



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: CINDY ESTHEFANÍA MALDONADO CÁRDENAS

**TEMA: CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE
UNA BACTERIA ROJA NO SULFUROSA ASOCIADA A UN
CONSORCIO DE UN EFLUENTE LÁCTEO, INCLUYENDO SU
CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE BACTERIOCLOROFILA *a* Y
CAROTENOIDES TOTALES**

DIRECTORA: B. Sc. PONCE LOAIZA, KARINA LOURDES

SANGOLQUÍ, AGOSTO 2015

CERTIFICACIÓN

El proyecto "CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE UNA BACTERIA ROJA NO SULFUROSA ASOCIADA A UN CONSORCIO DE UN EFLUENTE LÁCTEO, INCLUYENDO SU CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE BACTERIOCLOROFILA *a* Y CAROTENOIDES TOTALES" realizado por Cindy Esthefanía Maldonado Cárdenas, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, en el Reglamento de estudiantes.

Sangolquí, agosto de 2015



B. Sc. Karina Ponce

DIRECTORA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

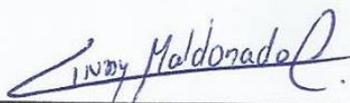
Yo, Cindy Esthefanía Maldonado Cárdenas

Declaro que:

El proyecto de grado denominado "CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE UNA BACTERIA ROJA NO SULFUROSA ASOCIADA A UN CONSORCIO DE UN EFLUENTE LÁCTEO, INCLUYENDO SU CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE BACTERIOCLOROFILA *a* Y CAROTENOIDES TOTALES", ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes y cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, agosto de 2015.



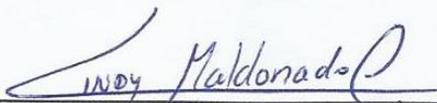
Cindy Esthefanía Maldonado Cárdenas

AUTORIZACIÓN

Yo, Cindy Esthefanía Maldonado Cárdenas

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, la publicación, en la biblioteca virtual de la institución el presente trabajo “CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE UNA BACTERIA ROJA NO SULFUROSA ASOCIADA A UN CONSORCIO DE UN EFLUENTE LÁCTEO, INCLUYENDO SU CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE BACTERIOCLOROFILA *a* Y CAROTENOIDES TOTALES”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, agosto de 2015.



Cindy Esthefanía Maldonado Cárdenas

DEDICATORIA

*A mis padres por impulsarme en cada etapa de mi vida demostrándome su apoyo y amor. Gracias a ustedes he llegado a ser la mejor versión de mí.
A mi hermana María José por tu amor, cariño, paciencia. Mi vida no sería lo mismo sin ti.*

A Miguel por haber conquistado mi corazón y ser un hombre maravilloso con quien anhelo compartir muchas experiencias.

AGRADECIMIENTO

Mi inmensa gratitud a la Universidad Politécnica Salesiana por la apertura para realizar mi trabajo de investigación.

Al Qm. Christian Larenas por la oportunidad de realizar el proyecto de investigación en las instalaciones de los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Campus “El Girón”.

Al Doc. Ever Morales por ser quien estuvo batallando para que este proyecto se realizara, no sólo le doy gracias por lo compartido dentro del laboratorio sino también por las enseñanzas impartidas fuera de él.

A mi directora B. Sc. Karina Ponce, al Ing. Pedro Romero y a la Dra. Blanca Naranjo; por la ayuda y guía en la ejecución del proyecto.

A mis padres Edison y Fanny, por su amor incondicional y ahínco para que culmine este período de mi vida. A María José por ser mi ejemplo y la mejor hermana.

A mi enamorado Miguel, por alentarme en todo momento, por estar en las buenas y sobre todo en las situaciones más difíciles.

A mis abuelitos, tíos y primos por demostrarme que no hay nada que se compare a la familia, son un gran motor que me impulsa a ser mejor.

A Nadya, Majo, Pame, Tita y Norma, gracias por tantos momentos compartidos y por cultivar esta maravillosa amistad que se ha mantenido a lo largo de años.

A mis amigas Estefy, Andy, Adry, Eve y Lunita por haber forjado esta hermosa amistad durante mi vida universitaria.

A mis alquitas parranderas, Kary, Geova, Carito, Dany, Karlita, Marquito, Byron y Mafer gracias por su amistad, preocupación y por ser los autores de momentos muy alegres.

Cindy Maldonado Cárdenas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| CERTIFICACIÓN | ii |
| DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD | iii |
| AUTORIZACIÓN..... | iv |
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO..... | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | vii |
| LISTADO DE TABLAS..... | x |
| LISTADO DE FIGURAS..... | xi |
| NOMENCLATURA | xiii |
| RESUMEN | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Formulación del problema..... | 1 |
| 1.2 Justificación del problema..... | 2 |
| 1.3 Objetivos de la investigación | 3 |
| 1.3.1 Objetivo general | 3 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 3 |
| 1.4 Marco teórico..... | 4 |
| 1.4.1 Efluentes lácteos | 4 |
| 1.4.2 Generalidades de bacterias fotosintéticas rojas..... | 6 |
| 1.4.3 Bacterias púrpuras no sulfurosas | 14 |
| 1.4.4 Fases de crecimiento de las bacterias | 18 |
| 1.4.5 Identificación bacteriana | 19 |
| 1.4.6 Métodos de determinación de la población bacteriana | 22 |
| 1.4.7 Cromatografía en capa fina (TLC) de pigmentos | 24 |
| CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS..... | 26 |
| 2.1 Zona de estudio..... | 26 |
| 2.1.1 Obtención de efluente con la bacteria fotosintética asociada al consorcio .. | 26 |

| | | |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.2 | Trabajo de laboratorio | 26 |
| 2.2 | Participantes..... | 27 |
| 2.3 | Período de tiempo de la investigación..... | 27 |
| 2.4 | Diseño..... | 27 |
| 2.5 | Variables de respuesta | 29 |
| 2.5.1 | Densidad celular..... | 29 |
| 2.5.2 | Medición de bacterioclorofila <i>a</i> | 29 |
| 2.5.3 | Medición de carotenoides totales | 30 |
| 2.6 | Procedimiento | 31 |
| 2.6.1 | Aislamiento de las bacterias presentes en el efluente lácteo | 31 |
| 2.6.2 | Mantenimiento del consorcio | 32 |
| 2.6.3 | Pruebas microbiológicas | 32 |
| 2.6.4 | Secuenciación del consorcio..... | 36 |
| 2.6.5 | Ensayo de concentración de caldo nutritivo | 39 |
| 2.6.6 | Ensayo de pH..... | 39 |
| 2.6.7 | Ensayo de iluminancia | 39 |
| 2.6.8 | Ensayo de presencia de aire..... | 40 |
| 2.6.9 | Análisis de los pigmentos fotosintéticos | 41 |
| 2.6.10 | Análisis de datos | 42 |
| CAPÍTULO 3: RESULTADOS..... | | 43 |
| 3.1 | Aislamiento | 43 |
| 3.2 | Pruebas microbiológicas | 43 |
| 3.3 | Secuenciación | 44 |
| 3.4 | Ensayo de concentración de caldo nutritivo | 45 |
| 3.5 | Ensayo de pH..... | 48 |
| 3.6 | Ensayo de iluminancia | 51 |
| 3.7 | Ensayo de presencia de aire | 54 |
| 3.8 | Análisis de los pigmentos fotosintéticos | 56 |

| | | |
|-------|------------------------------------------------|----|
| 3.8.1 | Cromatografía..... | 56 |
| 3.8.2 | Barrido espectral | 58 |
| | CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN..... | 60 |
| 4.1 | Aislamiento | 60 |
| 4.2 | Condiciones ambientales controladas | 61 |
| 4.3 | Análisis de los pigmentos fotosintéticos | 62 |
| | CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES..... | 64 |
| | CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES | 66 |
| | CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA | 67 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1.1 Longitud de onda en la cual hay la máxima absorción de luz en las clorinas de bacterias fotosintéticas..... | 12 |
| Tabla 1.2 Materiales usados como fase estacionaria para cromatografía de capa fina..... | 25 |
| Tabla 2.1 Factor controlado – concentración de caldo nutritivo | 28 |
| Tabla 2.2 Factor controlado - pH..... | 28 |
| Tabla 2.3 Factor controlado - iluminancia | 28 |
| Tabla 2.4 Factor controlado - presencia de aire | 29 |
| Tabla 2.5 Composición de la solución <i>Master mix</i> para amplificación de gen 16S rRNA..... | 37 |
| Tabla 3.1 Pruebas microbiológicas realizadas al consorcio | 44 |
| Tabla 3.2 Microorganismos identificados mediante la herramienta Blast comparadas en la base de datos..... | 45 |
| Tabla 3.3 Ecuación de la curva de crecimiento bacteriano y valor de R^2 en el ensayo “concentración de caldo nutritivo” | 46 |
| Tabla 3.4 Distribución de medias para los tres últimos días de toma de muestra de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo “concentración de caldo nutritivo” | 47 |
| Tabla 3.5 Ecuación de la curva de crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio y valor de R^2 del ensayo en función del pH..... | 49 |
| Tabla 3.6 Ecuación de la curva de crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio y valor de R^2 para el ensayo de iluminancia..... | 51 |
| Tabla 3.7 Ecuación de la curva de crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio y valor de R^2 en el ensayo de condición anaerobia, microaerófila y aerobia..... | 54 |
| Tabla 3.8 R_f obtenidos mediante TLC de biomasa seca y fresca de las BRNS..... | 58 |
| Tabla 3.9 Picos de absorción en el barrido espectral del cultivo <i>in vivo</i> | 59 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1: Características generales de las bacterias fotosintéticas rojas..... | 8 |
| Figura 1.2: Esquema del proceso fotosintético para producir ATP. | 10 |
| Figura 1.3: Estructura química de la bacterioclorofila <i>a</i> | 11 |
| Figura 1.4: Estructura química de algunos carotenoides..... | 13 |
| Figura 1.5: Curva de crecimiento de microorganismos en función del tiempo | 19 |
| Figura 1.6: Electroferograma de un amplicón | 22 |
| Figura 1.7: Diagrama de niveles energéticos..... | 23 |
| Figura 2.1: Agua residual de industria láctea. | 26 |
| Figura 2.2: Extracción de pigmentos fotosintéticos para cuantificación | 30 |
| Figura 2.3: Aislamiento de las bacterias presentes en el efluente lácteo..... | 31 |
| Figura 2.4: Escalamiento en caldo nutritivo de BRNS | 32 |
| Figura 2.5: Tinción Gram de las bacterias observadas con lente de inmersión..... | 33 |
| Figura 2.6: Prueba de catalasa..... | 34 |
| Figura 2.7: Prueba de oxidasa..... | 34 |
| Figura 2.8: Prueba TSI..... | 35 |
| Figura 2.9: Prueba del citrato de Simmons | 35 |
| Figura 2.10: Cuantificación de ADN el equipo Qubit Fluorometer 2.0..... | 37 |
| Figura 2.11: Electroforesis de los productos de PCR. | 38 |
| Figura 2.12: Uso de luxómetro para medir la iluminancia..... | 40 |
| Figura 2.13: Montaje del tratamiento de aireación | 41 |
| Figura 3.1: Crecimiento bacteriano en medio sólido..... | 43 |
| Figura 3.2: Movilidad de las BRNS en agar nutritivo | 44 |
| Figura 3.3: Curvas de dispersión del crecimiento bacteriano en el ensayo | |
| “concentración de C.N.” | 46 |
| Figura 3.4: Contenido de BChl <i>a</i> de las BRNS asociadas a un consorcio en el..... | |
| ensayo “concentración de caldo nutritivo” | 47 |
| Figura 3.5: Contenido de carotenoides totales de las BRNS asociadas a un..... | |
| consorcio en el ensayo “concentración de caldo nutritivo”. | 48 |
| Figura 3.6: Curvas de dispersión del crecimiento de las BRNS asociadas a un | |
| consorcio para el ensayo en función del pH..... | 48 |
| Figura 3.7: Comparación del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio en | |
| el ensayo de pH | 49 |
| Figura 3.8: Comparación del contenido de BChl <i>a</i> de las BRNS asociadas a un..... | |
| consorcio en el ensayo de pH..... | 50 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3.9: Comparación del contenido de carotenoides totales de las BRNS..... asociadas a un consorcio en el ensayo de pH..... | 50 |
| Figura 3.10: Curvas de dispersión del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio para el ensayo de iluminancia..... | 51 |
| Figura 3.11: Comparación del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio ... en el ensayo de intensidad luminosa..... | 52 |
| Figura 3.12: Comparación del contenido de BChl <i>a</i> de las BRNS asociadas a un..... consorcio en el ensayo de iluminancia..... | 53 |
| Figura 3.13: Comparación del contenido de carotenoides totales de las BRNS..... asociadas a un consorcio en el ensayo de iluminancia | 53 |
| Figura 3.14: Curvas de dispersión del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio del ensayo de condición anaerobia, microaerófila y aerobia | 54 |
| Figura 3.15: Comparación del crecimiento celular de las BRNS para el ensayo de.... condición anaerobia, microaerófila y aerobia. | 55 |
| Figura 3.16: Comparación del contenido de BChl <i>a</i> en las BRNS bajo condición anaerobia, microaerófila y aerobia | 56 |
| Figura 3.17: Comparación del contenido de carotenoides totales en las BRNS bajo.. condición anaerobia, microaerófila y aerobia | 56 |
| Figura 3.18: Cromatografía de capa fina aplicada a un extracto de pigmentos de..... BRNS..... | 57 |
| Figura 3.19: Barrido espectral del cultivo <i>in vivo</i> de las BRNS..... | 58 |

NOMENCLATURA

Abs: Absorbancia

BChl: Bacterioclorofila

BRNS: Bacterias rojas o púrpuras no sulfurosas

Chl: Clorofila

C.N.: Caldo nutritivo

LH: Complejos de recolección de luz o *light harvesting*

RC: Centro de Reacción

TLC: Cromatografía en Capa Fina o *Thin Layer Chromatography*

UFC: Unidades formadores de colonias

RESUMEN

Los estudios sobre microorganismos fotosintéticos capaces de crecer en efluentes con altas cargas orgánicas son importantes puesto que son fuente de antioxidantes (carotenoides), lo que amerita determinar las condiciones que puedan optimizar su desarrollo así como la identificación taxonómica. Se reporta la caracterización de una bacteria fotosintética roja no sulfurosa (BRNS) asociada a un consorcio de un efluente lácteo, en relación a su morfología, pH (5, 7, 9), caldo nutriente (2, 4, 6 y 8 g/L), iluminación (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 klx) y aireación. El crecimiento fue seguido mediante turbidez (680nm), contenido de bacterioclorofila *a* (770nm) y carotenoides totales (480 y 750nm). Esta cepa se identificó como un bacilo Gram negativo móvil, catalasa y oxidasa positiva, fermentadora de glucosa y/o sacarosa, productora de H₂S en presencia de SO₃Na. En fase estacionaria se obtuvo el mayor crecimiento entre 6 y 8 g/L de caldo nutritivo; el valor más elevado de Bchl *a* (3.74 mg/mL) y carotenoides totales (1.96 µg/mL) fue a 6 g/L. Al evaluar el pH, hubo mayor crecimiento y contenido de Bchl *a* (5.17 mg/mL) y carotenoides totales (1.12 µg/mL) a pH 7. En cuanto a la iluminancia se determinó que a 8 y 16klx, se mantuvo el crecimiento más alto. Sin embargo, el contenido de Bchl *a* y carotenoides totales fueron más altos a 4 klx con 6,47 mg/mL y 2,72 µg/mL; respectivamente. En condición microaerobia el crecimiento y producción de pigmentos fueron superiores, en relación a la condición anaerobia y aeróbica. Mediante cromatografía de capa fina (TLC) en biomasa fresca y seca, usando como fase móvil éter de petróleo:cloroformo:acetona (3:1:1) v/v se identificó que las BRNS aisladas en este estudio tenían una clase de caroteno y bacterioclorofila *a* y *b*, con el barrido espectral se corroboró la presencia de Bchl *a* y el carotenoide de la serie de las espirilloxantinas.

PALABRAS CLAVES:

- **EFLUENTE LÁCTEO**
- **BACTERIAS ROJAS**
- **ABSORBANCIA**
- **CAROTENOIDES TOTALES**
- **BACTERIOCLOROFILA**

ABSTRACT

Studies on photosynthetic microorganisms capable of growing in effluents with high organic loads are important because they are a source of antioxidants (carotenoids), so is necessary determine the conditions to optimize their development and taxonomic identification. Here was reported the characterization of a purple non sulfur bacteria (BRNS) associated with a consortium of a dairy effluent, regarding its morphology, pH (5, 7, 9), nutrient broth (2, 4, 6 and 8 g/L), illumination (0, 0.5, 1, 2, 4, 8,16 klx) and aeration. Growth was followed by turbidity (680nm), content bacteriochlorophyll *a* (770nm) and total carotenoids (480 and 750nm). This strain was identified as a mobile Gram negative rod, catalase and oxidase positive, which fermented glucose and/or sucrose with production of H₂S in the presence of SO₃Na. At stationary phase the higher growth was obtained between 6 and 8 g/L of nutrient broth; the highest value of Bchl *a* (3.74 mg/mL) and total carotenoids (1.96 µg/mL) was at 6 g/L .pH was evaluated, there was greater growth and content of BChl *a* (5.17 mg/mL) and total carotenoids (1.12 µg/mL) at pH 7. In the illuminance trial the highest growth was at 8 and 16klx. However, the content of Bchl *a* and total carotenoids were higher at 4 klx with 6.47 mg/mL and 2.72 µg/mL; respectively. In microaerobic condition the growth and pigment production were higher in relation to anaerobic and aerobic condition. By thin layer chromatography (TLC) on fresh and dry biomass, using as mobile phase petroleum ether:chloroform:acetone (3:1:1) v/v was identified that BRNS isolated in this study had a kind of carotene and bacteriochlorophyll *a* and *b*, with spectral scanning was corroborated the presence of Bchl *a* and the carotenoid of spirillloxantin serie.

KEYWORDS:

- DAIRY EFFLUENT
- PURPLE BACTERIA
- TURBIDITY
- TOTAL CAROTENIDS
- BACTERIOCHLOROPHYLL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Las descargas lácteas se caracterizan por contener compuestos de tipo orgánico e inorgánico, derivados de la producción de leche y de los aditivos que existen en los productos (Gandarillas, Sánchez, & Serrano, 2009), así dichas sustancias, principalmente las orgánicas sirven de alimento a los microorganismos que las usan para generar metabolitos e incorporarlos a su biomasa (Corpas, 2013).

En los efluentes lácteos se puede encontrar a los microorganismos fotosintéticos que usan la luz solar como fuente de energía; dentro de ellos están las bacterias fotosintéticas rojas no sulfurosas que deben su coloración a la bacterioclorofila y carotenoides, se caracterizan por poseer plasticidad metabólica que les permite ser cosmopolitas y adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Jones, 2009).

Estas bacterias producen diferentes carotenoides que son importantes industrialmente debido a que son antioxidantes; pero actualmente la producción microbiana de estos pigmentos sigue a la espera, porque hay que reducir costos y aumentar la productividad; pues se busca que la biomasa en menor tiempo acumule la mayor cantidad posible de éstos, así se facilitarían los procesos de extracción y purificación (Barredo, 2012).

La presente investigación busca obtener información sobre las condiciones de crecimiento a nivel del laboratorio de una bacteria fotosintética roja no sulfurosa asociada a un consorcio proveniente de un efluente lácteo para definir qué factores medioambientales afectan su crecimiento y producción de bacterioclorofila a y carotenoides totales.

1.2 Justificación del problema

Los efluentes son aguas con desechos sólidos, líquidos o gaseosos generados por los hogares y/o industrias, que se descargan a los cursos de agua (Gandarillas *et al.*, 2009). Los efluentes que se generan por la industria lechera proceden de los diferentes procesos de producción, por lo tanto, el agua descartada posee leche diluida, aceites, grasas, sólidos en suspensión, nitrógeno, lactosuero, compuestos orgánicos disueltos, suspensiones coloidales de proteínas. En aguas de lavado se encuentran en altas concentraciones residuos alcalinos y químicos, además por poseer azúcares estos son fermentados por los microorganismos lo que provoca un descenso rápido del pH (Kaewsuk, Thorasampan, Thanuttamavong, & Tae, 2010; Corpas, 2013; Paguay, 2013).

En las aguas residuales crecen diferentes microorganismos que ofrecen dos ventajas simultáneas, la primera, el reducir los contaminantes del agua, y por otra parte, la posibilidad de generar biomasa que puede ser estudiada para buscar aplicaciones biotecnológicas como complementos proteínicos, aditivos alimenticios o farmacéuticos, energía, fertilizantes entre otros (Moreno, Naranjo, & Koch, 2010). Existen diversos microorganismos en los efluentes y las poblaciones que se presenten van a depender de las condiciones ambientales; dentro de éstos se destacan las bacterias fotosintéticas rojas que utilizan la luz para producir energía y componentes celulares (Huang, Wu, Jih, & Chen, 2001).

Las bacterias rojas no sulfurosas pueden incorporar una amplia variedad de compuestos orgánicos y su presencia en los cuerpos de agua depende de los nutrientes que esta posea. Su existencia contribuye a la purificación del agua altamente contaminada que esté expuesta a la luz solar (Selvakumar & Dhevendaran, 2011). Tienen un metabolismo versátil; pueden combinar condiciones fototróficas y heterotróficas; están muy bien adaptados a diferentes ambientes (Kiriratnikorn, 2006), puesto que crecen en luz u oscuridad, usan compuestos orgánicos como fuente de carbono y donadores

de electrones, además por su relación con el oxígeno pueden ser estrictamente anaerobios o facultativamente aerobios (Stanier, 1961).

La característica distintiva de estos microorganismos son sus colores: rojo, café y púrpura que se forman por la combinación de carotenoides y bacterioclorofilas (Shabed, Azim, & Shoreit, 2008). Presentando un mayor interés en los carotenoides por ser antioxidantes, puesto que pueden emplearse en diversos fines biotecnológicos; sin embargo, es necesario determinar las condiciones de crecimiento para estas bacterias, que permitan una mayor acumulación de los mismos.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar a nivel de laboratorio una bacteria roja no sulfurosa asociada a un consorcio de un efluente lácteo, incluyendo su crecimiento y contenido de bacterioclorofila *a* y carotenoides totales.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar con técnicas microbiológicas bacterias presentes en el efluente lácteo.
- Identificar mediante técnicas microbiológicas y secuenciación las bacterias aisladas del efluente.
- Determinar el efecto de concentración de nutrientes, pH, intensidad luminosa y condición aerobia, microaerófila y anaeróbica sobre el crecimiento, carotenoides totales y bacterioclorofila *a* de la bacteria roja no sulfurosa aislada de un efluente lácteo.
- Separar los carotenoides totales de la bacterioclorofila *a* mediante cromatografía de capa fina.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Efluentes lácteos

Los cuerpos de agua naturalmente tienen la capacidad de autodepuración dependiendo de las condiciones ambientales, concentración y tiempo de permanencia de los contaminantes; lamentablemente los compuestos que se presentan naturalmente se combinan con lo producido por la actividad humana, imposibilitando la autoregeneración de la vertiente. Asimismo, los procesos industriales manipulan grandes volúmenes de agua para las diversas actividades como lavado, limpieza y desinfección utilizados en la transformación de la materia prima en productos, generando altas cantidades de aguas residuales con moléculas de tipo orgánico, inorgánico, solubles o en suspensión y diferente grado de toxicidad (Shivsharan, Wani, & Kulkarani, 2013).

Hablando específicamente de la industria láctea, esta genera descargas provenientes de la producción de leche procesada, queso, cremas, mantequilla, entre otros. Por lo tanto, las características del efluente dependerán de la carga y tipo de contaminantes que éste contenga, pero se diferencian de las aguas negras urbanas por abarcar mayor cantidad de materia orgánica y nutrientes. La disposición de estos efluentes conlleva un problema ambiental, por lo tanto, es necesario buscar una alternativa a estas descargas para reducir el daño ambiental (Gandarillas *et al.*, 2009; Belmonte, 2008).

1.4.1.1 Características de los efluentes lácteos

Los efluentes que se generan en la industria lechera provienen de la producción de derivados lácteos; por ejemplo: de la etapa de recepción cuando se ha rechazado la leche por no cumplir con los estándares de calidad. De la filtración y clarificación, donde se eliminan impurezas de la leche formándose lodos cargados de partículas de suciedad, microorganismos, elementos sanguíneos y proteínas; cuando se realiza la pasteurización, el vapor de agua que pasa por las tuberías es descartado al

perder su calidad, también existen saborizantes y otros aditivos que no son utilizados por completo en la producción, por esta razón, existen varios contaminantes que llegan al cuerpo de agua (Sevilla, 2008).

A estas descargas se añaden las que provienen de las actividades de limpieza, las cuales contienen detergentes, desinfectantes y agua a altas temperaturas, por lo tanto, el efluente posee leche diluida, sólidos suspendidos, grasas, lactosuero (proveniente de la producción de queso), sales, nitrógeno, coloides como caseína, albúminas o globulinas y aguas de lavado con restos químicos en altas concentraciones (Paguay, 2013).

Además, estos vertidos industriales son neutros o ligeramente alcalinos al momento que se depositan en las vertientes; pero la presencia de azúcares como la lactosa o los que se agregan para mejorar el sabor de los productos, tienden a acidificar rápidamente el agua por la presencia de microorganismos que los transforman en ácido láctico (Paguay, 2013).

Se ha observado que en una central lechera se descargan alrededor 1,5 a 2,5 litros de agua por cada litro de leche procesada (Sevilla, 2008). Por consiguiente, los grandes volúmenes de agua que se usan, los contaminantes de tipo orgánico e inorgánico y la microbiota que no sólo fermenta azúcares sino que emanan gases de mal olor, provocan problemas ambientales considerables (Bedoya & Sanches, 2009)

1.4.1.2 Bacterias de los efluentes lácteos

Los microorganismos de los efluentes lácteos se nutren de los compuestos que existen en ellos, principalmente los de tipo orgánico, estas aguas suelen ser un medio idóneo, donde puede vivir diferentes microorganismos como *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bifidobacterium*, *Pasteurella*, *Escherichia coli* y muchos más (Shivsharan *et al.*, 2013).

Los microorganismos que se presentan en los efluentes lácteos dependen de diferentes condiciones como pH, temperatura, concentración de materia orgánica y compuestos tóxicos (Prakashveni & Jagadeesan, 2012; Corpas, 2013).

Actualmente se habla de un grupo de microorganismos benéficos presentes en aguas residuales lácteas, dentro de los que se encuentran las levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias fotosintéticas que son simbióticas y tienen la capacidad de usar los contaminantes (principalmente los de tipo orgánico), como fuente de carbono y energía para realizar su metabolismo y generar biomasa. Los *Lactobacillus* spp. suelen aparecer en las aguas de desechos lácteos y producen ácido láctico que evita el crecimiento de ciertos patógenos, dentro de los *Saccharomyces* están los hongos productores de secreciones usadas como sustrato para las bacterias ácido lácticas, la sinergia de estos microorganismos se ha estudiado en Okinagua-Japón, donde se observó que algunos de ellos degradaban y transformaban compuestos de forma individual, pero que al agruparlos producen efectos positivos, por esta razón se investiga sus aplicaciones biotecnológicas (Moreno *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2009; Herrera & Corpas, 2013).

1.4.2 Generalidades de bacterias fotosintéticas rojas

Los microorganismos procariotes juegan un papel importante en el ciclo del carbono de los ecosistemas acuáticos (Lami *et al.*, 2007). En general las algas, cianobacterias y tres familias de bacterias fototróficas (bacterias rojas sulfurosas, verdes sulfurosas y rojas no sulfurosas) pueden generar ATP en presencia o ausencia de luz. Las bacterias fotosintéticas son procariotas con sistema fotosintético y amplia distribución en el medio ambiente, de acuerdo al Manual de Bergey de Bacteriología se dividen en 27 géneros distribuidos en tres familias. Sus principales características son: bacterias Gram negativas, con una diversidad de formas como esféricas, bastones o espirales, su tamaño oscila entre 0,3 y 1,5 μm de diámetro, se reproducen

mediante gemación o fisión binaria; sus colores brillantes como púrpura, rojo o marrón rojizo es su principal distintivo (Madukasi, Chunhua, & Zhang, 2011). Las bacterias rojas sulfurosas pertenecen a las γ -Proteobacterias, son anaerobios estrictos, ubicadas en las zonas anoxigénicas iluminadas de hábitats acuáticos, viven a cierta profundidad debido a que necesita concentraciones adecuadas de sulfuro y luz para generar energía (Huang *et al.*, 2001; Woese *et al.*, 1985).

Las bacterias rojas o púrpuras no sulfurosas (BRNS) tienen un metabolismo muy diversificado; viven en condiciones anaerobias o microaerófilas usando o no la luz para su metabolismo. Estos microorganismos combinan las funciones fototróficas y heterotróficas, están muy bien adaptados a diferentes escenarios, por ejemplo la baja cantidad de nutrientes es complementada con la energía proveniente de la luz (Lami *et al.*, 2007). Estos microorganismos son cosmopolitas; pueden ser encontrados en diversos hábitats como agua fresca, en el mar, manantiales de agua caliente que contienen azufre, arcilla, sedimentos e incluso en efluentes (Kiriratnikorn, 2006; Huang *et al.*, 2001).

Estos microorganismos poseen bacterioclorofila y carotenoides que les ayudan a realizar la fotosíntesis sin la producción de oxígeno, característica que los diferencia de las cianobacterias, microalgas y plantas. Su donador de electrones puede ser sulfuro, hidrógeno molecular o compuestos orgánicos. Son conocidas por usarlas en el tratamiento de purificación de agua, debido a su metabolismo respiratorio o fermentativo por lo tanto, les permite adaptarse a diferentes condiciones medioambientales, algunas especies incluso pueden sobrevivir en un ambiente con sustancias tóxicas usándolas como fuente de carbono para su crecimiento (Madukasi *et al.*, 2011).

Las propiedades más importantes que determinan el desarrollo y distribución de las bacterias fototróficas en la naturaleza son la disponibilidad

de luz, intensidad luminosa, concentración de sulfuro, oxígeno y compuestos carbonatados (Shabed *et al.*, 2008).

A continuación se presenta un cuadro en el que se muestra la diversidad metabólica de estos microorganismos.

| Características | Bacterias rojas | |
|--------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| | Sulfurosas | No sulfurosas |
| Bacterioclorofilas | a o b | a o b |
| Aparato fotosintético | Repliegues de la membrana | Repliegues de la membrana |
| Luz + anaerobiosis | Fotolitotrofa autotrofa | Fotoorganotrofa heterotrofa |
| Donador de electrones | S ²⁻ , H ₂ , otros compuestos. | Compuestos orgánicos |
| Luz + aerobiosis | No crecen | No crecen |
| Oscuridad + aerobiosis | No crecen | Quimioorganotrofas heterotrofas, quimiolitotrofas autotrofas. Resp. aerobia |
| Oscuridad + anaerobiosis | Quimioorganotrofas heterotrofas Resp. anaerob | Quimioorganotrofas heterotrofas Fermentación, resp. anaerob |

Figura 1.1: Características generales de las bacterias fotosintéticas rojas
El cuadro muestra las diferencias metabólicas entre bacterias rojas sulfurosas y no sulfurosas. Tomado de Martínez, 2010

1.4.2.1 Mecanismo fototrófico de las bacterias fotosintéticas rojas

La fotosíntesis es un proceso metabólico, en el cual se convierte energía radiante en energía química formando adenosín trifosfato (ATP) que bajo condiciones favorables se usa para sintetizar más material celular (Stanier, 1961).

Las bacterias fotosintéticas carecen de cloroplastos pero en su lugar tienen un sistema de pigmentos localizado en estructuras mucho más pequeñas conocidas como cromatóforos, los cuales tienen un diámetro entre 300 y 500 Å; en su interior llevan proteínas, fosfolípidos y pigmentos

respiratorios además de todo el complemento celular de bacterioclorofila y carotenoides (Stanier, 1961).

La energía necesaria para el crecimiento es provista por el aparato fotosintético que convierte la energía solar en energía química. La estrategia que usan los organismos que tiene clorofilas o bacterioclorofilas para transformar la energía lumínica es básicamente la misma:

1. La energía es captada por los pigmentos de los complejos de recolección de luz o *light harvesting* (LH), donde es almacenada temporalmente en forma de estado energético excitado.
2. Dicha energía es canalizada a una bacterioclorofila ubicada en el centro de reacción (RC) del fotosistema, el cual es un complejo proteína-pigmento que está dentro de la membrana plasmática, cuya función es separar una carga positiva de una negativa.
3. La separación de cargas produce una transferencia cíclica de electrones que se acopla a un flujo electroquímico de protones; esto involucra varias proteínas de transporte.
4. La ATPasa (proteína transmembrana) transfiere los protones para generar ATP.

La unidad mínima en las bacterias fotosintéticas rojas es el RC rodeado por el complejo de captura de luz LH1, juntos forman la unidad RC-LH1 que transforma la energía con ayuda de la ATPasa, el citocromo y el complejo cb1. En algunas especies la captación de luz se ve aumentada por uno o más tipos de complejo de antenas periféricas, llamadas LH2, LH3, etc. (Jones, 2009).

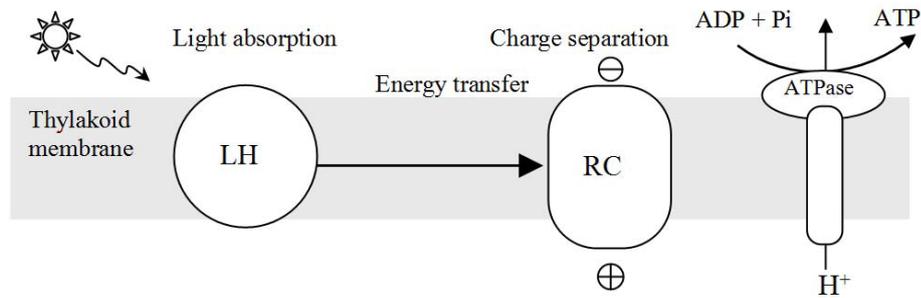


Figura 1.2: Esquema del proceso fotosintético para producir ATP.
Esquema de proceso fotosintético en bacterias rojas fotosintéticas para generar energía química (ATP). Tomado de Kwa, 2007.

La luz es un factor importante en la formación de los aparatos fotosintéticos, pero el mayor limitante para que se formen es el oxígeno. Se ha observado que es un regulador de la síntesis de estos aparatos, porque si está presente en concentraciones elevadas reprime la síntesis de bacterioclorofila, pero este efecto se revierte cuando el oxígeno disminuye (Koku, Eroğlu, Gündüz, Yücel, & Türk, 2002).

Las membranas que se forman en el interior de las bacterias y que contienen las moléculas necesarias para fotosíntesis, en condiciones anaerobias se producen inversamente a la intensidad luminosa, es decir, que en completa oscuridad se siguen generando dichas membranas, pero si se realizan subcultivos frecuentes puede afectar la producción de bacterioclorofila (Koku *et al.*, 2002).

1.4.2.2 Bacterioclorofila

Es el principal pigmento de captura de luz, de las bacterias rojas fotosintéticas; se lo describe como una porfirina de magnesio con un anillo tetrapirrol que tiene insaturaciones. Esta característica le permite absorber longitudes de onda más cercanas al infrarrojo en relación a la clorofila (Jones, 2009).

Existe bacterioclorofila *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *g*; pero en general consiste en dos unidades: un macrociclo conocido como *clorina* y una cadena alcohólica de isoprenos de 20 carbonos llamada fitol. La clorina es el principal fotopigmento encontrado en los organismos fotosintéticos, la cual en su interior tiene un átomo de magnesio. La estructura molecular de la BChl *a* es similar a la clorofila *a* que tienen las plantas superiores, pero se diferencian porque en el anillo A de la BChl *a* existe un grupo acetil carbonilo, mientras que en la Chl *a* está un grupo vinil, y la segunda diferencia es que en el anillo B la clorofila *a* tiene un doble enlace. (Figura 1.3), sólo en *Acidophilium rubrum*, una bacteria fotosintética aerobia se ha observado que el magnesio es sustituido por zinc; las ligeras variaciones del macrociclo en los organismos se debe a la adaptación al ambiente (Kwa, 2007).

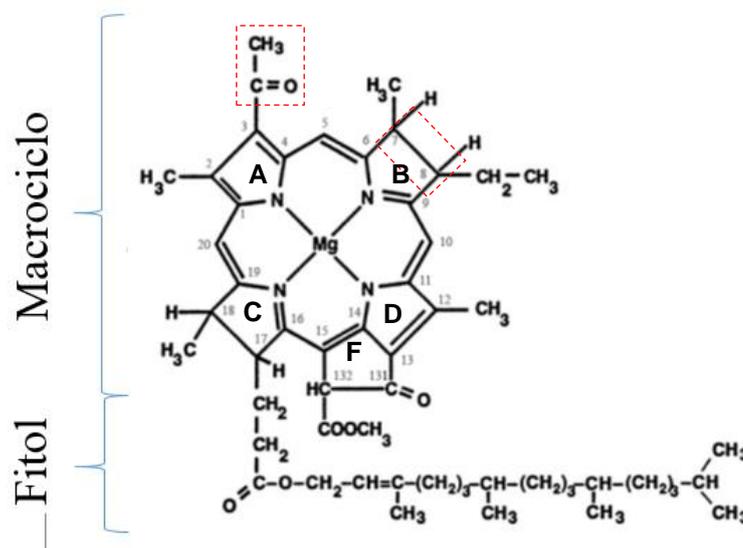


Figura 1.3: Estructura química de la bacterioclorofila *a*.

Los cuadros rojos entrecortados muestran los grupos funcionales que difieren entre la BChl *a* y Chl *a*. Tomado de Kwa, 2007.

Las clorinas tienen alteraciones en los grupos funcionales y el estado de hidratación del anillo. Estas modificaciones afectan el intervalo de longitud de onda, en la cual los organismos absorben la luz (Tabla 1.1) (Kwa, 2007).

Tabla 1.1

Longitud de onda en la cual hay la máxima absorción de luz en las clorinas de bacterias fotosintéticas

Tomado de Kwa, 2007.

| Grupo de organismo | Clorina | Absorción máxima <i>in vivo</i> |
|--------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------|
| Cianobacteria | Chl <i>a</i> | 670-675 |
| α , β , y γ Proteobacteria | BChl <i>a</i> | 375, 590, 800-810, 830-890 |
| Chlorobiaceae verde y <i>Chloroflexus</i> sp. | BChl <i>c</i> | 457-460, 745-755 |
| Chlorobiaceae verde | BChl <i>d</i> | 450, 715-745 |
| Chlorobiaceae marrón | BChl <i>e</i> | 460-462, 710-725 |
| Heliobacteriaceae | BChl <i>f</i> | 375, 419, 575, 788 |

1.4.2.3 Carotenoides

Los carotenoides son componentes liposolubles naturales con funciones biológicas como antioxidantes, estabilizadores de membranas y la base para otras moléculas; responsables de los colores amarillo, naranja y rojo en las plantas y bacterias fotosintéticas; en los animales el β -caroteno es esencial en su dieta por ser precursor de la vitamina A; los flamings, estrellas de mar, langostas y otros animales, deben sus colores brillantes a estas moléculas (Harborne, 1998).

La estructura química base de los carotenoides es una cadena de 40 átomos de carbono con dobles enlaces; se clasifican en carotenos y xantófilas; los primeros son compuestos hidrocarbonados y los últimos, derivados oxigenados de los carotenos (Zeb & Murkovic, 2010). Un ejemplo de caroteno es el licopeno formado por ocho unidades de isoprenos unidos por la cabeza a la cola del siguiente; las insaturaciones dan el color a la molécula. En el γ -caroteno, uno de sus extremos forma un ciclo, mientras que en el α y β -caroteno los dos extremos están ciclados. Las xantófilas más comunes son los monohidroxicarotenos, entre estos, la luteína y rubixantina, los dihidroxicarotenos como la zeaxantina o los dihidroxiepoxicarotenos como la violaxantina, en la siguiente figura se puede observar la estructura de algunos carotenoides (Harborne, 1998).

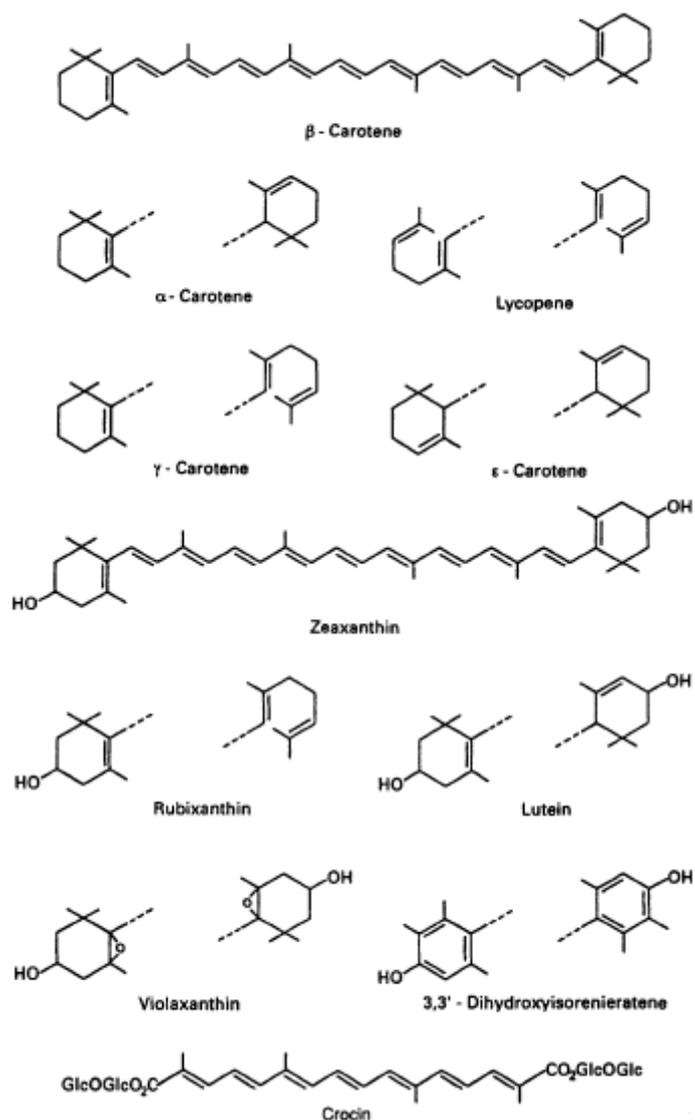


Figura 1.4: Estructura química de algunos carotenoides
Tomado del libro de Phytochemical methods (Harborne, 1998).

Estas moléculas en los microorganismos fotosintéticos tienen dos funciones bien definidas: (a) participar en la fotosíntesis debido a que absorben luz a cierta longitud de onda y la transfieren a las clorofilas y (b) proteger a las células de la oxidación por radicales libres (Goodwin, 1980; Barredo, 2012).

Estos compuestos son comercialmente importantes, ya que se usan como aditivos de color para la alimentación animal, acuicultura, aves de corral, cerdos y piensos; en la industria cosmetológica y farmacéutica, los más empleados son los α y β carotenos, β -criptoxantina, luteína, licopeno,

zeaxantina, violaxantina, neoxantina, cantaxantina y astaxantina (Zeb & Murkovic, 2010; Barredo, 2012).

1.4.3 Bacterias púrpuras no sulfurosas

Son un tipo de bacteria fotosintética que consume compuestos orgánicos como fuente de carbono y usa la energía lumínica de la zona infrarroja para la fotosíntesis (Kaewsuk *et al.*, 2010).

Las bacterias púrpuras o rojas no sulfurosas (BRNS), distribuidas ampliamente en la naturaleza; son pequeñas cuyo tamaño está entre 0,3 a 0,5 μm , presentan motilidad lo que dificulta separarlos de una solución mediante sedimentación gravitacional (Kaewsuk *et al.*, 2010). Presentan pigmentación rosada, violeta, púrpura, rojo e incluso café debido a la combinación de los carotenoides amarillos y rojos con la bacterioclorofila *a* o *b* (Niel, 1944; Shabed *et al.*, 2008). El analizar los pigmentos en estas bacterias ha ayudado a su caracterización y estimación de su biomasa, ya sea en muestras obtenidas de cultivos o cuerpos de agua. También los pigmentos son importantes para la taxonomía y ecología de este tipo de microorganismos (Núñez, 2003).

Una de sus características principales es que poseen metabolismos diversos, como la respiración aerobia o anaerobia, son fermentadores o fotoautótrofos. Pueden ser microorganismos quimioheterótrofos (su fuente de energía y carbono proviene de compuestos orgánicos) o fotoheterótrofos (su fuente de energía es la luz y la de carbono son compuestos orgánicos); los primeros pueden crecer aeróbicamente en la luz u oscuridad y los últimos en condiciones anaeróbicas en presencia de luz. Estas bacterias son capaces de fotoasimilar compuestos orgánicos como ácidos grasos, alcoholes primarios y secundarios, carbohidratos e incluso compuestos aromáticos (Huang *et al.*, 2001).

Estos microorganismos son versátiles, pero se ha visto que pueden vivir en condiciones anaerobias a valores de pH entre 7,0 y 7,5 y a temperaturas entre 25 y 40°C (Kaewsuk *et al.*, 2010).

Las BRNS pueden incorporar una amplia variedad de compuestos orgánicos y su presencia en los cuerpos de agua depende del grado de contaminación con materia orgánica. Su crecimiento contribuye a la purificación del efluente cuando se lo expone a la luz solar, como por ejemplo, en las lagunas de aguas residuales. En Japón, estas bacterias son usadas en la etapa de purificación de aguas con desechos orgánicos (Selvakumar & Dhevendaran, 2011).

1.4.3.1 Factores que influyen en el crecimiento de las bacterias

Muchos factores contribuyen en el desarrollo de los cultivos bacterianos, algunos de éstos afectan las características del crecimiento. Es importante determinar las condiciones óptimas para que las bacterias se desarrollen mucho más rápido y acumulen los metabolitos en estudio. El crecimiento y cultivo bacteriano se rige por la ley del mínimo, es decir, existe un factor que al agotarse evitará que las bacterias se sigan reproduciendo. (Aaronson & Dubinsky, 1982).

Las condiciones óptimas de temperatura, intensidad luminosa, nutrientes, aireación y pH para el cultivo de bacterias fotosintéticas varían ampliamente de una especie a otra, estos parámetros, han sido determinados en laboratorio y ayudan a comprender las condiciones óptimas para el desarrollo de las diferentes especies en cultivo (Ruiz, 2011).

1.4.3.2 Nutrientes

El carbono es el elemento básico para el crecimiento de cualquier microorganismo (FAO, 2014). Se han realizado estudios con ácidos grasos (compuestos carbonatados) concluyéndose que los productos metabólicos son un material de reserva celular más reducido en comparación con los

carbohidratos, cuya fórmula empírica es $C_4H_6O_2$, de este modo se considera al fotometabolismo de las bacterias púrpuras como una catálisis con uso de luz para la asimilación de compuestos orgánicos. (Stanier, 1961).

Además, varios elementos inorgánicos son universalmente requeridos tales como N, P, K, Mg, Ca, S (macronutrientes) y Fe, Cu, Mn y Zn (micronutrientes). Algunas bacterias requieren vitaminas si su metabolismo es heterotrófico (Mondragón, Vicente, & Guillenea, 1984).

1.4.3.3 Intensidad luminosa

Como se ha mencionado las bacterias fotosintéticas rojas son versátiles respecto a su metabolismo, pero su principal característica es que son fotosintéticas, es decir, requieren de la luz para generar sus productos, por consiguiente su desarrollo en el laboratorio dependerá del control de la intensidad y tipo de espectro luminoso, puesto que si se encuentran en condiciones limitadas de luz (sombra) crecerá lentamente, sin embargo, intensidades muy elevadas, pueden causar inhibición del crecimiento por daño a los pigmentos, como los carotenoides que son necesarios para realizar la fotosíntesis y actúan contra la foto-oxidación. La radiación óptima en este tipo de bacterias cae dentro del rango del espectro visible entre 400 y 700 nm (Stanier, 1961; Hemaiswarya, Raja, Kumar, Ganesan & Anbazhagan, 2011; Mitra, 2012).

La respuesta fotosintética a la energía luminosa se caracteriza por una respuesta lineal baja al incremento de la irradiación, hasta llegar a su máxima capacidad fotosintética, donde las células son independientes de la cantidad de luz. Por tanto, el crecimiento al inicio es bajo hasta que alcanza la fase exponencial (Abalde, 2004).

1.4.3.4 Temperatura

Cuando la intensidad de luz aumenta la temperatura también lo hace. Por otro lado, las concentraciones de CO_2 en el agua, son reguladas por la

temperatura durante la fotosíntesis que da lugar a la producción de materia orgánica, así este factor influye en la disponibilidad de nutrientes (FAO, 2014).

Las bacterias fotosintéticas se las encuentra en el ambiente desde ríos hasta aguas residuales, por lo que se ha visto que pueden crecer entre 25 a 40°C, es decir, temperatura ambiente, si sale de ese rango, el crecimiento bacteriano se ve afectado (Kaewsuk *et al.*, 2010).

1.4.3.5 Potencial de Hidrógeno (pH)

El potencial de Hidrógeno o pH está determinado por la concentración de iones de hidrógeno libres y se ve influenciado por los procesos biológicos dentro del ecosistema. Las variaciones de pH afectan los procesos químicos y biológicos en el agua. La mayor parte de los organismos acuáticos prefieren un rango de pH entre 6,5 y 8,5; pero cuando sale de este rango puede haber disminución en la diversidad, debido al estrés generado en los organismos no adaptados, incluso la incapacidad de mantener el pH balanceado provoca la muerte del cultivo, puesto que se interrumpen procesos celulares (Su, Mennerich, & Urban, 2011).

Las bacterias fotosintéticas viven entre 7,0 y 7,5 de pH, pero este puede incrementarse conforme la edad del cultivo, esto es debido a la acumulación de minerales y oxidación de nutrientes. La mayoría de los factores que influyen sobre el pH tienen origen en los minerales del suelo, materia orgánica, respiración de los organismos acuáticos, productos de la fotosíntesis de las plantas acuáticas, dióxido de carbono y otras sustancias que caen con las lluvias y los desechos (FAO, 2014).

1.4.3.6 Aireación

Las bacterias púrpuras sulfurosas se caracterizan por ser estrictamente anaeróbicas, pero las no sulfurosas pueden tener un metabolismo

respiratorio, ya que pueden crecer a oscuridad aeróbicamente (Stanier, 1961).

Es necesario realizar estudios para conocer el nivel de tolerancia de oxígeno en un cultivo de bacterias fotosintéticas rojas no sulfurosas; se ha determinado que pueden vivir en condiciones de bajo oxígeno hasta condiciones aeróbicas, porque en el aire existe el dióxido de carbono usado por algunas especies para la fotosíntesis (FAO, 2014; Stanier, 1961).

1.4.4 Fases de crecimiento de las bacterias

El crecimiento de cultivos axénicos de bacterias se caracteriza por cuatro fases que corresponden al estado nutricional de las células. La duración de cada fase depende de los factores que intervienen en su crecimiento como temperatura, intensidad luminosa, concentración del inóculo, concentración y tipo de nutrientes (FAGRO, 2011).

La primera fase es la *aclimatación* caracterizada por ser de crecimiento lento, debido a que las bacterias deben acostumbrarse a las condiciones del medio de cultivo. La siguiente es la *aclimatación con crecimiento* en este período las células crecen, se dividen y por tanto se multiplican de acuerdo al tiempo de generación de cada especie y en función de su capacidad de utilizar los sustratos. En la *fase estacionaria* los microorganismos se reproducen y mueren a una velocidad similar, se mantiene una población relativamente constante, puesto que las células han consumido los nutrientes y el crecimiento de nuevas células es contrarrestado por la muerte de las existentes. La última fase es la de *extinción o fase endógena*, donde se observa que los nutrientes se agotaron, por lo tanto, las bacterias se ven obligadas a metabolizar su protoplasma. Existe lisis celular, al morir las células liberan los sustratos que contenían, para ser aprovechados por las sobrevivientes, en este período al existir poco alimento, el crecimiento celular se ve restringido y es menor a la velocidad de muerte (FAGRO, 2011).

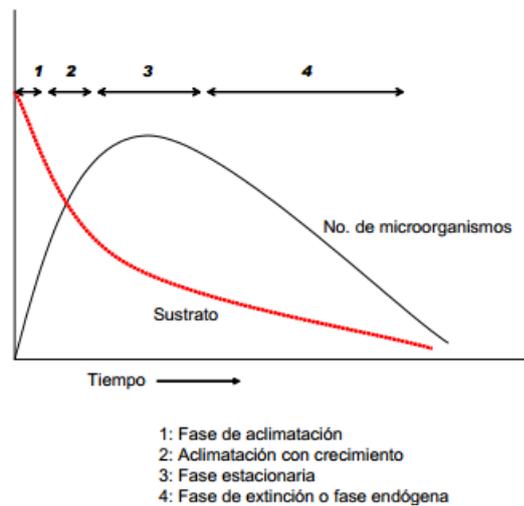


Figura 1.5: Curva de crecimiento de microorganismos en función del tiempo
 Tomado de FAGRO, 2011.

1.4.5 Identificación bacteriana

Existen algunas formas de identificar microorganismos, entre estos los métodos convencionales que usan reactivos para determinar la actividad metabólica o las técnicas de Biología Molecular como la secuenciación.

1.4.5.1 Pruebas microbiológicas

Dentro de Microbiología se pueden usar técnicas convencionales basadas en las características fenotípicas u “observables” de las bacterias como la morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas (Olmos, de la Fuente, Saéz, & Valdezate, 2010).

Se inicia con métodos rápidos como la observación microscópica en fresco o la tinción para conocer la forma de las células, estructura, tamaño o agrupaciones. La tinción Gram es una de las primeras técnicas usadas para la identificación bacteriana en base al tipo de pared celular diferenciándose en Gram positivas si se tiñen de violeta y Gram negativas si son rojas o rosadas. Las formas celulares que se observan son bacilos, cocos, cocobacilos, filamentosos, etc., también pueden existir endosporas, o la forma de agruparse: parejas, cadenas, tétradas, entre otras (Olmos, *et al.*, 2010).

Otra manera de identificar las bacterias es mediante la morfología de las colonias en medios de cultivo sólido preferiblemente cuando son jóvenes. Se analizan las características de tamaño, forma (bordes y grosor), textura (seca, viscosa, con superficie lisa o granular) y color (Olmos, *et al.*, 2010).

Cuando se cultivan las bacterias estas se multiplican y son visibles alrededor de las 24 horas, en general todas requieren una fuente de energía, carbono, nitrógeno, sales, oligoelementos y agua, un medio no selectivo es el agar nutritivo que contiene 3 g de extracto de carne y 5 g de pluripeptona por cada litro de solución, éste se emplea para microorganismos no exigentes. Pero existen microorganismos más estrictos en su metabolismo por lo que pueden requerir vitaminas, factores o aminoácidos, para lo cual se emplean medios selectivos, como aquellos que llevan NaCl en altas dosis, citrato de sodio, sales biliares o antibióticos que promueve el crecimiento de unas bacterias e inhibe el de otras (Olmos, *et al.*, 2010).

Las pruebas bioquímicas se usan para determinar las características metabólicas de las bacterias, algunas de ellas son rápidas arrojando el resultado en pocos segundos entre ellas la catalasa u oxidasa, otras requieren que el microorganismo crezca, detectándose componentes metabólicos o la sensibilidad al sustrato como el de rojo de metilo o Voges-Proskauer (Olmos *et al.*, 2010).

1.4.5.2 Secuenciación

Actualmente la Biología Molecular se emplea en investigación de marcadores moleculares de ADN que son estables, discretos y heredables a fin de identificar individuos, poblaciones o especies (Jordano, 2006).

La secuenciación es una técnica molecular de identificación, para llegar a ella es necesario realizar varios pasos como extraer el ADN del organismo en estudio, realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en la cual se sintetizan copias de un fragmento de ADN *in vitro*. Para obtenerlos

se usa una polimerasa que abre las cadenas y copia las secciones deseadas; la enzima más empleada es la *Taq*, debido a que es termoestable y sencilla de obtener, además se necesita primers o cebadores que flanquean el sitio diana del ADN que se quiere copiar, los 4 desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) que se acoplan a su base complementaria y una solución Buffer de Magnesio y Tris-HCl que mantiene el pH estable en 8 y es un cofactor de la polimerasa (Tamay , Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Por otro lado, la electroforesis permite visualizar los fragmentos de ADN para su posterior estudio. El fundamento de esta técnica es la migración de moléculas que en solución presentan carga, por lo tanto pueden viajar desde el cátodo (carga negativa) al ánodo (carga positiva), la velocidad en que recorren estas biomoléculas va a depender del peso molecular, porosidad del gel y voltaje aplicado (Pérez, 2000).

Cuando se corrobora mediante electroforesis que los fragmentos de ácido nucleico se amplificaron, se prosigue a la secuenciación para buscar el orden de las bases nitrogenadas del fragmento de ADN, se somete a la muestra a electroforesis, lo cual lleva a la separación de la cadena en fragmentos del tamaño de una una base nitrogenada. En 1977 Sanger describe la metodología para una secuenciación mediante reacciones enzimáticas, siendo su fundamento, el uso de un solo iniciador y de dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3', característica que impide que más nucleótidos se unan a la cadena molde, están marcados con un grupo fluoróforo que emite una fluorescencia al ser excitados por la luz UV (Guo *et al.*, 2008).

En la actualidad, la secuenciación es automatizada para reducir el tiempo de espera y se basa en la técnica propuesta por Sanger por su gran efectividad. La automatización de esta reacción enzimática consiste en el uso de cuatro ddNTPs marcados con diferentes fluoróforos que al ser

excitados por la luz emiten cuatro colores que corresponden a los nucleótidos guanina, citosina, timina y adenina. Para la lectura de los nucleótidos el equipo tiene incorporado un polímero que los separa del fragmento a secuenciar, y un láser va midiendo la absorbancia para posteriormente transformarla en un electroferograma (Figura 1.6) (Bautista, 2010).

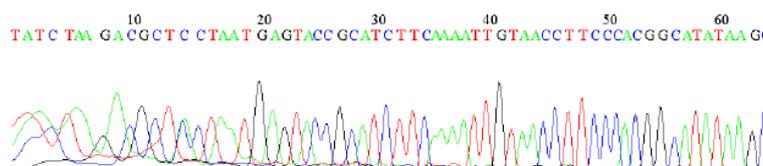


Figura 1.6: Electroferograma de un amplicón
Suministrado por Macrogen

1.4.6 Métodos de determinación de la población bacteriana

Son utilizados para llevar un control de la curva de crecimiento, por estos métodos se puede determinar si la administración de nutrientes es la adecuada, así se logra determinar el tiempo de vida y el desarrollo de los organismos en el cultivo (FAO, 2014).

1.4.6.1 Determinación de la turbidez mediante densidad óptica con espectrofotómetro

La espectroscopía UV-visible es un método sencillo, útil y fácilmente accesible con el cual se pueden identificar y cuantificar biomoléculas, que estén en muestras biológicas o en una solución (cuando son extraídas). Esta técnica se fundamenta en la capacidad de los compuestos para absorber la radiación (dentro del espectro UV-visible) de ciertas longitudes de onda (λ), la eficiencia con que lo logren va a depender de la estructura atómica de dicha molécula y de las condiciones del medio como el pH, temperatura, fuerza iónica, entre otras (Abril *et al.*, sf).

Es una herramienta valiosa para determinar y caracterizar biomoléculas. Funciona porque las moléculas captan la luz y la absorben, esto provoca un

salto energético desde un estado basal también conocido como fundamental E_1 a un estado excitado E_2 con mayor energía. Cada molécula tiene una serie de estados de alto grado energético que la diferencia del resto, así las longitudes de onda absorbidas constituyen su huella. Por último la molécula libera la energía en forma de vibración, rotación u otros mecanismos para regresar a su estado energético basal como se observa en la Figura 1.7 (Abril *et al.*, sf).

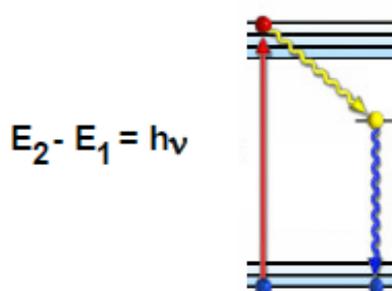


Figura 1.7: Diagrama de niveles energéticos.

La energía excita una molécula para que pase del estado basal E_1 al estado energético E_2 , después la energía es liberada en forma de vibración, rotación u otro mecanismo. Tomado de Abril *et al.*, sf.

La luz ultravioleta es una región de energía muy alta, comprende las longitudes de onda corta entre 195 a 400nm, ciertos grupos funciones de las moléculas como dobles y triples enlaces, enlaces peptídicos, anillos aromáticos, entre otros alcanzan su máxima absorbancia en esta región, por lo tanto, es importante para analizar los compuestos orgánicos. Por otro lado, la región visible para el ojo humano va desde 400nm (violeta) a 700nm (rojo), en esta zona del espectro las longitudes de onda transmitidas son las que se observan y no la absorbidas por la molécula, es decir, si se ve un color rojo es porque la molécula captó la longitud de onda correspondiente al color verde (Abril *et al.*, sf).

En algunos trabajos la espectroscopía es el fundamento para la determinación de la turbidez (turbidimetría), con la cual se conoce el crecimiento bacteriano, se basa en la multiplicación bacteriana en un medio líquido al tornarse turbio. El instrumento empleado es el espectrofotómetro,

en el cual un haz de luz traspasa una suspensión microbiana y llega a una celda fotoeléctrica; al aumentar la células menos luz alcanza la celda; este cambio es registrado como porcentaje de trasmisión o absorbancia que es una medición logarítmica conocida también como densidad óptica. La absorbancia (Abs) es usada para graficar el crecimiento bacteriano (Tortora, Funke, & Case, 2007).

1.4.6.2 Determinación cuantitativa de bacterioclorofila

Las bacterias fotosintéticas realizan fotosíntesis, mediante los pigmentos accesorios como la bacterioclorofila *a* (la mayoría) o *b*, además de carotenos. Estos pigmentos se ubican en las membranas internas y se los puede usar como una forma de cuantificación del crecimiento bacteriano mediante el uso de fórmulas (Núñez, Chávez, & Signoret, 2011).

1.4.6.3 Determinación cuantitativa de carotenoides totales

Tanto las bacterioclorofila como los carotenoides en las bacterias púrpuras, son pigmentos necesarios para la fotosíntesis y foto-protección. Se puede cuantificar el contenido de carotenoides totales (no se sintetiza un solo tipo sino varios), para lo cual se han diseñado fórmulas (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

1.4.7 Cromatografía en capa fina (TLC) de pigmentos

La cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) es una técnica para separar compuestos o mezclas de forma fácil, económica y con diversas aplicaciones en la industria farmacológica, química, análisis de agua, fitoquímica, entre otras. También existe cromatografía en columna (CC), de gases (CG) y la más sofisticada la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), siendo éstas las más conocidas (Guarnizo & Martínez, 2009).

Este tipo análisis de separación consta de dos fases: una *estacionaria* o *sólida* y otra *móvil*. La primera retiene a los compuestos, su espesor suele ser entre 0,1 y 0,25 mm y se dispone sobre una placa de vidrio, aluminio o acetato, mientras que la *fase móvil* es una mezcla de solventes o eluyentes para separar los compuestos en estudio ésta recorre la fase sólida. Existen diferentes materiales inertes para la fase estacionaria pero los más empleados son la sílica gel y el óxido de aluminio. En la siguiente tabla se muestran los compuestos separados por diferentes sorbentes (Guarnizo & Martínez, 2009).

Tabla 1.2

Materiales usados como fase estacionaria para cromatografía de capa fina

| Sorbente | Compuestos a separar |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sílica gel | Toda clase de compuestos. |
| Óxido de aluminio | Compuestos básicos (alcaloides, aminas, etc.), esteroides, terpenos, hidrocarburos aromáticos y alifáticos. |
| Celulosa | Aminoácidos y derivados, aditivos alimenticios (ácidos y básicos), carbohidratos. |
| Kieselguhr | Carbohidratos, aflatoxinas, herbicidas, tetraciclinas. |
| Poliamida | Fenoles, flavonoides, nitro-compuestos. |
| Sílica gel con amino enlazado | Particularmente óptimo para carbohidratos, fenoles, ácidos sulfónicos, fenoles, ácidos carboxílicos, nucleótidos, nucleósidos. |
| Sílica gel con ciano enlazado | Muchas clases de compuestos, y particularmente bueno para pesticidas, esteroides y preservantes. |
| Silicagel con diol enlazado | Muchas clases de compuestos, bueno en la separación de esteroides y hormonas. |
| Sílica gel de Fase Reversa (RP) | Mejora la separación de compuestos apolares como esteroides, tetraciclinas, ftalatos, antioxidantes, lípidos, barbitúricos, capsaicinas, aminofenoles, ácidos grasos. |
| Sílica gel con modificación quiral | Separación de enantiómeros de aminoácidos, halogenados, péptidos simples, α -hidroxiácidos. |
| Sílica gel impregnada con nitrato de plata | Lípidos, saturados e insaturados con sus isómeros geométricos. |
| Sílica gel impregnada con cafeína | Particularmente selectiva en la separación de hidrocarburos poliaromáticos. |
| Sílica gel impregnada con ácido bórico/fosfato | Selectivo para carbohidratos. |

Materiales para realizar TLC con los compuestos que pueden separar. Tabla tomada de Guarnizo y Martínez (2009)

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Zona de estudio

El proyecto implicó dos fases:

2.1.1 Obtención de efluente con la bacteria fotosintética asociada al consorcio

El efluente lácteo fue recolectado de ECUALAC S.A, empresa pasteurizadora ubicada en la Panamericana Sur, a 36 kilómetros de la ciudad de Quito, en el barrio “El Tambo”, Parroquia Machachi, Cantón Mejía, de la Provincia de Pichincha, por parte de la señorita Daniela Ortega. El agua contaminada fue llevada al invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, donde fue aireada y se aumentó su pH, el color del efluente pasó de blanco leche a naranja y hasta un tono rojo (Figura 2.1), cuando presentó la última coloración se lo recolectó para ser usado en el proyecto.



Figura 2.1: Agua residual de industria láctea.

A. Efluente lácteo recolectado. B. Efluente lácteo procesado con crecimiento de bacterias fotosintéticas rojas.

2.1.2 Trabajo de laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida, de la Universidad Politécnica Salesiana Ecuador (UPS) Campus “El

Girón”, ubicado en la Av. 12 de octubre 2422 y Wilson, Cantón Quito, de la Provincia de Pichincha, Ecuador.

2.2 Participantes

La investigación fue realizada bajo la asesoría externa del Ph.D. Ever Morales Avendaño y la dirección de la B. Sc. Karina Ponce, además se contó con la ayuda del Ing. Pedro Romero y de la Dra. Blanca Naranjo. La fase inicial se realizó en el invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE y contó con el apoyo de los laboratorios de Ciencias de la Vida la Universidad Politécnica Salesiana sede “El Girón”.

2.3 Período de tiempo de la investigación

La investigación tuvo una duración de 15 meses.

2.4 Diseño

El diseño experimental para cada uno de los factores analizados (concentración de caldo nutritivo, pH, iluminancia y presencia de aire) fue un diseño completamente al azar (DCA), debido a que se evaluó cada factor por separado con tres repeticiones cada uno.

Un diseño completamente al azar (DCA) con tres o más réplicas, está dado por la ecuación:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde μ es llamado la media global, τ_i mide el efecto del tratamiento i , y ε_{ij} es el error cuando se hace la medición u observación Y_{ij} , mientras que Y_{ij} es la observación que se hizo en el tratamiento (Gutiérrez & Vara, 2008).

Para las variables descritas, la evaluación se realizó durante un mes desde el día de inoculación o cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria. En la investigación se efectuó regresiones lineales para

describir las curvas de crecimiento, un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Duncan.

Se desarrolló cuatro DCA tomando en cuenta que ese fue el número de factores analizados; el primer diseño constó de 4 niveles (Tabla 2.1) el segundo de 3 (Tabla 2.2), el tercero 7 (Tabla 2.3) y el cuarto 3 (Tabla 2.4); cada tratamiento tuvo tres unidades experimentales, con dos mediciones.

Tabla 2.1

Factor controlado – concentración de caldo nutritivo

| Código | Descripción |
|---------------|--------------------|
| C1 | 2 g/L |
| C2 | 4 g/L |
| C3 | 6 g/L |
| C4 | 8 g/L |

Tabla 2.2

Factor controlado - pH

| Código | Descripción |
|---------------|--------------------|
| P1 | 5 |
| P2 | 7 |
| P3 | 9 |

Tabla 2.3

Factor controlado - iluminancia

| Código | Descripción |
|---------------|--------------------|
| L1 | 0 lx (oscuridad) |
| L2 | 500 lx |
| L3 | 1000 lx |
| L4 | 2000 lx |
| L5 | 4000 lx |
| L6 | 8000 lx |
| L7 | 16000 lx |

Tabla 2.4**Factor controlado - presencia de aire**

| Código | Descripción |
|---------------|-------------------------|
| A1 | Condición aerobia |
| A2 | Condición microaerófila |
| A3 | Condición anaerobia |

Las unidades experimentales de cada ensayo se colocaron al azar, se expusieron a luz constante, temperatura ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) y la agitación fue manual al momento de tomar la muestra.

2.5 Variables de respuesta

2.5.1 Densidad celular

El crecimiento celular se midió usando un espectrofotómetro a 680nm, longitud de onda usada para bacterias rojas fotosintéticas (Goodwin, 1984), la absorbancia inicial fue de 0,08 y se cuantificó hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria, dato sugerido por el Ph. D. Ever Morales (comunicación personal).

2.5.2 Medición de bacterioclorofila *a*

El pigmento fue medido cuando los microorganismos alcanzaron la fase estacionaria, para lo cual se extrajo alrededor de 1 mL de cada repetición por duplicado, se centrifugó a 7000 rpm por 20 minutos, se conservó el pellet para adicionarle aproximadamente 2,5 mL de acetona:metanol (7:2), se homogenizó y conservó en oscuridad durante 24 horas a -20°C ; se centrifugó por segunda vez, para extraer el sobrenadante y medir su absorbancia a 770nm, como blanco se usó la solución de acetona:metanol. Todo el procedimiento se lo realizó en oscuridad (Figura 2.2).

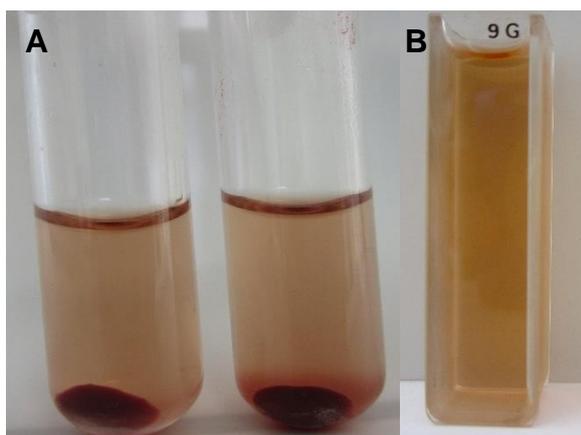


Figura 2.2: Extracción de pigmentos fotosintéticos para cuantificación
 A. Biomasa centrifugada, al pellet se adicionó el solvente. B. Pigmentos extraídos con el solvente acetona:metanol (7:2)

Para conocer el contenido de BChl *a* se recurrió a la Ecuación 2.1 (Núñez, *et al.*, 2011):

$$mgml^{-1} = \frac{A}{CE} * \frac{Ve}{Vm} * 1000 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde:

A: Absorbancia registrada a 770nm

CE: Coeficiente de extinción de la BChl *a* en acetona:metanol a 770nm=84,1

Ve: Volumen del extracto

Vm: Volumen de la muestra

2.5.3 Medición de carotenoides totales

Los carotenoides totales fueron medidos cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria, se empleó el mismo extracto para cuantificar BChl *a* (Figura 2.2). Para determinar su contenido se efectuaron lecturas de la absorbancia emitida a 480 nm y 750 nm; usando como blanco el solvente acetona:metanol. Para establecer la concentración de carotenoides totales se aplicó la Ecuación 2.2 (Strickland & Parsons, 1972):

$$Car(\mu g/mL) = \frac{4 (A_{480} - A_{750}) * Ve}{Vm} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde:

A_{480} : Absorbancia registrada a 480nm

A_{750} : Absorbancia registrada a 750nm

V_e : Volumen del extracto

V_m : Volumen de la muestra

2.6 Procedimiento

2.6.1 Aislamiento de las bacterias presentes en el efluente lácteo

Se inoculó el efluente lácteo con coloración roja en un medio selectivo sólido propuesto por Mondragón *et al.*, (1984) cuyo contenido de reactivos por cada litro de solución fue: 300 mg de $(NH_4)_2Cl$, 1 g de $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$, 50 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 100 mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 200 mg de NaCl, 10mL de solución de elementos trazas, 20 μg de vitamina B_{12} , 300 mg de extracto de levadura, 1g de acetato de sodio y 15g de agar, con la técnica de estriado por agotamiento y siembra en tubo, se incubó a temperatura ambiente ($20 \pm 5^\circ C$) y luz artificial constante. La misma técnica de cultivo se aplicó para agar nutritivo preparado según las especificaciones del fabricante (Difco). Se realizaron subcultivos de las colonias rojas hasta obtener el menor número de colonias asociadas como se observa en la Figura 2.3.

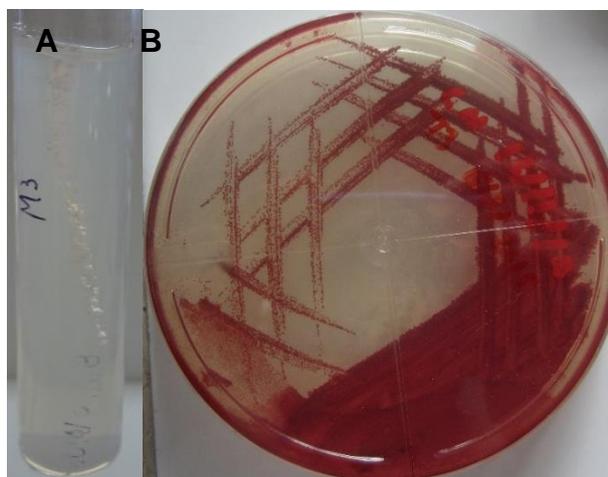


Figura 2.3: Aislamiento de las bacterias presentes en el efluente lácteo.

A. Bacterias sembradas en medio selectivo. B. Bacterias cultivadas en agar nutritivo.

2.6.2 Mantenimiento del consorcio

Mayor tipo y cantidad de cepas se obtuvieron en agar nutritivo que en medio selectivo, por tanto se optó por el primero para realizar los ensayos. Cuando los subcultivos presentaron pocas colonias asociadas, se procedió a extraerlas del medio sólido para sembrarlas en caldo nutritivo. El medio fue adicionado periódicamente en recipientes de vidrio de capacidad de 475 mL, cerrados herméticamente para evitar contaminación, se los mantuvo a temperatura ambiente ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) y expuestos a irradiación permanente con focos fluorescentes para mantener un *cultivo madre* que se usó posteriormente en la investigación (Figura 2.4).



Figura 2.4: Escalamiento en caldo nutritivo de BRNS

2.6.3 Pruebas microbiológicas

Cuando se obtuvo el cultivo base que contenía las BRNS, se procedió a tomar una muestra y observar en el microscopio con lente de inmersión, para después inocularlas en agar nutritivo y realizar las pruebas bioquímicas a los 5 días de ser cultivadas.

2.6.3.1 Tinción Gram

La tinción Gram permite hacer una primera diferenciación bacteriana, considerando que las bacterias que presentan una coloración morada se las considera Gram positivas y las rosadas Gram negativas, para desarrollar

esta técnica se recolectó una colonia aislada de la BRNS del agar nutritivo, se la frotó en un portaobjetos y se la fijó con calor. Después se colocó cristal de violeta por un minuto, se lavó con agua destilada, se puso lugol por un minuto, se volvió a lavar, se añadió el decolorante por 10 segundos, se enjuagó, se tiñó con safranina, se lavó y dejó secar la placa. Con el lente objetivo de 100X se observó la morfología y color de las bacterias como se muestra en la Figura 2.5 (Olmos *et al.*, 2010).

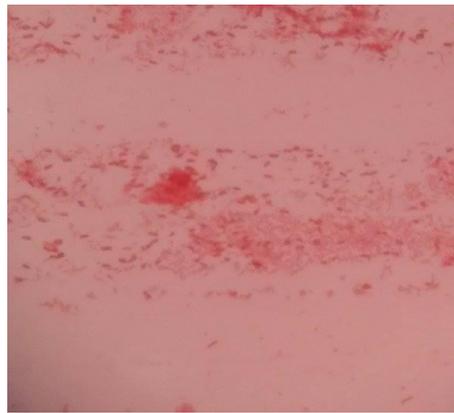


Figura 2.5: Tinción Gram de las bacterias observadas con lente de inmersión

2.6.3.2 Tinción con verde malaquita

Las bacterias pueden presentar esporas que son una forma de resistencia cuando las condiciones son adversas, para realizar la técnica se tomó una colonia vieja, la cual se frotó en un portaobjetos, se la secó y fijó con calor. Después se adicionó el verde malaquita que tiñe las esporas, a emisiones de vapores por 10 minutos, se lavó, se adicionó safranina como colorante de contraste y se observó al microscopio con lente objetivo de inmersión. (Olmos *et al.*, 2010).

2.6.3.3 Prueba de catalasa

Este test se ejecuta para conocer si las bacterias presentan la enzima catalasa, para lo cual en un portaobjetos, se colocó la colonia en estudio sobre una gota de peróxido de hidrógeno Figura 2.6. Las bacterias que son catalasa positiva presentan efervescencia (Olmos *et al.*, 2010).



Figura 2.6: Prueba de catalasa

Los microorganismos que tienen la enzima catalasa hidrolizan el H_2O_2 en agua y oxígeno que se libera en forma de burbujas

2.6.3.4 Prueba de oxidasa

La prueba se realiza para determinar si la bacteria tiene la enzima citocromo oxidasa, la cual cede los electrones de un sustrato de oxígeno, en el transporte de electrones. Se empleó una tira reactiva de la marca Merck sobre la cual se colocó una colonia (Figura 2.7), la prueba es positiva si la tira se torna morada (Olmos *et al.*, 2010).

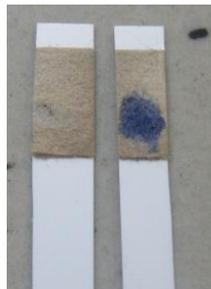


Figura 2.7: Prueba de oxidasa

La citocromo oxidasa es una enzima que participa en la obtención energética de algunas bacterias, su presencia se corrobora cuando aparece una coloración violeta al reaccionar con el clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina

2.6.3.5 Prueba de TSI (Triple Azúcar Hierro)

Es un medio empleado para diferenciar Enterobacterias. El medio contiene glucosa, lactosa y sacarosa por lo cual se identifica si la bacteria es capaz de fermentar los azúcares, producir gas y ácido sulfhídrico. En un tubo pico de flauta con el medio TSI (rojo) se inoculó la colonia por picadura hasta el fondo del agar, se retiró siguiendo el mismo camino y en la inclinación se hizo una siembra por estría. Se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente, Figura 2.8 (Olmos *et al.*, 2010).



Figura 2.8: Prueba TSI

Prueba para determinar la capacidad de fermentación de azúcares de las bacterias, si el medio pasa de rojo a amarillo evidencia la degradación de la glucosa y lactosa, si se torna negro produce H_2S

2.6.3.6 Prueba de Citrato de Simmons

Es un medio empleado para diferenciar Enterobacterias que contiene citrato de sodio como única fuente de carbono y las sales de amonio como única fuente de nitrógeno, las bacterias que dan positiva a la prueba poseen la citrato permeasa. Se efectuó la prueba inoculando la bacteria hasta el fondo del agar (verde) y retirándola formando en la superficie del pico de flauta una estría y se incubó por 48 horas a temperatura ambiente Figura 2.9 (Macfaddin, 2000).



Figura 2.9: Prueba del citrato de Simmons

Una respuesta positiva a la presencia de citrato permeasa es cuando el medio pasa de verde a azul

2.6.4 Secuenciación del consorcio

Las bacterias poseen la subunidad 16S del gen rRNA, importante para estos microorganismos, dicha molécula ayuda a la identificación bacteriana (McGarvey, Miller, Zhang, Ma, & Mitloehner, 2007). Para llegar a la secuenciación e identificación de los microorganismos es necesario realizar varios pasos: extracción del ADN, amplificación del gen 16S rRNA y reacción de secuenciación.

2.6.4.1 Extracción del ADN genómico

Se empleó el kit *PureLink® Genomic DNA* de Invitrogen para la extracción del ADN genómico, siguiendo las indicaciones del fabricante para obtener el producto purificado.

Primero se obtuvo la lisis celular, para lo cual se tomó 0,5 mL de caldo nutritivo con las bacterias rojas, se centrifugó a 10000 rpm durante dos minutos para conservar el pellet, se dejó secar el agua residual a 30°C durante toda la noche. Después se siguió el protocolo propuesto por el fabricante para lisados de bacterias Gram negativas, seguido por el binding, washing y elution DNA, metodologías que permiten separar el ADN de contaminantes e inhibidores, lavarlo y recuperación del mismo, respectivamente, para luego conservar el ADN a -20°C.

2.6.4.2 Amplificación del gen 16S rRNA

Una vez realizada la purificación, fue necesario cuantificar su concentración, se usó el equipo Quibt Fluorometer 2.0 para poder realizar las lecturas se emplearon los reactivos del kit *dsDNA Broad range assays* de Invitrogen.

Primero se preparó la *Working solution* con 1µL de *Reagent* y 199 µL de del *Buffer*, es decir, 200 µL por cada muestra examinada. Del reactivo se recolectaron 190 µl a los cuales se agregó 10 µL de cada muestra de ADN a analizar, se homogenizó la mezcla y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

Cada muestra fue medida en el equipo Qubit Fluorometer 2.0, para lo cual se escogió la opción de DNA (también se puede cuantificar ARN y proteínas), después se escogió Broad Range, el dispositivo indica que se introduzca la muestra, para leerla se elige Read; los valores de concentración son expresados en ng/mL (Figura 2.10).

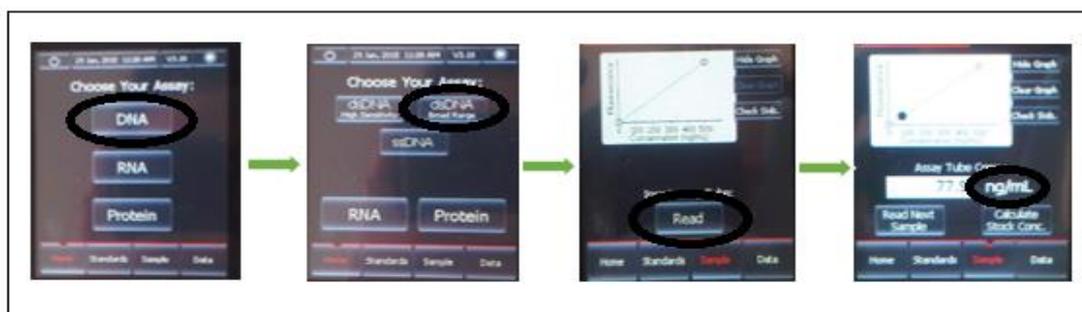


Figura 2.10: Cuantificación de ADN en el equipo Qubit Fluorometer 2.0.
Fuente (Navarrete & Suasnavas, 2015)

Conocida la concentración de cada muestra se escogió las que tengan los mayores valores para ser amplificadas, se preparó una solución master mix donde los reactivos utilizados se describen en la Tabla 2.5. El reactivo *Go Taq Green Master Mix* empleado fue de Promega, el cual posee Taq-polimerasa, $MgCl_2$, *Buffer* de carga y dNTPs.

Tabla 2.5

Composición de la solución *Master mix* para amplificación de gen 16S rRNA

| Reactivo | Volumen por muestra (μ L) | Concentración final |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Go Taq Green Master Mix | 12,5 | 1 X |
| Primer Forward | 0,8 | 1nM |
| Primer Reverse | 0,8 | 1 nM |
| ADN | 5 | 4ng/ μ L |
| Agua | 5,9 | |
| Volumen total | 25 | |

Fuente: Modificado de Navarrete & Suasnavas, 2015

Las muestras fueron amplificadas en un termociclador modelo TC9610 de Labnet. El programa utilizado fue 94°C por 1 minuto para la desnaturalización inicial, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, el primer anillamiento a 54°C por 30 segundos, la elongación a 72°C por 30 segundos y la extensión final a 72°C por 20 minutos (Mejía, 2007).

Los fragmentos de ADN que se amplificaron fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, el voltaje utilizado fue 120 voltios por 30 minutos a 500mA, se empleó el marcador de peso molecular *low DNA Mass Ladder* (Figura 2.11).

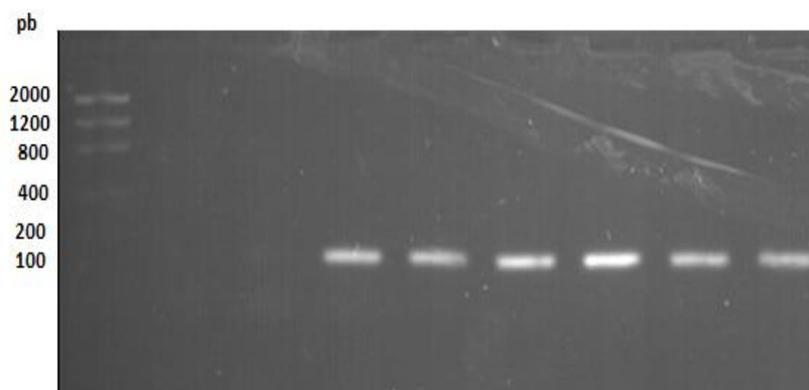


Figura 2.11: Electroforesis de los productos de PCR.

2.6.4.3 Secuenciación del gen 16S rRNA

La secuenciación fue realizada por la empresa Macrogen establecida en Corea. Una sus prestaciones es la secuenciación de ácidos nucleicos para alcanzarlo ejecutan tres procedimientos: purificación del amplicón, PCR de secuencia y reacción de secuenciación. Para esta investigación se enviaron 4 muestras.

Para la edición de las secuencias enviadas por Macrogen se utilizó el software gratuito Chromas, en donde se eliminó los “ruidos” o picos que contamina el electroferograma.

2.6.5 Ensayo de concentración de caldo nutritivo

Para este estudio se emplearon cuatro concentraciones de caldo nutritivo estéril (2, 4, 6 y 8 g/L) al cual se adición alrededor de 3mL del *cultivo madre* hasta llegar a una absorbancia de 0,08 a 680nm usando como blanco el medio de cultivo de cada tratamiento, se distribuyó 100 mL por cada repetición, se mantuvo a luz artificial constante, temperatura ambiente y agitación al momento de tomar la muestra. El crecimiento bacteriano se siguió diariamente hasta que alcanzar la fase estacionaria, al llegar a esta etapa se cuantificó la BChl a (Ecuación 2.1) y los carotenoides totales (Ecuación 2.2).

2.6.6 Ensayo de pH

En esta prueba se analizaron 3 valores de pH (5, 7 y 9), para lo cual se empleó la concentración de caldo nutritivo que dio mejores resultados en el factor anterior, para acidificar el medio se usó ácido acético al 4% v/v (vinagre) y para alcalinizarlo bicarbonato de sodio al 20% p/v, se esterilizó el medio y se adicionó el *cultivo madre* llegando a un valor de 0,08 de absorbancia medida a 680nm, se distribuyó 100 mL por triplicado, el pH se reguló cada 7 días con los buffers estériles; se conservó a temperatura ambiente, irradiación constante y agitación al tomar la muestra. El crecimiento bacteriano se monitoreó hasta llegar a la fase estacionaria, para poder establecer el contenido de BChl a y carotenoides totales.

2.6.7 Ensayo de iluminancia

En esta prueba se analizaron 7 valores de iluminancia 0, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 y 16000 lx, se usó un luxómetro marca Fisher Scientific (código 0666263), se puso la celda fotoeléctrica del equipo frente a un foco fluorescente y se marcó el sitio donde la celda arrojó los valores usados se marcó tres sitios para cada nivel (Figura 2.12), se mantuvo a temperatura ambiente y a la concentración de caldo nutritivo y pH que dieron mayores valores de las variables de respuesta en los estudios anteriores. Se

monitoreó el crecimiento hasta fase estacionaria, en la cual se cuantificó los pigmentos.



Figura 2.12: Uso de luxómetro para medir la iluminancia

2.6.8 Ensayo de presencia de aire

Aquí se estudiaron tres condiciones (aerobia, microaerófila y anaerobia); con el objetivo de incorporar aire al medio se usó un aireador para peceras conectado a llaves de tres vías con mangueras (adentro se colocó algodón) que se introdujeron en los frascos de vidrio, que fueron cerrados con tapones de caucho (Figura 2.13), para medir el volumen de aire que ingresaba se utilizó una probeta llena de agua puesta “de cabeza” dentro de un recipiente con el mismo líquido; se introdujo en la probeta, la manguera conectada al motor, se midió el volumen de agua desplazado por el aire durante un minuto, se repitió hasta obtener en las tres mangueras un caudal de 150 mL de aire/min, todo se esterilizó antes de inocular el *cultivo madre*. La condición microaerófila no tuvo aireación y solo se agitó el medio para muestrear, y para la anaerobiosis se emplearon tubos de ensayo con tapa rosca llenados completamente. Se mantuvieron constantes los resultados más altos obtenidos en los ensayos de concentración del C.N., pH e iluminación. Se cuantificó el crecimiento hasta llegar a la fase estacionaria y se midieron en esa etapa los pigmentos.



Figura 2.13: Montaje del tratamiento de aireación

2.6.9 Análisis de los pigmentos fotosintéticos

2.6.9.1 Cromatografía en capa fina

En este ensayo se separaron los carotenoides totales de la bacterioclorofila para lo cual se extrajeron los pigmentos de la biomasa seca y fresca. Para obtener la biomasa seca se midió un litro del cultivo rojo y se eliminó el agua en una estufa a 40°C después se pesó 0,05 g; en cambio de la biomasa fresca se recolectaron 3 mL de las células vivas, se centrifugó y se conservó el pellet.

Se usaron dos soluciones de solventes acetona:metanol (7:2) y éter de petróleo:acetona (1:1), para la extracción en las dos biomasas; se dejó a oscuridad y frío por 4 días para obtener los pigmentos. Se usó como fase móvil éter de petróleo:acetona:cloroformo (3:1:1) y como fase estacionaria placas de sílica gel con soporte de vidrio que fueron colocadas dentro de una cámara de cromatografía. Se observaron los pigmentos con una lámpara de luz UV, y los que no se logró ver se revelaron con vapores de iodo. El R_f se calculó con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia entre el punto de partida y la línea del pigmento}}{\text{distancia entre el punto de partida y el frente del solvente}} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

2.6.9.2 Barrido espectral

El espectro de luz fue recorrido usando el espectrofotómetro entre los 300 y 1100 nm para determinar la presencia de los pigmentos fotosintéticos como la bacterioclorofila y los carotenoides, el cultivo celular fue diluido en suero fisiológico.

2.6.10 Análisis de datos

2.6.10.1 Análisis filogenético

Las secuencias se compararon con los alineamientos de un banco de datos conocido como *Gen bank*, que tiene el programa *Blast* que coteja secuencias parecidas a la búsqueda expresando la similitud en porcentaje.

2.6.10.2 Análisis estadístico

Los datos de los ensayos se estudiaron con el software estadístico *InfoStat*.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Aislamiento

Las bacterias sembradas en el medio para BRNS y agar nutritivo presentaron la pigmentación roja a los 24 días, en el medio selectivo solo se alcanzaron a visualizar alrededor de 25 UFC, mientras que en agar nutritivo se observó crecimiento en toda la placa (Figura 3.1). Se observaron 2 tipos de colonias una pequeña puntiforme de borde ondulado, convexa, superficie lisa, textura cremosa y color rojo similar a la sangre. La otra colonia fue de forma irregular, borde lobulado, plana, superficie lisa, cremosa, color blanco opaco; esta bacteria creció primero y la roja sobre ésta.

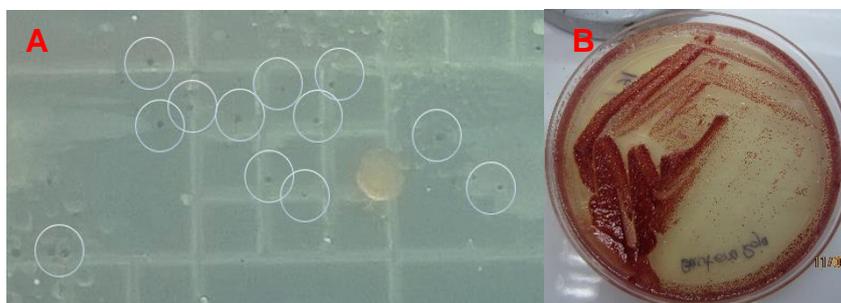


Figura 3.1: Crecimiento bacteriano en medio sólido.

A. Bacterias en medio para BRNS (acercamiento). B. Bacterias en agar nutritivo.

3.2 Pruebas microbiológicas

Se efectuaron algunas pruebas bioquímicas para caracterizar a la BRNS, primero se observó con lente de inmersión una muestra fresca, donde se determinó que las bacterias presentaban movilidad y se corroboró con siembra en tubo con agar nutritivo (Figura 3.1), después se las sometió a la tinción Gram observándose que eran bacilos Gram negativos, la tinción con verde de Malaquita mostró ausencia de esporas (esto se realizó a cultivos viejos), fueron catalasa y oxidasa positiva, capaces de fermentar glucosa y/o sacarosa con producción de H_2S y no usaron el citrato de sodio como única fuente de carbono, en la siguiente tabla se muestra un resumen de los test realizados a la BRNS asociada al consorcio del efluente lácteo.



Figura 3.2: Movilidad de las BRNS en agar nutritivo

Tabla 3.1

Pruebas microbiológicas realizadas al consorcio

| PRUEBAS BIOQUÍMICAS | |
|-----------------------------|----------------------|
| PRUEBA | RESULTADO |
| Motilidad | + |
| Tinción Gram | Bacilos Gram (-) |
| Tinción con verde malaquita | No presentan esporas |
| Catalasa | + |
| Oxidasa | + |
| TSI | A/A H ₂ S |
| Citrato | - |

3.3 Secuenciación

Cada una de las secuencias editadas se colocó en la herramienta *Blast*, obteniéndose la identificación de los microorganismos que conforman el consorcio bacteriano, la herramienta *Blast* presenta el % de identificación y el % de query cover para cada una de las muestras estudiadas. El % de query cover representa la cantidad de alineamiento de la secuencia estudiada con las encontradas en la base de datos.

Tabla 3.2

Microorganismos identificados mediante la herramienta Blast comparadas en la base de datos

| Especie | % Identificación | % Query cover | pares de base (pb) |
|----------------------------------|------------------|---------------|--------------------|
| <i>Pseudomonas citronellolis</i> | 98 | 84 | 300 |
| <i>Pseudomonas citronellolis</i> | 95 | 85 | 250 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 97 | 82 | 423 |
| <i>Pseudomonas citronellolis</i> | 95 | 85 | 250 |

Las secuencias enviadas por MacroGen presentaron contaminación que presuntamente fue causado por el transporte de las muestras. Para la edición de las secuencias se utilizó el software gratuito Chromas, en donde se eliminaron los “ruidos” o picos que contaminan el electroferograma. Se identificaron dos especies *Pseudomonas citronellolis* y *Lactobacillus rhamnosus*.

3.4 Ensayo de concentración de caldo nutritivo

Para llegar a la fase estacionaria a las bacterias les tomó 10 días (Figura 3.3). La regresión de la curva de crecimiento para cada nivel fue de tipo polinómica de segundo grado con un buen ajuste mayor a 0,87 (Tabla 3.3). La media máxima de absorbancia al final del tratamiento fue de 1,6, 1,57, 1,16 y 0,90 para los tratamientos de 6, 8 4 y 2 g/L, respectivamente.

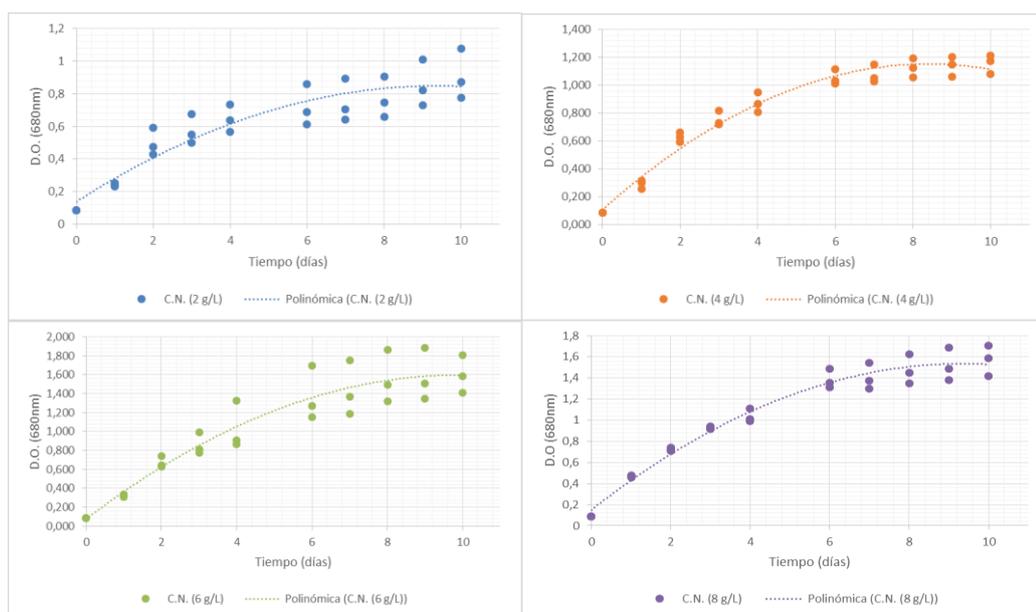


Figura 3.3: Curvas de dispersión del crecimiento bacteriano en el ensayo “concentración de C.N.”

Tabla 3.3

Ecuación de la curva de crecimiento bacteriano y valor de R^2 en el ensayo “concentración de caldo nutritivo”

| Concentración de C. N. (g/L) | Ecuación de la curva | R^2 |
|------------------------------|-------------------------------|-------|
| 2 | $y = -0,01x^2 + 0,17x + 0,12$ | 0,87 |
| 4 | $y = -0,02x^2 + 0,26x + 0,10$ | 0,98 |
| 6 | $y = -0,02x^2 + 0,31x + 0,07$ | 0,90 |
| 8 | $y = -0,02x^2 + 0,30x + 0,15$ | 0,97 |

Se comparó las absorbancias con el test de Duncan de las tres últimas tomas de datos para observar el comportamiento de las bacterias al final del estudio. En el día 8 se separaron los datos en tres grupos siendo el último de 6 y 8 g/L. Para el día 9 se dividió en dos por un lado 2 y 4 g/L y el otro en 6 y 8 g/L, lo mismo ocurrió para el décimo día. Como se puede observar en la Tabla 3.4 en los tres días la mayor media fue a 6 y 8 g/L.

Tabla 3.4

Distribución de medias para los tres últimos días de toma de muestra de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo “concentración de caldo nutritivo”

| Días | Unidades | Grupo A | | Grupo B | | Grupo C | |
|------|----------|---------|------|---------|------|---------|------|
| 8 | g/L | 2 | | 4 | | 6 | 8 |
| | Abs | 0,77 | | 1,13 | | 1,47 | 1,56 |
| 9 | g/L | 2 | 4 | 8 | 6 | | |
| | Abs | 0,85 | 1,14 | 1,52 | 1,58 | | |
| 10 | g/L | 2 | 4 | 8 | 6 | | |
| | Abs | 0,91 | 1,16 | 1,57 | 1,60 | | |

En la Figura 3.4 se muestra el contenido de BChl a, al octavo día no hubo diferencia en las medias para la concentración de 4, 6 y 8 g/L, pero para el décimo día el contenido de este pigmento fue de 3,74 mg/mL en 6 g/L de C.N. siendo el más alto en comparación al resto.

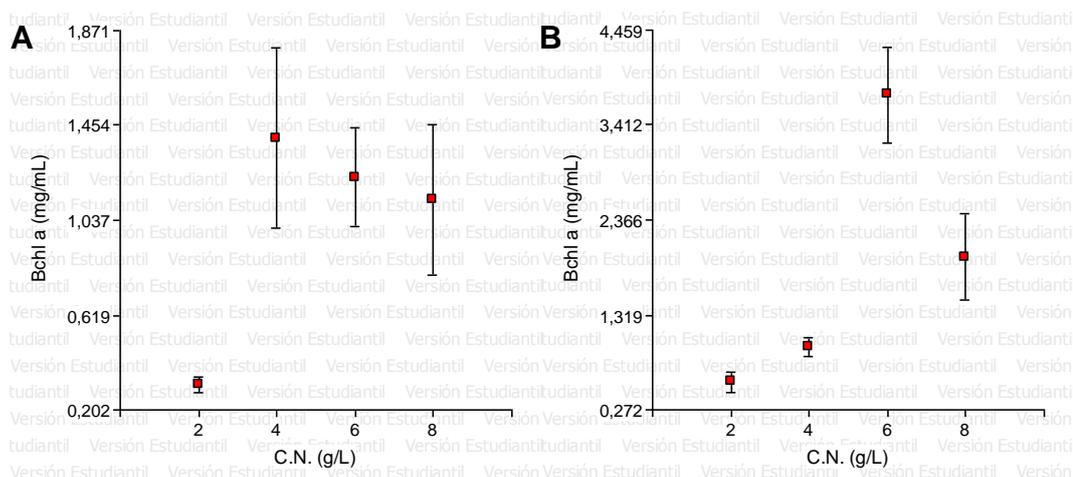


Figura 3.4: Contenido de BChl a de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo “concentración de caldo nutritivo”

A. Octavo día de crecimiento. B. Décimo día de cultivo.

El contenido de carotenoides totales fue mayor para el caso de 6 g/L tanto para el octavo día (2,03 $\mu\text{g/mL}$) como para el décimo (1,96 $\mu\text{g/mL}$) Figura 3.5. Así comparando las tres variables de respuesta se escogió la concentración de 6 g/L para los siguientes ensayos, porque la mayor acumulación de pigmentos se dio en ese tratamiento y el crecimiento no tuvo diferencia con 8 g/L, por tanto se evitó gastar medio innecesariamente.

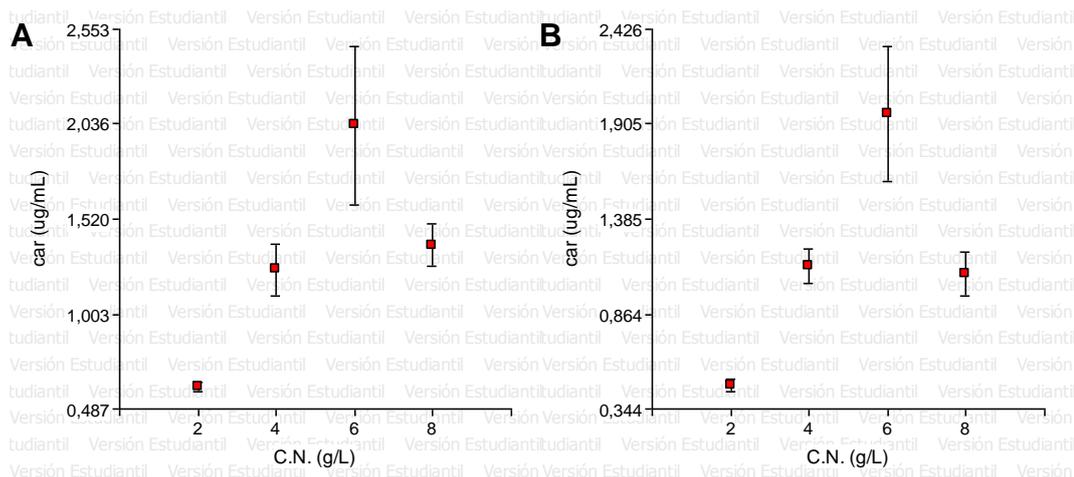


Figura 3.5: Contenido de carotenoides totales de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo “concentración de caldo nutritivo”.
 A. Octavo día de crecimiento. B. Décimo día de cultivo.

3.5 Ensayo de pH

Esta experimentación se hizo con 6 g/L de caldo nutritivo y se analizaron tres valores de pH, el crecimiento se siguió hasta el día 37, donde se observó que los microorganismos disminuyeron su crecimiento (Figura 3.6), la regresión lineal de las curvas fue de tipo polinómica de segundo grado con un R^2 mayor a 0,74, lo que indica un buen ajuste (Tabla 3.5).

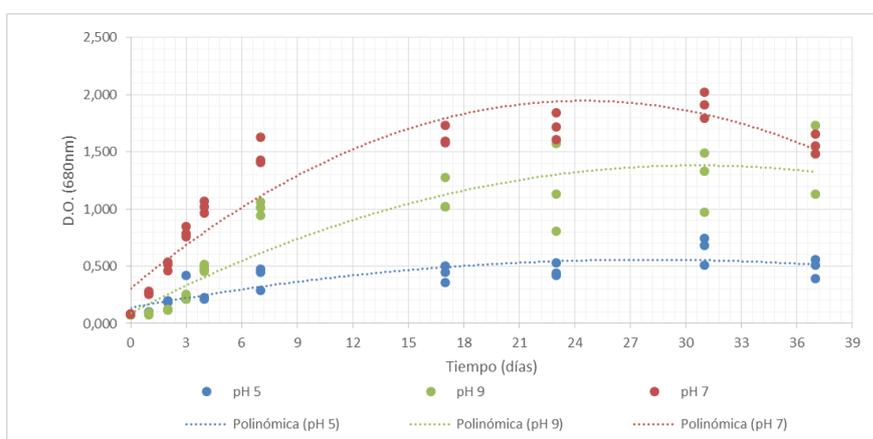


Figura 3.6: Curvas de dispersión del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio para el ensayo en función del pH

Tabla 3.5

Ecuación de la curva de crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio y valor de R² del ensayo en función del pH

| Ph | Ecuación de la curva | R ² |
|----|----------------------------------|----------------|
| 5 | $y = -0,00054x^2 + 0,03x + 0,14$ | 0,74 |
| 7 | $y = -0,0027x^2 + 0,134x + 0,31$ | 0,90 |
| 9 | $y = -0,0014x^2 + 0,08x + 0,09$ | 0,84 |

Se hizo una prueba de Duncan para los tres últimos días de experimentación. El día 23 se observó que el crecimiento fue mayor a pH 7 seguido por pH 9 y por último a pH 5, las medias de absorbancia fueron 1,72, 1,17 y 0,46, respectivamente. Para el día 31 los microorganismos tuvieron el mayor crecimiento manteniendo el mismo patrón de desarrollo con medias de: 0,65 (pH 5), 1,26 (pH 9) y 1,91 (pH 7). Al final el mayor crecimiento se dio a pH 9 (1,45 Abs) y 7 (1,56 Abs) en el cual las células ya estaban entrando a fase endógena (Figura 3.7).

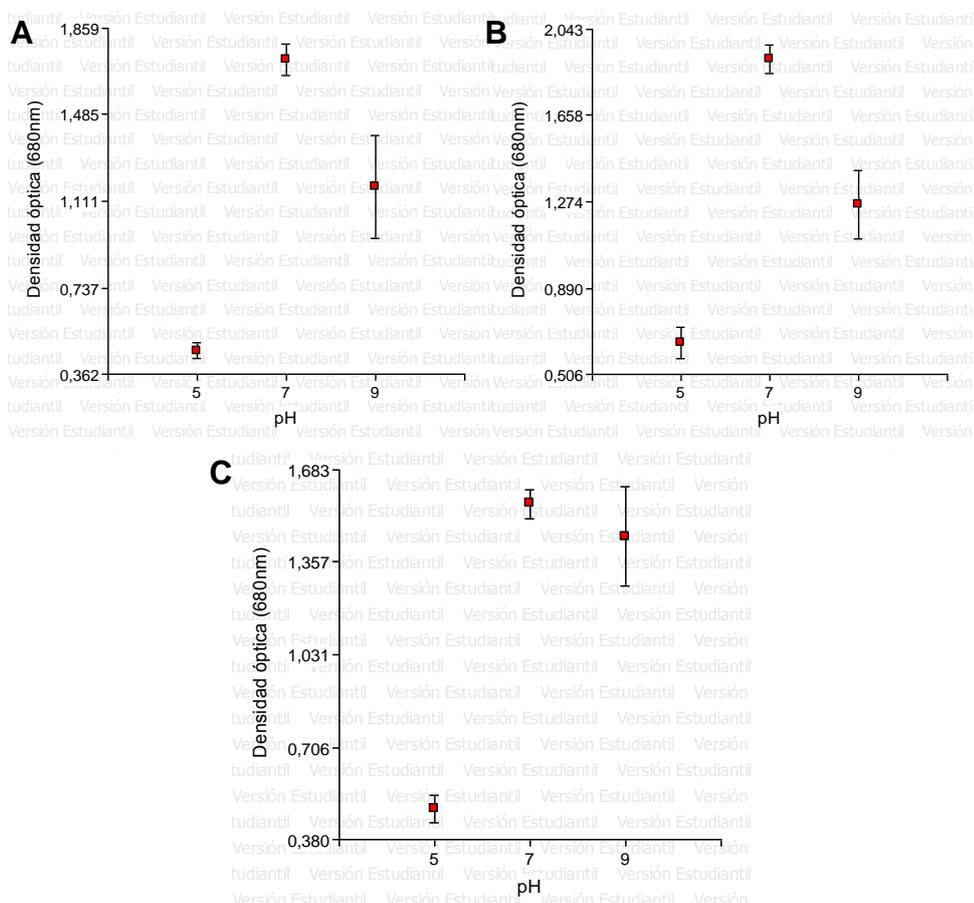


Figura 3.7: Comparación del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo de pH

Densidad óptica medida a los 23 (A), 31 (B) y 37 (C) días

El contenido de BChl *a* se analizó a los 23 y 37 días de edad del cultivo. En la primera toma de muestra se determinó que el mayor contenido de dicho pigmento fue a pH 9 con una media de 4,26 mg/mL, por otro lado al final del ensayo hubo más BChl *a* en el nivel de pH 7 (5,17 mg/mL) y pH 9 (4,15 mg/mL) Figura 3.8.

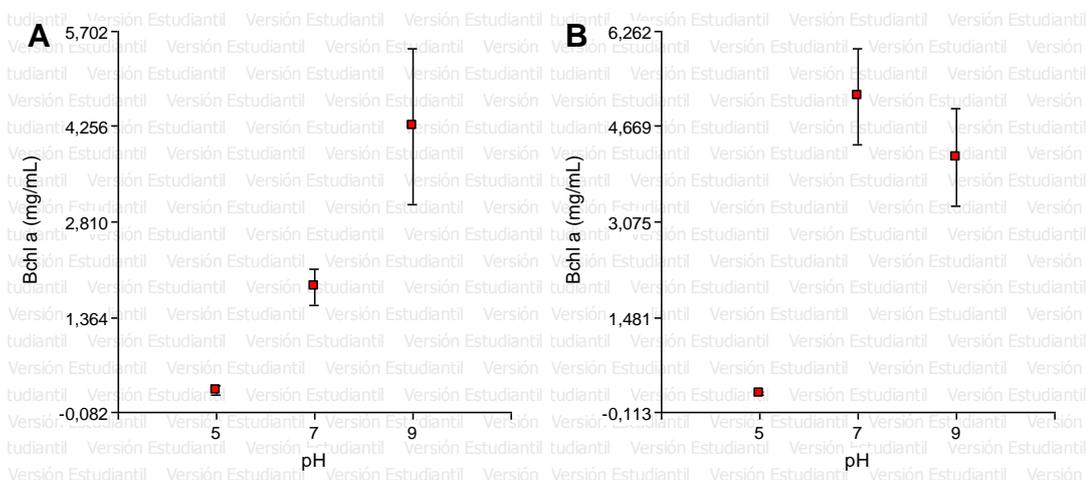


Figura 3.8: Comparación del contenido de BChl *a* de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo de pH
BChl *a* (mg/mL) medida a los 23 (A) y 37 (C) días

El contenido de carotenoides totales fue mayor a pH 7 (0,44 $\mu\text{g/mL}$) y pH 9 (0,74 $\mu\text{g/mL}$) al día 23, para el día 37 se observó el mismo comportamiento a pH 7 (0,98 $\mu\text{g/mL}$) y pH 9 (1,12 $\mu\text{g/mL}$) Figura 3.9.

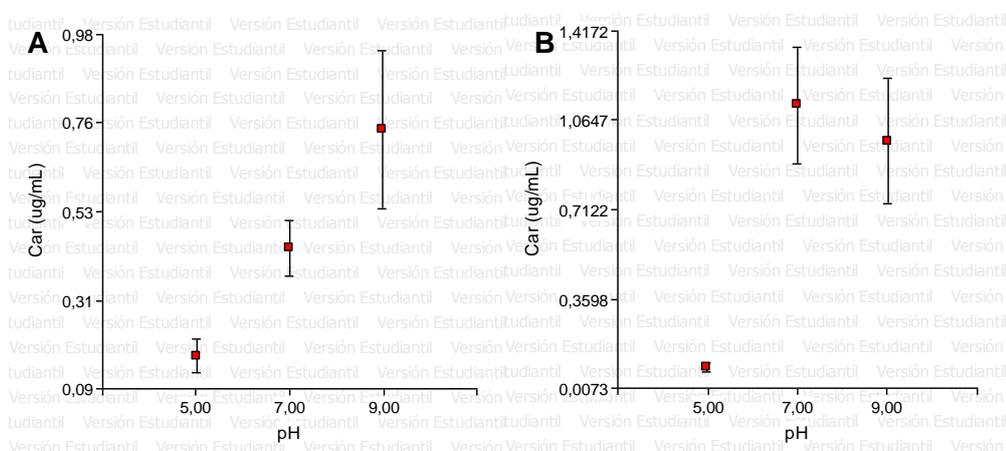


Figura 3.9: Comparación del contenido de carotenoides totales de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo de pH
Carotenoides totales ($\mu\text{g/mL}$) a los 23 (A) y 37 (C) días

No hubo diferencia entre el contenido de carotenoides totales, BChl a y el crecimiento celular en los tratamientos de pH 7 y 9, por lo tanto se optó por el primero para continuar la experimentación en los otros ensayos.

3.6 Ensayo de iluminancia

Este ensayo se hizo con caldo nutritivo 6 g/L y a pH 7, puesto que fueron los mejores valores de los anteriores factores; a las bacterias les tomó 33 días para llegar a la fase estacionaria (Figura 3.10) y se realizaron regresiones lineales para determinar que las curvas eran de tipo polinómicas de segundo grado con un buen ajuste, mayor a 0,86 (Tabla 3.6).

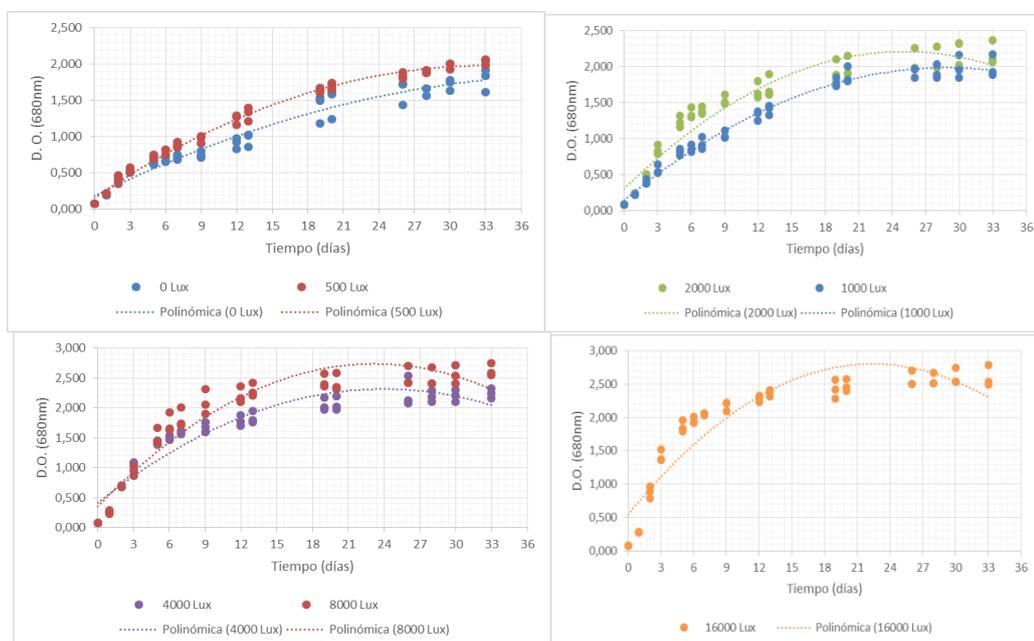


Figura 3.10: Curvas de dispersión del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio para el ensayo de iluminancia

Tabla 3.6

Ecuación de la curva de crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio y valor de R^2 para el ensayo de iluminancia.

| Iluminancia (klx) | Ecuación de la curva | R^2 |
|-------------------|---------------------------------|-------|
| 0 | $y = -0,0001 + 0,08x + 0,18$ | 0,96 |
| 0,5 | $y = -0,0017x^2 + 0,11x + 0,16$ | 0,99 |
| 1 | $y = -0,0022x^2 + 0,13x + 0,14$ | 0,98 |
| 2 | $y = -0,003x^2 + 0,15x + 0,30$ | 0,93 |
| 4 | $y = -0,0033x^2 + 0,16x + 0,41$ | 0,90 |
| 8 | $y = -0,0044x^2 + 0,21x + 0,35$ | 0,92 |
| 16 | $y = -0,0045x^2 + 0,20x + 0,55$ | 0,86 |

Se hizo una comparación con el test de Duncan para conocer a que intensidad luminosa se daba el mayor crecimiento bacteriano, determinándose que el desarrollo es dependiente de la luz, debido a que para las tres últimas tomas de datos a los 28, 30 y 33 días, los valores que se destacaron fueron a 8 y 16 klx, cuya media de absorbancia se mantuvo entre 2,5 y 2,6 para los tres días (Figura 3.10).

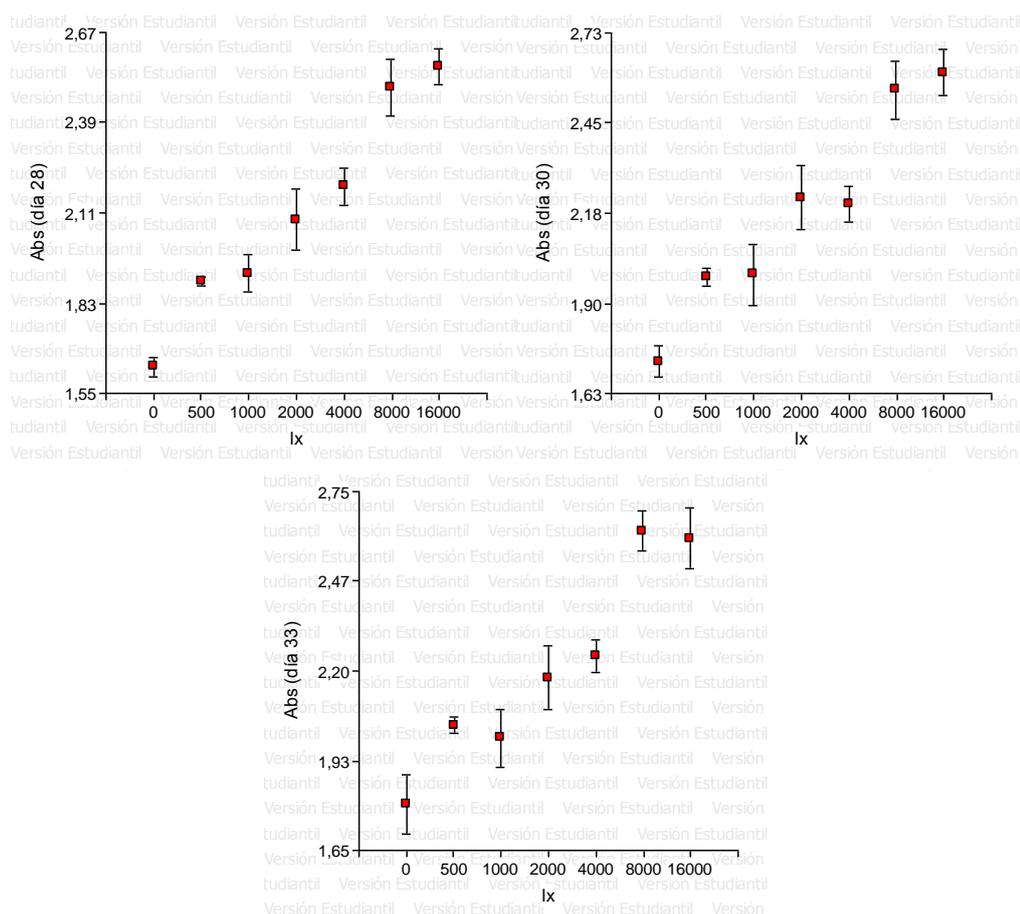


Figura 3.11: Comparación del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo de intensidad luminosa
Densidad óptica medida a los 28 (A), 30 (B) y 33 (C) días

Los pigmentos fotosintéticos no tuvieron el mismo comportamiento que el crecimiento; para el día 26 la BChl a fue de 6,83 mg/mL para 4 klx seguido por 4.56 mg/mL a 2 klx y el resto de tratamientos se mantuvieron entre 2,91 mg/mL hasta un mínimo de 0,16 mg/mL (oscuridad) y para el día 33 fue de 6,47 mg/mL para 4000 lx, mientras que los otros niveles tuvieron valores entre 0,27 (oscuridad) y 4,77 mg/mL (Figura 3.12). Por otro lado, los

carotenoides totales al día 26 fueron de 1,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 4000 lx, en los otros tratamientos los valores estuvieron entre 0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (oscuridad) hasta 1,59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2000lx; para el día 33 se obtuvo 2,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 4000 lx, los otros niveles estuvieron entre 0,14 y 2,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3.13).

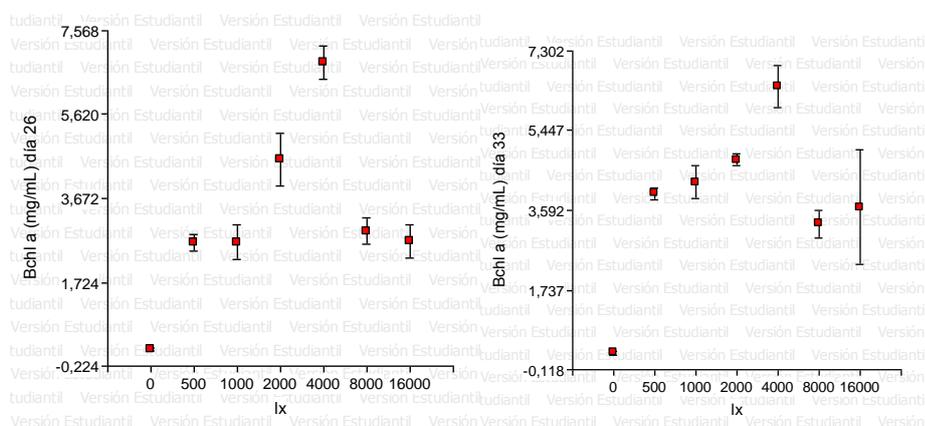


Figura 3.12: Comparación del contenido de BChl a de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo de iluminancia
Cuantificación de BChl a, para el día 26 y 33 de crecimiento.

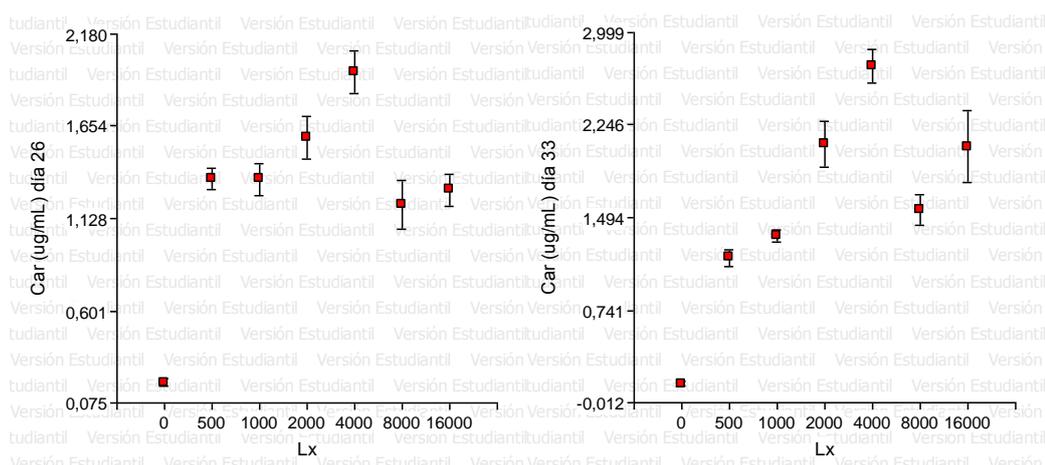


Figura 3.13: Comparación del contenido de carotenoides totales de las BRNS asociadas a un consorcio en el ensayo de iluminancia
Cuantificación de carotenoides totales ($\mu\text{g}/\text{mL}$), para el día 26 y 33 de crecimiento

Por tanto, para el siguiente ensayo se usó la intensidad luminosa de 4000lx, puesto que fue el nivel que dio mayores valores en contenido de pigmentos fotosintéticos a pesar de presentarse mayor densidad celular para 8000 y 16000 lx.

3.7 Ensayo de presencia de aire

Se realizó con caldo nutritivo 6 g/L, a pH 7 e iluminancia a 4000 lx, debido a que, en ensayos previos el mejor desarrollo bacteriano y mayor contenido de pigmentos fotosintéticos se dio a esos valores; en esta experimentación a las bacterias les tomó 25 días para llegar a la fase estacionaria (Figura 3.14) y se realizaron regresiones lineales determinándose que las curvas fueron de tipo polinómicas de segundo grado para la condición microaerófila y anaerobia con un ajuste mayor a 0,8, mientras que en la condición aerobia el crecimiento mayor fue hasta el octavo día y después disminuyó notablemente, en este nivel la curva fue polinómica de tercer grado con un ajuste de 0,88 (Tabla 3.7).

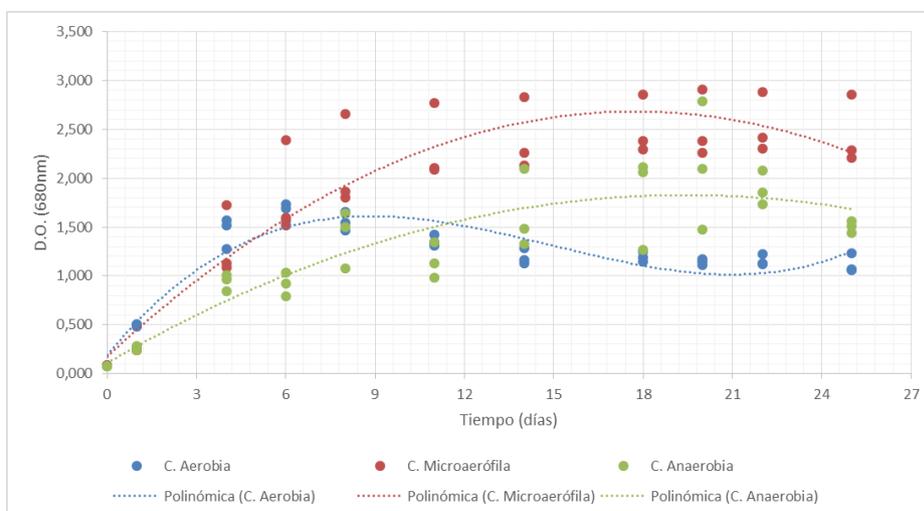


Figura 3.14: Curvas de dispersión del crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio del ensayo de condición anaerobia, microaerófila y aerobia

Tabla 3.7

Ecuación de la curva de crecimiento de las BRNS asociadas a un consorcio y valor de R^2 en el ensayo de condición anaerobia, microaerófila y aerobia

| Condición | Ecuación de la curva | R^2 |
|----------------------|------------------------------------------|-------|
| Aerobia | $y = 0,0007x^3 - 0,03x^2 + 0,37x + 0,19$ | 0,88 |
| Microaerófila | $y = -0,01x^2 + 0,28x + 0,18$ | 0,88 |
| Anaerobia | $y = -0,005x^2 + 0,18x + 0,11$ | 0,80 |

Se hizo la prueba de Duncan para los tres últimos días de toma de datos. En el día 20 el mayor crecimiento se observó en la condición microaerófila y

anaerobia con medias de absorbancia 2,52 y 2,12, respectivamente, el tratamiento con aireación fue rezagado como la condición menos favorable (1,12 de absorbancia). Para el día 22 las bacterias aumentaron su población, pero el crecimiento fue más favorable en la condición microaerófila, anaerobia y por último la aerobia. Cuando se concluyó la experimentación al día 25 la mejor condición fue la microaerófila (2,45 Abs), seguida de la anaerobia (1,50 Abs) y aerobia (1,12 Abs), las dos últimas no tuvieron diferencia Figura 3.15.

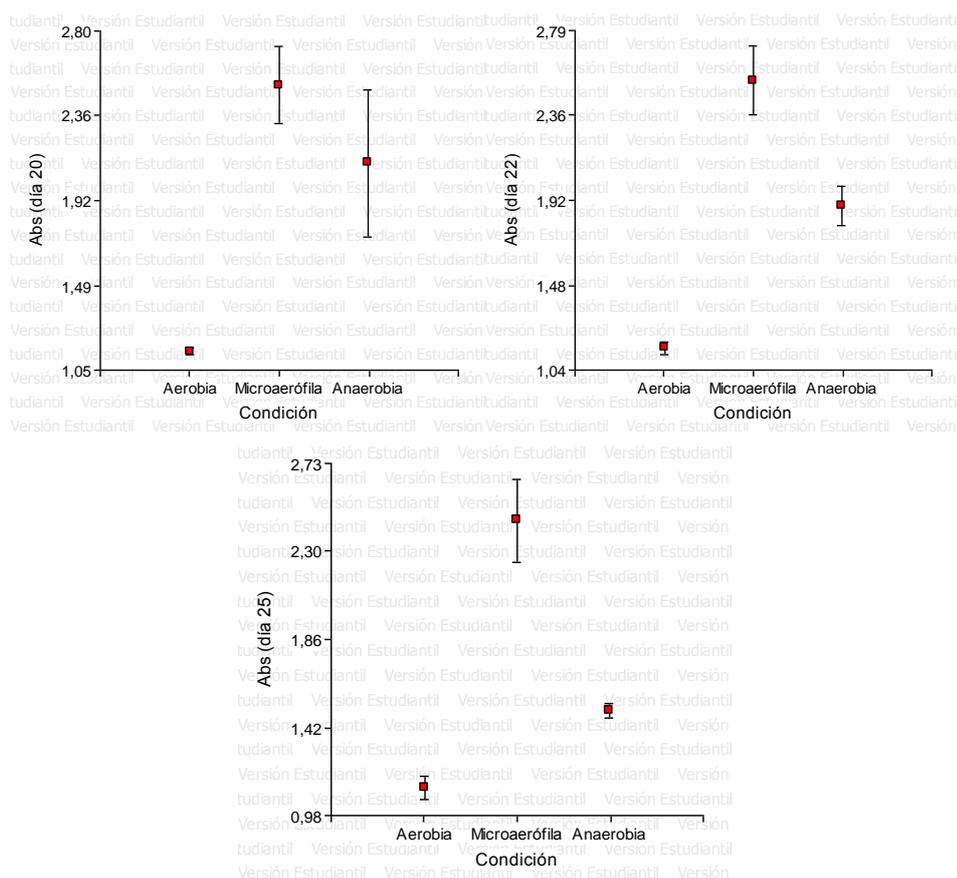


Figura 3.15: Comparación del crecimiento celular de las BRNS para el ensayo de condición anaerobia, microaerófila y aerobia.
Densidad óptica medida a los 20, 22 y 25 días

La BChl a y los carotenoides totales se midieron a los 22 y 25 días de edad del cultivo, para el día 22 la BChl a se mantuvo igual para las tres condiciones, sin embargo, para el día 25 el tratamiento microaerófilo fue el que produjo un mayor contenido del pigmento con 2,44 mg/mL Figura 3.16. Los carotenoides totales al día 22 en la condición anaerobia fue de 1,74 µg/mL y en la microaerófila 2,32 µg/mL, generaron una mejor acumulación

de estas moléculas comparado con la adición de aire al medio $0,13 \mu\text{g/mL}$. Al día 25 los carotenoides fueron mayormente acumulados en la condición microaerófila presentado $2,46 \mu\text{g/mL}$, mientras que para anaerobiosis fue de $1,01 \mu\text{g/mL}$ y por último la aerobia con $0,15 \mu\text{g/mL}$ Figura 3.17.

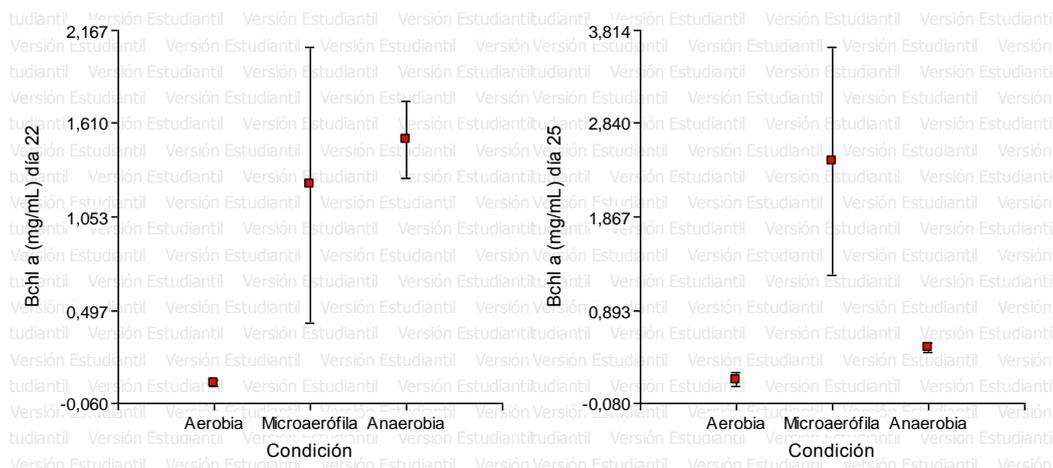


Figura 3.16: Comparación del contenido de BChl a en las BRNS bajo condición anaerobia, microaerófila y aerobia
Cuantificación de BChl a (mg/mL), para el día 22 y 25 de iniciado el tratamiento

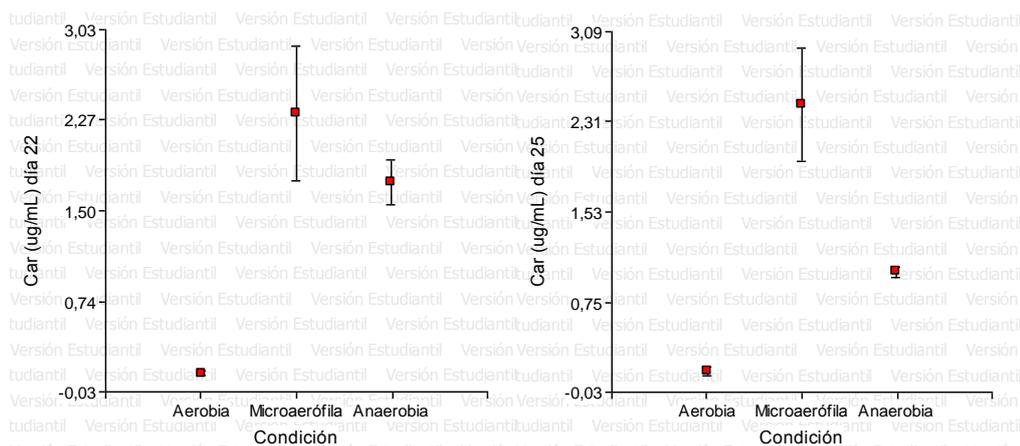


Figura 3.17: Comparación del contenido de carotenoides totales en las BRNS bajo condición anaerobia, microaerófila y aerobia
Cuantificación de carotenoides totales ($\mu\text{g/mL}$), para el día 22 y 25 de iniciado el tratamiento

3.8 Análisis de los pigmentos fotosintéticos

3.8.1 Cromatografía

La TLC mostró la presencia de tres compuestos, un caroteno de color naranja a simple vista; con vapores de yodo se revelaron dos compuestos más la feofitina (R_f entre 0,86 y 0,89) y la bacterioclorofila con R_f entre 0,47 y

0,55, con luz UV de longitud de onda larga se observó que en el punto de aplicación se quedaron compuestos, lo cuales emitían luz roja, por tanto, se identificaron como un tipo de bacterioclorofilas visualizados también al usar vapores de yodo (Figura 3.18). El caroteno se observó sólo en biomasa seca extraída con éter de petróleo:acetona (1:1), y los otros compuestos en los dos tipos de biomasa, estos se oxidaban fácilmente puesto que en menos de dos horas acabada la cromatografía, dejaron de ser visibles.

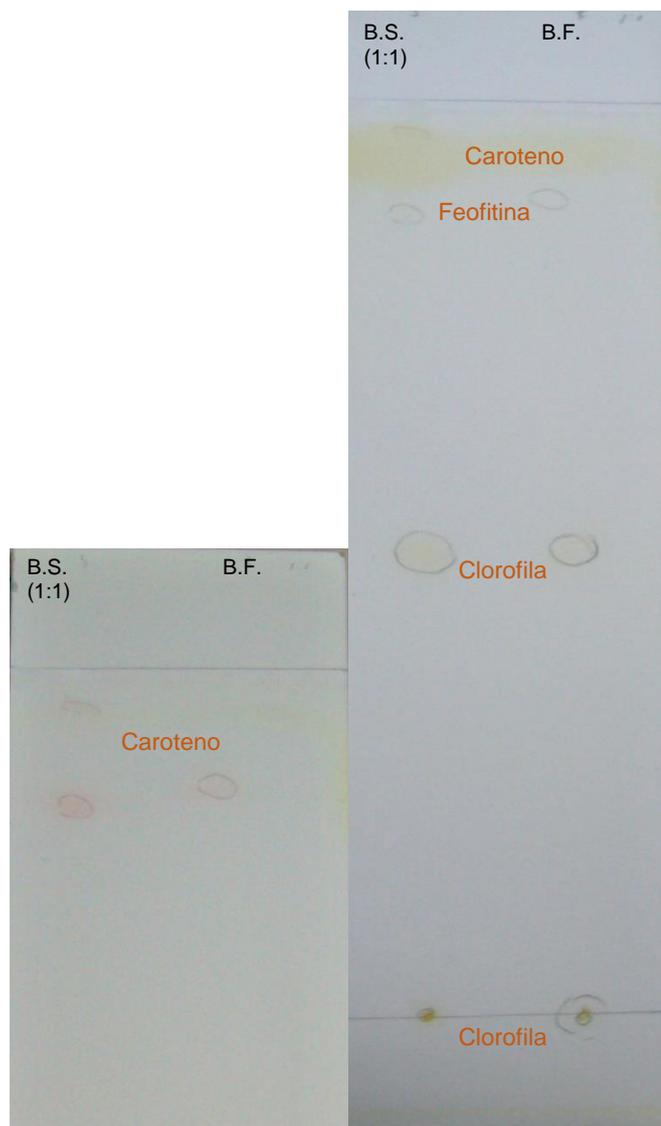


Figura 3.18: Cromatografía de capa fina aplicada a un extracto de pigmentos de BRNS

Se usó como fase estacionaria placas de sílica gel en las cuales se aplicó el extracto de biomasa fresca (BF) y de biomasa seca (BS). La fase móvil fue éter de petróleo:acetona: cloroformo (3:1:1). El revelado se hizo con vapores de yodo.

Tabla 3.8

R_f obtenidos mediante TLC de biomasa seca y fresca de las BRNS

| Fase móvil éter de petróleo:acetona: cloroformo (3:1:1) | | | |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------|
| Solvente para la extracción: Éter de petróleo: acetona (1:1) | | | |
| Biomasa seca (R_f) | Molécula | Biomasa fresca (R_f) | Molécula |
| 0,97 | Caroteno (naranja) | 0,89 | Feofitina |
| 0,87 | Feofitina | 0,50 | Clorofila |
| 0,49 | Clorofila | | |
| Solvente para la extracción: Acetona: metanol (7:2) | | | |
| Biomasa seca (R_f) | Molécula | Biomasa fresca (R_f) | Molécula |
| 0,87 | Feofitina | 0,86 | Feofitina |
| 0,47 | Clorofila | 0,55 | Clorofila |

3.8.2 Barrido espectral

La suspensión celular creció en condición microaerófila fotoheterotróficamente, fue roja, el barrido espectral se midió entre 300 y 1100nm (Figura 3.19), el espectro de absorción máximo de las células vivas se resume en la Tabla 3.9. Los mayores picos se observaron a 370, 390, 500, 800, 810, 860 y 950 nm, estos indican la presencia de BChl *a* y carotenoides característicos de las BRNS.

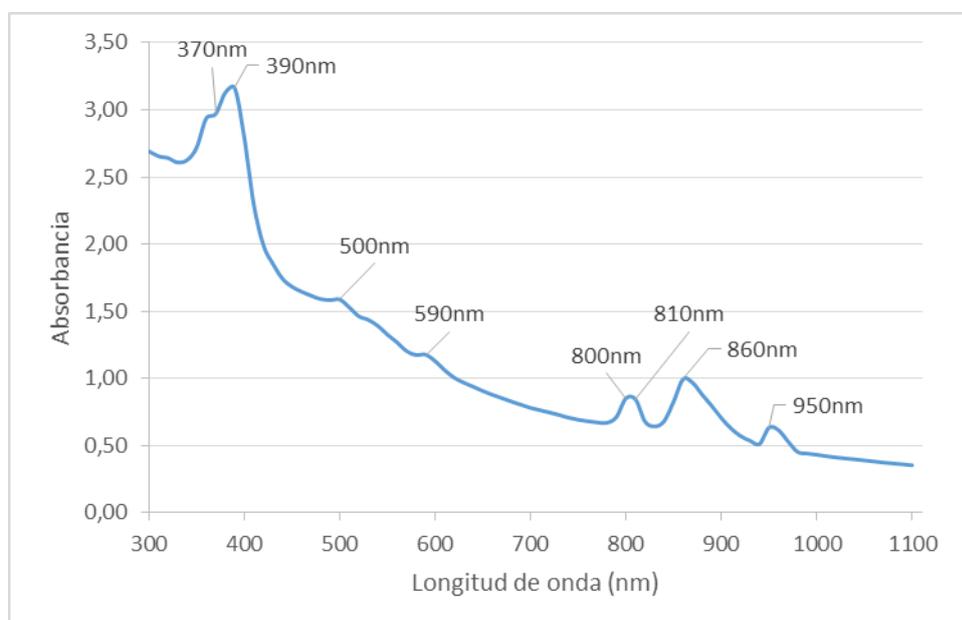


Figura 3.19: Barrido espectral del cultivo *in vivo* de las BRNS

Tabla 3.9

Picos de absorción en el barrido espectral del cultivo *in vivo*

| Picos de absorción | 370 nm | 390 nm | 500 nm | 590 nm | 800 nm | 810 nm | 860 nm | 950 nm |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 3,036 | 3,161 | 1,784 | 1,347 | 1,035 | 1,030 | 1,245 | 1,004 |
| 2 | 3,038 | 3,163 | 1,524 | 1,117 | 0,782 | 0,775 | 0,895 | 0,463 |
| 3 | 2,833 | 3,162 | 1,455 | 1,069 | 0,740 | 0,730 | 0,846 | 0,436 |

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento

Madukasi *et al.*, (2011) demuestra el uso de agar nutritivo como medio de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de *Rhodobacter* sp., una especie de Bacterias Rojas No Sulfurosas (BRNS). En este estudio la aparición de bacterias rojas se alcanzó a los 24 días en presencia de luz y condiciones microaerófilas, otros autores demuestran la aparición de éstas a los 7 días a temperatura ambiente, con presencia de luz y en anaerobiosis (Mehrabi, Ekanemesang, Aikhionbare, Kimbro, & Bender, 2001), por lo que el oxígeno del ambiente pudo retardar la presencia de la pigmentación roja puesto que si está más restringido el suministro de dicha molécula, más pronunciada es la pigmentación en las células (Cohen, Sistro, & Stanier, 1957). Mediante secuenciación se obtuvo la identificación de dos especies *Pseudomonas citronellolis* y *Lactobacillus rhamnosus*. Las secuencias enviadas por MacroGen presentaron contaminación que presuntamente fue causado por el transporte de las muestras. Marquéz, (2010) menciona que la edición de las secuencias de forma manual permite obtener secuencias más limpias útiles para análisis bioestadístico. Por lo tanto, no se pudo asegurar que estos dos microorganismos sean los identificados, sin embargo, se conoce que las bacterias del género *Rhodobacter* spp. son un grupo de bacilos Gram negativos fotosintéticos (Wang, Liu, Zheng, & Wang, 2014)., que presentan movilidad capaces de degradar contaminantes orgánicos (Bhattacharya, Sarma, Sanjeet, & Lal, 2003), pueden vivir en condiciones microaerófilas o anaerobias (Forkl, Vandekerckhove, Drews, & Tadros, 1993) algunas especies son catalasa y oxidasa positiva (Lalucat, Bennisar, Bosch, García, & Palleroni, 2006), pueden usar como sustrato el tiosulfato y generar H₂S (Breed *et al.*, 1957; Niel, 1944; Kantachote, Kornochalart, & Chaiprapat, 2010). Por consiguiente, se presume que la bacteria roja pertenezca al género *Rhodobacter*. El crecimiento de las bacterias hasta llegar a fase estacionaria tomó entre 10 y 37 días dependiendo del tipo de ensayo, cuando se probó las cuatro concentraciones de caldo nutritivo se observó

que a mayor cantidad de nutrientes, mayor fue el crecimiento y acumulación de pigmentos, siendo 6 y 8 g/L los valores más altos, esto se debió a que el caldo nutritivo lleva en su composición extracto de carne y pluripeptona (una mezcla en partes iguales de peptona de carne y caseína); los dos componentes proveen a los microorganismos aminoácidos, vitaminas, la fuente de nitrógeno y carbono (ACUMEDIA, 2009), así las bacterias tuvieron los componentes orgánicos necesarios para su crecimiento fotoheterotrófico.

4.2 Condiciones ambientales controladas

Cuando se recolectó la muestra, las bacterias tomaron la coloración roja al estar en un pH neutro a alcalino, esta misma respuesta tuvo Okamura, Kanbe & Hiraishi (2009), cuando tomaron una muestra de un estanque a pH 7,2 para aislar BRNS. Mehrabi *et al.*, 2001 probó en el medio de cultivo cuatro valores de pH 5, 6, 7 y 8, observando el mejor crecimiento a pH 6 - 8 bajo condiciones fotoheterotróficas, un comportamiento similar se observó en este estudio puesto que las bacterias pudieron crecer entre pH 7 y 9.

Cuando se probaron 7 intensidades de luz, desde la más baja que fue a completa oscuridad, las intermedias de 0,5 a 4 klx y las más altas de 8 y 16 klx, se observó un crecimiento proporcional a la iluminancia por lo tanto, existe una respuesta a los niveles de iluminación por parte de la BRNS al crecer fotoheterotróficamente; puesto que se sintetiza una membrana intracitoplasmática, la cual alberga los aparatos fotosintéticos (LH y RC) (Shipman, Fan, & Kao, 1977). Cuando las BRNS están en presencia de luz se suele observar mayor acumulación de carotenoides y BChl *a* pues se almacena más energía lumínica para la fotosíntesis (Shipman *et al.*, 1977; Jodlowska & Latala, 2011). Si bien, hubo una buena respuesta de crecimiento de acuerdo al aumento de la intensidad luminosa, el mejor contenido de BChl *a* y carotenoides totales fue a iluminancia intermedia de 4 klx como se observó en el estudio realizado por Cohen *et al.*, (1957) donde se presentaron más pigmentos fotosintéticos cuando se expuso a las células a luz tenue en comparación a las que crecieron en luz brillante; esto se debe

a la influencia de los factores ambientales, como tensión de oxígeno, temperatura y luz en las membranas fotosintéticas (Kwa, 2007), además la luz pudo dañar los pigmentos fotosintéticos principalmente los carotenoides que actúan como fotoprotectores (Goodwin, 1980).

Cuando se probó las condiciones microaerófila, anaerobia y aerobia, a pH 7 y 4000 lx se observó que el crecimiento, contenido de BChl *a* y carotenoides totales se daba mejor cuando había menos tensión de oxígeno esto se corrobora en estudios con BRNS en aguas residuales farmacéuticas en condiciones microaerófilas fotoheterótroficas, en las cuales las suspensiones celulares fueron rojas (Madukasi *et al.*, 2011); otro estudio realizado en una bacteria fotosintética encontrada en aguas residuales del procesamiento de mariscos mostró una mayor acumulación de carotenoides en anaerobiosis y expuesta a luz (Prasertsan, Choorit, & Suwanno, 1993). Este comportamiento se debe a que el oxígeno afecta la síntesis de los pigmentos fotosintéticos actuando como un blanqueador y conduciendo a la reducción del contenido de carotenoides (Cohen *et al.*, 1957).

4.3 Análisis de los pigmentos fotosintéticos

En la TLC se obtuvieron tres tipos de moléculas; el caroteno con un R_f de 0,97 que fue muy cercano al que obtuvo Reiss (1994) de 0,98 en pigmentos de hojas de espinaca. Las bacterioclorofilas tienen una similitud molecular con las clorofilas (Kwa, 2007); éstas se mantuvieron en medio de la clorofila *a* y *b* dado que en la experimentación de Reiss (1994), el R_f fue de 0,42 y 0,59, respectivamente; mientras, que en ésta fue de 0,47 a 0,55; por tanto, no se alcanzó una buena separación de las bacterioclorofilas. Por consiguiente, se confirma la existencia de BChl *a* y se presume la presencia de BChl *b*. La feofitina tuvo un R_f entre 0,86 y 0,89, similar al obtenido por Reiss (1994) de 0,81; lo que se debió a una conversión de la clorofila a su forma libre de magnesio (Zonneveld, Klop, & Gorin, 1984). La decoloración de los pigmentos en menos de dos horas después de realizar la TLC se debe a que son moléculas insaturadas, siendo propensos a la degradación

oxidativa dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y presencia de luz (Waksmundzka, Sherma, & Kowalska, 2008). El daño molecular pudo ocurrir porque no se empleó una atmósfera de nitrógeno, mientras se visualizaba la cromatografía o no se adicionó una capa de parafina líquida para evitar su oxidación (Sajilata, Singhal, & Kamat, 2008).

El barrido espectral demostró la presencia de bacterioclorofila *a*, cuyos picos de absorción fueron a 370, 800 y 860nm, un estudio realizado por Madukasi *et al.*, (2011), mostró picos a 370 y 850nm, mientras que Soto, De Jesús, Vega, & Ríos (2010) los obtuvieron a 805 y 865 nm. Para carotenoides la mayor absorción fue a 500nm que correspondió a la serie de espirilloxantina que poseen las BRNS (Soto *et al.*, 2010)

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Se llegó a aislar dos bacterias en agar nutritivo, una pequeña puntiforme de color rojo sangre y una blanca opaca de borde irregular.
- La bacteria roja se presume que pertenece al género *Rhodobacter* sp., debido a que se identificó como un bacilo Gram negativo, con movilidad, capaz de usar el tiosulfato para reducir a H₂S, fermentadora de glucosa y/o sacarosa, catalasa y oxidasa positiva.
- La concentración de caldo nutritivo adecuada para el crecimiento y producción de pigmentos fotosintéticos de las BRNS en condiciones fotoheterotróficas fue 6 g/L.
- Las BRNS fueron capaces de crecer en pH neutro a alcalino, en este estudio se encontró que un pH 7 a 9, fue el rango más adecuado para su crecimiento.
- La iluminancia moderada está correlacionada a la acumulación de carotenoides totales y BChl *a*, puesto que a una intensidad media de 4000 lx existió una mayor acumulación de pigmentos, la luz tenue estimuló la producción de las membranas intracitoplasmáticas, las cuales albergaban los pigmentos fotosintéticos, pero en altos niveles de luz se inhibió su síntesis.
- El crecimiento y producción de BChl *a* y carotenoides totales fueron adecuados en condiciones microaerófilas a anaerobias, siendo evidente que el oxígeno actuó como un blanqueador que dañó los pigmentos principalmente carotenoides.
- Mediante TLC y barrido espectral se confirmó la presencia de BChl *a*. Usando TLC se presume que se sintetizó BChl *b*, además un

caroteno, el cual, se oxidó fácilmente cuando fue expuesto a temperatura ambiente y al aire.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Usar el medio específico propuesto por Mondragón *et al.*, 1984 en condición anaerobia y así lograr separar las dos bacterias.
- Realizar la secuenciación de una cepa axénica y no del consorcio para obtener una mayor similitud con las secuencias de la base de datos.
- Aplicar las bacterias aisladas en este estudio a un efluente de industria alimenticia con el fin de evaluar otros valores de pH y salinidad.
- Emplear la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y de esta forma identificar con precisión, los tipos de carotenoides.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, S., & Dubinsky, Z. (1982). MASS PRODUCTION OF MICROALGAE. *Experientia*, 36-40.
- Abalde, J. (2004). MICROALGAS: Cultivo y Aplicaciones. 111-113.
- Abril, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Túñez, I. (sf). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Campus Universitario de Rabanales, Córdoba, 1-8.
- ACUMEDIA. (28 de mayo de 2009). BEEF EXTRACT POWDER (7228). Obtenido de neogen: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7228_PI.pdf
- Barredo, J. (2012). Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae: Methods and Protocols. *Springer Protocols*, 1-355
- Bautista, R. (2010). Las tres generaciones de la secuenciación. *Encuentros en la Biología*, 3(128), 4.
- Bedoya, O., & Sanches, L. (2009). Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea en sistemas anaerobios tipo UASB. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 7(2), 24-31.
- Belmonte, M. (2008). Estudios preliminares de trazabilidad a un purín de cerdo. Santiago de Chile.
- Bhattacharya, D., Sarma, P., Krishnan, S., Mishra, S., & Lal, B. (2003). Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1435-1441.
- Breed, R., Murray, E., & Smith, N. (1966). Bergey's manual of determinative bacteriology, ed. 7, Baltimore, 1957. *Williams & Wilkins Company. Hoffman, H., and Frank, ME: Microbial Burden of Mucosal Squamous Epithelial Cells, Acta cvtol*, 10, 272-285.
- Cohen, G., Siström, W., & Stanier, R. (1957). Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49(1), 25-68.
- Corpas, E. (2013). Reducción de la contaminación en agua residual industrial láctea utilizando microorganismos benéficos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1).

- FAO. (2014). LA PRODUCCIÓN DE ALGAS. Manual para la Producción y uso de la Alimentación en vivo para Acuicultura.
- Forkl, H., Vandekerckhove, J., Drews, G., & Tadros, M. H. (1993). Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene for catalase-peroxidase (cpeA) from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* B10. *European Journal of Biochemistry*, 214(1), 251-258.
- Gandarillas, L., Sánchez, T., & Serrano, R. (2009). Estación depuradora de aguas residuales de una industria láctea.
- García, M., & Silva, M. (2004). Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos. España: MAD, S.L.
- Goodwin, T. (1980). The Biochemistry of the Carotenoids. London: Chapman and Hall.
- Goodwin, T. (1984). Photosynthetic Bacteria. In The Biochemistry of Carotenoids. London: Champan and Hall. 320-342
- Guarnizo, A., & Martínez, P. (2009). Experimentos de Química Orgánica: Con enfoque en Ciencias de la Vida. Armenia: Ediciones ELIZCOM.
- Guo, J., Xu, N., Li, Z., Zhang, S., Wu, J., Kim, D. H. & Ju, J. (2008). Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27), 9145-9150.
- Gutiérrez, H., & Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México D.F., México: Mc Graw Hill.
- Harborne, J. (1998). Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plants analysis (Tercera ed.). United Kingdom: Chapman & Hall.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1737-1746.
- Huang, J., Wu, C., Jih, C., & Chen, C. (2001). Effect of addition of *Rhodobacter* sp. to activated-sludge reactors treating piggery wastewater. *Water research*, 35(16), 3867-3875.
- Jodłowska, S., & Latała, A. (2011). The comparison of spectrophotometric method and high-performance liquid chromatography in

- photosynthetic pigment analysis. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 11, 63-69.
- Jones, M. (2009). Bacterial Photosynthesis. *School of Medical Sciences*, United Kingdom, 1-22.
- Jordano, P. (2006). Utilidad y aplicaciones de técnicas moleculares en ecología y conservación. Estación Biológica de Doñana, CSIC, 1-3.
- Kaewsuk, J., Thorasampan, W., Thanuttamavong, M., & Seo, G. T. (2010). Kinetic development and evaluation of membrane sequencing batch reactor (MSBR) with mixed cultures photosynthetic bacteria for dairy wastewater treatment. *Journal of environmental management*, 91(5), 1161-1168.
- Kantachote, D., Kornochalert, N., & Chaiprapat, S. (2010). The use of the purple non sulfur bacterium isolate P1 and fermented pineapple extract to treat latex rubber sheet wastewater for possible use as irrigation water. *Afr J Microbiol Res*, 4, 2296-308.
- Kiratnikorn, S. (2006). ISOLATION AND SCREENING FOR THE HIGHLY CAROTENOID PRODUCTION OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA. Tailandia: Prince of Songkla University.
- Koku, H., Eroğlu, I., Gündüz, U., Yücel, M., & Türker, L. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1315-1329.
- Kwa, L. G. (2007). *Study of protein-bacteriochlorophyll and protein-lipid interactions of natural and model light-harvesting complex 2 in purple bacterium Rhodobacter sphaeroides* (Doctoral dissertation, Imu).
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García, E., & Palleroni, N. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510-547.
- Lami, R., Cottrell, M., Ras, J., Ulloa, O., Obernosterer, I., Claustre, H & Lebaron, P. (2007). High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean. *Applied and environmental microbiology*, 73(13), 4198-4205.
- Mitra, B. (2012). Standardization of cultivation parameters for the extraction of carotenoid from pink pigmented facultative methylotrophic (PPFM) Bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(2), 52-57

- Macfaddin, J. (2000). Pruebas bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica (Tercera ed.). Argentina: Panamericana.
- Madukasi, E., Chunhua, H., & Zhang, G. (2011). Isolation and application of a wild strain photosynthetic bacterium to environmental waste management. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 8(3), 513-522.
- Marquéz, J. (2010). Secuenciación de fragmentos de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en Ecología, 10.
- Martínez, J. (2010). BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS ANOXIGÉNICAS. Universidad de Sevilla, 1-7.
- McGarvey, J., Miller, W., Zhang, R., Ma, Y., & Mitloehner, F. (2007). *Applied and Environmental Microbiology*, 193-202.
- Mehrabi, S., Ekanemesang, U., Aikhionbare, F., Kimbro, K., & Bender, J. (2001). Identification and characterization of *Rhodopseudomonas* spp., a purple, non-sulfur bacterium from microbial mats. *Biomolecular Engineering*, 18(2), 49-56.
- Mejía, M. (2007). Relaciones Simbióticas y Antagónicas entre *Leptospira* saprófita y bacterias fotosintéticas. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Mondragón, R., Vicente, E., & Guillenea, J. (1984). Aislamiento e identificación de bacterias fotosintéticas en el monolimnion del Estany de Cullera (Valencia). *Limnética*, 1, 78-85.
- Moreno, M., Naranjo, B., & Koch, A. (2010). Evaluación de dos métodos para la reducción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales, mediante un cultivo axénico de cianobacterias y un consorcio microbiano, inmovilizados y en suspensión. Quito: *Revista CIENCIA*.
- Navarrete, S., & Suasnavas, B. (2015). Análisis filogenético de quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd) utilizando el gen *rpoB* en muestras provenientes de las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo.
- Niel, C. (1944). The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriological reviews*, 8(1), 1.

- Núñez, M. (2003). Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la laguna de Tampamachoco, Veracruz Isolation and pigment characterization of purple sulphur bacteria from Tampamachoco lagoon, Veracruz. *Hidrobiológica*, 13(3), 171-176.
- Núñez, M., Chávez, M., & Signoret, M. (2011). Aislamiento y caracterización de bacterias rojas no sulfurosas provenientes del humedal de la Mixtequilla, Veracruz (México).
- Okamura, K., Kanbe, T., & Hiraishi, A. (2009). *Rhodoplanes serenus* sp. nov., a purple non-sulfur bacterium isolated from pond water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(3), 531-535.
- Olmos, A., de la Fuente, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. *eimc*, 1-52.
- Paguay, J. (2013). Diseño del sistema de tratamiento y reutilización del agua residual en la Planta de Lácteos ESPOCH.
- Pérez, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-41.
- Prakashveni, R., & Jagadeesan, M. (2012). Isolation identification and distribution of bacteria in dairy effluent. *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research*, 3, 1316-1318.
- Prasertsan, P., Choorit, W., & Suwanno, S. (1993). Isolation, identification and growth conditions of photosynthetic bacteria found in seafood processing wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(5), 590-592.
- Reiss, C. (1994). *Experiments in Plant Physiology*. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de Microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. *Universidad Politécnica de Valencia*.
- Sajilata, M., Singhal, R., & Kamat, M. (2008). The carotenoid pigment zeaxanthin—a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 7(1), 29-49.
- Sánchez, G., Gil, M., Gil, M., Giraldo, F., Millán, L., & Villada, M. (2009). Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte

antioqueño mediante microorganismos eficientes. *Producción más limpia*, 65-74.

Selvakumar, D., & Dhevendaran, K. (2011). Studies on photosynthetic bacterial diversity from retting areas of Murukkumpuzha along Kerala Coast, India. *Middle East journal of scientific research*, 7, 937-942.

Sevilla. (2008). Los vertidos del sector lácteo.

Shabed, M., Azim, N., & Shoreit, A. (2008). Ecological and Physiological Studies on Purple Sulphur Bacteria (Chromatiaceae) at Aswan High Dam Lake. *IDOSI*, 462-467.

Shipman, R., Fan, L., & Kao, I. (1977). Single-cell protein production by photosynthetic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol*, 21, 161-183.

Shivsharan, V., Wani, M., & Kulkarani, S. (2013). Isolation of Microorganism from Dairy Effluent for Activated Sludge Treatment. *International Journal of Computational Engineering Research*, 161-167.

Soto, K., De Jesús, M., Vega, J., & Ríos, C. (2010). Isolation and characterization of purple non-sulfur anoxyphototropic bacteria from two microecosystems: tropical hypersaline microbial mats and bromeliads phytotelmata. *Current Research Technology and Education Topics Applied Biotechnology and Microbial Technology*, 109-116.

Stanier, R. (1961). Photosynthetic mechanisms in bacteria and plants: development of a unitary concept. *Bacteriological reviews*, 25(1), 1-17

Strickland, J., & Parsons, T. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada*, 167.

Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water research*, 45(11), 3351-3358.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

Tortora, Funke, & Case. (2007). Introducción a la Microbiología. Argentina: Panamericana.

Waksmundzka, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (Eds.). (2008). *Thin layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press.

- Wang, D., Liu, H., Zheng, S., & Wang, G. (2014). *Paenirhodobacter enshiensis* gen. nov., sp. nov., a non-photosynthetic bacterium isolated from soil, and emended descriptions of the genera *Rhodobacter* and *Haematobacter*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 2), 551-558.
- Woese, C. R., Weisburg, W. G., Hahn, C. M., Paster, B. J., Zablen, L. B., Lewis, B. J., ... & Stackebrandt, E. (1985). The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(1), 25-33.
- Zeb, A., & Murkovic, M. (2010). Thin-layer chromatographic analysis of carotenoids in plant and animal samples. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 23(2), 94-103.
- Zonneveld, H., Mop, W., & Gorin, N. (1984). Analysis of unboiled and boiled beans for chlorophylls and pheophytins by thin-layer chromatography and fluorimetry—Comparison with spectrometry. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 178(1), 20-23.