

SELECCIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRESERVACIÓN
DE ACTINOMICETOS AISLADOS DEL SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

Presentado por
DANIELA HERNÁNDEZ SERNA
ANDREA STEPHANIA LOAIZA CANO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2014

SELECCIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRESERVACIÓN
DE ACTINOMICETOS AISLADOS DEL SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

ANTEPROYECTO DE TRABAJO DE GRADO
Requisito final para optar al título de Tecnóloga Química

Presentado por
DANIELA HERNÁNDEZ SERNA
ANDREA STEPHANIA LOAIZA CANO

Directora
LILIANA BUENO LÓPEZ
Licenciada en Biología

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2014

AGRADECIMIENTOS

- *Primeramente gracias a Dios por la oportunidad que me ha brindado de estudiar, y la gracia que ha puesto en mí. Gracias a mis padres por el apoyo que me han dado durante toda mi vida, gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado, gracias a Esteban porque a su modo me ha brindado su amor y su amistad, y a toda mi familia por apoyarme siempre.*
- *Gracias a todos mis compañeros y amigos ya que con ellos disfrute mi paso por la universidad.*
- *También quiero dale mis sinceros agradecimientos a Aura, Corina, Katherine y Luisa ya que por ellas empecé mi viaje con los Actinomicetos y a todos los integrantes del GEA.*

Daniela Hernández Serna

- Especialmente, gracias a Dios por darme luz en mi destino, por guiarme e iluminarme por este camino.
- Gracias Hernando Loaiza Aguirre, mi papi, que por sus consejos y dedicación cada día ha hecho de mí una persona con grandes proyecciones a futuro, mil y mil gracias por estar siempre a mi lado.
- Gracias Rosa Cano, mi mami, por levantarse cada día y entregarme su amor antes de salir de casa, por sus regaños por sus besos inesperados que me hacían llenar de luz días oscuros, por siempre estar al pendiente de algún dolor o lagrima, gracias mil gracias por ser la gran mujer que eres.
- Gracias Anderson Rúa por hacer parte de mi camino, por darme fuerza cuando más la he necesitado y por estar cada día de este proceso, por hacer que mi alma sonría en días de angustia y por su inmensa paciencia.
- Gracias a toda mi familia, Hermanos, Tíos, Primos por su gran apoyo, cada uno a su manera, gracias por sus buenos deseos.
- A mis amigos por cada una de sus risas, por sus locuras por formar parte de unos lindos recuerdos y de otros que todavía faltan por llegar, que feliz me hace poder contar con personas tan lindas.

Andrea Stephania Loaiza Cano

Gracias a la Escuela de Química y a sus profesores por sus valiosas enseñanzas ya que sin esto no hubiese sido posible. Gracias a la Directora de la Escuela Luz Estela Ramírez por brindarnos su apoyo y conocimiento durante este proceso. Gracias al semillero GEA por dar la idea inicial de este trabajo. Gracias a Mancho y a Javi por la disposición y colaboración durante estos años en la Escuela.

DEDICATORIA

Daniela Hernández Serna

- Quiero dedicar este gran logro a Dios a mis padres y a mi hermano, ya que sin ellos, este trabajo no se hubiese podido realizar.

Andrea Stephania Loaiza Cano

- Quiero dedicar este nuevo logro en mi vida a Dios y a mis padres que me han guiado por el mejor camino, y a cada una de las personas que contribuyeron a que este logro fuera posible.

TABLA DE CONTENIDO

| | PÁG |
|--|------------|
| 1 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 4 |
| 3 JUSTIFICACIÓN..... | 6 |
| 4 OBJETIVOS..... | 6 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL..... | 6 |
| 4.2 Objetivos Específicos | 6 |
| 5 MARCO TEÓRICO | 7 |
| 5.1 ACTINOMICETOS..... | 7 |
| 5.2 Características..... | 7 |
| 5.3 Características de algunos géneros de actinomicetos | 8 |
| 5.4 Aplicación Industrial de los Actinomicetos..... | 12 |
| 5.5 Métodos generales de conservación de microorganismos | 14 |
| 5.6 Principios de la conservación | 14 |
| 5.7 Métodos de conservación a largo plazo | 15 |
| 5.8 Métodos de conservación alternativos | 19 |
| 5.9 Métodos Restringidos..... | 20 |
| 5.10 Crioprotectores..... | 22 |
| 6 METODOLOGÍA..... | 24 |
| 6.1 Microorganismos de Estudio..... | 24 |
| 6.2 Pruebas Preliminares..... | 25 |
| 6.3 Caracterización macroscópica..... | 25 |

| | | |
|------|---|----|
| 6.4 | Caracterización microscópica..... | 26 |
| 6.5 | Pruebas Bioquímicas..... | 29 |
| 6.6 | Concentración de microorganismos a conservar..... | 32 |
| 6.7 | Metodología para la conservación por congelación en glicerol | 34 |
| 6.8 | Metodología en discos de papel filtro semistock | 35 |
| 6.9 | Recuperación del microorganismo | 36 |
| 6.10 | Pruebas Posteriores..... | 38 |
| 7 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 41 |
| 7.1 | Microorganismos en estudio..... | 41 |
| 7.2 | Determinación de la concentración de las colonias por el método de Unidades Formadoras de Colonia | 42 |
| 7.3 | Conservación por el método de congelación en glicerol al 10%..... | 45 |
| 7.4 | Pruebas de Viabilidad para el método de Congelación en Glicerol al 10% 47 | |
| 7.5 | Conservación por el método de Discos de Papel Filtro Semistock..... | 55 |
| 7.6 | Pruebas de Viabilidad para el método de Discos de Papel Filtro Semistock | 57 |
| 7.7 | Ventajas y Desventajas de cada uno de los métodos de conservación y preservación en estudio..... | 64 |
| 7.8 | Discusión de Selección | 66 |
| 8 | CONCLUSIONES | 68 |
| 9 | RECOMENDACIONES..... | 69 |
| 10 | REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 70 |
| 11 | ANEXOS | 77 |

LISTADO DE TABLAS

| | PÁG |
|--|------------|
| Tabla 1. Código de las colonias en estudio. | 41 |
| Tabla 2. Concentración para la colonia de <i>Nocardia</i> | 42 |
| Tabla 3. Concentración para la colonia de <i>Thermomonospora</i> | 43 |
| Tabla 4. Concentración para la colonia de <i>Streptomyces</i> | 43 |
| Tabla 5. Resultado de la recuperación. | 46 |
| Tabla 6. Observación macroscópica de las colonias en estudio..... | 48 |
| Tabla 7. Observación microscópica de Coloración de Gram de las colonias en estudio, Comparación de los resultados iniciales y finales | 49 |
| Tabla 8. Descripción microscópica de microcultivos de las colonias en estudio.... | 51 |
| Tabla 10. Resultado de Pruebas Bioquímicas para el método de congelación en Glicerol 10% estudiado al inicio y posteriores a la preservación y conservación...54 | 54 |
| Tabla 11. Resultado de la concentración durante las recuperaciones para método de Discos de Papel Filtro Semistock..... | 56 |
| Tabla 12. Observación Macroscópica después de la conservación..... | 58 |
| Tabla 13. Observación de la Coloración de Gram después de la conservación. | 59 |
| Tabla 14. Observación de Microcultivos después de la conservación <i>Nocardia</i> (JBUTP_GEA_G_A013) <i>Thermomonospora</i> (JBUTP_GEA_BS_A010), <i>Streptomyces</i> (JBUTP_GEA_H_A018)..... | 61 |
| Tabla 15. Resultado de Pruebas Bioquímicas para el método de Preservación en Papel Filtro al inicio y posteriores a la preservación y conservación. | 63 |

LISTADO DE FIGURAS

| | PÁG |
|--|------------|
| Figura 1. Esquema Adaptación de colonias en Agar Actinomyces. Fuente: Autoras | 25 |
| Figura 2. Esquema Metodología de observación macroscópica. Fuente: Autoras | 26 |
| Figura 3. Esquema Metodología Coloración de Gram. Fuente: autoras | 27 |
| Figura 4. Esquema general Microcultivo (Fuente: (Ordoñez C.; Salazar A., 2013). | 29 |
| Figura 5. Esquema de Unidades Formadoras de Colonia. Fuente: Autoras | 33 |
| Figura 6. Esquema Conservación por congelación en Glicerol 10% | 35 |
| Figura 7. Esquema conservación por Discos de Papel Semistock. Fuente: Autoras | 36 |
| Figura 8. Esquema Descongelación Fuente: Autoras | 36 |
| Figura 9. Esquema Siembra por superficie (Recuperación) Fuente: Autoras | 37 |
| Figura 10. Esquema de Recuperación. Fuente: Autoras | 38 |
| Figura 11. Diagrama de metodología..... | 39 |
| Figura 12. Unidades Formadoras de Colonia (UFC) (Fuente: Autoras)..... | 42 |
| Figura 13. Gráfico de la Concentración de los actinomicetos por el método de UFC | 44 |
| Figura 14. Controles | 45 |
| Figura 15. Control vs. Viabilidad para una de las colonias estudiadas. | 56 |

1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, pues participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de los cuales depende sobrevivir y afrontar los desafíos del futuro, como lo son: alta demanda de alimentos, producción de medicamentos y mitigar el impacto ambiental por medio de desarrollo biotecnológico. (Montaño N, Sandoval A. Camargo S, Sánchez J., 2010)

Los microorganismos hacen parte de la actividad biológica que permite el desarrollo de la vida; en las últimas décadas, son la base de avances biomédicos, farmacéuticos, industriales, entre otros. Por ello, la preservación y la conservación de estos microorganismos son claves para que las propiedades y componentes activos permanezcan iguales durante el transcurso del tiempo. (Adaptado, Brock T.D., 1998)

Un amplio grupo de estos microorganismos de interés son los actinomicetos conocidos por desarrollar diversas actividades en el ecosistema tales como; ayudar al crecimiento de las plantas, el mejoramiento del suelo, producción de compuestos, tienen actividad antagonista contra microorganismos patógenos siendo los principales productores de antibióticos y cumplen un papel importante en la descomposición de biopolímeros. Se encuentran frecuentemente en el suelo y constituyen un componente sustancial de la microbiota, registrándose hasta más

de un millón de unidades formadoras de colonias en un gramo de tierra fértil, (Franco-Correa, 2008).

Teniendo en cuenta la importancia que se le ha dado a los actinomicetos, se busca obtener una manera apropiada de mantener estos microorganismos, la preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación. (García MD 2000) y (Floccari M 1998). El método de preservación y conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos. De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable. (Castro G, Hernández JT 2000) y (Smith D, Green P, Day J 2000)

Todos los métodos tienen ventajas y desventajas; por tanto, es necesario hacer una selección del método a utilizar a partir de un análisis de las características de cada técnica, factibilidad de su uso y las necesidades que se requieran, como lo es la optimización del espacio, la disminución de costos entre otros. (Uzunova-Doneva y Donev 2004-2005).

La universidad Tecnológica de Pereira cuenta con actinomicetos aislados e identificados hasta género de los suelos del Jardín Botánico (JBUTP), estos microorganismos presentan gran impacto en el suelo por ser controladores biológicos, fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosforo, descomposición de biopolímeros y poseer capacidad degradativa de materia orgánica. Por esto, surgió el interés de evaluar diferentes métodos de conservación y seleccionar el método más adecuado de preservación y conservación para los Actinomicetos

aislados del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, evaluando las características de una conservación por congelación en glicerol 10% y conservación en papel filtro.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El creciente uso de los bancos de cepas en la biotecnología y la protección medio ambiental, han fortalecido la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables, haciendo así un conjunto de colecciones de microorganismos que constituyen la base de futuras investigaciones (Kirsop B, 1991).

La transferencia periódica es una técnica que permite la supervivencia de cultivos de microorganismos en cortos períodos de tiempo, por eso se reconoce como un método de conservación a corto plazo, basado en transferir un cultivo del medio seco a uno fresco proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento, lo que condiciona el elevado riesgo de contaminación y variabilidad de las características de las cepas, las cuales constituyen sus principales desventajas. (Castro G ,2000 y Snell JJS, 1991)

Actualmente el Grupo de Estudio Agrícola (GEA) busca implementar en la escuela de química de la Universidad Tecnológica de Pereira un cepario, del cual ya se encuentra un trabajo previo titulado “Clasificación de Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación”, que contiene un grupo ya aislado de Actinomicetos del Jardín botánico de la Universidad (JBUTP) con los cuales se busca realizar una colección más amplia para fines de investigación para posteriores trabajos.

El método que se ha utilizado para mantener dichos microorganismos ha sido el de transferencia periódica del cual se ha obtenido resultados poco satisfactorios, a causa del alto riesgo al que está expuesto por contaminación ; por ello con este

trabajo se busca implementar un método alternativo de preservación y conservación que proporcione mejores condiciones. Los diferentes métodos que se han empleado en otros trabajos de investigación según la documentación que se ha hecho al respecto, buscan un mayor beneficio utilizando crioprotectores, muy bajas temperaturas de almacenamiento, técnicas de secado entre otras, todo esto para que permitan evitar alteraciones tales como : contaminación, cambio en las características tanto macroscópicas como microscópicas, y disminuir el dispendioso trabajo que conlleva el método actualmente utilizado, ya que el tiempo de durabilidad de las condiciones óptimas para su supervivencia es solo de 15 días y lo que se desea, es prolongar el tiempo de preservación y las temperaturas optimas que conlleven a resultados muchos más confiables.

3 JUSTIFICACIÓN

Los actinomicetos constituyen un importante grupo de organismos procariotas habitantes del suelo, el género principal es *Streptomyces* cuyas especies suelen excretar antibióticos, con un olor característico a tierra mojada debido al metabolito secundario llamado geosmina, además presenta ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares como la solubilización de fosforo, la promoción de crecimiento vegetal por medio de la fijación de nitrógeno ya sea simbiótico o no simbiótico según el género, controladores fitopatógenos, etc. Los actinomicetos predominan en forma libre en los suelos secos y cálidos en cantidades de millones por cada gramo de suelo, y se han descrito como Rizobacterias promotores de crecimiento vegetal.

Estos microorganismos adquieren cada vez mayor importancia como mecanismos o vías para la conservación de la biodiversidad y representan un importante elemento estratégico y económico para el desarrollo de las investigaciones científicas, con particularidad en las ramas biotecnológicas y biomédicas. (Sly LI 1994)

Es importante entender que para el mantenimiento de los cultivos antes mencionados, ellos deben permanecer puros y homogéneos bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética; que permita alcanzar estos objetivos existe un gran número de métodos descritos para la preservación microbiana, que incluyen criterios de selección del método como la viabilidad, pureza, costos del proceso, cantidad de cultivo y frecuencia de uso (Meza R, Monroy A 2004)

Cumpliendo con los criterios que se presentan para realizar una buena conservación se desea seleccionar un método apropiado entre conservación por congelación en glicerol al 10% y conservación en discos de papel filtro para mantener las colonias de actinomicetos aisladas del JBUTP y poder obtener el mejor método, para que el tiempo de estabilidad y pureza de dichos microorganismos sea mayor, a temperaturas adecuadas de conservación y preservación; y entregando a la Universidad y a la escuela de tecnología química más herramientas para investigaciones posteriores. Para ello se brindara un manual- guía explicando la manera en la que se debe realiza la conservación y preservación de las colonias de actinomicetos por los métodos antes mencionados, con registro fotográfico. (Autoras)

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Seleccionar un método adecuado de preservación y conservación para los Actinomicetos aislados de los suelos del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, entre congelación por glicerol 10% y conservación por papel filtro.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer condiciones adecuadas de tiempo y temperatura, para la conservación de los Actinomicetos utilizando criterios como viabilidad y pureza, mediante métodos de congelación por glicerol 10% y por el método semi-stock en papel filtro.
- Evaluar los métodos a utilizar para la preservación y la conservación de los actinomicetos aislados del JBUTP con el fin de seleccionar el método óptimo.
- Elaborar un manual de técnicas de preservación y conservación de Actinomicetos.

5 MARCO TEÓRICO

5.1 ACTINOMICETOS

5.1.1 Generalidades

Los actinomicetos son bacterias aeróbicas, Gram-positivas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes, ampliamente distribuidas en el suelo, así como también en otros ambientes naturales del mundo. Inicialmente fueron clasificadas como hongos pero, debido a los estudios de los componentes de su pared celular, se reclasificaron dentro del orden de los Actinomycetales. (McNeil MM, Brown JM., 1994)

Los actinomicetos representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales, tienen gran importancia, han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), degradación de materia orgánica de origen animal o vegetal, mineralización, biotransformación de productos. (Weng Z, 2005)

5.2 CARACTERÍSTICAS

La mayoría de los actinomicetos son mesófilos, su crecimiento registra entre 25°C a 30°C, en temperaturas superiores a 55°C solo algunas especies termofílicas de *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.* Son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismos si está acompañado de humedad (Stanley, 1994)

Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, adicionalmente presentan una actividad metabólica alta producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares. (Ezziyyani et al., 2004). También desarrollan actividades para el mejoramiento de la estructura del suelo y producción de compuestos bioactivos con actividad antagonista contra microorganismos patógenos, siendo los principales productores de antibióticos. Particularmente, se han descrito actividades que pueden catalogar a los actinomicetos como Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: PGPR (del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”) (Kloepper, 1991)

En relación con los requerimientos de oxígeno, estos microorganismos generalmente son aerobios creciendo en buena proporción de suelos drenados de granulación óptima que permiten un adecuado intercambio gaseoso. De acuerdo a la especie son afectados por la disminución en la concentración de oxígeno, debido a que algunos de ellos son microaerófilos y toleran bajas presiones parciales de dicho gas en el suelo (Koneman, 2001)

5.3 CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS GÉNEROS DE ACTINOMICETOS

5.3.1 Streptomyces

El género *Streptomyces* es uno de los géneros más característicos y conocidos de la división Actinobacteria. Se caracterizan por poseer una morfología particular en donde se diferencian dos formas de crecimiento, una primaria o asimilatoria y una secundaria o reproductiva. Las esporas reproductivas asexuales de *Streptomyces* se forman en los extremos de los filamentos aéreos. Si cada espora se deposita en un sustrato adecuado, puede germinar y formar una colonia nueva. Estos

microorganismos son aerobios estrictos. A menudo producen enzimas extracelulares que les permiten utilizar las proteínas, polisacáridos como el almidón, la celulosa y diversas materias orgánicas halladas en el suelo. De un modo característico producen un compuesto gaseoso llamado geosmina, que le confiere al suelo tu típico aroma a suelo. El género es de gran importancia biotecnológica debido a que produce metabolitos secundarios como los antibióticos que son de amplio uso en medicina humana y veterinaria, así como compuestos represores de tumores, enzimas y vitaminas, (Tohme, 2000).

5.3.2 Nocardia

Nocardia es un género de bacteria Gram positiva que se encuentra en suelos ricos de materia orgánica, así como en aguas o materia orgánica en descomposición. Se pueden hallar principalmente en zonas tropicales y subtropicales, mientras que son poco frecuentes en zonas templadas o frías. Ciertas especies de *nocardias* tienen gran importancia clínica como agentes patógenos para el hombre y los animales. Forman filamentos y ramificaciones muy desarrolladas. Poseen micelio vegetativo que se fragmenta en elementos bacilares y cocoides. Los filamentos profundos se separan y toman forma de rosario, en cambio los filamentos aéreos al fragmentarse producen células similares a esporas unicelulares que se dispersan y forman aerosoles. Estos microorganismos pueden reconocerse en el laboratorio por la formación ya sea de colonias lisas, duras, adherentes, cereas o secas que se desarrollan después de tres días a dos semanas de incubación, (Uzcasteguí-Negrón, 2009). Verificación

5.3.3 Thermonospora

La *Thermonospora* se caracteriza por ser altamente sensible al calor, la espora de dicho microorganismo, puede ser sésil pero usualmente se forman esporóforos

ramificados; en muchas cepas la repetición de esporófos ramificados conlleva a la formación de agrupaciones de esporas, estas también son producidas en las hifas. (Bergey's, 2005)

La producción y esporulación del micelio aéreo generalmente es óptimo a pH>8. Un amplio rango de compuestos, incluyendo sustratos poliméricos pueden ser usados como fuente de carbono y energía. (Bergey's, 2005)

Las esporas mueren por tratamiento a 90°C por 30 minutos en suspensión acuosa; todas las cepas de *Thermomonospora* son sensibles al novobiocin (50µg/mL). (Bergey's, 2005)

Las cepas termofílicas son comunes en abonos, compost y forrajes sobrecalentados; las cepas de *thermomonospora* mesófilos pueden ser aislados del suelo. (Bergey's, 2005)

La habilidad de las *thermomonosporacea* de secretar una variedad termoestable de enzimas extracelulares, les permite establecerse como la población dominante del compostaje a altas temperaturas de residuos vegetales y otros desperdicios. (Bergey's, 2005)

5.4 APLICACIÓN INDUSTRIAL DE LOS ACTINOMICETOS

Los actinomicetos son cuantitativa y cualitativamente importantes en la rizósfera, pueden influir en el crecimiento de las plantas y la protección de sus raíces contra la invasión por hongos patógenos. Adicionalmente estos pueden participar en la

formación de micorrizas, y en la producción de compuestos herbicidas e insecticidas (Crawford *et al*, 1993).

Los actinomicetos participan principalmente en procesos de degradación de materia orgánica, incluyendo lignina y quitina, así como en la formación y estabilización de pilas de compostaje y humus (Titus y Pereira, 2007). Además de la función ecológica de los actinomicetos, estos microorganismos son de suma importancia debido a que han demostrado ser la fuente más importante de metabolitos secundarios bioactivos de valor industrial y comercial (Ezziyani *et al*, 2004)

Los antibióticos constituyen la aplicación industrial más importante de los actinomicetos. Estas moléculas de origen natural manifiestan, a bajas concentraciones, actividades biológicas con efecto antibacteriano, antifúngico, anticanceroso, antiviral o antiparasitario. Adicionalmente, estas bacterias tiene la capacidad de sintetizar enzimas hidrolasas extracelulares que permiten la descomposición de la materia orgánica o la degradación de las paredes de hongos o plantas (Leveau Y Bouix, 2000). Los actinomicetos son considerados como los principales organismos involucrados en la producción de quitinasas y en consecuencia en la descomposición de la quitina en el suelo; teniendo en cuenta que la quitina es un componente significativo de la pared celular de la mayoría de los hongos, resulta lógico asumir que los actinomicetos pueden atacar las hifas y esporas de los hongos, pudiendo ser considerados como potenciales agentes de control biológico (Ames, 1989)

5.5 Métodos generales de conservación de microorganismos

5.6 PRINCIPIOS DE LA CONSERVACIÓN

En la naturaleza los microorganismos que pueblan un ecosistema completo están sometidos en principio a las mismas leyes que gobiernan a los otros seres vivos que lo habitan. Entre ellas las más determinantes, son las que se basan en la subsistencia: la competición por alimento. Puede especularse que cuando un microorganismo implanta en un ecosistema comienza a desarrollarse consumiendo los nutrientes disponibles y expandiéndose en el espacio a medida que se incrementa su desarrollo, en competición con el resto de los habitantes del medio. Agotadas las fuentes nutritivas o bajo condiciones adversas, paraliza o atenúa su metabolismo, entrando en un periodo de dormancia. A este fenómeno descrito se le ha denominado microbiostasis o hipobiosis. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables o existe una nueva fuente nutritiva el microorganismo inicia nuevamente su desarrollo. La conservación de microorganismos vivos in-vitro ha intentado copiar este procedimiento, a pesar de ello puede decirse que no existe ningún método de conservación perfecto, cada uno tiene sus ventajas e inconvenientes, dependiendo su elección de las circunstancias concretas de cada laboratorio. (Tello et al, 1991)

Los objetivos de la conservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos:

- Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades;
- Preservar los niveles de su productividad inicial;

- Lograr que el cultivo pueda ser trasportando y manejado con facilidad. Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación. (Tello et al, 1991)

Los métodos de conservación para microorganismos se agrupan atendiendo a los factores tiempo y características fisiológicas de la cepa en tres grandes grupos, métodos a largo plazo, métodos a corto plazo y métodos alternativos. (Gherna, 1998)

5.7 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

Es el mejor, porque se detiene el crecimiento de las células microbianas, sin provocar la muerte, garantizando la estabilidad genética, al evitarse la aparición de generaciones sucesivas, Aun así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo. (Tello et al, 1991)

5.7.1 Congelación

La congelación es, al igual que la liofilización, uno de los métodos de mantenimiento más utilizados, porque se logran los periodos de conservación más largos (superiores a los veinte años, cuando se utiliza nitrógeno líquido). En el proceso de congelación, lo más importante es controlar la velocidad de disminución de la temperatura, porque, si es muy lenta, los cristales que se forman a partir del líquido contenido en las células serán muy grandes y pueden romper la membrana celular. (Hernández, A., 2003)

Existen algunas sustancias, como el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol, que ayudan a proteger los microorganismos durante el proceso de congelación, se conocen como crioprotectores. Estas sustancias tienen un bajo punto de

congelación (menor a 0°C), por lo que reduce la velocidad de congelación de los componentes de la célula microbiana. (Hernández, A., 2003)

El proceso de congelación se puede clasificar, con base en la temperatura en la que se lleva a cabo en: Congelación ordinaria, congelación ultra fría, congelación con nitrógeno líquido. (Hernández, A., 2003)

- Congelación Ordinaria: Durante la congelación ordinaria se mantienen temperaturas de -5 a -20°C; en este intervalo, los microorganismos permanecen viables (es decir, una vez descongelados, los microorganismos conservan todas sus funciones y características) por uno o dos años (Drew, 1986). El método no se recomienda para periodos de almacenamiento mayores (Hernández, A., 2003)
- Congelación Ultrafría: El cultivo por congelar se recoge directamente por centrifugación de una suspensión de microorganismos, o se prepara raspando muestra de la suspensión en un tubo con las condiciones adecuadas para su crecimiento. Luego, el cultivo se suspende en un medio con glicerol o DMSO. La suspensión se coloca en tubos especiales. La congelación ultrafría se efectúa en congeladores mecánicos, a temperaturas entre -50 y -80°C. (Hernández, A., 2003)

Como se mencionó, debe controlarse la velocidad de congelación de los microorganismos para mantener su viabilidad y que la cepa no sufra daños irreparables. (Hernández, A., 2003)

- Congelación con nitrógeno líquido: El método de conservación por congelación más recomendado es el que utiliza nitrógeno líquido, porque se logran temperaturas de -150 a -196°C (Stanbury y Whitaker, 1987). La velocidad de congelación debe ser 1 a 2°C/min hasta alcanzar una

temperatura de -30°C , luego $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -56°C . Después, se colocan las muestras directamente en nitrógeno líquido para acelerar el proceso de congelación. (Hernández, A., 2003)

El metabolismo celular se detiene completamente a partir de los -130°C ; por esta razón, si el microorganismo soporta el proceso de congelación, su viabilidad permanece durante muchos años. Una de las principales ventajas de este método es que son innecesarias las resiembras, por lo que se reducen al mínimo los riesgos de contaminación y los cambios genéticos y bioquímicos en el microorganismo. Sin embargo, el costo del equipo requerido es alto y es necesario mantener un suministro constante de nitrógeno, lo que encarece el proceso. Además, es imprescindible tomar previsiones en cuanto a fallas mecánicas y eléctricas para evitar perder toda una colección (Hernández, A., 2003)

5.7.2 Conservación por liofilización.

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad. La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram-positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas cuando se las liofiliza y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporas, actinomicetos y muchos hongos incluidas levaduras. Sin embargo, no es adecuada para células animales, algas y hongos en fase de micelio. La técnica consiste en partir de un cultivo de fase estacionaria (donde las células son

usualmente más resistentes) re-suspendiendo las células con un medio crioprotector, en el cual se obtenga una alta densidad celular. Unas pocas gotas de suspensión celular son transferidas a una ampolla, la cual es congelada a aproximadamente -40 °C y deshidratada mediante una sublimación en vacío. Este debe ser mantenido en 5-10 um mediante una bomba. El secado continúa hasta llegar a valores de humedad del orden del 1%; luego, la ampolla es sellada bajo vacío. Se debe evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, ya que están asociados con pérdida de viabilidad; de allí la importancia de mantener el vacío. El medio empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. Entre los agentes recomendados están la leche descremada en concentraciones del 10 al 20%; suero equino, mezclas de suero, glucosa y extracto de levadura; suero fetal bovino, etc. En algunos casos el efecto protector de la leche descremada es mejorado por el agregado de solutos tales como ácido ascórbico o tiourea. Normalmente la liofilización produce daños en las células, siendo los mismos en algunos casos reversibles, por lo cual éstas necesitan un tiempo de recuperación que es variable en función del tipo de daño producido. En la reconstitución de un tubo liofilizado se logra incrementar la sobrevivencia de los microorganismos si en lugar de agua destilada se agrega caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las células; de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma proceda en forma lenta. Se encuentra con frecuencia que el crecimiento después de la rehidratación tiene una fase de retardo extendida. Se puede reducir esta fase si se emplea para el crecimiento un medio de igual composición que el que da óptimo desarrollo pero disminuyendo su concentración original entre un 25 y un 50%. En general no es posible determinar para cada grupo de organismos el método de conservación, por lo que se trata de emplear el más adecuado. De todos, la liofilización es el más utilizado, aunque algunos organismos muestran altas tasas de mortalidad. (Journal Science, Technology and innovation)

5.8 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN ALTERNATIVOS

Se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de conservación a largo plazo, bien por carecer de los equipos necesarios o porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos. (García y Uruburu, 2001).

5.8.1 Conservación de transferencia periódica

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio en el que ha crecido, consiste en la transferencia del cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo. Estos intervalos varían dependiendo de las características del microorganismo en cuestión, algunas especies requieren ser transferidas a nuevos medios después de días o semanas, y otras después de meses o años. Esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, en un refrigerador a 4°C o en un freezer entre -10°C y -20°C, bajo aceite mineral o agua, en un período de 15 días a 2 meses (Snell J, 2001; Merck E, 2000)

5.8.2 Conservación por suspensión con agua destilada o en el agua de mar estéril

El vertiginoso progreso en materia de conservación de microorganismos, no ha impedido que la conservación en agua destilada estéril continúe acaparando un lugar de preferencia por ser un método simple, económico, seguro y capaz de asegurar la supervivencia de los cultivos por períodos prolongados (Martínez, 2009).

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años, en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar, siendo preparadas en criotubos. La concentración celular no debe ser superior a 10^4 - 10^5 células/ml en el caso de bacterias. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia, el poder fermentativo y la preservación de transformantes genéticos (Hill L, 2000)

5.9 MÉTODOS RESTRINGIDOS

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos q no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc.

Los fundamentos de los métodos se basan en detener el crecimiento de las células al eliminar el agua disponible (actividad acuosa).

5.9.1 Desecación en papel de filtro.

El empleo de un soporte de papel bastante absorbente (Whatmann nº 3) para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas. La técnica consiste en embeber tiras de papel filtro con una suspensión densa de organismos en suero, en glutamato de sodio o en otro agente. Las tiras de papel son posteriormente colocadas en tubos para su posterior secado al aire libre (en condiciones estériles) o bajo vacío. De esta forma se han logrado conservar cepas de género salmonella

y *Streptomyces* por períodos de hasta 2 años a temperatura ambiente. (Centro de investigaciones biotecnológico de Calkiní en el Estado de Campeche, 2009)

5.9.2 Desecación en suelo, arena, silicagel.

Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método. Es importante esterilizar el soporte por aplicación de calor seco, NO esterilizar en autoclave. La tierra estéril puede ser inoculada con un cultivo e incubada varios días para inducir esporulación de bacilos aerobios y anaerobios. Una vez que la esporulación se manifiesta, la tierra es secada (desecador) y el cultivo es mantenido de esta forma en una atmósfera seca o en refrigerador. El método ha sido utilizado ampliamente con hongos y actinomicetos, los cuales han sido mantenidos en estas condiciones varios años. También se puede utilizar tierra para la conservación directa de suspensiones de esporas. (Centro de investigaciones biotecnológico de Calkiní en el Estado de Campeche, 2009)

5.9.3 Desecación en bolas de alginato.

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4°C y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato. Este es un método que se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales. Los alginatos son polisacáridos extraídos de algas pardas, constituidos por residuos de ácido

gulurónico y ácido manurónico. En presencia de calcio, el alginato puede formar una estructura conocida como: “caja de huevos”. En esta estructura, los iones de calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico. (Centro de investigaciones biotecnológico de Calkiní en el Estado de Campeche, 2009)

5.9.4 Deseccación en sal gorda para halobacterias.

Para su conservación por este método se mezclan las células con sal y se dejan desecar espontáneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible. (García y Uruburu, 2001).

5.10 Crioprotectores

Las sustancias denominadas criopreservantes impiden por interacción molecular con el agua, la acción destructiva del congelamiento sobre las células, es decir, protegen de la formación de cristales de hielo con un grado bajo de toxicidad para las células vivas (Hubalek, 2003)

Una de las hipótesis en las cuales se basa el efecto de los criopreservantes es en que las características físico-químicas de estas sustancias le confieren afinidad por el agua molecular y de esa forma atrapar la molécula de agua en su interior, lo que impide que el agua forme cristales geométricos ordenados; en consecuencia, la solidificación del medio se establece con una distribución molecular desordenada del agua y la sustancia toma el carácter de sustancia vítrea protectora. (García, 1991; Van, 2003)

Las sustancias más utilizadas en la conservación bacteriana a bajas temperaturas se encuentran:

1. Sustancias no ionizables de bajo peso molecular que provocan solidificación amorfa y vítrea en lugar de cristalización para evitar la formación de zonas intracelulares con alta concentración de sales para evitar la deshidratación celular: glicerol, sacarosa, lactosa, DMSO (dimetilsulfóxido), entre otros.
2. Sustancias ricas en proteína como la leche, suero, extracto de carne.
3. Proteínas purificadas como la albúmina
4. Macromoléculas no proteicas como PVP (polivinilpirrolidona) y dextranos.

Algunos de los criopreservantes presentan toxicidad para la célula viva a temperatura ambiente, por lo tanto en los procesos de congelación y descongelación se debe tener en cuenta los tiempos de exposición de las células a estas sustancias.

6 METODOLOGÍA

6.1 Microorganismos de Estudio

Las colonias de actinomicetos en estudio, fueron suministradas por el semillero de investigación “Grupo de Estudio Agrícola GEA”. Estas fueron aisladas dentro del proyecto “Clasificación de Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, para usos en biorremediación”. Es de aclarar que en este trabajo las colonias se aislaron en medio avena suplementado con nistatina.

Teniendo en cuenta que los actinomicetos desarrollan mejor su metabolismo en el medio selectivo Actinomyces, se tomó la decisión de realizar el presente trabajo de investigación con dicho medio, garantizando mejor comportamiento de las colonias en estudio.

Se tomaron las colonias que se encontraban en medio avena y se llevaron a purificación en medio actinomicetos por medio de repiques sucesivos hasta la adaptación del metabolismo de los microorganismos en el nuevo medio.

Para la selección de las colonias, se tuvo en cuenta: la estabilidad morfológica y que estuviera libre de cualquier tipo de contaminación.

Para la selección de las colonias, se tuvo en cuenta: la estabilidad morfológica (El no presentar variación en la observación del Gram, que no hayan cambios en su textura, color, superficie y su característico olor a suelo húmedo durante el tiempo que se conservó por medio de transferencias periódicas) y que estuviera contaminación.

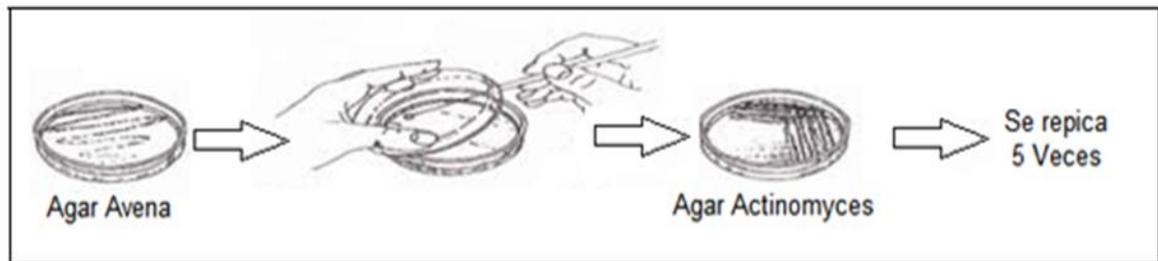


Figura 1. Esquema Adaptación de colonias en Agar Actinomyces. Fuente: Autoras

6.2 Pruebas Preliminares

Para verificar las características macroscópicas y microscópicas de las colonias en estudio y su identificación dentro de los géneros de *Nocardia*, *Thermomonospora* y *Streptomyces* se lleva a cabo las siguientes pruebas preliminares:

6.3 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

Se realiza una observación de las características macroscópicas de cada una de las colonias en estudio, como lo son su textura, color, forma, superficie y borde. Teniendo en cuenta que las características más representativas de los actinomicetos son su olor fuerte a tierra húmeda, ser adheridas al agar y algunas de color blanco, o colores oscuros. (Franco C., 2008)

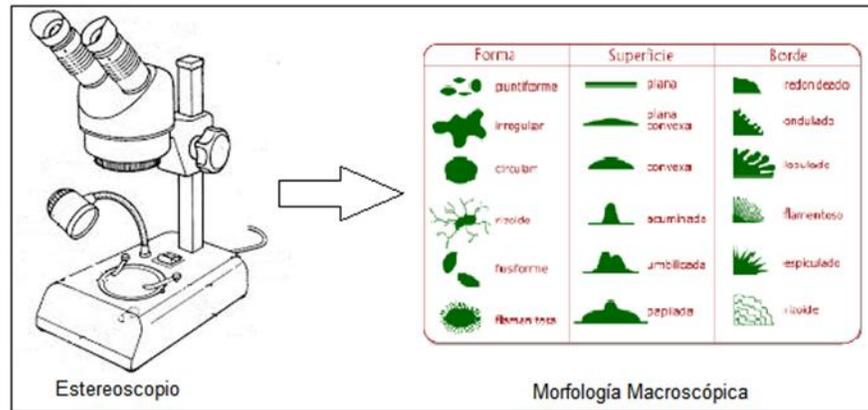


Figura 2. Esquema Metodología de observación macroscópica. Fuente: Autoras

6.4 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

6.4.1 Coloración de Gram

Considerando la morfología general de los actinomicetos a nivel microscópico, se presentan en forma de cocos Gram positivos (Valdés et al., 2005). Se realiza una tinción de Gram para confirmar que las colonias en estudio sean actinomicetos.

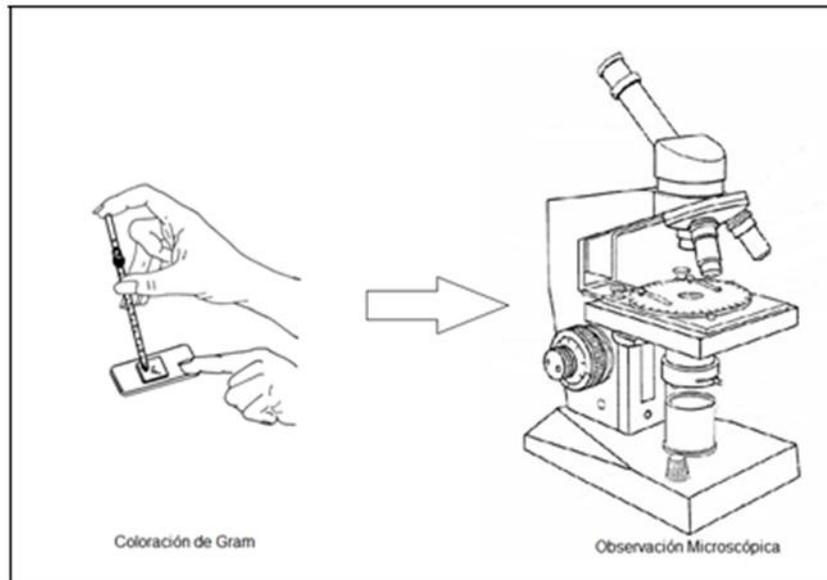


Figura 3. Esquema Metodología Coloración de Gram. Fuente: autoras

6.4.2 Microcultivo

La verificación del género de cada una de las colonias del presente trabajo se llevó a cabo por medio de la técnica de microcultivo. (Bergey, 2000)

1. Se realiza una siembra masiva de cada microorganismo en medio Actinomices (medio selectivo).
2. Se corta en forma de cuadro de 1cm de lado y 3mm de espesor con un bisturí estéril y caliente el medio de cultivo inoculado.
3. Se lleva los cuadros a un frasco tapa azul que contenga 50 mL de agua destilada estéril y se realiza agitación constante durante 15 minutos.

4. Se siembra 1mL de la solución del frasco tapa azul a la caja de Petri del punto anterior, por superficie y se agita para homogenizar la siembra.
5. Se realiza de nuevo el corte en forma de cuadros en la caja que contiene medio de cultivo Actinomices inoculado en el punto anterior.
6. Se coloca el cuadro de medio Actinomices inoculado en un portaobjeto que esta sobre dos palillos en una caja de Petri (previamente esterilizada).
7. Se coloca sobre el Agar un cubreobjetos y se presiona ligeramente para que se adhiera al medio.
8. Se coloca una mota de algodón humedecido con agua destilada estéril en un extremo de la caja de Petri para mantener la humedad.
9. Se incuba la caja a 28°C durante 10 días.
10. Se realizan observaciones los días 3, 5 y 7. Realizando tinción de Azul de Lactofenol al Agar y el cubreobjeto, y tinción de Gram al portaobjeto.
11. Se comparan la estructura miceliales de los días mencionados anteriormente y se comparan con la clave taxonómica de Bergey 2000. (Identificación de género parcial). (Ordoñez C.; Salazar A., 2013).

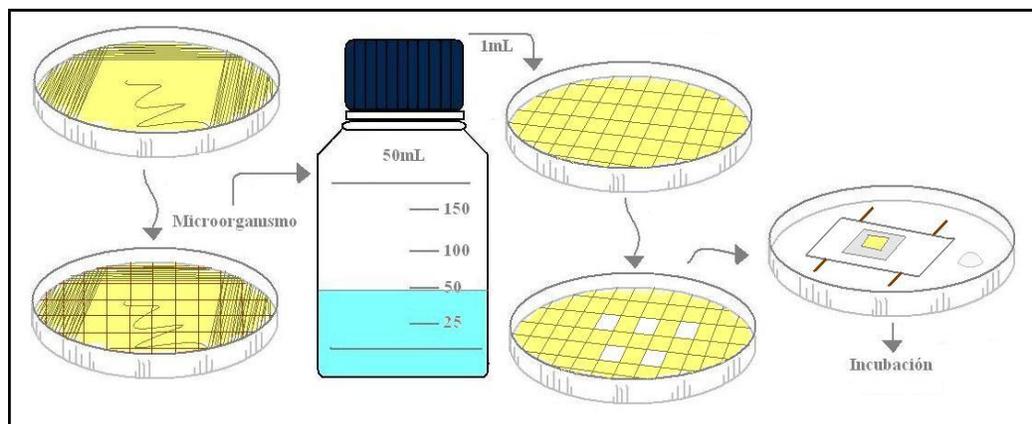


Figura 4. Esquema general Microcultivo (Fuente: (Ordoñez C.; Salazar A., 2013)).

6.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Los ensayos bioquímicos son pruebas que se desarrollan para demostrar en forma clara características bioquímica como presencia o ausencia de una actividad enzimática, grupo de enzimas o vías metabólicas, a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

A partir de las características bioquímicas que se evidencian con la aplicación de estas pruebas, se logra la identificación en género de microorganismos mediante comparación de similitudes con características bioquímicas que han sido reportadas, (MacFaddin, 2000).

A continuación se hace una descripción de las pruebas bioquímicas básicas que se realiza para corroborar las colonias en estudio.

6.5.1 Prueba de la Oxidasa

Al ser la mayoría de los actinomicetos aerobios estrictos, la prueba de la Oxidasa permite poner de manifiesto el sistema citocromoxidasa, que se encuentra en

organismos de este tipo. Para ello se usó el método directo en donde se adiciona una gota del reactivo de Kovacs sobre las colonias en medio Actinomices. El resultado es positivo si se produce una reacción de color violeta a los pocos segundos, (Bailón, 2003).

6.5.2 Prueba de la Catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias que contienen citocromo. Para ello se deposita una gota de Peróxido de Hidrógeno al 30% sobre un portaobjetos y haciendo uso de un asa de argolla se deposita sobre el reactivo la masa bacteriana. El resultado será positivo si se observa la producción de pequeñas burbujas como resultado de la degradación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, (Bailón, 2003).

6.5.3 Reducción de Nitratos

Algunas enterobacterias como los Actinomicetos tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos. Ésta es una característica utilizada para la identificación y diferenciación de muchas especies, (Bailón, 2003). Para poner en manifiesto esta capacidad, se inocula las colonias en Caldo Nitratos contenido en tubos de ensayo y se incuba a 28°C durante 10 días. Transcurrido este tiempo se evalúa la capacidad reductora de Nitratos con la adición de 3 gotas de α -naftilamina y 3 gotas de ácido sulfanílico observando como resultado positivo una coloración roja a los 30 segundos, (MacFaddin, 2000).

6.5.4 Hidrólisis de Urea

Pone de manifiesto la actividad de la enzima ureasa que poseen ciertos microorganismos, para degradar la urea en dos moléculas de amoníaco. Para ello se inocula la colonia en Caldo Urea contenido en tubos de ensayos y se incuba a 28°C durante 10 días. Si la Hidrólisis por producción de ureasa es Positiva el medio se torna color rosa fucsia; Si el medio torna a una coloración amarilla es Negativo, (Bailón, 2003).

6.5.5 Prueba de la Caseína

Se utiliza para comprobar la actividad proteolítica de ciertos microorganismos, es decir, su capacidad para degradar proteínas, como lo es en este caso la Caseína. Para ello, se inocula la colonia por punción o picadura haciendo uso de la asa de punta sobre el Agar Calcio Caseína y se incuba a 28°C durante 10 días. Finalizado el tiempo de incubación se evidencia un halo de transparencia alrededor de las colonias que presenten actividad proteolítica, sino se produce este halo el resultado de la determinación es negativo, (Bailón, 2003).

6.5.6 Hidrólisis de Gelatina

La hidrólisis de Gelatina determina la capacidad de un organismo de producir enzimas proteolíticas, estas enzimas se denominan gelatinazas las cuales son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas. El catabolismo de las proteínas por las gelatinazas se da en dos etapas la primera origina polipéptido y posteriormente estos se desdoblan en aminoácidos individuales, (Bailón, 2003). Para evidenciar esta capacidad se usa Medio Gelatina en tubos de ensayo y se inocula la colonia por picadura usando asa de punta, finalmente se incuba a 28°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo, se lleva los tubos a refrigeración durante

15 minutos y se observa la consistencia del medio, si este es líquido indica la presencia de enzimas proteolíticas, (MacFaddin, 2000).

6.5.7 Prueba de Citratos Simmons

Determina si el organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y compuesto amoniacales como única fuente de nitrógeno. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones de amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, (Bailón, 2003). Para este caso, se emplea el Agar Simmon's Citato en tubos de ensayo de forma inclinada, se inocula la colonia sembrando por estría usando asa de argolla y se incuba a 28°C durante 10 días. Un color azul en el medio indica que la prueba es positiva, si permanece el color café verdoso del medio es negativa, (MacFaddin, 2000).

6.5.8 Crecimiento anaerobio

Adicional a la caracterización Bioquímica, existen pruebas que pueden brindar mayor información acerca del comportamiento y las características de las colonias aisladas. Una de ellas es la evaluación del crecimiento en condiciones anaerobias, para ello se realizaron cámaras de anaerobiosis, observando al final de la incubación si hubo crecimiento o no de los microorganismos en estudio, (Rodríguez 2010).

6.6 CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS A CONSERVAR

Se selecciona una caja inoculada de la cual se toma una colonia representativa con el asa previamente esterilizada en mechero, esta colonia se lleva a un frasco

tapa azul que contiene agua destilada estéril la cual se agita en vortex, posteriormente se toma de esta suspensión llamada solución madre, 1ml, los cuales se adicionan a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril, a este tubo se realiza una agitación en vortex, el cual es rotulado como dilución 10^{-1} , de esta dilución se toma 1ml que se lleva a otro tubo, el cual también contiene 9 ml de agua destilada estéril se lleva a vortex de nuevo y esta sería la dilución 10^{-2} y así sucesivamente se realizan las diluciones que se consideren necesarias, en este caso se realizaron diluciones hasta 10^{-8} . De cada tubo se realiza una siembra por superficie de 0.1ml por triplicado en agar actinomyces, luego de realizar todas las siembras Se lleva a incubar a 28°C y se realiza un conteo desde el día 3 hasta el día 7 para determinar la concentración a utilizar eligiendo una dilución dónde el número de colonias no varíe significativamente, permitiéndose un rango de 10 a 15 colonias de diferencia entre las cajas de una misma dilución. (Ramírez, L 2000)

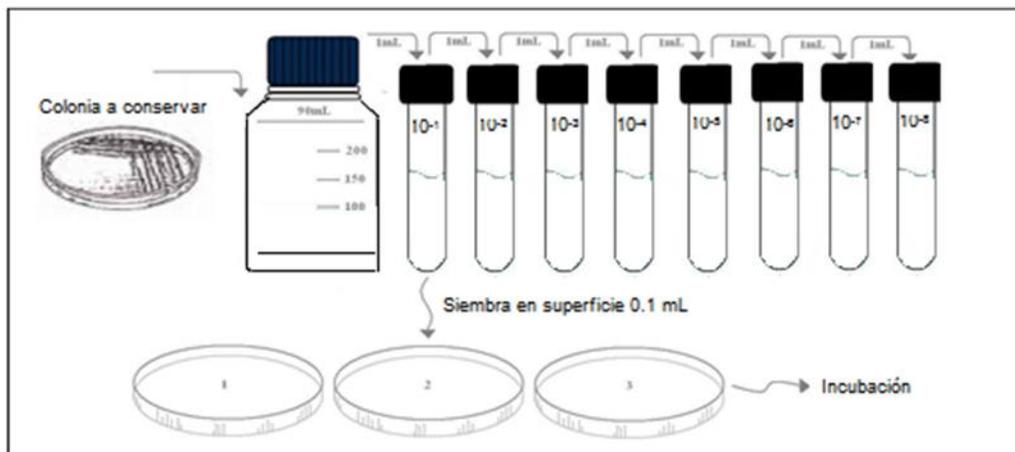


Figura 5. Esquema de Unidades Formadoras de Colonia. Fuente: Autoras

6.7 METODOLOGÍA PARA LA CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN EN GLICEROL

Luego de seleccionar la concentración por el método de UFC se toma una de las cajas de concentración conocida y se le realiza un trozado con un bisturí completamente estéril utilizando mechero y alcohol, el contenido de la caja es incorporado a un frasco tapa azul el cual contiene 100ml de una solución previamente esterilizada de glicerol al 10%, luego de hacer una homogenización para desprender los microorganismos del agar en vortex, se empieza a adicionar 0.3ml en cada uno de los eppendorff estériles correspondientes, luego son llevados a tres temperaturas diferentes 4°C, -10°C, y -20°C por un tiempo de 2 meses. (Modificado de Sánchez C., 2005)

Para las temperaturas de -10°C, y -20°C se le realizó un escalonamiento (Llevar los eppendorff por una hora a 4°C, luego pasarlos a -10°C por el mismo periodo de tiempo y por ultimo llevarlos a -20°C), se realiza para que no haya un daño en el microorganismo con un cambio brusco de temperatura. (Autoras)

NOTA2: Las variables de tiempo y temperatura para la conservación y preservación las define el analista.

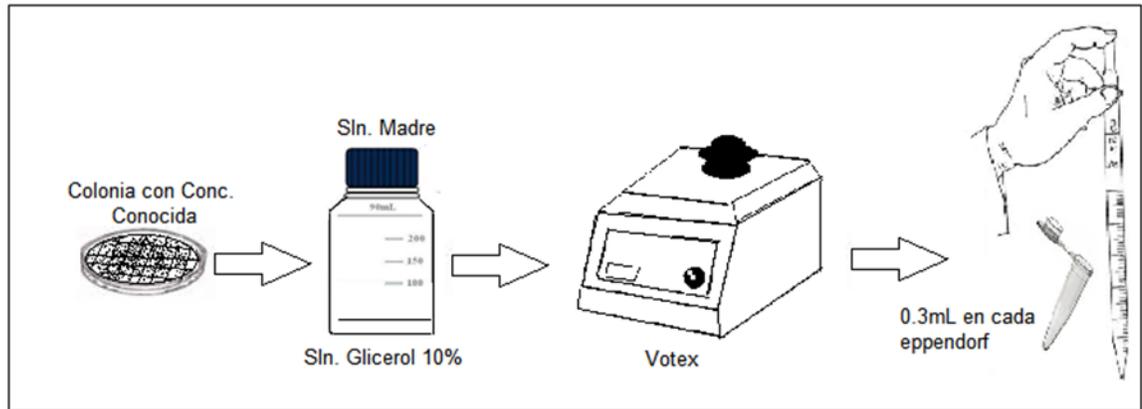


Figura 6. Esquema Conservación por congelación en Glicerol 10%

6.8 METODOLOGÍA EN DISCOS DE PAPEL FILTRO SEMISTOCK

Luego de haber seleccionado la concentración adecuada por el método de UFC se toma una de las cajas de la cual ya se ha obtenido la concentración y se le realiza un trozado con un bisturí completamente estilizado con mechero y alcohol, el contenido de la caja es adicionado a un frasco tapa azul el cual contiene 100ml de una solución de agua destilada estéril, luego de hacer una buena homogenización para desprender los microorganismos del agar en vortex, se empieza a adicionar a cada vial 4 papeles whatman #4 (fisher p8 #604) con un diámetro de 0.6cm estériles y 0.1ml de la solución homogenizada, los viales son tapados y llevados a la nevera a una temperatura de 4°C por un tiempo de 2 meses. (Modificado de Parra-Perez, 2006).

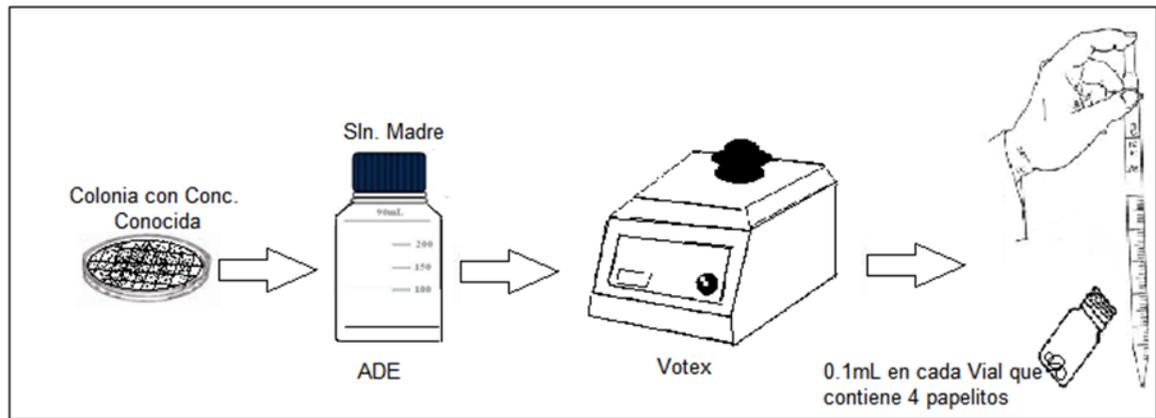


Figura 7. Esquema conservación por Discos de Papel Semistock. Fuente: Autoras

6.9 RECUPERACIÓN DEL MICROORGANISMO

6.9.1 Para la metodología de congelación en glicerol al 10%

6.9.1.1 Descongelación

Se retira el eppendorf del congelador, se verifica que esté bien cerrado, y se lleva a un baño termostático de 30°C por 10 minutos, para lograr un equilibrio térmico. (Modificado de Angel, 2006)

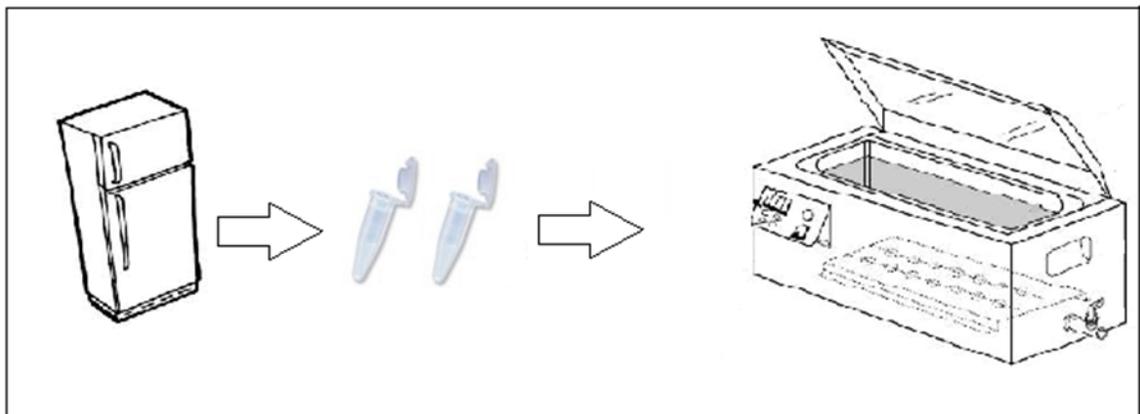


Figura 8. Esquema Descongelación Fuente: Autoras

6.9.1.2 Siembra

Después de retirado el eppendorf del baño termostático (Descongelación), posteriormente se realiza una siembra por superficie, tomando 0.1 ml de la suspensión del eppendorf, en medio de cultivo Actinomices, selectivo para actinomicetos, se lleva a incubación a 28°C durante 7 días. (Adaptado de Martínez 2009).

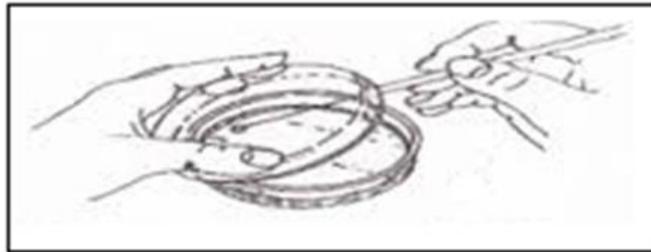


Figura 9. Esquema Siembra por superficie (Recuperación) Fuente: Autoras

6.9.2 Para la metodología de Discos de Papel Flitro Semistock

Se retira el vial del refrigerador, y se deja 15 minutos hasta alcanzar temperatura ambiente. Posteriormente con una pinza estéril se toma un disco de papel y se ubica en el centro de la caja Petri que contiene medio de cultivo Actinomyces, se lleva a incubación a 28°C durante 7 días. (Autoras)

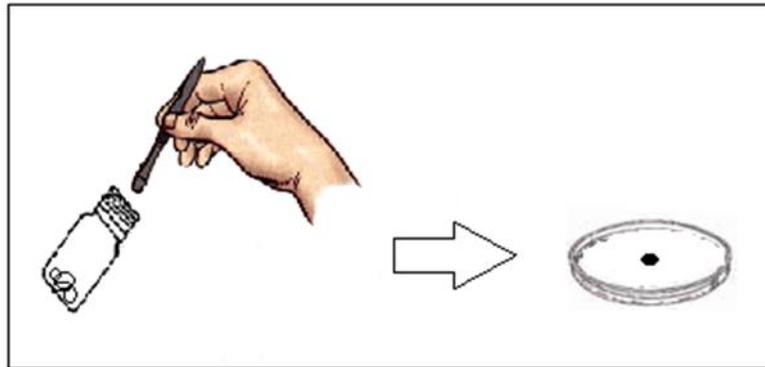


Figura 10. Esquema de Recuperación. Fuente: Autoras

6.10 PRUEBAS POSTERIORES

Se confirmará las características macroscópicas de las colonias: secas, adheridas al agar, colores tierras: grisáceos, café, negro, olor a tierra húmeda y morfología microscópica por coloración de Gram (presencias de cocos Gram positivos), microcultivos (observándose filamentos ramificados, crecimiento micelar) y Pruebas bioquímicas básicas para actinomicetos. (Bergey 2005).

En la figura 11, En el siguiente diagrama se observa la metodología del presente trabajo.

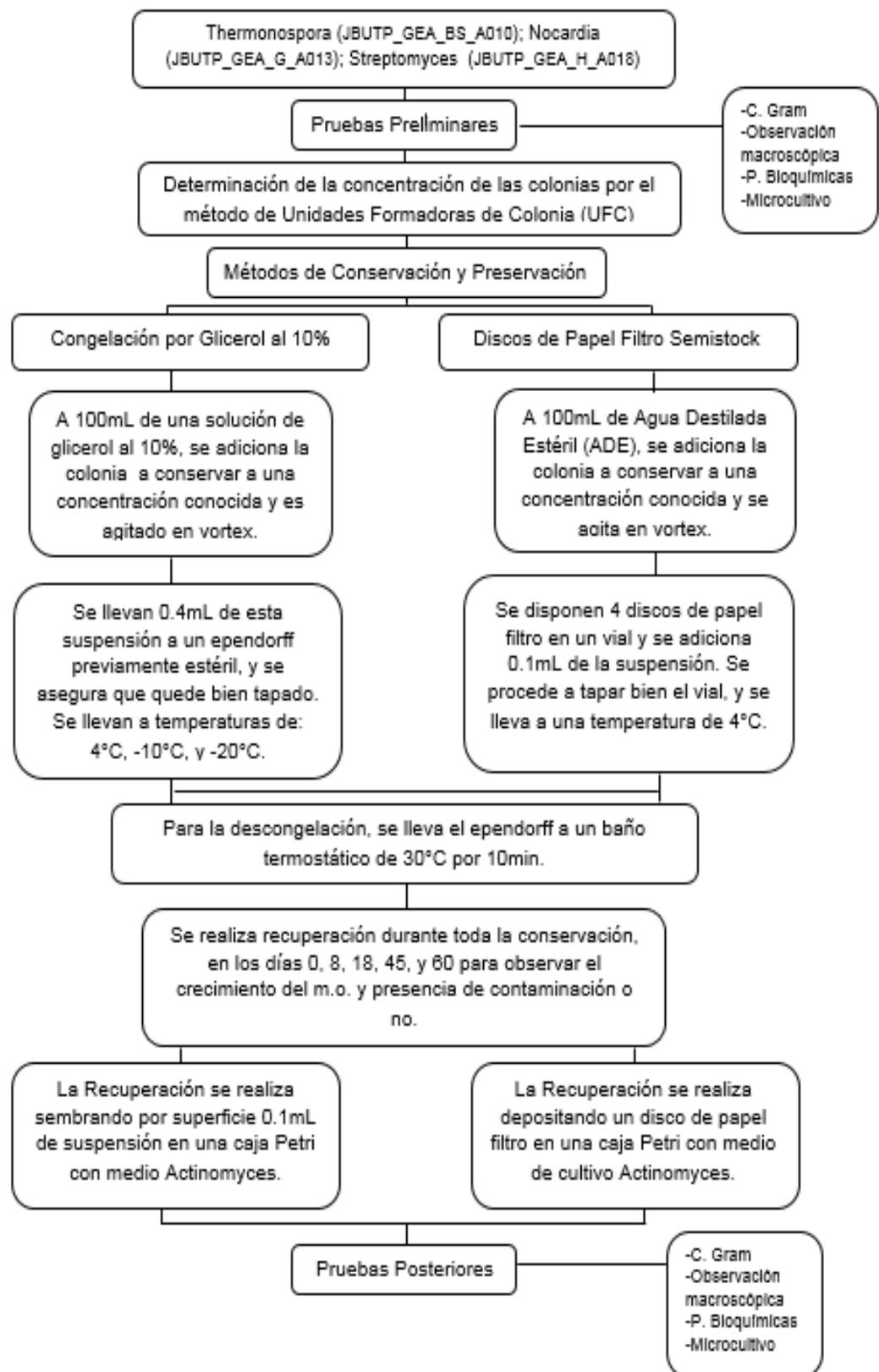


Figura 11. Diagrama de metodología

Materiales y Equipos

- Cabina de seguridad biológica C4, modelo FLC 120 (Cali, Valle del Cauca; Colombia).
- Incubadora con Temperatura controlada de 28°C, VELP Scientifica, modelo FOC 225 i
- Incubadora con temperatura controlada de 35°C, MLW, NURFÜR 110 v~, Tipo BSU 3, Numero 74089
- Autoclave JP SELECTA, Número de Serie 0464704
- Autoclave MODEL 25X-1
- Microscopio LEICA DM500, CH-9435 Heerbrugg (Switzerland)
- Estereoscopio UNICO ZM181HF
- Balanza analítica OHAUS, modelo PA214 (Lindavista, México D.F, México).
- Vortex Fisher Scientific (Barrington, Illinois, USA)

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

Las cepas en estudio son de 3 géneros que se identificaron en el proyecto “Clasificación de Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación”; para el presente trabajo de investigación se hace uso de las siguientes colonias de actinomicetos: *Streptomyces*, *Nocardia* y *Thermomonospora*.

Tabla 1. Código de las colonias en estudio.

| Colonia | Código |
|------------------------|-------------------|
| <i>Thermomonospora</i> | JBUTP_GEA_BS_A010 |
| <i>Nocardia</i> | JBUTP_GEA_G_A013 |
| <i>Streptomyces</i> | JBUTP_GEA_H_A018 |

7.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS COLONIAS POR EL MÉTODO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA

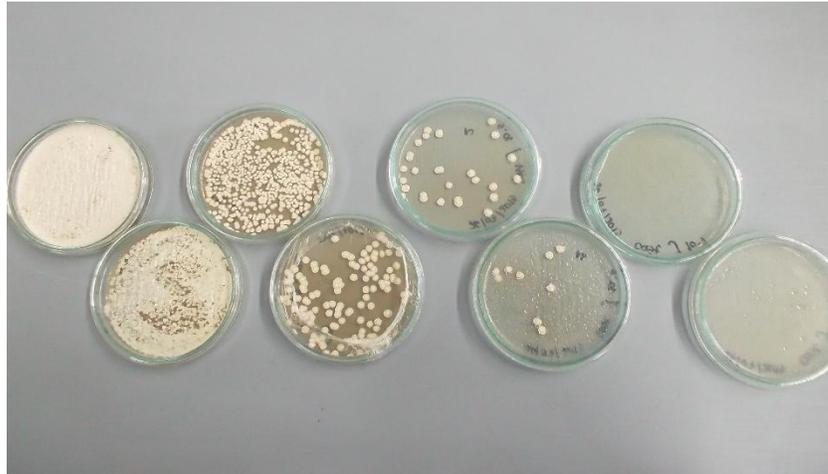


Figura 12. Unidades Formadoras de Colonia (UFC) (Fuente: Autoras)

Dada la variabilidad del tamaño de las colonias en el momento de realizar la preservación y conservación, se establece tomar para la cuantificación de las UFC, colonias de aproximadamente 0.3mm de diámetro.

En las siguientes tablas se presentan las concentraciones en UFC según la dilución, para cada una de las colonias.

Tabla 2. Concentración para la colonia de Nocardia.

| Dilución \ Colonia | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| JBUTP_GEA_G_A013 | INC | INC | 260 | 34 | 2 | 0 | 0 | 0 |

En la tabla 2. La casilla subrayada muestra la concentración utilizada para la preservación y conservación de la colonia *Nocardia*.

Tabla 3. Concentración para la colonia de *Thermomonospora*.

| Dilución | 10⁻¹ | 10⁻² | 10⁻³ | 10⁻⁴ | 10⁻⁵ | 10⁻⁶ | 10⁻⁷ | 10⁻⁸ |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Colonia | | | | | | | | |
| JBUTP_GEA_BS_A010 | INC | INC | INC | 144 | 25 | 5 | 0 | 0 |

En la tabla 3. La casilla subrayada señala la concentración usada para la preservación y conservación de la colonia *Thermomonospora*.

Tabla 4. Concentración para la colonia de *Streptomyces*.

| Dilución | 10⁻¹ | 10⁻² | 10⁻³ | 10⁻⁴ | 10⁻⁵ | 10⁻⁶ | 10⁻⁷ | 10⁻⁸ |
|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Colonia | | | | | | | | |
| JBUTP_GEA_H_A018 | INC | INC | INC | 102 | 16 | 0 | 0 | 0 |

En la tabla 4. La casilla subrayada señala la concentración usada para la preservación y concentración de la colonia *Streptomyces*.

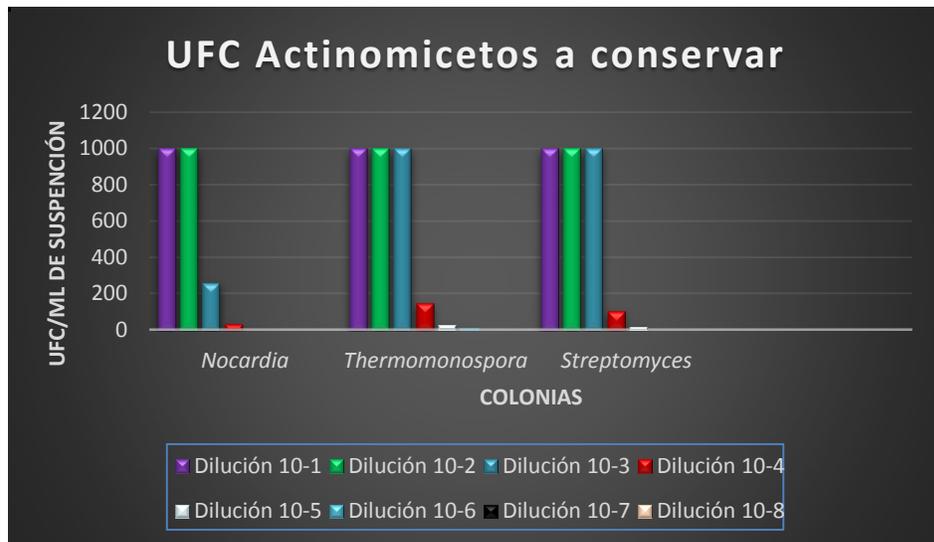


Figura 13. Gráfico de la Concentración de los actinomicetos por el método de UFC

Según el gráfico (1) se observa que las Unidades Formadoras de Colonias en las diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} tanto la *Nocardia* como la *Thermomonospora* y la *Streptomyces* son incontables. A su vez, se observa que las concentraciones de las diluciones de 10^{-5} a 10^{-8} no evidencian crecimiento alguno.

Por ello se decidió tomar la concentración más significativa para cada colonia, obteniendo para la *Thermomonospora* la concentración de 10^{-4} , para la *Nocardia* la concentración de 10^{-3} y para la *Streptomyces* una concentración de 10^{-4} .

Este procedimiento se realizó para conocer el número de colonias que se iban a preservar y conservar.

7.3 CONSERVACIÓN POR EL MÉTODO DE CONGELACIÓN EN GLICEROL AL 10%

Para esta metodología se realizó una siembra por superficie con la suspensión inicial (madre) que se utilizó para llevar a cabo la conservación. Esta siembra se realizó en el día 0, de la cual se hizo un transferencia periodica posterior como se observara a continuación, es decir antes de llevar los ependorff a las diferentes temperaturas en las que se mantuvieron durante la investigación. Se realizó para evidenciar la forma de crecimiento, y observar que no se presentaba ninguna variación en las diferentes recuperaciones que se hicieron durante la conservación teniendo como base esa primera siembra, la cual se le dio el nombre de control.

Se realizaron recuperaciones para evaluar la conservación del microorganismo, es decir que el microorganismo no varíe su morfología tanto macroscópica como microscópica; además asegurar ausencia de contaminación.

Estas pruebas se realizaron durante el escalonamiento de temperatura, y en los días 8, 17, 45, y 60, dónde se obtuvieron resultados iguales al control.



Figura 14. Controles

Se observa durante todas las siembras de recuperación que no existe ningún tipo de contaminación, puesto que sus características tales como: color, forma, textura, no varían; además su olor a suelo húmedo siempre está presente.

Al realizar una transferencia periódica del microorganismo recuperado, se logra evidenciar una morfología macroscópica como microscópica igual a la inicial, sin ninguna alteración.

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos en la recuperación del día 0 y día 60.

Tabla 5. Resultado de la recuperación.

| Colonia | 0 | 60 |
|--|--|---|
| Thermonospora (JBUTP_GEA_BS_A010) |  |  |
| Nocardia (JBUTP_GEA_G_A013) |  |  |



La tabla 5. Hace referencia para cada una de las temperaturas. Realizándose siembras por triplicado para cada colonia a 4°C como en -10°C y -20°C.

7.4 PRUEBAS DE VIABILIDAD PARA EL MÉTODO DE CONGELACIÓN EN GLICEROL AL 10%

Se realizan con el fin de tener el registro de las características macroscópicas, microscópicas (micro cultivos, coloración de Gram) y pruebas bioquímicas de cada una de las colonias antes de realizar la preservación y conservación.

7.4.1 Observación macroscópica

Según libro “The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Vol.3” las colonias de actinomicetos, se caracterizan por ser adheridas al agar, polvorosas, secas y de colores entre blanco grisáceo, crema, colores tierra y negro; además presentan un olor típico a suelo húmedo debido a la producción de un metabolito llamado geosmina. Se tiene en cuenta en la observación macroscópica, forma, borde, superficie y color.

Tabla 6. Observación macroscópica de las colonias en estudio.

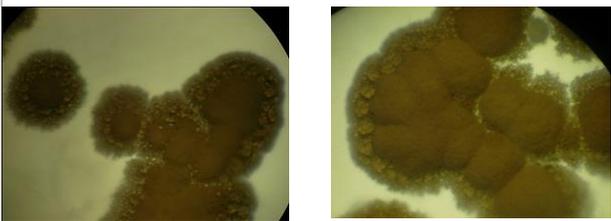
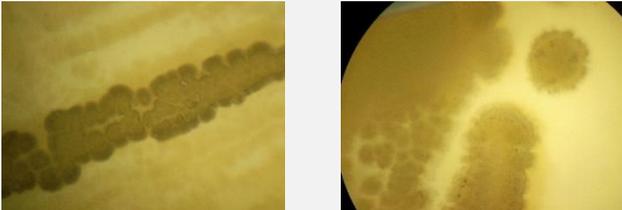
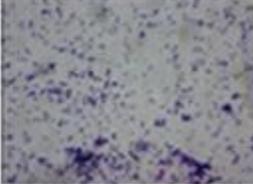
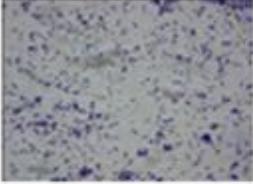
| Colonias | Descripción |
|--|--|
| <p>Nocardia (JBUTP_GEA_G_A013)</p> <p><i>INICIAL</i> <i>FINAL</i></p>  | <p>Colonias secas adheridas al agar, anverso amarillo ocre, de forma irregular, de superficie convexa, borde filamentosos.</p> |
| <p>Thermomonospora (JBUTP_GEA_BS_A010)</p> <p><i>INICIAL</i> <i>FINAL</i></p>  | <p>Colonias secas adheridas al agar, anverso ocre Duero, de forma circular, superficie umbilicada, borde lobulado.</p> |
| <p>Streptomyces (JBUTP_GEA_H_A018)</p> <p><i>INICIAL</i> <i>FINAL</i></p>  | <p>Colonias adheridas al agar, anverso café, de forma irregular, superficie plana convexa, borde espiculado.</p> |

Tabla 7. Observación microscópica de Coloración de Gram de las colonias en estudio, Comparación de los resultados iniciales y finales

| Gram | Descripción |
|--|---|
| <p data-bbox="423 489 878 527">Nocardia (JBUTP_GEA_G_A013)</p> <p data-bbox="440 541 553 573"><i>INICIAL</i></p>  <p data-bbox="748 541 841 573"><i>FINAL</i></p>  | <p data-bbox="976 527 1425 709">Cocos y cadena de estreptococos, con algunas agrupaciones de estafilococos en algunas partes de la placa. Gram +</p> <p data-bbox="1187 730 1203 762">+</p> |
| <p data-bbox="488 905 813 984">Thermomonospora (JBUTP_GEA_BS_A010)</p> <p data-bbox="472 1010 586 1041"><i>INICIAL</i></p>  <p data-bbox="716 1010 813 1041"><i>FINAL</i></p>  | <p data-bbox="987 1041 1414 1121">Se presentan agrupaciones de estafilococos Gram +</p> |
| <p data-bbox="402 1398 911 1436">Streptomyces (JBUTP_GEA_H_A018)</p> <p data-bbox="467 1436 581 1467"><i>INICIAL</i></p>  <p data-bbox="727 1436 824 1467"><i>FINAL</i></p>  | <p data-bbox="997 1482 1386 1514">Cocos y diplococos Gram +</p> |

Después de realizar la conservación y preservación se realizó una observación macroscópica, para evidenciar una posible alteración en las colonias. *Nocardia* (JBUTP_GEA_G_A013), *Thermomonospora* (JBUTP_GEA_BS_A010) y *Streptomyces* (JBUTP_GEA_H_A018). Al ubicarlas en el estereoscopio, se puede afirmar que las colonias no presentan cambios que pueden apreciarse a simple vista presentando las mismas características iniciales como se observa en la tabla 2.

7.4.2 Observación microscópica por coloración de Gram

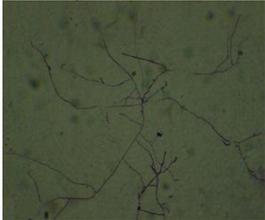
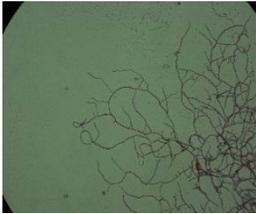
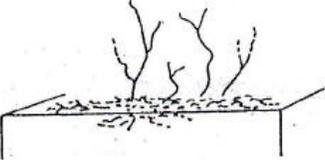
Los actinomicetos, se caracterizan por ser Gram positivos, con una morfología de cocos y agrupación de cadenas de cocos (Valdés et al., 2005).

Para la colonias *Nocardia* (JBUTP_GEA_G_A013), *Thermomonospora* (JBUTP_GEA_BS_A010), y *Streptomyces* (JBUTP_GEA_H_A018) se puede observar una coloración de Gram Positiva (+), su morfología es de cocos y cadenas de cocos (estreptococos), No se evidencia ningún cambio en la morfología microscópica de estas colonias, lo que indica ausencia de algún tipo de contaminación, tomando como referencia las observaciones que se realizaron al iniciar la conservación.

7.4.3 Microcultivos

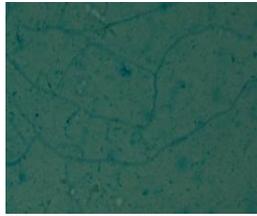
Por medio de la técnica de Ridell, en el Microcultivo, se puede observar el crecimiento del micelio aéreo de los Actinomicetos al generarse cultivos sobre un cubreobjetos y portaobjetos. (Rodríguez, 2010).

Tabla 8. Descripción microscópica de microcultivos de las colonias en estudio.

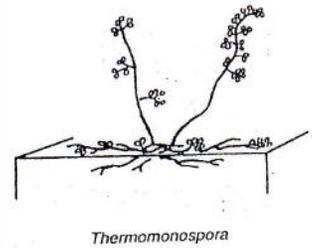
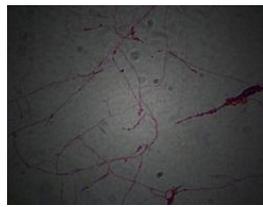
| Colonia | Microcultivos | | Clave Taxonómica de Bergey's |
|---------------------------------------|---|--------------------|--|
| | Gram | Azul de lactofenol | |
| <i>Nocardia</i> (JBUTP_GEA_G_A013) | INICIAL | |   |
| | FINAL | | |
| |   | |  <i>Nocardia</i> |
| | <p>Crecimiento miceliar vegetativo, ramificaciones fragmentadas sin presencia de conidióforos, ni conidios. Se observa claramente semejanza con la taxonomía en el manual de Bergey's</p> | | |

Thermomonospora (JBUTP_GEA_BS_A010)

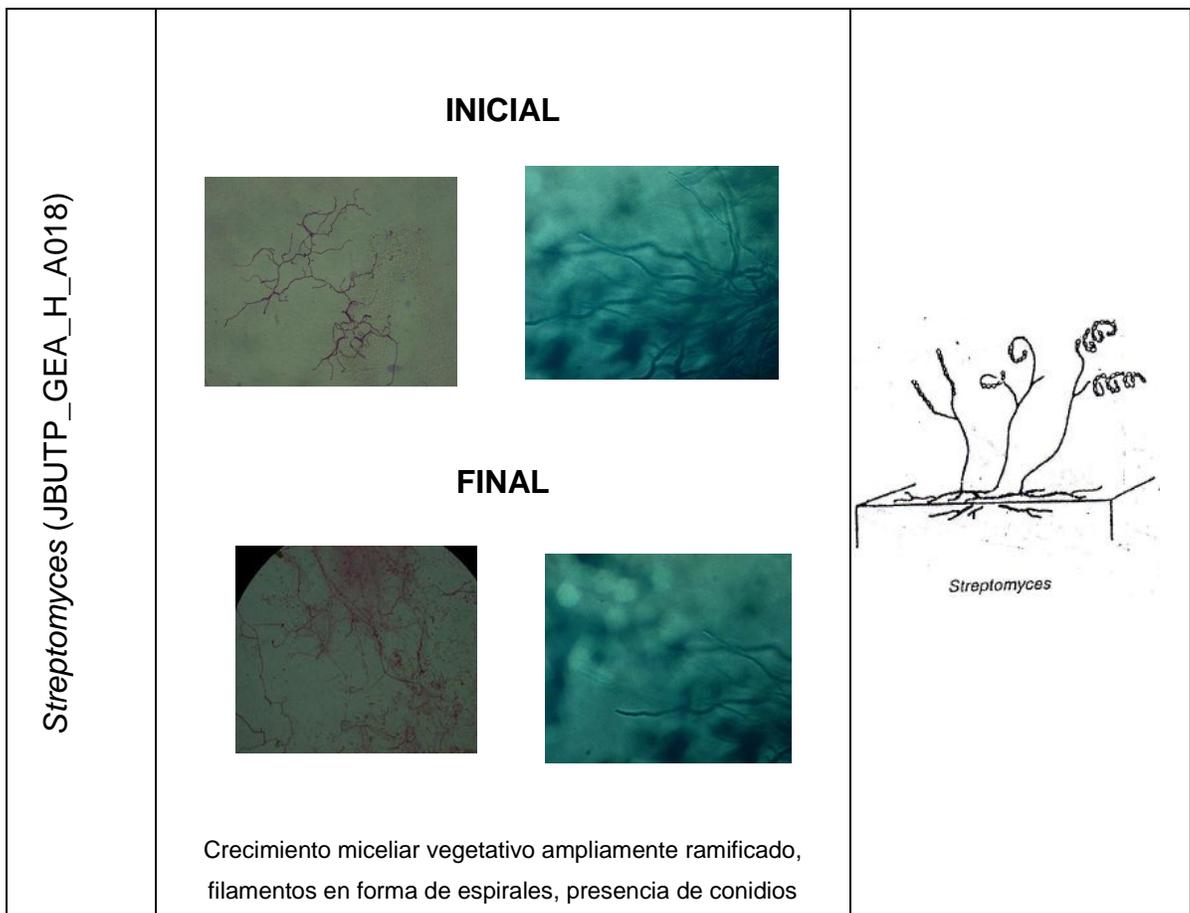
INICIAL



FINAL



Amplio crecimiento micelial vegetativo, se observa ramificaciones fragmentadas no septadas, presencia de conidios en algunas fragmentaciones.



Posterior a la conservación se observa que para la colonia *Nocardia* (JBUTP_GEA_G_A013) al realizar la técnica de microcultivos, tiene un crecimiento, ramificación septada, para la colonia *Thermomonospora* (JBUTP_GEA_BS_A010) conservo los conidios propios de dicho género y para *Streptomyces* (JBUTP_GEA_H_A018) presenta pequeñas espirales característico de la *streptomyces*, concluyendo que en el trascurso de la preservación y conservación no presentaron cambios, conservando las características propias de cada género de actinomicetos ya descrito.

7.4.4 Pruebas Bioquímicas

Debido a que se llevó acabo un cambio de medio de cultivo de agar avena a Actinomyces (Selectividad para actinomicetos), se decidió realizar pruebas bioquímicas para asegurar que la colonia no haya sufrido algún cambio o contaminación. (Autoras)

Tabla 9. Resultado de Pruebas Bioquímicas para el método de congelación en Glicerol 10% estudiado al inicio y posteriores a la preservación y conservación.

| Colonia | <i>JBUTP_GEA_BS_A010</i> | <i>JBUTP_GEA_G_A013</i> | <i>JBUTP_GEA_H_A018</i> |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Bioquímica | | | |
| Catalasa | - | + | + |
| Oxidasa | - | - | - |
| Citratos | + | + | + |
| Urea | + | - | + |
| Gelatina | - | + | + |
| Caseína | - | - | + |
| Anaerobia | - | - | - |

Se realizaron pruebas bioquímicas para observar si hubo algún cambio en las colonias conservadas durante 2 meses.

Se observa en la tabla de resultados que no hubo ningún cambio se logra evidenciar que en el transcurso del trabajo no se presentó ningún tipo de alteración ni contaminación.

Dichas pruebas ponen en manifiesto vías metabólicas o actividades enzimáticas propias de los microorganismos lo cual ayuda a garantizar que no existe ningún tipo de contaminación. (MacFaddin, 2000).

7.5 CONSERVACIÓN POR EL MÉTODO DE DISCOS DE PAPEL FILTRO SEMISTOCK

A continuación, se mostrarán los resultados de las recuperaciones.

Para esta metodología se realizó una siembra del disco de papel filtro en el centro de la caja Petri, con la suspensión inicial que se utilizó para llevar a cabo la conservación. Esta siembra se realizó en el día 0, es decir antes de llevar los viales a 4°C, que fue la temperatura a la cual se mantuvieron las colonias durante la investigación. Se realizó para evidenciar la forma de crecimiento, y observar que no se presentaba ninguna variación en las diferentes viabilidades que se hicieron durante la conservación teniendo como base esa primera siembra, la cual se le dio el nombre de control.



Figura 15. Control vs. Viabilidad para una de las colonias estudiadas.

Durante las recuperaciones se observó que no hubo ningún cambio en las características iniciales de las colonias, conservándose; sin necesidad de realizar una transferencia periódica, ya que el método permite observar directamente la morfología de cada una de las colonias. Así mismo se pudo evidenciar olor a suelo húmedo característico de estas.

Tabla 10. Resultado de la concentración durante las recuperaciones para método de Discos de Papel Filtro Semistock

| | Viabilidad (día) 0 | 60 |
|--|--|---|
| Colonia | | |
| Thermonospora (JBUTP_GEA_BS_A010) |  |  |



En cada recuperación se realizaron siembras por triplicado para cada una de las colonias conservadas a 4°C.

7.6 PRUEBAS DE VIABILIDAD PARA EL MÉTODO DE DISCOS DE PAPEL FILTRO SEMISTOCK

Posteriormente, se realiza una comparación de las características iniciales con las finales para así determinar si los microorganismos no tuvieron cambios en su morfología y su comportamiento bioquímico o presencia de contaminación.

7.6.1 Observación Macroscópica

Tabla 11. Observación Macroscópica después de la conservación

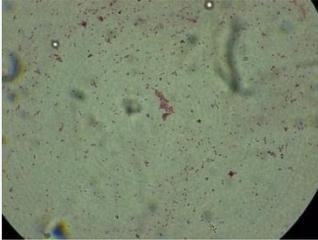
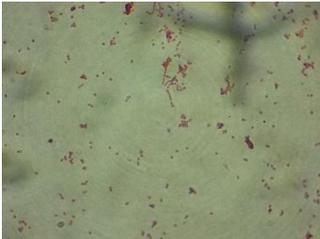
| Colonias | Descripción |
|---|---|
| <p>Nocardia (JBUTP_GEA_G_A013)</p>  | <p>Colonias secas adheridas al agar, anverso amarillo ocre, de forma irregular, de superficie convexa, borde filamentoso.</p> |
| <p>Thermomonospora (JBUTP_GEA_BS_A010)</p>  | <p>Colonias secas adheridas al agar, anverso ocre Duero, de forma circular, superficie umbilicada, borde lobulado.</p> |
| <p>Streptomyces (JBUTP_GEA_H_A018)</p>  | <p>Colonias cremosas adheridas al agar, anverso café, de forma irregular, superficie plana convexa, borde espiculado.</p> |

Nocardia (JBUTP_GEA_G_A013), *Thermomonospora* (JBUTP_GEA_BS_A010),
Streptomyces (JBUTP_GEA_H_A018)

Para las colonias en estudio, se puede observar que la morfología macroscópica durante el tiempo que se realizó la conservación por el método de discos de papel filtro semistock, no varió, ni se presentaron cambios apreciativos a simple vista.

7.6.2 Observación Microscópica por Coloración de Gram

Tabla 12. Observación de la Coloración de Gram después de la conservación.

| Gram | Descripción |
|---|--|
| <p data-bbox="354 989 850 1024">Nocardia (JBUTP_GEA_G_A013)</p>  | <p data-bbox="1008 976 1323 1062">Cocos y cadenas de estreptococos Gram +</p> |
| <p data-bbox="415 1350 789 1436">Thermomonospora (JBUTP_GEA_BS_A010)</p>  | <p data-bbox="946 1388 1385 1474">Cocos, diplococcosy algunas agrupaciones en estafilococos.</p> <p data-bbox="1110 1497 1219 1528">Gram +</p> |

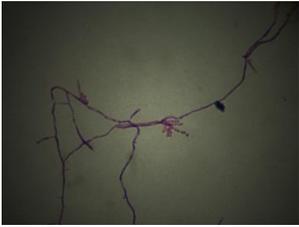
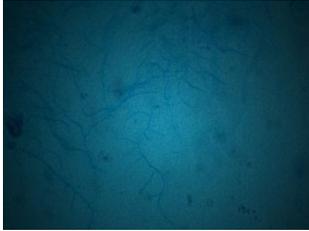
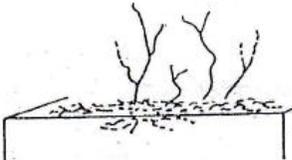
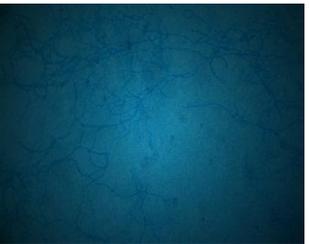
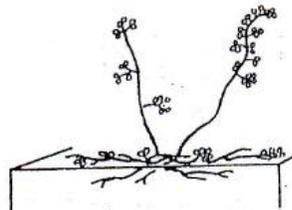
| | |
|---|----------------|
| Streptomyces (JBUTP_GEA_H_A018)  | Cocos Gram +/- |
|---|----------------|

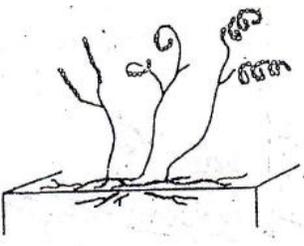
Nocardia (JBUTP_GEA_G_A013), *Thermomonospora* (JBUTP_GEA_BS_A010),
Streptomyces (JBUTP_GEA_H_A018)

Para las colonias mencionadas, se puede observar que en la coloración de Gram después de realizada la conservación por el método de discos de papel filtro semistock continua igual, teniendo en cuenta la observación realizada antes de comenzar la investigación

7.6.3 Microcultivos

Tabla 13. Observación de Microcultivos después de la conservación *Nocardia* (JBUTP_GEA_G_A013) *Thermomonospora* (JBUTP_GEA_BS_A010), *Streptomyces* (JBUTP_GEA_H_A018)

| Colonia | Microcultivos | | Clave Taxonómica de Bergey's |
|--|---|--|---|
| | Gram | Azul de lactofenol | |
| <i>Nocardia</i> (JBUTP_GEA_G_A013) |  |  |  <i>Nocardia</i> |
| <p>Crecimiento micelar vegetativo, ramificaciones fragmentadas sin presencia de conidióforos, ni conidios. Se observa claramente semejanza con la taxonomía en el manual de Bergey</p> | | | |
| <i>Thermomonospora</i> (JBUTP_GEA_BS_A010) |  |  |  <i>Thermomonospora</i> |
| <p>Amplio crecimiento micelar vegetativo, se observa ramificaciones fragmentadas no septadas, presencia de conidios en algunas fragmentaciones.</p> | | | |

| | | |
|--|---|--|
| <p style="text-align: center;">Streptomyces (JBUTP_GEA_H_A018)</p> | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p style="text-align: center;">Crecimiento miceliar vegetativo ampliamente ramificado, filamentos en forma de espirales, presencia de conidios</p> |  <p style="text-align: center;"><i>Streptomyces</i></p> |
|--|---|--|

Para las presentes colonias, se puede observar un crecimiento miceliar vegetativo, equivalente a la observación inicial, dichas características fueron iguales a la conservación por glicerol, el método utilizado para ambos metodologías fue el de Ridell.

7.6.4 Pruebas Bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para asegurar que la colonia no haya sufrido algún cambio o contaminación en el transcurso de la conservación por el método de papel. (Autoras)

Tabla 14. Resultado de Pruebas Bioquímicas para el método de Preservación en Papel Filtro al inicio y posteriores a la preservación y conservación.

| Colonia | <i>JBUTP_GEA_BS_A010</i> | <i>JBUTP_GEA_G_A013</i> | <i>JBUTP_GEA_H_A018</i> |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Bioquímica | | | |
| Catalasa | - | + | + |
| Oxidasa | - | - | - |
| Citratos | + | + | + |
| Urea | + | - | + |
| Gelatina | - | + | + |
| Caseína | - | - | + |
| Anaerobia | - | - | - |

Se realizaron pruebas bioquímicas básicas antes y después de realizar la preservación y conservación, se llevaron a cabo con el fin de presenciar cambios en el metabolismo de las colonias estudiadas.

Dichas pruebas ponen en manifiesto vías metabólicas o actividades enzimáticas propias de los microorganismos lo cual ayuda a garantizar que no existe ningún tipo de contaminación. (MacFaddin, 2000).

7.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE CADA UNO DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y PRESERVACIÓN EN ESTUDIO.

7.7.1 Ventajas del Método de Congelación en Glicerol 10%

- La utilización de un crioprotector ayuda a garantizar que no habrá ningún daño a nivel celular a temperaturas inferiores a -10°C esto es una gran ventaja en el momento de asegurar que no ha existido en la colonia ningún tipo de cambio o daño, ya que crioprotectores son sustancias que protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. (García y Uruburu, 2001; Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005)
- Las temperaturas de conservación a las cuales se realiza este método logra garantizar una completa inactividad del microorganismo además que se puede disminuir contaminación puesto que a estas temperaturas no crecen ningún tipo de microorganismos esto ayudara a que se obtenga un éxito en la conservación.
- Este es uno de los métodos que a comparación en costos con métodos a largo plazo como lo son congelación en nitrógeno es mucho más asequible, puesto que es más fácil obtener glicerol y refrigeradores que congelen a temperaturas inferiores a -10 C que refrigeradores que congelen aproximadamente -196 C y nitrógeno que es un reactivo que requiere de altos cuidados.
- La metodología para llevar a cabo esta conservación es fácil de realizar si colocamos a comparación una liofilización, o una desecación.

7.7.2 Desventajas del Método de Congelación en Glicerol 10%

- Al realizar la recuperación de la conservación por este método se debe hacer una transferencia periódica para poder hacer una observación macroscópica y esto podría generar una contaminación que no se había obtenido en el transcurso de la conservación.
- En el momento de empezar con la conservación se debe realizar un escalonamiento de temperatura para que los microorganismos no tengan un cambio brusco en sus condiciones de vida habituales porque debido a estas variables pueden ocurrir alteraciones en la célula o algún tipo de daño. Se considera como desventaja con respecto a la metodología de discos de papel filtro semistock donde no es necesario realizar un escalonamiento.
- Como método a largo plazo la congelación por glicerol es una de las conservaciones más económicas, pero con respecto al crioprotector utilizado, el glicerol es uno de los más costosos.

7.7.3 Ventajas del Método de Discos de Papel Filtro Semistock

- La temperatura a la cual se lleva a cabo la conservación por este método es de 4 C, por lo cual no es necesario tener refrigeradores que lleven a temperaturas bajo cero.
- Por medio de este método no es necesario realizar un escalonamiento de temperatura ya que el cambio de temperatura ambiente a 4°C no es tan drástico como si se fuera a llevar a conservar a temperaturas tales como -10°C y -20 C, donde en el método de congelación en glicerol al 10% si se debe llevar a cabo.
- Las observaciones macroscópicas de las colonias recuperadas por este método fueron directamente de la caja de Petri en la cual se hizo la

recuperación. No hubo necesidad de realizar una transferencia periódica para llevar a cabo dichas observaciones.

- Este método es económico ya que consta de un bajo equipamiento, materiales de fácil acceso en el mercado, como lo son los viales, papel filtro whatman, agua destilada estéril y un refrigerador común.

7.7.4 Desventajas del Método de Discos de Papel Filtro Semistock

- Debido a las condiciones en las cuales se realiza esta conservación se pueden tener altos riesgo de contaminación uno de ellos puede ser efectuado a causa de la temperatura de conservación 4°C puesto que en dicha temperatura están en etapa de latencia muchos tipos de microorganismos.
- En este método no se utiliza ningún tipo de crioprotector por lo cual la célula podría tener algún tipo de daño.

7.8 DISCUSIÓN DE SELECCIÓN

Luego de hacer las observaciones respectivas para cada uno de los métodos, se logró establecer que ambos cumplieron con los objetivos propuestos en este trabajo, las colonias conservadas no tuvieron ningún tipo de contaminación ni ningún cambio a nivel morfológico, aunque observando las ventajas y las desventajas de los dos métodos se puede considerar que el glicerol fué más óptimo en cuanto al resultado obtenido, ya que podemos observar que el crioprotector actuó muy bien en cada una de las temperaturas 4, -10, y -20°C hubo un crecimiento igual en el transcurso de los 2 meses que se hizo esta investigación, además que es uno de los métodos más usados por los bancos de cepas, fuera de la liofilización y la congelación por nitrógeno. Por supuesto sin excluir la conservación en papel filtro, pues este también obtuvo unos excelentes

resultado solo que no se escoge como método principal a causa de las dificultades en la temperatura de almacenamiento puesto que en 4°C pueden sobrevivir muchos tipos de microorganismos y puede adquirir muy fácilmente dicha contaminación.

8 CONCLUSIONES

- Se logró determinar que el método de congelación en glicerol al 10% es el método más óptimo entre los dos métodos estudiados, por sus ventajas en la utilización de un crioprotector cómo lo es el Glicerol, que ayuda a que no exista un daño en el microorganismo, además de ser uno de los más recomendados, y sin duda al mantenerse a temperaturas bajo cero la disminución en la contaminación es considerable.
- Los métodos utilizados en el estudio de conservación de Actinomicetos, presentaron buenos resultados reflejados en las viabilidades, no hubo ningún tipo de contaminación, ni ninguna alteración morfológica; dependiendo de los recursos que se obtengan, se puede elegir entre ambos tanto por el método congelación en glicerol al 10% y conservación en papel filtro semistock para posteriores trabajos o estudios con estas colonias.
- No se logró identificar la temperatura óptima debido al corto tiempo de duración de este estudio; en cada una de ellas se obtuvo los mismos resultados en el crecimiento.
- Al evaluar la viabilidad de las colonias *Nocardia* (JBUTP_GEA_G_A013) *Thermomonospora*, (JBUTP_GEA_BS_A010), *Streptomyces* (JBUTP_GEA_H_A018) a las temperaturas 4, -10, y -20°C y con respecto al tiempo, se observó que en el transcurso de 2 meses se logra obtener viabilidades en cada una de éstas temperaturas, evidenciándose crecimiento puro de las colonias en estudio.

9 RECOMENDACIONES

- Evaluar la conservación de actinomicetos con un tiempo mínimo de 6 meses para así obtener valores significativos que puedan reflejarse en una temperatura óptima.
- Realizar la conservación y preservación con otro tipo de microorganismos para evaluar la efectividad de los métodos de conservación empleados en esta investigación.
- Llevar a cabo esta investigación utilizando otro tipo de crioprotectores como la sacarosa, la lactosa o el DMSO (dimetilsulfóxido) y evaluar la efectividad que este posee.
- Utilizar colonias identificadas hasta especie para realizar el proceso de conservación, ya que al realizar las pruebas de verificación de las características iniciales deben ser 100% coherentes

10 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Ames RN. (1989). Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin-decomposing Actinomycetes, New York, 112:423-427
- Ángel D. (2006). Evaluación de Técnicas de Conservación para Hongos Filamentosos y Levaduriformes en el Cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Bailón, L; González, R; Cervantes, A; 2003. Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Universidad Autónoma de México. Facultad de Estudios superiores Zaragoza.
- Bergey's, 2005. Manual of Systematic Bacteriology.
- Brock T.D. 1998. Biology of microorganism. USA
- Castro G, Hernández JT, Aquino C. Manual sobre conservación de microorganismos. México: Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 2000:21
- Centro de investigaciones biotecnológico, 2009. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el Estado de Campeche (ITESCAM)
- Crawford, DL, JM Lynch, JM Whipps, y Ousley MA, 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen.

- Dworkin, M, 2006. Editor en jefe. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Vol.3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer Science+Business Media, LLC.
- Ezziyyani, M., Perez,C., Requena, M., Rubio, L Candela, M 2004Biocontrol por *streptomyces rochei* –ziyani-,de la podredumbre del piemiento (*capsicum annum* L.) Causada por *phytophthora capsii*. Anales de Biología 26.69-78
- Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Arg Microbiol. 1998; 30:42-51.
- Franco, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas. Universidad de Granada. Departamento de Fisiología Vegetal. Tesis Doctoral.
- García L, Scherer C, Rodríguez R. Líquidos sobre enfriados y vidrios. La ciencia para todos, biblioteca digital. Física. Fondo de Cultura Económica. México.1991.
- García, M. D.; F. Uruburu: «La conservación de cepas microbianas. Colección Microbiana de Cultivos Tipo (CECT) Universidad de Valencia, Act SEM 2000; 30:12-6.
- Hernandez, A. 2003 Microbiología Industrial. Disponible en:
<http://books.google.com.co/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA18&lpg=PA18&dq=m%C3%A9todos+de+conservacion+de+microorganismos&source=bl&ots=NZuOZKm33n&sig=21bdBQqxOWcmd0NAuHH3nIZLr->

w&hl=es&sa=X&ei=mRYEUufKOoGQ9QTUhYCwAw&ved=0CFYQ6AEwBQ
#v=snippet&q=ALICIA&f=false.

- Hill LR. Living Resources for Biotechnology. Cambridge: Cambridge Edition; 2000.
- Hubalek Z. Review. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Criobiology*. 2003; 46: 205-229.
- Kirsop B, Doyle A. 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells; a manual of laboratory methods. 2nd ed. London, Academic Press. pp-308
- Kloepper JW, Zablutowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R. (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En *The rhizosphere and plant growth*, Keister DL, Cregan PB (eds). Kluwer academic Publishers, Netherlands, pp 315-326.
- Koneman EW. (2001) *Diagnostico microbiológico: Texto y Atlas a Color*. Quinta Edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Leveau, J Y., Bouix, M 2000 *Microbiología industria: los microorganismos de interés industrial*. Acribia. Zaragoza, España
- MacFaddin, 2000. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. 3th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Estados Unidos.
- Martínez, Aidin 2009. Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril.

- McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Rev. 1994; 7: 357-417.
- Merck E. Principal's methods of microorganism's conservation. Darmstat. Merck KGAA Edition. Microbiology Manual. 2nd edition; 2000.p.407-10.
- Meza R, Monroy A, Mercado M, Poutou R, Rodríguez P, Pedroza A. Study of the stability in real time of cryopreserved strain banks. Universitas Scientiarum. 2004; 9(2):35-42
- Montañó N, Sandoval A. Camargo S, Sánchez J. Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos 77(2010) 15-23
- Ordoñez, C.; Salazar, A; 2013. Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira. Risaralda, Colombia.
- Parra S., Perez M.M., 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN)
- Ramírez, L 2000. Manual de Microbiología. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. Pereira, Colombia.
- Rodríguez, 2010. Evaluación de Etapas del proceso productivo de un Bioinsumo dirigido a la degradación de materiales orgánicos y regulación sanitaria de cultivos. Universidad Católica de Manizales. Manizales, Colombia.

- Sánchez C, 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Science, technology and innovation. Proviene de <http://www.science.oas.org/> Simbiosis; con ruta URL: http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap3_mi.pdf, ultimo día visitado: 5 noviembre 2013.
- Slideshare,[EnLínea].Available: <http://www.slideshare.net/cesarturo26/tema-2-10conservacioncepas> [Último acceso: Agosto 2013]
- Sly LI. Culture Collections World-wide. En: The biodiversity of microorganisms and the role of Microbial Resource Centres. Kirshop B, Hawksworth DL ed. Surrey: World Federation for Culture Collections Biodiversity Committee; 1994. p. 29-35.
- Smith D, Green P, Day J. Management and maintenance of culture collections. Presentado en: Curso Taller Internacional sobre gerencia y mantenimiento de colecciones de cultivos. Instituto de Sueros y Vacunas Finlay. La Habana. 2000:22.
- Snell JJS. General introduction to maintenance methods. In: Kirsop BE, Doyle A, eds. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London: Academic Press. 1991:21-30.

- Snell J.J. General Introduction to Maintenance Methods. Maintenance of Microorganisms and cells. 2nd edition. London: B.E. Kirsop and A. Doyle (eds); 2001.
- Stanley, Y. 1994. The Family Streptomycetaceae. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore USA: USA: Ed. Williams & Wilkins. pp. 2344-2347
- Tello, J.; C.; Vares, F.; Lacasa, A.; 1991. Análisis de muestras. En: Manual de laboratorio. Diagnóstico de Hongos, bacterias y nemátodos patógenos, 5: 81-82. MAPA.
- Titus, A., Pereira, G.N. 1999-2007. The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology. [Online]
<http://www.ineedcoffee.com/05/actinomycetes/print.asp>. Acceso 21 de Diciembre de 2008
- Tohme, J. and Verdier, V. 2000. AFLP`s fingerprinting. An efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. Microbiology 145:107-114.
- Uzcasteguí - Negrón, 2009. Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: Un estudio fenotípico comparativo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.
- Uzunova-Doneva, T.; T. Donev: «Anabiosis and Conservation of Microorganisms», Journal of Culture Collections 4:17-28, Bulgaria, 2004-2005, <http://hdl.handle.net/1807/5199> (consultado en enero de 2011).

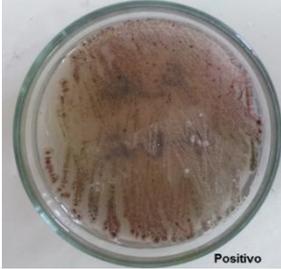
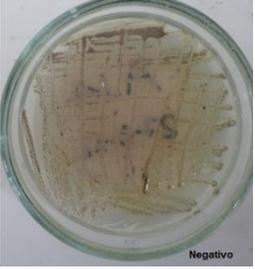
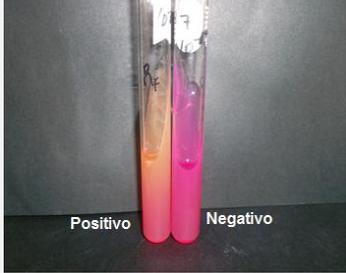
- Valdes M, Perez N, Estrada P, Caballero J, Peña J, Normand P, Hirsch A. (2005). Non-*Frankia* Actinomycetes Insolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 1:460-466

- Van P, Thevelein J. Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance and biotechnological applications. *Advances in Applied Microbiology*. 2003;53: 129 – 176

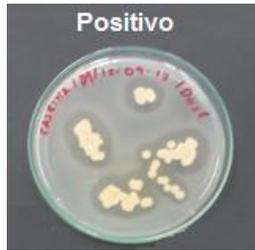
- Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿que debemos conocer?. *Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]*. 2005 Sep. [citado: 15 mayo 2006]; 43(3):0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006&lng=es

11 ANEXOS

Anexo 1. Descripción de resultados de pruebas bioquímicas

| PRUEBA BIOQUÍMICA | Resultado Positivo | Resultado Negativo |
|----------------------------------|--|---|
| <i>Prueba de la Catalasa</i> |  |  |
| <i>Prueba de la Oxidasa</i> |  |  |
| <i>Hidrólisis de Urea</i> |  | |

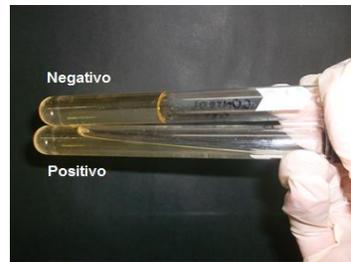
Prueba de la Caseína



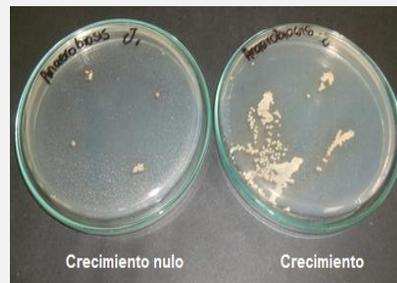
Prueba de Citratos



Hidrólisis de la gelatina



Crecimiento anaerobio



Anexo 2. Tablas de Unidades Formadoras de Colonia.

| Día | Dilución | | | | | | | |
|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ |
| 3 | INC | INC | 250 | 30 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 236 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 270 | 38 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | INC | INC | 255 | 41 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 237 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 273 | 39 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | INC | INC | 265 | 42 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 237 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 285 | 39 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | INC | INC | 267 | 42 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 241 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 285 | 39 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | INC | INC | 273 | 42 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 241 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 282 | 39 | 2 | 0 | 0 | 0 |

➤ Colonia M (JBUTP_GEA_G_A013)

| Dilución Día | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 3 | INC | INC | 677 | 164 | 13 | 9 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 639 | 115 | 29 | 2 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 680 | 137 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| 4 | INC | INC | 858 | 170 | 13 | 9 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 835 | 115 | 29 | 2 | 0 | 0 |
| | INC | INC | 931 | 137 | 19 | 4 | 0 | 0 |
| 5 | INC | INC | INC | 176 | 13 | 9 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 117 | 29 | 2 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 138 | 19 | 4 | 0 | 0 |
| 6 | INC | INC | INC | 192 | 13 | 9 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 117 | 29 | 2 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 138 | 19 | 4 | 0 | 0 |
| 7 | INC | INC | INC | 192 | 13 | 9 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 117 | 29 | 2 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 138 | 19 | 4 | 0 | 0 |

Colonia J (JBUTP_GEA_BS_A010)

| Día | Dilución | | | | | | | |
|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ |
| 3 | INC | INC | INC | 63 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 104 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 115 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | INC | INC | INC | 67 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 116 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 119 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | INC | INC | INC | 68 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 119 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 123 | 27 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | INC | INC | INC | 70 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 119 | 16 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 126 | 27 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | INC | INC | INC | 70 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 119 | 16 | 0 | 0 | 0 |
| | INC | INC | INC | 126 | 27 | 0 | 0 | 0 |

➤ Colonia R (JBUTP_GEA_H_A018)