas especies

respiratorias anoxibiónticas son capaces de emplear el tiosulfato sódico como aceptor final de electrones en la cadena transportadora. Por lo que este compuesto se reduce a ácido sulfhídrico, que a su vez reacciona con el hierro (Fe^{2+}) presente en el medio formando un precipitado negro de sulfuro de hierro. Los iones Fe^{2+} produciendo los iones Fe^{3+} del citrato férrico y aparecen debido a los cambios en los potenciales redox producidos al someter al autoclave el medio de cultivo.

Prueba de la movilidad: Esta prueba nos ayuda a determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles. El medio SIM permite que ésta prueba se realice, gracias a ser un medio semisólido, ya que presenta solamente 3.5g/L de agar. En estas condiciones, las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por el contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron.

9.9 Degradación de polímeros (agar almidón, gelatina, pectina y CMC)

La hidrólisis de los polisacáridos son ensayos ampliamente utilizados en la identificación y caracterización de microorganismos.

En condiciones de asepsia, se toma una asada del cultivo fresco (24 horas de incubación), se siembra por estría recta empezando por el borde de la caja que contienen cada uno de los polímeros. Invertir las cajas e incubar a 37°C durante 3 días.

Degradación de almidón: se cubre la superficie de la caja con solución de lugol, observar la coloración que se produce al reaccionar el almidón del medio con el lugol, las zonas transparentes son indicativos de la degradación del polisacárido.

Degradación de gelatina: determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan o hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. Si el microorganismo lleva a cabo la hidrólisis de gelatina el medio presenta licuefacción, sino permanece sólido.

Degradación de CMC: Se cubre la superficie de la caja con solución de rojo congo y se deja reposar un minuto, posteriormente se realizan 2 o 3 lavados con HCl 1M hasta lograr contrastar los halos de hidrólisis, si la superficies se mantiene completamente roja indica que no hubo hidrólisis, en tanto que si hay presencia de halos blanquecinos indica que hubo hidrólisis a azúcares más simples a partir de la celulosa.