

Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de biopolímeros a partir de efluentes industriales

Isolated and characterization of biopolymer producing bacteria from industrial effluents

*Guido Ernesto Villota-Calvachi**, *Karol Viviana González Marín***,
*Sandra María Marulanda Moreno***, *Narmer Fernando Galeano Vanegas***,
*Diana Steffanny Velasco Ortega****, *Luz Adriana Ocampo Henao*****,
*Lita Castañeda Betancur*****, *Carolina Giraldo Morales*****, *Nataly Rodríguez Montes*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.76660

RESUMEN

Se realizó una caracterización físico-química de los efluentes procedentes de industrias del sector educación, metalmecánico, lácteos y confitería de la ciudad de Manizales, Caldas; posteriormente se obtuvieron aislamientos, en medios diferenciales suplementados, de bacterias con potencial para la producción de biopolímeros a los cuales se les aplicó pruebas para la caracterización morfológica, bioquímica y molecular. Los parámetros físico químicos obtenidos de los efluentes industriales demuestran diferencias entre ellos, ya que cada industria genera diferentes residuos aportando una determinada contaminación al efluente, se obtuvieron 73 aislamientos productores de exopolisacáridos (EPS) y 101 productores de polihidroxialcanoatos (PHA), con características morfológicas y bioquímicas variables. El estudio muestra que los efluentes industriales son una gran fuente de bacterias de interés para la producción de diversos polímeros microbianos; principalmente aquellos que producen polímeros tipo biopolímeros intracelulares como PHA, debido a su variabilidad físico-química y nutricional permitiendo que los microorganismos se adapten a diversas características medioambientales y de composición.

Palabras clave: Exopolisacáridos, Polihidroxialcanoatos, Efluente, Industria.

ABSTRACT

A physical-chemical characterization of effluents from industries in the education, metal-mechanic, dairy and confectionery sectors of the city of Manizales, Caldas; Later isolates were obtained, in differential media supplemented, from bacteria with potential for the production of biopolymers to which they were applied tests for morphological, biochemical and molecular characterization. The physical chemical parameters obtained from the industrial effluents show a difference between them, since each industry generates different waste contributing a certain contamination to the effluent, 73 isolates producing exopolysaccharides (EPS) and 101 producers of polyhydroxyalkanoates (PHA) were obtained, with morphological characteristics and variable biochemistry. The study shows that industrial effluents are a great source of bacteria of interest for the production of various microbial polymers; mainly those that produce polymers like intracellular biopolyesters such as PHA, due to their physical-chemical and nutritional variability allowing the microorganisms to adapt to diverse environmental and compositional characteristics.

Keywords: Exopolysaccharides, Polyhydroxyalkanoates, Effluent, Industry.

Recibido: agosto 15 de 2021 **Aprobado:** mayo 16 de 2022

* Universidad Católica de Manizales, Programa de Bacteriología, Colombia, Email: gvillota@ucm.edu.co Orcid: 0000-0002-1472-1963

** Universidad Católica de Manizales, Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, Colombia

*** Tecnóloga en Biotecnología Aplicada a la Industria. Estudiante Ingeniería de Alimentos, Universidad de Caldas, Colombia

**** Bacterióloga, Universidad Católica de Manizales, Colombia

***** Bióloga, Universidad de Caldas, Colombia.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad hay una gran variedad de procesos industriales que son fuentes generadoras de diferentes tipos de residuos de los cuales el 70% se vierten a cuerpos de agua superficiales sin realizarles ningún tipo de tratamiento (Rodríguez *et al.*, 2006), aumentando el deterioro del entorno por su contenido de elementos insolubles, ácidos, bases, metales, elementos orgánicos como azúcares, proteínas, entre otros (Cruz V, 2008), esta alta diversidad de elementos hace de los efluentes industriales una buena fuente para el desarrollo de microorganismos, los cuales por su capacidad de degradar estos compuestos presentan un alto potencial para ser utilizados en procesos de biorremediación y en la producción de sustancias como exopolisacáridos (EPS) y polihidroxialcanoatos (PHA), que son materiales con aplicabilidad en varios sectores industriales entre los que se destacan la industria alimenticia, química, farmacéutica, petroquímica y medicina. En el caso específico de EPS han sido utilizados como aditivos, texturizantes, espesantes, estabilizantes, gelificantes, saborizantes, encapsulantes, además son usados por su capacidad para retener metales pesados, agentes antivirales, antitumorales, sustituyentes de plasma sanguíneo entre otras aplicaciones (Nadzir M. *et al.*, 2021; Moscovici M., 2015), esta variedad de usos hace de los polímeros microbianos sustancias con buen potencial de industrialización y comercialización (Amadu *et al.*, 2021).

Los efluentes industriales presentan diferencias en su composición y proporción de residuos de acuerdo con el tipo de procesos que se realizan en la empresa, pero en general los efluentes contienen una alta carga de materia orgánica (Reyes S, 2009) que puede ser transformada en compuestos no contaminantes por la acción de microorganismos (Sánchez y Rodríguez, 2003), al ser utilizada como sustrato para producir biopolímeros como PHA o EPS (Segura *et al.*, 2007). Los polihidroxialcanoatos son sintetizados en forma de gránulos intracitoplasmáticos de biopolímeros por algunas bacterias al encontrarse sometidas a condiciones ambientales como exceso en la fuente de carbono y carencia de nutrientes como nitrógeno o fósforo entre otros. La producción de PHA de origen microbiano surge como una alternativa para la reducción del uso de algunos tipos de materiales plásticos obtenidos de fuentes no renovables como el petróleo, que por tratarse de polímeros sintéticos no son fácilmente degradables (Anjum *et al.*, 2016; Ali Raza, Abid & Banat, 2018).

Las sustancias poliméricas extracelulares microbianas (EPS) son el grupo de materiales poliméricos renovables y más significativas. La diversidad química y estructural

de los EPS les confiere funciones diversificadas en varios campos, como ecología microbiana, medicina, industria láctea, biopelículas, industria agrícola, cosmética, productos farmacéuticos, etc., que representan su importancia biotecnológica (Andhare *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la gran variedad de compuestos presentes en los efluentes industriales y la capacidad que tienen los microorganismos de utilizarlos como fuente de carbono y energía para producir biopolímeros, se hace necesario el estudio de la población microbiana nativa del efluente de manera que se realice a futuro un aprovechamiento de las características bioquímicas y metabólicas de dichos microorganismos procedentes de efluentes del sector industrial de Manizales, donde aproximadamente cuarenta empresas de la zona industrial Maltería; vierten sus aguas industriales residuales a la quebrada Manizales que, a su vez, entrega sus caudales al río Chinchiná, por lo que sus aguas contaminadas afectan también a otros municipios, como Villamaría y Chinchiná (Botero M., 2015). Para esto es necesario el aislamiento y caracterización de microorganismos propios de dichos efluentes que sean de potencial uso para la biorremediación y otras aplicaciones biotecnológicas, lográndose la conversión de contaminantes en productos de valor agregado como los biopolímeros.

MATERIALES Y MÉTODOS

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS EFLUENTES INDUSTRIALES

Se utilizaron efluentes industriales de empresas de la ciudad de Manizales pertenecientes a los sectores de: Educación, Metalmecánico, Confitería y Lácteo, ubicados en la ciudad de Manizales, Caldas. Realizando mediciones de parámetros como pH, temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, sólidos disueltos y salinidad directamente en cada uno de los efluentes empleando una sonda multiparámetro de análisis físico químico WTW Multi 3430.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS

Muestreo: Se realizó el muestreo de los efluentes industriales, de acuerdo con el British Columbia Field Sampling Manual (2013), tomando una muestra compuesta de 100 mL en un frasco de vidrio estéril por duplicado; el cual fue transportado en una nevera de icopor al laboratorio de Biotecnología del Tecnoparque SENA nodo Manizales, para su procesamiento.

Aislamiento de bacterias productoras de EPS: La siembra de las muestras obtenidas de los efluentes industriales se llevó a cabo según la metodología descrita por

(Ricciardi *et al.*, 1997; Ruas-Madiedo y De los Reyes-Gavilán, 2005), con algunas modificaciones, realizando diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-10} , utilizando diluciones pares y realizando siembra por duplicado.

La siembra se hizo por superficie utilizando 0,1 mL de cada dilución y adicionándola sobre la superficie de placas con agar infusión cerebro corazón (BHI) suplementado con 0,08% (w/v) de rojo congo y 3,6% (w/v) de sacarosa, la muestra se homogenizó con perlas de vidrio estériles, las siembras se incubaron a 37°C durante 72 horas, realizando seguimiento al crecimiento cada 24 horas para evidenciar la presencia de colonias negras u oscuras sobre el medio de cultivo (Freeman *et al.*, 1989). Después de un crecimiento de 72 horas, se procedió a purificar los aislamientos que evidenciaron presencia de colonias negras, realizando siembra por agotamiento sobre Plate Count Agar (PCA). Estos crecimientos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. La conservación de los aislados se realizó en glicerol al 10% a temperaturas de -20 y -80°C (García & Uruburu, 2000; Hernández *et al.*, 2003).

Aislamiento de bacterias productoras de PHA: Las muestras de los efluentes se sembraron por superficie; adicionando 0,1 mL de cada una de las diluciones pares de cada efluente en Agar PCA suplementado con rojo nilo al 0,1% (w/v), incubándose a 37°C. Se realizaron las lecturas bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 362 nm de las colonias que presentaran fluorescencia rosada (Ostle y Holt, 1982; Spiekermann, 1999), a las 24, 48 y 72 horas (Fernández *et al.*, 2006); cada colonia considerada como positiva se purificó en PCA. La conservación de los aislados se realizó en glicerol al 10% a temperaturas de -20 y -80°C (García & Uruburu, 2000; Hernández *et al.*, 2003).

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS ESPECIES DE BACTERIAS AISLADAS

Caracterización macroscópica de los aislamientos: Las bacterias aisladas se caracterizaron morfológicamente teniendo en cuenta 9 aspectos: forma, margen, elevación, superficie, textura o consistencia, propiedad óptica, tamaño, conformación y color (Villota-Calvachi & Otero-Ramírez, 2009).

Caracterización microscópica de los aislamientos: Los aislamientos fueron caracterizados microscópicamente utilizando la tinción de Gram describiendo la forma presentada por cada uno, para las bacterias productoras de EPS se realizó tinción Negativa para evidenciar la presencia de cápsula (Koneman *et al.*, 2008), y en el caso de las bacterias productoras de PHA se realizó la tinción

con Sudan Negro al 0,1% (Pandolfi *et al.*, 2007) para la detección de gránulos intracelulares.

Caracterización bioquímica de los aislamientos: La caracterización bioquímica de los aislamientos seleccionados se realizó de acuerdo a lo descrito por Koneman *et al.*, en 2008; llevándose a cabo 21 pruebas para los microorganismos obtenidos de los efluentes industriales. Dichas pruebas fueron: catalasa, oxidasa, rojo de metilo, Voges-Proskauer, fermentación de 12 azúcares, triple azúcar hierro (TSI), medio sulfuro indol motilidad (SIM), urea, agar hierro lisina (LIA) y citrato de Simmons.

SIMILARIDAD DE BACTERIAS AISLADAS DE EFLUENTES INDUSTRIALES PRODUCTORES DE PHA Y EPS BASADOS EN CARACTERES MICROSCÓPICOS, MACROSCÓPICOS Y BIOQUÍMICOS

Con los resultados de las pruebas microscópicas, macroscópicas y bioquímicas obtenidos, se elaboró una matriz mediante métodos numéricos, de acuerdo a Presencia (1) / Ausencia (0). Esta matriz se analizó por medio del paquete estadístico PAST 2.17 el cual realiza una comparación de diversas características, cada una recibe el mismo valor; realizado el análisis de caracteres se calcula para cada par de organismos del grupo un coeficiente de asociación, que es la función que determina la concordancia de estos caracteres que presentan esos organismos, de forma que cada uno se compara con todos los demás de la matriz.

En este estudio utilizamos el coeficiente de Jaccard (Sj), en él, se ignoran todos aquellos caracteres ausentes en los organismos. Ambos coeficientes aumentan linealmente de valor desde 0 (no hay concordancia) a 1 (100% de concordancia). Los organismos con mayor semejanza se agrupan y se encuentran separados de organismos no semejantes, todos estos datos se verán reflejados en dendrogramas para visualizar los agrupamientos de los 104 aislados y la relación entre sí, tomando como referencia porcentajes mayores de 85% para un nivel de similaridad alta.

Adicionalmente se realizó una matriz con bacterias referentes de PHA y EPS para elegir algunas bacterias a las cuales se aplicó una batería de pruebas en sistemas miniaturizados API® 20E, API® 20NE y API® 50CH para una identificación más confiable.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS

Se realizó la recuperación de los aislamientos a partir de los viales criopreservados para lo cual se activó el cultivo mediante un choque térmico a 37°C, con posterior

siembra en superficie sobre agar nutritivo (Oxoid, EUA). Se tomó una colonia de cada placa, y se transfirió a 5 ml de caldo nutritivo, el cual se incubó a 37°C y 150 rpm hasta alcanzar un factor de densidad óptica entre 0.9 y 1.0. Para la recuperación de la biomasa, se centrifugó el cultivo en medio líquido durante 10 minutos a 2500 rpm. Se llevó la biomasa resultante a una concentración aproximada de 10⁹ células/mL. La extracción y purificación de ADN genómico se realizó mediante el Kit Pure-Link® Genomic DNA (Invitrogen, EUA), recomendado para la lisis de bacterias.

La identificación molecular de los aislamientos se realizó mediante la amplificación del Gen 16s rRNA a partir del ADN genómico previamente extraído por PCR. Para ello se utilizaron los cebadores universales RB (5'- AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3') y RM (5'- GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC C-3'), con el fin de amplificar un fragmento de aproximadamente 800 pb utilizando el termociclador MS mini (Bio-Rad®, EUA). Una vez amplificado el ADN de la región 16S de cada aislamiento se realizó la secuenciación de los productos de PCR en la compañía Macrogen® (Corea del Sur). A las secuencias obtenidas se les realizó un análisis de calidad usando el programa CLC® Main Workbench (Qiagen Company, EUA). Se desarrolló la anotación de las secuencias usando el programa BLASTN ver. 2.2.27+ contra la base de datos nt del NCBI. Estos resultados fueron filtrados con el 80% de similitud y 80% de cobertura de la región que estaba amplificando con los primers descritos en el numeral anterior. Una vez obtenidas las descripciones por BLAST se procedió a construir la base de datos para los alineamientos de acuerdo con los taxones que cumplieron con las características para ser considerados como un acierto (hit). Para el alineamiento se usó el software Clustal W ver. 2.1 y el resultado se usó como entrada (input) al programa de análisis filogenético Mega 5 ver. 5.2.2, utilizando el método de Neighbor-Joining, con base en las distancias medias, asumiendo una tasa de

mutación uniforme; la topología del árbol se evaluó utilizando bootstrap con 10000 submuestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS EFLUENTES INDUSTRIALES

Los parámetros físico químicos obtenidos de los efluentes industriales son muy variables entre sí, ya que cada industria genera diferentes residuos aportando una determinada contaminación al efluente por lo tanto, las bacterias nativas de estos efluentes pueden desarrollarse en ambientes y bajo condiciones muy diferentes, utilizando dichas características para su crecimiento y reproducción (Tabla 1) (Corton & Viale, 2006). De acuerdo con Tortora *et al.*, (2013), las bacterias, en general, se desarrollan con mayor facilidad a un pH próximo a la neutralidad o ligeramente alcalino, pero la mayoría toleran un pH que se encuentre entre 5 y 9; para el caso específico de bacterias productoras de EPS su rango óptimo esta entre 6 y 8 de acuerdo con Torres *et al.*, (2012) y entre 5.5 y 9.5 para productoras de PHA (Saharan, Grewal & Kumar, 2014).

Los efluentes industriales analizados difieren en sus temperaturas, a pesar de esto se puede inferir que el rango de temperatura presentado es adecuado para el desarrollo de microorganismos mesófilos, ya que estos microorganismos tienen un límite mínimo de crecimiento de 10° C, una temperatura óptima de crecimiento de 37°C y un límite máximo de crecimiento de 40°C, por lo cual se encuentran abundantemente en la naturaleza (Tortora *et al.*, 2013).

Generalmente la materia disuelta está constituida por materia orgánica e inorgánica presente en el efluente, la cual constituye la principal fuente de energía y de carbono necesaria para el crecimiento de los microorganismos (principalmente bacterias), otro parámetro de gran importancia es el oxígeno disuelto ya que facilita la

Tabla 1. Datos físico-químicos de los efluentes industriales.

EFLUENTE INDUSTRIAL	PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS					
	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (µS/cm)	Oxígeno disuelto (mg/L O ₂)	Sólidos disueltos (mg/L)	Salinidad (%)
SECTOR METALMECANICO	9,129	30	6,7	2,82	6760	3,7
SECTOR CONFITERIA	6,272	34,7	421	2,25	420	0,1
SECTOR EDUCACION	6,902	16,7	1479	0,02	1477	0,7
SECTOR LACTEO	7,661	24,4	543	6,08	543	0,2

Tabla 2. Número de bacterias aisladas de los efluentes industriales productora de EPS y PHA.

EMPRESA	NUMERO DE AISLAMIENTOS EPS	NUMERO DE AISLAMIENTOS PHA
Sector Educativo	19	28
Sector Metalmecánico	21	15
Sector Confitería	18	24
Sector Lácteos	15	34
TOTAL	73	101

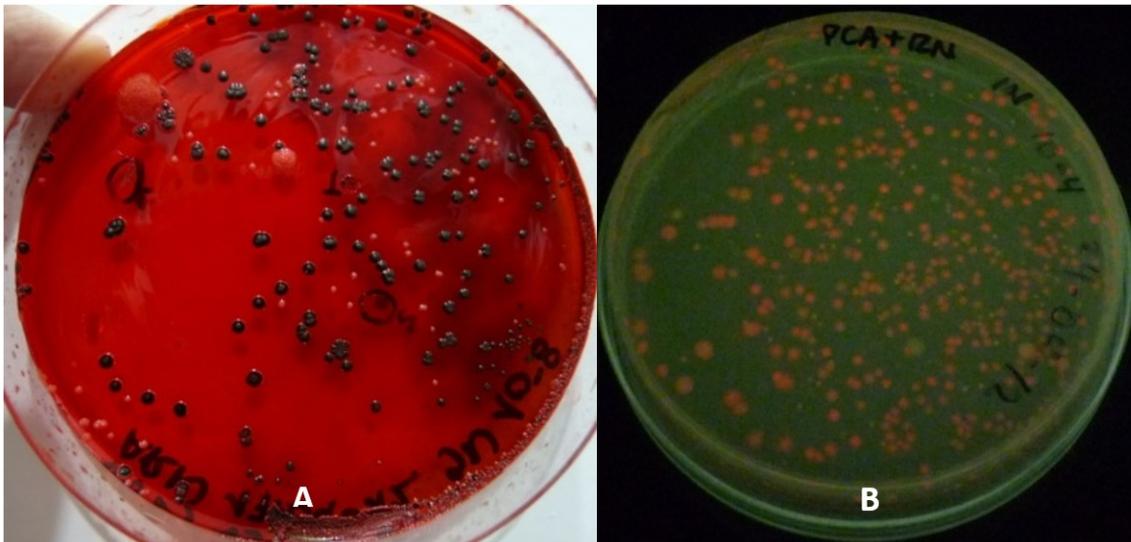


Figura 1. Crecimiento inicial de colonias aisladas de efluentes industriales sobre agar BHI suplementado con rojo Congo y sacarosa (A) y PCA suplementado con Rojo Nilo (B).

realización de procesos bioquímicos con los cuales las bacterias logran la degradación de la materia orgánica presente en el efluente industrial (Rodríguez *et al.*, 2006), en los efluentes hay presencia de oxígeno disuelto lo que indica que los microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios facultativos.

La conductividad expresa la capacidad que presenta el agua de transportar una corriente eléctrica y está directamente relacionada con la concentración de iones, por lo cual; es una forma de medir indirectamente la salinidad del agua. En el efluente del sector metalmecánico la conductividad es muy baja y la salinidad es alta, en comparación con los datos obtenidos de los demás efluentes (Tortora *et al.*, 2013).

La concentración de iones (sales) en los efluentes, es un parámetro de gran importancia para el desarrollo bacteriano. Un contenido de sal por encima del 2% inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias (Tortora *et al.*, 2013). Al analizar los datos tomados se puede notar que en los efluentes industriales de las empresa del sector

educativo, confitería y lácteos la concentración de sal es menor al 2%, por lo cual no se ve afectado el desarrollo microbiano; el efluente de la empresa perteneciente al sector metalmecánico presentó mayor salinidad en comparación con los demás efluentes, lo cual indica que los microorganismos nativos de este efluente son halófilos facultativos los cuales pueden crecer en concentraciones de sal hasta del 15%.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS

Aislamiento de bacterias productoras de EPS: Se evidenció el crecimiento de gran variedad de colonias (negras, blancas, rojas, rosadas), pero únicamente se aislaron y purificaron las colonias negras, de acuerdo con la metodología descrita por Freeman *et al.*, (1989). En total se aislaron 73 morfotipos diferente productores de EPS. (Tabla 2).

El uso del colorante rojo congo en una concentración del 0,08% (w/v) permitió evidenciar colonias de color

Tabla 3. Caracterización microscópica de los aislados productores de EPS y PHA.

EMPRESA	TINCION DE GRAM (EPS)	TINCION NEGATIVA (EPS)	TINCION DE GRAM (PHA)
Sector Educativo	Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos Bacilos cortos Gram negativos	Positiva	Cocos Gram positivos Cocos Gram negativos Bacilos Gram negativos Bacilos cortos Gram negativos Bacilos largos Gram positivos Bacilos cortos Gram positivos
Sector Metalmecánico	Bacilos largo Gram positivos Bacilos cortos Gram negativos Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos		Bacilos cortos Gram negativos Bacilos Gram negativos
Sector Confeitería	Bacilos cortos Gram negativos Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos Bacilos cortos Gram positivos		Cocos Gram positivos Bacilos cortos Gram negativos Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos
Sector Lácteos	Cocos Gram positivos en racimo Bacilos cortos Gram negativos Bacilos cortos Gram positivos Cocos Gram positivos Cocos Gram negativos Bacilos largos Gram negativos		Bacilos cortos Gram negativos Cocos Gram negativos

negro (Figura 1), pero de acuerdo con lo descrito por Pérez-Ordoyo., (2010) un aumento en la concentración del colorante rojo congo puede intensificar el color en las colonias productoras de EPS y las cepas no productoras conservarán su color inicial, por lo tanto el colorante rojo congo se puede utilizar hasta una concentración de 0,12% (w/v).

Según Freeman *et al.*, (1989), el uso de suplementos de azúcar como glucosa o sacarosa es esencial para la detección de bacterias productoras de exopolisacáridos utilizando el método del rojo congo, Lancheros, (2001), encontró que el uso de la sacarosa en concentraciones de 10g/L y mayores promueven la producción de EPS, lo que indica que la concentración de 36g/L utilizada fue adecuada y permitió a las bacterias la correcta utilización de la sacarosa en la producción del biopolímero extracelular.

Aislamiento de bacterias productoras de PHA: Se aislaron en total 101 colonias de bacterias procedentes de los efluentes industriales (Tabla 2), que presentaron fluorescencia rosada en un tiempo comprendido entre 24 y 72 horas (Figura 1).

El medio de cultivo utilizado para realizar el aislamiento, suplementado con el colorante lipofílico rojo nilo permitió aislar y diferenciar las bacterias posiblemente

productoras de PHA de aquellas que no poseen esta característica, ya que las colonias acumuladoras de este tipo de biopolímero emiten fluorescencia al ser observadas en una lámpara de U.V por la combinación del colorante con material lipídico del gránulo intracitoplasmático de PHA (Bello y Brandl , 2007) el cual se encuentra rodeado por una monocapa fosfolipídica (González G *et al.*, 2013). El aislamiento de estas bacterias mediante la técnica con el colorante rojo nilo fue una prueba cualitativa, realizada de manera fácil y permitió obtener resultados rápidos.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Caracterización macroscópica de los aislamientos productores de EPS y PHA: Se realizó la caracterización macroscópica a los 174 aislamientos obtenidos, pero teniendo en cuenta la similitud presentada por los aislamientos se seleccionaron 10 (entre productores de PHA y EPS) de cada empresa para las fases siguientes del estudio.

Al realizar la descripción de la morfología macroscópica presentada por las colonias aisladas de los efluentes industriales se puede notar que las colonias obtenidas de los cuatro efluentes industriales presentan diferencias en cuanto a este aspecto, lo cual es indicativo de la gran diversidad microbiana, presente, con capacidad para la

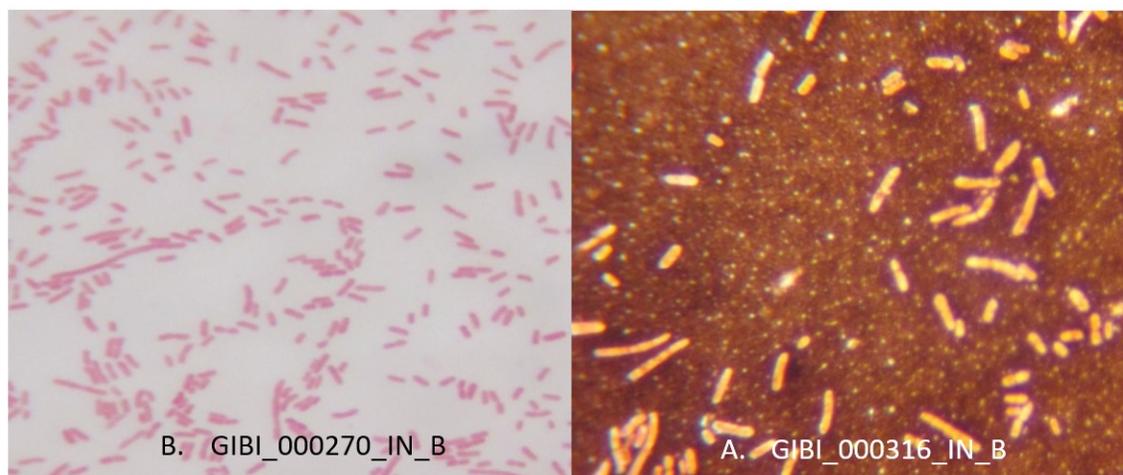


Figura 2. Características microscópicas de aislados productores de EPS A. Tinción de Gram B. Tinción negativa.

producción de estos biopolímeros. Según Rodríguez *et al.* (2006), los efluentes industriales son una buena fuente para el desarrollo de microorganismos debido a la capacidad metabólica de los mismos para utilizar y eliminar diversas sustancias y componentes presentes en ellos. Estas características aportan información para la posterior identificación y taxonomía del grupo de bacterias al que pertenecen. Las características de mayor predominancia entre los microorganismos productores de EPS y PHA, fueron en cuanto a Forma: circular, Margen: entero, Elevación: elevada, Superficie: lisa, Textura: cremosa, Propiedad óptica: brillante, Configuración: redonda y Color: beige.

Caracterización microscópica de los aislamientos productores de EPS y PHA: El resultado de la descripción microscópica general realizada a las 40 bacterias fue la presencia de Bacilos Gram negativos, Bacilos Gram positivos, Cocos Gram positivos y Cocos Gram negativos (Tabla 3, Figura 2), lo que refleja que una gran variedad de microorganismos tiene la capacidad de producción de biopolímeros. Observando las bacterias productoras de EPS y de acuerdo con lo descrito por Malaka R., (2021) y Ventorino *et al.*, (2019), tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas pueden producir exopolisacáridos.

En general, en los efluentes industriales hubo mayor presencia de Bacilos Gram negativos que de acuerdo con Ruas-Madiedo y De los Reyes-Gavilan, (2005), en la industria de alimentos tienen gran utilidad algunos exopolisacáridos producidos por bacterias Gram negativas como *Xanthomonas campestris* y *Acetobacter xylinum* las cuales son bacilos que producen xantano y acetano respectivamente, biopolímeros utilizados para modificar las propiedades reológicas en algunos productos.

En los efluentes de las industrias perteneciente a los sectores metalmeccánico y confitería los bacilos Gram negativos están en mayor proporción (Figura 3), a pesar de esto se debe notar que en el efluente de la industria del sector lácteo hay presencia de bacilos y cocos tanto Gram negativos como Gram positivos, lo que convierte a este efluente en una buena fuente de microorganismos productores de varios tipos de exopolisacáridos.

Con respecto a las bacterias productoras de PHA; los aislamientos de los efluentes de las empresas pertenecientes a los cuatro sectores son en su mayoría bacilos Gram negativos (Tabla 4), lo cual indica que estos efluentes contienen las condiciones adecuadas para el desarrollo de estos microorganismos con potencial para la producción de PHA (Díaz, 2012). Algunas bacterias Gram negativas productoras de PHA son *Pseudomonas aeruginosa* (Serrano R., 2010), *Azospirillum brasilense* (Martínez *et al.*, 2004) y *Azotobacter vinelandii* (Carminatti *et al.*, 2006). La presencia en los efluentes de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas indican la capacidad que poseen ambos grupos microbianos de sintetizar gránulos de PHA (Segura *et al.*, 2007; Carminatti *et al.*, 2006). En los efluentes de las empresas del sector educativo y confitería se observó mayor diversidad morfológica, en comparación con las empresas de los otros dos sectores.

Al realizar tinción negativa se observó la presencia de cápsula en la totalidad de los aislamientos lo cual según Franco R., (2004), pone de manifiesto la producción de exopolisacáridos capsulares unidos a la pared celular.

Caracterización bioquímica de los aislamientos productores de EPS y PHA: Las pruebas bioquímicas se realizaron a los microorganismos procedentes de 2 de

Tabla 4. Morfología bacteriana productora de EPS Y PHA predominante por efluente industrial.

INDUSTRIA	BIOPOLIMERO	MORFOLOGIA BACTERIANA			
		BACILOS GRAM(-)	BACILOS GRAM (+)	COCOS GRAM (-)	COCOS GRAM (+)
		% AISLAMIENTOS			
SECTOR METALMECANICO	EPS	70	20	10	0
	PHA	0	100	0	0
SECTOR CONFITERIA	EPS	70	30	0	0
	PHA	20	60	20	0
SECTOR EDUCACION	EPS	10	60	0	30
	PHA	40	40	10	10
SECTOR LACTEO	EPS	40	30	10	20
	PHA	0	7	0	30

Tabla 5. Pruebas de Catalasa y Oxidasa para los aislamientos productores de EPS y PHA.

INDUSTRIA	BIOPOLIMERO	CATALASA	OXIDASA
		% aislados positivos	
SECTOR METALMECANICO	EPS	66,7	0
	PHA	16,6	100
SECTOR CONFITERIA	EPS	71,43	0
	PHA	100	11,1

los 4 efluentes industriales (metalmecánico y confitería) utilizados en este estudio, por interés propio de la investigación.

El 66,7% de los productores de EPS y el 16,6% de las bacterias productoras de PHA correspondientes al efluente del sector metalmecánico; así como el 71,43% y el 100% de los aislamientos productores de EPS y PHA respectivamente, del efluente del sector confitería fueron catalasa positiva (Tabla 5) (Marrero C., 2006; Koneman *et al.*, 2008).

Todos los microorganismos productores de EPS, pertenecientes a los dos sectores anteriormente mencionados fueron oxidasa negativa, por lo tanto dichos aislamientos pueden ser anaerobios facultativos, ya que para su desarrollo no necesitan el oxígeno, pero si esta presente lo utilizan para su metabolismo (Montoya V, 2008). Algunos bacilos Gram negativos como los miembros de las familias Enterobacteriaceae, especies de *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas maltophilia*, no producen la enzima oxidasa (Forbes, 2009). Contrario a los aislamientos productores de PHA donde el 100% provenientes del sector metalmecánico

y un 11,1% del sector confitería presentan la enzima citocromo que actúa en la respiración aeróbica; dando resultados positivos a esta prueba (Tabla 5) (Marrero C., 2006; Koneman *et al.*, 2008).

En los efluentes industriales hay presencia de materia orgánica la cual es degradada por los microorganismos utilizando para ello el oxígeno disuelto presente en el agua, este proceso de biodegradación de materia orgánica favorece el crecimiento microbiano lo cual genera agotamiento del oxígeno y lo limita en el efluente, estos bajos niveles de oxígeno disuelto inhiben el desarrollo de microorganismos oxidasa positivos y se promueve el crecimiento de anaerobios facultativos (Rodríguez *et al.*, 2006).

Las Enterobacterias tienen la capacidad de fermentar la glucosa mediante la vía ácido mixta o la vía 2,3 butanodiolica, produciendo variedad de compuestos tras los procesos de fermentación, estos compuestos pueden ser ácidos orgánicos, alcoholes y gases como dióxido de carbono e hidrógeno lo cual depende del tipo de microorganismo, del sustrato utilizado por cada uno de

Tabla 6. Pruebas bioquímicas basadas en metabolismo glucosídico de bacterias productoras de EPS y PHA.

INDUSTRIA	BIOPOLIMERO	PRUEBA BIOQUIMICA						
		MR	VP	SAC	GLU	MALT	ARAB	GAL
		% aislados positivos						
SECTOR METALMECANICO	EPS	55,5	0	77,7	100	11,1		
	PHA	0	0	16,6	0			
SECTOR CONFITERIA	EPS	85,7	14,3	100		57,1		
	PHA	88,8	22,2	44,4	66,6		55,5	66,6
INDUSTRIA	BIOPOLIMERO	PRUEBA BIOQUIMICA						
		FRUC	MAN	LACT	XIL	MANI	RAMN	RIB
		% aislados positivos						
SECTOR METALMECANICO	EPS	11,1		0	11,1			
	PHA	0						
SECTOR CONFITERIA	EPS	71,4		57,1		71,4	57,1	71,4
	PHA	44,4	55,5	33,3	22,2	44,4	22,2	33,3

ellos y de las enzimas que estén presentes (Rodríguez *et al.*, 2006).

El resultado positivo en la prueba de Rojo de Metilo indica que el 55,5% de aislados procedentes del sector metalmeccánico y el 85,7% procedentes del sector confitería, son productores de EPS; así como el 88,8% de aislados productores de PHA provenientes del mismo sector (confitería), tienen la capacidad de utilizar la vía ácido mixta para fermentar la glucosa y generar como productos finales de la fermentación grandes cantidades de ácidos orgánicos fuertes como (láctico, fórmico, acético) (Tabla 6), (Marrero, 2006; Koneman *et al.*, 2008). Esta alta producción de ácidos contribuye a bajar el pH lo cual fue evidenciado con el valor obtenido en el efluente de esta empresa el cual registro un pH 6.2. El 100% de las bacterias aisladas del efluente metalmeccánico fueron negativas para la prueba de rojo de metilo indicando que pueden generar ácidos débiles, pero debido a su baja concentración de hidrogeniones (H⁺) su tendencia va a ser a la neutralidad (Bailón *et al.*, 2004).

Solo el 14,3% de los microorganismos del sector confitería, productores de EPS, fue positivo en la prueba Voges-Proskauer, lo cual pone de manifiesto la capacidad de este aislamiento de fermentar la glucosa usando la vía 2,3 butanodiólica mediante la cual se produce la acetoína que es un precursor en la producción del 2,3 butanodiol (Allaer, 2003). El 100% de los aislamientos del efluente metalmeccánico y el 77,7% de los aislamientos del sector confitería, productores de PHA, fueron negativos para esta prueba. La alta proporción de aislamientos negativos para esta prueba indica que los microorganismos no tienen la capa-

acidad de producir alcoholes al fermentar la glucosa, pues no se genera acetoína la cual se acumula cuando los microorganismos crecen en aerobiosis y en los efluentes industriales los niveles de oxígeno disuelto promueven el desarrollo de anaerobios facultativos (MacFaddin, 2003; Koneman *et al.*, 2008).

En referencia a la utilización de carbohidratos como fuente de carbono y energía, el 100% de los microorganismos aislados del efluente industrial del sector metalmeccánico tienen la capacidad de degradar el monosacárido glucosa, el 77,7% son fermentadores de sacarosa y el 11,1% fermentan los demás carbohidratos evaluados excepto la lactosa que no es metabolizada por ninguno de los aislamientos provenientes de este efluente, esto en lo que tiene que ver con los aislados productores de EPS. Para este mismo sector el 83,33% de los aislamientos de origen metalmeccánico, productores de PHA, no fermentaron ningún tipo de azúcar, esto demuestra que probablemente la única fuente de carbono y energía para dichas bacterias proviene de la capacidad de utilizar el citrato. El 16,66% fermentó solamente la sacarosa, lo que evidencia que este efluente puede presentar un bajo contenido de carbohidratos, dado que la mayoría de bacterias aisladas no asimilaron ningún tipo de azúcar.

Los microorganismos procedentes del efluente del sector confitería que producen EPS, varían mucho en cuanto a la utilización de los diversos azúcares, pero de manera general todos los aislamientos tienen capacidad de utilizar sacarosa y glucosa, el 71,4% pueden utilizar a parte de glucosa y sacarosa, fructosa, manosa, manitol o ribosa y el 57, 1% pueden metabolizar el resto de azu-

Tabla 7. Pruebas basadas en metabolismo proteico de bacterias productoras de EPS y PHA.

INDUSTRIA	BIOPOLIMERO	PRUEBA BIOQUIMICA					
		MOTILIDAD	H ₂ S	INDOL	UREA	DESCARB. LISINA	DESAM. LISINA
		% aislados positivos					
SECTOR METALMECANICO	EPS	66,6	11,1		22,2	88,8	11,1
	PHA	16,6	0			83,3	16,6
SECTOR CONFITERIA	EPS	71,4	14,3	0	57,1	71,4	28,6
	PHA	44,4	33,3	0	66,6	77,7	11,1

cares evaluados. Las bacterias productoras de PHA aisladas del mismo efluente asimilaron y fermentaron en un 66.7% glucosa, maltosa y galactosa; 55.5% arabinosa y manosa; 44.4% sacarosa, fructosa y manitol; 33.3% lactosa y ribosa; 22.2% xilosa y ramnosa. Este hecho evidencia que estos aislamientos tienen una amplia capacidad de degradar y metabolizar diversos mono y disacáridos, debido a que son nativos de un efluente rico en azúcares y compuestos orgánicos, los cuales son degradados para ser utilizados como fuentes de carbono y energía (Koneman *et al.*, 2008).

Según Marrero, (2006), la movilidad es de gran importancia en la identificación de microorganismos y al analizar esta característica se observa que los aislamientos productores de EPS, procedentes del sector metalmeccánico son móviles en un 66,7% así como el 71,4% de los aislamientos del sector confitería (Tabla 7). Para los aislados productores de PHA; el 44,4% de las bacterias aisladas del sector confitería y el 16,6% de las bacterias del sector metalmeccánico presentaron movilidad, esto muestra que dichas bacterias pueden presentar flagelos o cilios que permiten su locomoción (MacFaddin, 2003).

Los aislamientos GIBI_000271_IN_B del efluente metalmeccánico y GIBI_000292_IN_B del efluente de confitería, productores de EPS, fueron positivos para la producción de H₂S el cual produce un precipitado negro de sulfuro de hierro. La producción de H₂S se lleva a cabo en un ambiente ácido y en los efluentes analizados los valores de pH tienden a la neutralidad o son alcalinos lo que inhibe la capacidad bacteriana de producirlo (Marrero, 2006; Koneman *et al.*, 2008). La producción de H₂S fue negativa en un 100% y 66.66% para las bacterias aisladas de los efluentes metalmeccánico y confitería respectivamente productoras de PHA, lo que indica que estos microorganismos no presentan la enzima requerida para liberar azufre de los aminoácidos que lo contienen para producir H₂S; esta reacción debe llevarse a cabo en un medio ácido (MacFaddin, 2003) lo cual

para el primer efluente podría ser posible ya que registro un valor de pH básico de 9.1.

De acuerdo con Koneman *et al.*, (2008) y Forbes (2009), para la producción de indol es necesario que las bacterias cuenten con la enzima triptofanasa para hidrolizar y desaminar el triptófano produciendo indol, ácido pirúvico y amoniaco lo cual evidencia la capacidad de los microorganismos de degradar y metabolizar proteínas y sólo el aislamiento GIBI_000271_IN_B, productor de EPS, perteneciente al efluente metalmeccánico presentó resultado positivo para esta prueba.

Según lo descrito por Marrero, (2006), la hidrólisis de la urea es llevada a cabo por los microorganismos que poseen la enzima ureasa los cuales poseen la capacidad de degradar la urea produciendo amonio el cual es utilizado como fuente de Nitrógeno inorgánico, el amonio cambia el pH del medio alcalinizándolo, esto concuerda con el pH de 9,129 presentado por el efluente metalmeccánico, donde el 22,22% (2 aislamientos) de los microorganismos aislados poseen esta enzima; del efluente del sector confitería el 57,14% (4 aislamientos) la poseen, lo cual es un indicador de la capacidad que tienen estos aislamientos de utilizar el nitrógeno inorgánico obtenido de la urea para biosíntesis de aminoácidos y proteínas.

La enzima ureasa está presente en diversos microorganismos principalmente gram negativos como especies de *Proteus*, los cuales son degradadores rápidos de la urea (reacción positiva en 1 o 2 horas) y especies de *Klebsiella* que son degradadores lentos de la urea (reacción positiva en 3 días o más) y en microorganismos como *Enterobacter*, y *Helicobacter pylori* y en microorganismos gram positivos como *Corynebacterium urealyticum* (Marrero, 2006; Koneman *et al.*, 2008; Forbes, 2009). El 66,66% de los aislamientos del sector confitería y productores de PHA; presentan la enzima ureasa la cual posee la capacidad de hidrolizar la urea lo que produce que sean liberadas moléculas de amonio pu-

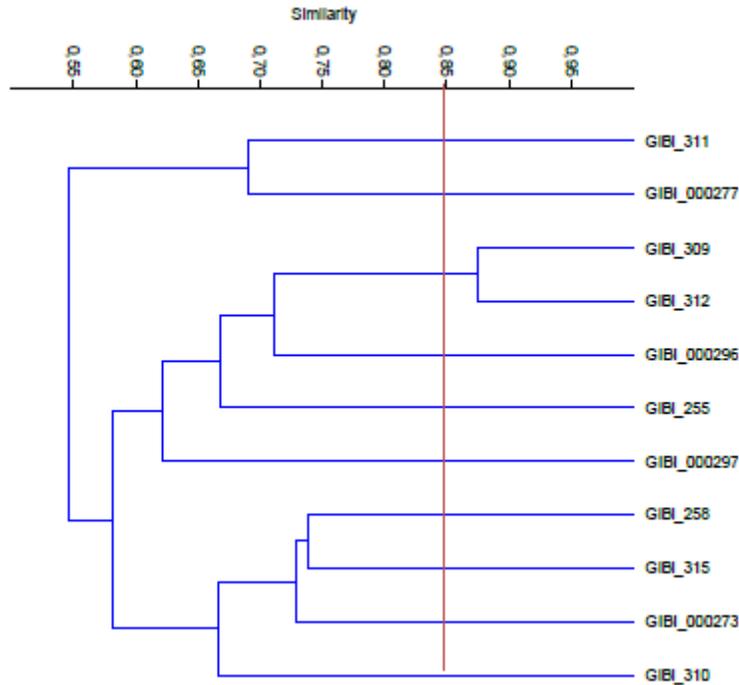


Figura 3. Dendrograma de bacterias Gram positivas productoras de EPS.

diendo ser utilizadas por las bacterias como fuente de nitrógeno. En lo referente a los aislamientos productores de EPS son positivos a esta reacción en un 22,2 y 57,1% correspondientes a los sectores metalmeccánico y confitería respectivamente.

El 88,88% de los aislamientos productores de EPS, procedentes del efluente metalmeccánico cuentan con la enzima Lisina descarboxilasa y proceden de un efluente con pH alcalino a causa de la amina cadaverina generada por el proceso de descarboxilación de la lisina la cual alcaliniza el medio. En los aislamientos del efluente de confitería el 71,4% cuentan con la presencia de la enzima. El proceso de la descarboxilación de la lisina indica capacidad enzimática para degradar proteínas en las cuales esté presente el aminoácido lisina que es utilizado como sustrato y como fuente de carbono fermentable la glucosa. El proceso de descarboxilación de la lisina se da en medio ácido por lo cual es necesario que se fermente previamente la glucosa (Koneman *et al.*, 2008). El 83,3% y 77,7% de las bacterias productoras de PHA, aisladas de los efluentes metalmeccánico y confitería respectivamente presentan dicha enzima.

El aislamiento GIBI_000272_IN_B, procedente de la empresa metalmeccánica y el 28,6% de los procedentes del sector confitería, productores de EPS, son los únicos que cuentan con la enzima desaminasa, con lo cual se evidencia la capacidad de estos aislados de degradar

enzimáticamente las proteínas y de utilizar el nitrógeno orgánico proveniente de aminoácidos como lisina y de acuerdo con Koneman *et al.*, (2008) bacterias Gram negativas del género *Providencia*, *Proteus* y algunas cepas de *Morganella* tienen la capacidad de desaminar dicho aminoácido. Un 16,66% (metalmeccánico) y 11,11% (confitería), productores de PHA, tienen la capacidad de desaminar la lisina produciendo el ión amonio (NH₄⁺) como producto secundario (Rodríguez *et al.*, 2005), pudiendo ser utilizado por las bacterias como una fuente de nitrógeno.

Solo 2 aislamientos del efluente metalmeccánico (22,22%) y 5 aislamientos del efluente confitería (71,42%), productores de EPS, poseen la capacidad de metabolizar el citrato de sodio y utilizarlo como fuente de energía para llevar a cabo procesos de biosíntesis (Koneman *et al.* 2008 ; Rodríguez *et al.*, 2006). Con respecto a los productores de PHA, las bacterias aisladas del efluente metalmeccánico fueron positivas en un 83,33% y las del sector confitería en un 66,66%.

SIMILARIDAD BASADA EN CARACTERES MICROSCÓPICOS, MACROSCÓPICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS AISLAMIENTOS PRODUCTORES DE PHA Y EPS

Mediante el análisis usando el coeficiente de Jaccard (Sj) se encontraron 10 morfotipos diferentes para bacterias productoras de EPS Gram positivas, 15 para Gram nega-

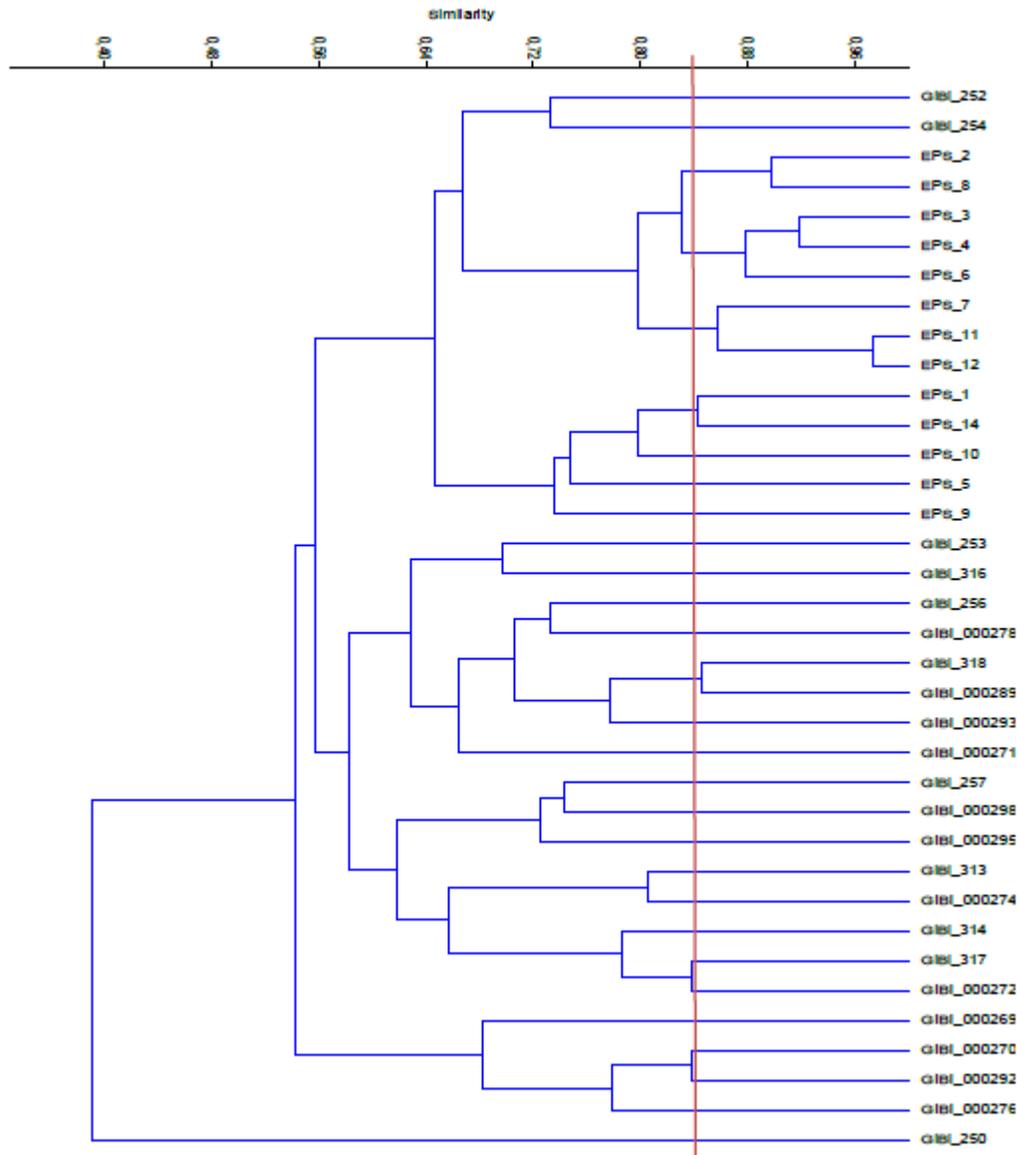


Figura 4. Dendrograma de bacterias Gram negativas productoras de EPS.

tivas, 10 morfotipos para productoras de PHA Gram positivas y 5 para Gram negativas, tomando un porcentaje de similitud de 85%.

En la figura 3 se aprecian 3 grupos representativos que comparten aproximadamente un 54% de similitud, con varios microorganismos cada uno. El primero constituido por microorganismos procedentes de los sectores lácteo y metalmeccánico (Gibi311- Gibi000277), el segundo por los sectores lácteo, confitería y educación (Gibi309- Gibi312- Gibi000296- Gibi255- Gibi000297) donde se observa que Gibi309 y Gibi312 tienen un porcentaje de similitud del 88% por lo que se consideran del mismo género; el tercer grupo con un 66% con aislados de los

sectores educación, lácteo y metalmeccánico (Gibi258- Gibi315- Gibi000273- Gibi310).

La figura 4 se destacan 5 grupos compartiendo un 39% de similitud con varios microorganismos cada uno, constituidos por las 5 empresas estudiadas, el primero muy emparentado con un 80% de similitud se puede considerar del mismo género, estimando EPS 11 y EPS 12 iguales con un 97% de similitud, los demás grupos representando un gran porcentaje de semejanza ya que se pueden valorar similitudes mayores al 85% y considerarse del mismo género estos morfotipos con relación a los caracteres microscópicos, macroscópicos y bioquímicos.

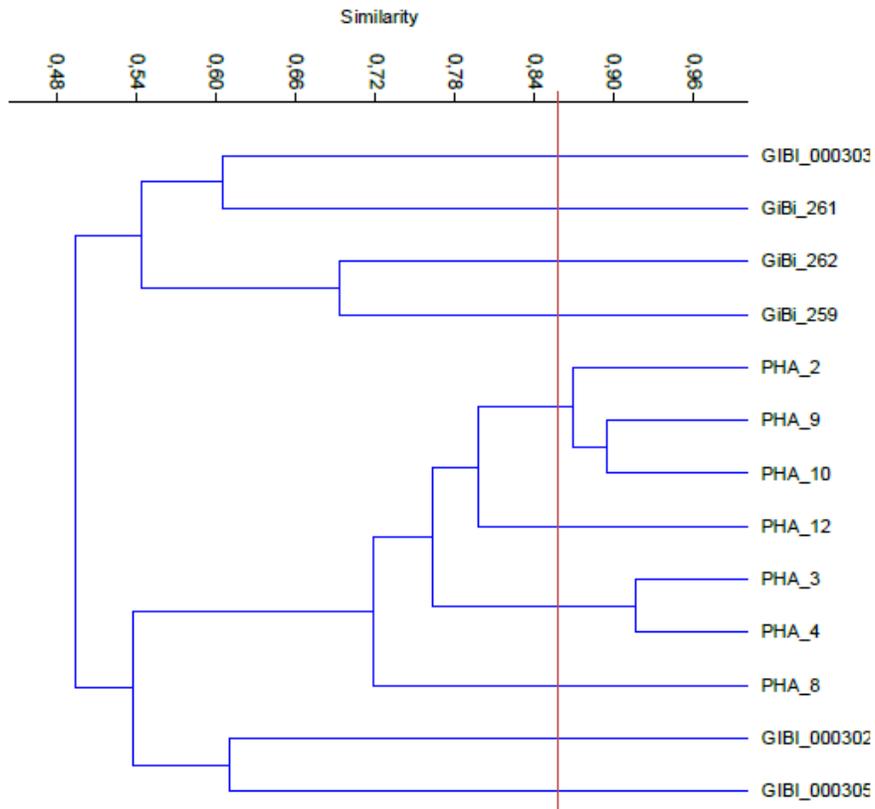


Figura 5. Dendrograma de bacterias Gram positivas productoras de PHA.

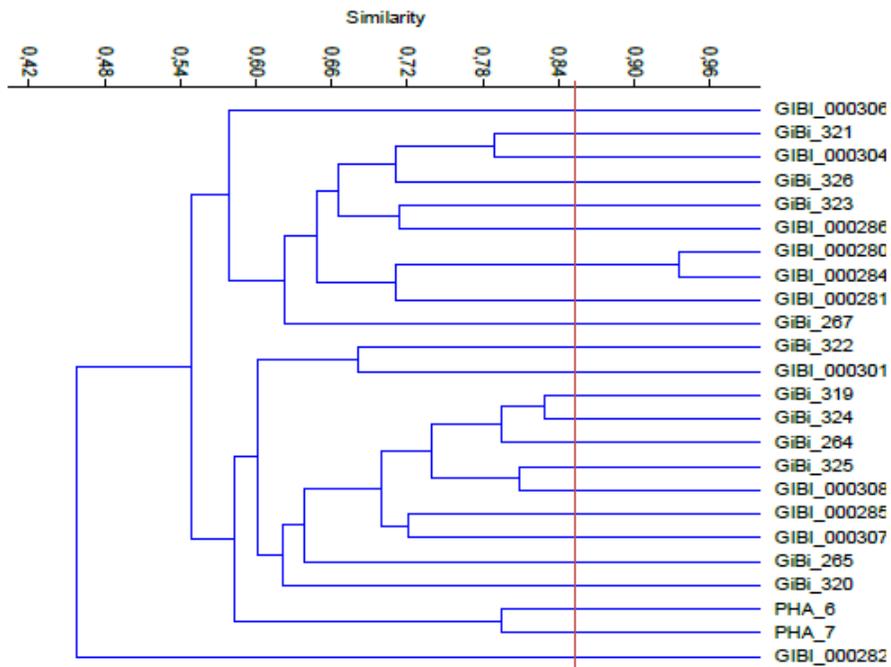


Figura 6. Dendrograma bacterias Gram negativas productoras de PHA.

En la figura 5 se observan 2 grupos representativos con un 49% de similitud conformados por los sectores confitería y educación, el segundo tiene cepas más emparentadas con un 72% con aislados pertenecientes al sector lácteo demostrando que PHA3-PHA4 y PHA9-PHA10 son los morfotipos con un alto porcentaje de similitud previendo ser la misma especie.

El índice de similitud que se evidencia en la Figura 6 es un 46%, presentando 2 grupos con varios microorganismos de cada uno de las empresas, el primero se observa con un porcentaje de similitud del 58% aproximadamente, con 2 morfotipos destacándose Gibi280 y Gibi284 con un 94% de similitud considerándose iguales, el segundo grupo con un porcentaje de 59% donde se destacan Gibi329 y Gibi324 con una similitud de 83% considerándose del mismo género.

Referentes bacterianos

Para el análisis de similitud también se adjuntaron referentes bacterianos a las matrices de resultados junto con los aislados de las empresas para relacionarlos y así seleccionar los microorganismos con mayor porcentaje de semejanza con los referentes y aplicarles las pruebas miniaturizadas API. Con los resultados de estas nuevas matrices se seleccionaron los siguientes aislados para realizar la batería de pruebas API 20E: EPS9, GIBI000295, GIBI320, GIBI000271, GIBI324, EPS4, GIBI000284, GIBI322, GIBI000298, EPS2, EPS11, GIBI000289, GIBI313, GIBI000272, GIBI000292, PHA7, GIBI000285, EPS1 se aplicó la batería de API 20NE para GIBI309, GIBI000296, GIBI315, GIBI000273, GIBI322, GIBI000284, GIBI000281, GIBI000285, GIBI314 y las API 50CH para GIBI000277, GIBI000273, GIBI315, GIBI000303, PHA8, PHA3, PHA10, GIBI000296. Los resultados obtenidos con las pruebas API se muestran en la Tabla 8.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS. Por costos se realizó la identificación molecular de trece de los 40 aislamientos, los cuales se seleccionaron de acuerdo a los morfotipos obtenidos y al origen del efluente de donde fue aislado. De estos se pudo identificar hasta género los trece microorganismos y hasta especie 11 de los mismos, teniendo en cuenta el parámetro de identificación de especie en procariotas con este gen, donde el valor umbral se ubica en una identidad del 98.65% (Kim, M., et al. 2014). Se obtuvo la identificación de 7 aislamientos pertenecientes a Enterobacterales, 5 a Lactobacillales y uno al orden Burkholderiales (Tabla 9).

Los resultados obtenidos se corroboran con diferentes investigaciones, es así como Arshad et al, en 2013, evaluaron 18 aislamientos obtenidos de ambientes contaminados y no contaminados para la producción de biopolímeros (PHA y EPS). Del total de cepas aisladas 9 presentaron la formación de gránulos dentro de las células, lo cual es indicativo de la producción de PHA; de estas cepas 4 dieron positivo para la producción de exopolisacáridos. Basados en pruebas bioquímicas determinaron que las cepas correspondían a los géneros *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Bacillus*. Así mismo Echavarría, Martínez y Montoya en 2013 utilizando subproductos lácteos y de caña de azúcar lograron identificar 38 cepas productoras de PHA, mediante identificación del gen *phaC*, representando 18 morfotipos bacterianos pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Pantoea* y *Gluconobacter*; coincidiendo con algunos de los géneros encontrados en este estudio.

Las bacterias ácido lácticas han demostrado gran potencial como productoras de sustancias poliméricas extracelulares, como lo demuestra Xu et al., en 2017; quienes fermentaron harina de haba con *Leuconostoc* spp, uno de los géneros identificados en el estudio, y *Weissella* spp. con y sin la adición de sacarosa para evaluar su potencial en la producción de EPS; encontrando que la cepa de *Leuconostoc* spp. DSM 20193 muestra un alto potencial en la producción del polímero y en la modificación de las propiedades reológicas de la pasta de habas.

Bruwal et al., en 2013 utilizando lodos y aguas residuales provenientes de las industrias de papel, celulosa y cartón; identificaron los aislados de *Enterococcus* sp. NAP11 y *Brevundimonas* sp. NAC1 como buenos candidatos para la producción industrial de polihidroxibutirato (PHB). En 2009 Mostafa, El-Mezawy y Heller identificaron una cepa de *Enterococcus faecium* como productora de exopolisacáridos aislada a partir de heces de infantes Egipcios; la cepa logor una producción máxima de 23g/L luego de 6 horas de fermentación en medio M17 suplementado con 1% de sacarosa.

El género *Burkholderia* comprende más de 60 especies capaces de adaptarse a un amplio rango de ambientes tales como suelo y agua; dentro de las propiedades de esta bacteria está la de producir varios tipos de sustancias poliméricas extracelulares; entre los que se encuentran el cepaciano, levano, PS-I, EPS A, EPS B entre otros (Ferreira et al., 2011). En 2007, Herasimenka et al.; determinaron la producción de EPS por 7 cepas del complejo *Burkholderia cepacea* (tres cepas de *B. multivorans*, tres de *B. cenocepacia* y una de un miembro Bcc de genovar

Tabla 8. Aislados identificados por pruebas API®.

BACTERIAS IDENTIFICADAS CON API	CEPA	PERFIL	%ID
<i>Burkholderia cepacia</i>	Gibi 309-122N	1467777	99.9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gibi 315-129N	7077747	97.9
<i>Pseudomonas luteola</i>	Gibi 322-150N	5527645	98.7
<i>Enterobacter cloacae</i>	Gibi 320-139N	3205573	95.1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Gibi 324-155N	3345773	99.5
<i>Pseudomonas luteola</i>	Gibi 322-150N	5527645	98.7
<i>Enterobacter cloacae</i>	Gibi 313-127N	7305577	99
<i>Pseudomonas luteola</i>	Gibi 296-95S	1467741	96.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	Gibi 295-88S	7305573	99
<i>Enterobacter cloacae</i>	Gibi 298-97S	3305573	95.1
<i>Pseudomana sp.</i>	Gibi 289-81S	2200004	-
<i>Citrobacter koseri/amalonicus</i>	Gibi 292-85S	3344513	99.9
<i>Pseudomonas luteola</i>	Gibi 296-95S	1467741	96.2
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Gibi 273-49I	467320	99.9
<i>Pseudomonas luteola</i>	Gibi 284-69I	5467741	99.8
<i>Citrobacter koseri/amalonicus</i>	Gibi 271-46I	3345513	96.2
<i>Pseudomonas luteola</i>	Gibi 284-69I	5467741	99.8
<i>Citrobacter koseri/amalonicus</i>	Gibi 272-47I	3344513	99.9
<i>Enterobacter cloacae</i>	Gibi 285-71I	3305577	95.1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Gibi 273-49I	467320	99.9
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	EPS 9	7355773	99.8
<i>Citrobacter koseri/amalonicus</i>	EPS 4	3345513	96.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	EPS 2	7305573	99
<i>Pasteurella multocida</i>	PHA 7	40024	98.5
<i>Pasteurella multocida</i>	EPS 11	40024	98.5
<i>Citrobacter koseri/amalonicus</i>	EPS 1	3344513	99.9
<i>Bacillus coagulans</i> (CH50)	PHA 10	-	90.8

Tabla 9. Identificación molecular de bacterias productoras de biopolímeros con el gen ribosomal 16S.

Aislamiento	Orden	Género	Especie
GIBI271	Enterobacteriales	<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>
GIBI273	Lactobacillales	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>
GIBI285		<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i>
GIBI289	Enterobacteriales	<i>Klebsiella</i>	<i>Pneumonia</i>
GIBI295		<i>Enterobacter</i>	<i>Cloacae</i>
GIBI298		<i>Cedecea</i>	<i>Davisae</i>
GIBI292	Burkholderiales	<i>Burkholderia</i>	<i>Glathei</i>
GIBI296	Lactobacillales	<i>Streptococcus</i>	<i>Gallyoticus</i>
GIBI313	Enterobacteriales	<i>Enterobacter</i>	<i>Ludwigii</i>
GIBI322		<i>Enterobacter</i>	Sp
GIBI324		<i>Enterobacter</i>	Sp
GIBI315	Lactobacillales	<i>Streptococcus</i>	<i>Lutetiensis</i>
GIBI320		<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i>

no determinado); encontrando una gran producción de este biopolímero en especial de cepaciano.

A partir de muestras de rizosfera de caña de azúcar, Shradha *et al.*, en 2011; lograron el aislamiento de 10 bacterias; de las cuales 6 cepas fueron productoras de PHA, al identificarlas mediante la base de datos, basada en taxonomía numérica, PIBWin (Probabilistic identification of bacteria) determinaron que las bacterias corresponden a: *Micrococcus luteus*, *Micrococcus mucilaginosus*, *Micrococcus nishinomiyaensis*, *Micrococcus radiodurans*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus raffinolactis*, de los cuales *M. mucilaginosus* y *S. raffinolactis* son los mayores productores del polímero.

CONCLUSIONES

Se pudieron identificar cepas de *Enterobacter* spp., *Leuconostoc* spp. y *Pseudomonas* spp.; entre otras, las cuales son géneros reportados en los referentes bibliográficos utilizados. La morfología predominante en los efluentes industriales fueron bacilos Gram negativos importantes en la producción de exopolisacáridos de interés comercial como xantano y acetano. Así como también bacilos Gram positivos con buena capacidad de producción de polihidroxialcanoatos. Las pruebas bioquímicas realizadas permiten ver la variedad enzimática presentada por los microorganismos aislados y su capacidad

de degradar y metabolizar compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en los efluentes industriales lo que representa un gran potencial en la remoción de estos compuestos y en la producción de biopolímeros.

Para finalizar los efluentes industriales utilizados para este estudio, son una fuente prometedora para el aislamiento de bacterias de interés para la producción de diferentes tipos de biopolímeros como son las sustancias poliméricas extracelulares y los polihidroxialcanoatos. Debido a sus diferencias en cuanto a características físico-químicas y composicionales, los efluentes, exponen a los microorganismos nativos a condiciones transitorias, sometiéndolos a periodos alternos de concentraciones fluctuantes de sustrato y a ambientes aerobios y anaerobios, situaciones desequilibradas ante las cuales las bacterias responden produciendo diferentes tipos de biopolímeros ya sea como mecanismos de protección o de supervivencia a ese tipo de condiciones. Dichas características de producción de este tipo de sustancias pueden ser utilizadas dentro de las mismas industrias para plantear sistemas de tratamiento biológicos que permitan no solamente disminuir la carga contaminante de sus efluentes sino también optar por una valorización de sus residuos. Pueden ser utilizados en la mejora o innovación de productos, aprovechando características como el aumento de la reología importante en productos lácteos. El potencial de estos aislamientos en diferentes

tipos de industrias es muy grande y este trabajo demuestra la importancia de mirar hacia esos desechos o efluentes que generan estas empresas para aplicarlos en procesos de mejora propios de cada lugar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali Raza Z., Abida S. & Banat I. (2018) Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126:45–56.
- Allaert C. & Escolá M. (2003). Métodos de análisis microbiológico de alimentos. España: Díaz de Santos S.A. 272 p.
- Amadu A., Qiua S., Gea S., Addico G., Ameka G., Yu Z., Xia W., Abbew A., Shao D., Champagne P. & Wang S. (2021). A review of biopolymer (Poly- β -hydroxybutyrate) synthesis in microbes cultivated on wastewater. *Science of The Total Environment*. Volume 756. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143729>.
- Andhare P., Chauhan K., Dave M. & Pathak H. (2015). Microbial Exopolysaccharides: Advances in Applications and Future Prospects, *Biotechnology Vol. 3: Microbial Biotechnology*.
- Anjum A., Zuber M., Zia K., Noreen A., Anjum M. & Tabasum S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements, *International Journal of Biological Macromolecules*, 89:161–174.
- Arshad M., Jamil N., Naheed N. & Hasnain S. (2013). Analysis of bacterial strains from contaminated and non-contaminated sites for the production of biopolymers, *African Journal of Microbiology*, 1 (1), 009-014.
- Bailón L., Cervantes S., González R. (2004). Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias, in Facultad de estudios superiores de Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bello G D., Brandl H. (2007). Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxibutirato. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 41(2): 10-18.
- Bhuwal A., Singh G., Aggarwal N., Goyal V. & Yadav A. (2013). Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes, *International Journal of Biomaterials*, Article ID 752821, 10 pages.
- Botero M. (2015). La quebrada Manizales, quebrada ambientalmente por la legalidad e ilegalidad de los vertimientos. *Summa Iuris*, 3(1), 207-233.
- British Columbia Field Sampling Manual (2013). Ministry of Water, Land and Air Protection. Laboratory and Systems Management.
- Carminatti C., El Messane F., Zanchet B M.C., Rodrigues P.V. (2006). Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs), in Departamento de engenharia química e engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. 10-11.
- Corton E., Viale A. (2006). Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. En: Revista científica y técnica de ecología del medio ambiente. *Ecosistemas*, 15 (3):148-157.
- Cruz V D.G. (2008). Remoción de metales por microorganismos productores de polisacáridos. Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada. Santiago, Querétano: Centro de investigación de ciencia aplicada y tecnología avanzada. Instituto politécnico Nacional. 88 p.
- Díaz F. (2012). Conformado de materiales plásticos. *Lecturas de ingeniería*, Universidad Nacional Autónoma de México: Cuautitlán Izcalli.15.
- Echavarría A., Martínez A. & Montoya M. (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 66(2): 7129-7140.
- Fernández I., Ortiz F., Burbano O., Guerrero M., España J. (2006). Influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento bacteriano y síntesis de polihidroxialcanoatos de una cepa de *Bacillus micoides*-FBL2. *Centro de estudios en salud*, 1: 34-42.
- Ferreira A., Silva I., Oliveira V., Cunha R. & Moreira L. (2011). Insights into the role of extracellular polysaccharides in *Burkholderia* adaptation to different environments, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, December, Volume 1, Article 16.
- Forbes B., Sahm D.F., Weissfeld A.S. (2009). Diagnóstico microbiológico, Editorial Médica Panamericana. Doce ed. Buenos Aires, Argentina. 1160.
- Franco R J.F. (2004). Producción de biopolímeros vía fermentativa utilizando cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Manizales, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Ingeniería Química. 58 p.

- Freeman D., Falkiner F., Keane C. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Department of Clinical Microbiology, Sir Patrick Dun's Laboratory, St James's Hospital, Dublin, Eire. *J Clin Pathol.*, 42: 872-874.
- García MD & Uruburu F. (2000). La conservación de cepas microbianas. 30: 12-16.
- González G Y., Meza C J.C., González R O., Córdova L J.A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 29(1): 77-115.
- González R G. (2009). El eco diseño en el marco de un modelo de gestión ambiental para el manejo de efluentes industriales y domésticos en el lago de Maracaibo, estado Zulia - Venezuela Tesis para optar el título de doctor en Ciencias Ambientales. Maracaibo, Venezuela: Universidad Tecnica Americana. 112 p.
- Herasimenka Y., Cescutti P., Impallomeni G., Campana S., Taccetti G., Ravenni N., Zanetti F. & Rizzo R. (2007). Exopolysaccharides produced by clinical strains belonging to the *Burkholderia cepacia* complex, *Journal of Cystic Fibrosis*, 6: 145-152
- Hernández A., Alfaro I., Arrieta R. (2003). Microbiología Industrial. San José de Costa Rica: Universidad estatal a distancia. 251 p.
- Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. (2008). Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. 6 ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. 1696 p.
- Lancheros, Ruth J. (2001). Producción de Polisacáridos por Fermentación Empleando Cepas de *Rhizobium*. Universidad Nacional de Colombia.
- MacFaddin. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Buenos Aires, Argentina.: Médica Panamericana. 839 p.
- Malaka R. (2021). Bacterial exopolysaccharides production and their roles for human life. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 788. doi:10.1088/1755-1315/788/1/012109.
- Marrero C D. (2006). Guía para la Identificación de las Bacterias más frecuentes en el Laboratorio de Microbiología Clínica. Hospital pediátrico universitario "Octavio de la concepción y de la Pedraja" laboratorio de microbiología. Holguín. 23 p.
- Martínez J.; Rodríguez M.; Fernández A.I. (2004). Producción de polihidroxicanoatos en bacterias diazotrofas. Influencia de la aeración de poli-B-hidroxitirato en *Azospirillum brasilense* cepa 7. *Revista Biológica*, 18(1): 87-94.
- Montoya V H.H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Editorial Universidad de Antioquía. Segunda ed. Medellín, Colombia. 255.
- Moscovici M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front. Microbiol.*, 6:1012. doi:10.3389/fmicb.2015.01012
- Mostafa H., El-Mezawy A., Geis A. & Heller K. (2009). Exopolysaccharide production by *Enterococcus faecium*, *Milchwissenschaft* 64 (4).
- Nadzir M., Nurhayati R., Idris F. & Nguyen M. (2021). Biomedical Applications of Bacterial Exopolysaccharides: A Review. *Polymers*, 13, 530. <https://doi.org/10.3390/polym13040530>.
- Ostle A., Holt J. (1982). Nile blue A as a fluorescent satín for poly- β -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1): 238-241.
- Pandolfi D., Pons M-N & da Motta M. (2007). Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis, *Biotechnol Lett*, 29:1263-1269
- Pérez-Ordoyo G L I. (2010). Exopolisacáridos y otros factores de virulencia en cepas de Staphylococcus aisladas de leche ovina. Tesis para optar el grado de Doctor. León.: Universidad de León. Facultad de Veterinaria. Departamento de Salud animal. 320 p.
- Reyes S A.M. (2009). Análisis y control del abultamiento filamentoso en una planta de tratamiento de efluentes. Tesis de grado, in Facultad de ciencias químicas Universidad Veracruzana: Coatzacoalcos, Veracruz.
- Ricciardi A., P E., CF A. (1997). Simple methods for screening of lactic acid bacteria, for the production of exopolisaccharides in liquid medio. In: *Biotechnology Techniques*, 11: 271-275.
- Rodríguez C E., Gamboa C M.M., Hernández C F., García H J.D. (2005). Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica.: Editorial Universidad de Costa Rica. 475 p.
- Rodríguez F.A., Leton G.P., Rosal G.R., Dorado V.M., Villar F.S., Sanz G.J. (2006). Tratamiento Avanzado de Aguas Residuales Industriales. Informe de Vigilancia Tecnológica. 136 p.
- Ruas-Madiedo P., De los Reyes-Gavilan C.G. (2005). Methods for screening, isolation and characterization of exopolisaccharides produced by lactic acid bacteria.

- Instituto de productos lácteos de Asturias. American Dairy Science Association. *J Dairy Sci*, (88): 843-856.
- Saharan B., Grewal A. & Kumar P. (2014). Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments, *Chinese Journal of Biology*, Article ID 802984
- Sánchez M J., Rodríguez G J.L. (2003). Biorremediación. Fundamentos y aspectos microbiológicos. Universidad de Oviedo.
- Segura D., Noguez R., Espin G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plástico biodegradable. En: *Biotecnología*, 14: 361-371.
- Serrano R J.Y. (2010). Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. *Revista Teoría y Praxis investigativa*, 5(2): 79-84
- Shraddha G., Yogita R., Simanta S., Aparna S., & Kamlesh S. (2011). Screening and production of bioplastic (PHAs) from sugarcane rhizospheric bacteria, *International Multidisciplinary Research Journal*, 1(9): 30-33
- Spiekermann P., Rehm B., Kalscheuer R., Baumeister D., & Steinbuchel A. (1999). A Sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. 73-80.
- Torres C., Antunes S., Ricardo A., Grandfils C., Alves V., Freitas F. & Reis M. (2012). Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis, *Bioresource Technology*, 119:148-156.
- Tortora G J., Funke B R., Case C L. (2013). Microbiology an introduction, Eleventh Edition, Pearson education Inc.
- Ventorino V., Nicolaus B., Di Donato P., Pagliano G., Poli A., Robertiello A., Iavarone V. & Pepe O. (2019). Bioprospecting of exopolysaccharide-producing bacteria from different natural ecosystems for biopolymer synthesis from vinasse. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 6:18. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0154-3>.
- Villota-Calvachi G. & Otero-Ramírez I. (2009). Características culturales de bacterias cultivables, Grupo de Biotecnología Microbiana, Universidad de Nariño.
- Xu Y., Wang Y., Coda R., Säde E., Tuomainen P., Tenkanen M. & Katina K. (2017). *In situ* synthesis of exopolysaccharides by *Leuconostoc* spp. and *Weissella* spp. and their rheological impacts in fava bean flour, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 248, Pages 63-71.