

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar un agradecimiento muy especial a la directora de la tesis, MSc. Alma Koch, quien apoyó esta investigación desde el principio colaborando en todo lo posible para que se realice de una forma adecuada. Extiendo el agradecimiento al codirector Ing. Marco Taipe quien aportó con su conocimiento especialmente en la parte estadística. Gracias a la fundación Amigos de la Naturaleza de Mindo que permitieron y facilitaron la toma de muestras dentro de la zona que protegen. A todas las personas que colaboraron en la fase de laboratorio empezando por los pasantes que ayudaron con su mano de obra muy calificada: Mauricio, Mario, Fátima, Christian, Andrés, Adrián y Leo. A todas las personas de los laboratorios de Biotecnología de la ESPE. A Paola Castillo y Jessica Maisincho que me brindaron siempre su ayuda de buena voluntad. A Pao Párraga de biotecnología humana quien colaboró de manera muy eficiente con la extracción y amplificación de ADN y al Dr. Marcelo Grijalva que permitió que esto se realice. A la Dra. Karina Proaño, Santiago y Vale de biotecnología vegetal que me ayudaron con consejos y uno que otro material, indispensables para el trabajo. A Anita del CEINCI por su apoyo y colaboración en el laboratorio. A Francisco Jarrín del CIP quien me ayudo con la liofilización de las muestras. A Paty, por supuesto, que me ayudó a mantenerme enfocado cuando los resultados no eran los esperados. A todas las personas de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la ESPE, a mi familia y amigos. Gracias.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a toda mi familia
en especial a mi madre.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema: La industria enzimática apareció a principios del siglo veinte con la producción de amilasas de origen fúngico y ha ido creciendo paulatinamente hasta la actualidad. Hoy en día las enzimas gozan de un campo de aplicación muy amplio y en crecimiento. Así también, las fuentes para la obtención de enzimas son muy variadas, las más importantes a nivel industrial son las pertenecientes a la micro fauna como hongos y bacterias. Existen en nuestro suelo una serie de recursos potenciales que pueden ser aprovechados a nivel biotecnológico, al caracterizar y descubrir las propiedades de nuestras bacterias estamos dando un primer paso hacia el desarrollo de una industria biotecnológica enfocada a los microorganismos, como existe ya, de manera muy exitosa, en muchos países del mundo.

1.2 Justificación del problema: El aprovechamiento de los recursos naturales autóctonos es un concepto fundamental para el surgimiento de una economía en un País en vías de desarrollo como el Ecuador. La biodiversidad que posee nuestra tierra es un tesoro que no ha sido explotado. Al utilizar la biotecnología como herramienta, podemos alcanzar el potencial que nuestro País ofrece.

Varios compuestos químicos pueden ser, o lo son ya, reemplazados por compuestos microbiológicos en todos los campos de la producción. La tendencia mundial va en busca de una producción más limpia, lo que ha abierto un campo para el desarrollo de productos biológicos estables, eficaces y de bajo impacto ambiental. Dentro de estos productos encontramos a las enzimas. El campo de la enzimología es vasto y no ha sido del todo explorado. Existe una gran cantidad de organismos que pueden otorgarnos beneficios en este ámbito sin incurrir en daño alguno al medio ambiente. Las bacterias son un claro ejemplo; lamentablemente no existen estudios enfocados al descubrimiento de la riqueza microbiológica de nuestros bosques.

Se estima que tan solo se conoce 12% de las bacterias existentes a nivel mundial. Una fuente muy importante de bacterias son los entornos naturales como agua y suelo, o fruta en descomposición. De todas las bacterias conocidas, tan solo un porcentaje mínimo ha podido ser cultivado en laboratorio, por lo que existe un gran interés por descubrir nuevas bacterias que puedan ser cultivadas y tengan capacidades aprovechables (Prescott, Harley & Klein, 2004).

Aunque existen técnicas de mejoramiento genético de bacterias para lograr un mejor producto en las diferentes fermentaciones a nivel industrial y para su uso a nivel ambiental, generalmente es una mejor opción el trabajar con fuentes naturales inalteradas (Cases, I & de Lorenzo, V., 2005).

La investigación sobre nuestra riqueza microbiológica es el primer paso para el desarrollo de un nuevo enfoque productivo que tenga como herramienta a la biotecnología y, como materia prima, a la biomasa generada en nuestra tierra, sin que esto genere un impacto en la ecología.

Nuestro País tiene una gran capacidad de producción de alimentos con alto contenido de almidón, como: plátano, banano, papa, yuca, maíz, arroz y achira. Éstos pueden ser aprovechados para la producción de amilasas a nivel industrial. En el presente trabajo se han considerado tres fuentes de almidón como sustrato. La primera es la papa (*Solanum tuberosum*), debido a su uso generalizado a nivel mundial como fuente de almidón para la producción de amilasas. La segunda es el banano (*Musa paradisiaca*), debido a que nuestro país es uno de los mayores productores de esta fruta en el mundo. La tercera es la achira (*Canna edulis*), debido a su presencia en el bosque del cual se van a obtener las cepas bacterianas.

1.3 Objetivos de la Investigación:

1.3.1 Objetivo Principal:

Identificar y determinar la actividad amilolítica de por lo menos 3 cepas bacterianas formadoras de esporas aisladas de los suelos del bosque protector “Mindo-Nambillo” utilizando tres fuentes distintas de almidón como sustrato.

1.3.2 Objetivos específicos:

Aislar tres cepas bacterianas productoras de amilasas a partir de muestras de suelo del bosque protector “Mindo-Nambillo”.

Caracterizar bioquímicamente las cepas bacterianas aisladas.

Identificar molecularmente las tres cepas con mayor actividad.

Extraer almidón de tres fuentes distintas y transformarlo en almidón soluble.

Obtener curvas de absorbancia vs. unidades formadoras de colonias en caja para cada una de las tres cepas.

Someter a cada una de las bacterias a distintos tratamientos con los factores: temperatura, pH y fuente de almidón como sustrato.

Medir la actividad amilasa y el crecimiento bacteriano para cada uno de los tratamientos.

1.4 Marco Teórico:

1.4.1 Bacterias aerobias formadoras de esporas: Dentro de este grupo existen varios géneros de bacterias resistentes a los cambios medio ambientales y a condiciones extremas gracias a su capacidad de esporular, por lo que, pueden mantenerse latentes por periodos largos de tiempo hasta que las condiciones sean adecuadas para volver a su forma vegetativa. Esporas de ciertas arqueobacterias (*Bacillus sphaericus*, *Bacillus permians*) bajo determinadas condiciones (inclusión en ámbar o cristales salinos) poseen una viabilidad tan prolongada, que podría decirse que las mismas pueden sobrevivir indefinidamente (McGourty, 2000).

Las esporas formadas son conocidas como endósporas y “son formas de perdurabilidad de ciertos grupos de bacterias frente al calor, la desecación, la radiación y las influencias químicas. Contienen un genoma y toda la maquinaria metabólica esencial” (Raisman, 2007).

La resistencia al calor es una de las principales características de las endósporas. Pueden soportar temperaturas superiores a los 80 °C por lo que su aislamiento es relativamente fácil, al calentar el material donde se supone que existen esporas a 100 °C durante 10 minutos mueren todas las bacterias y, seguidamente, las esporas sobrevivientes se hacen germinar y crecer en el medio de cultivo adecuado. Para eliminarlas son necesarias temperaturas muy altas u otras técnicas de esterilización como con químicos cuya efectividad ha sido probada en cepas no patógenas (Phillips, Berry & Kohn, 2004).

Al observar estas bacterias al microscopio se puede apreciar claramente la endóspora debido a la refringencia de la misma (Fig. 1.1). El elevado índice de refracción se da debido a las proteínas deshidratadas y concentradas en el pequeño espacio de la espora. Casi toda la materia seca de la bacteria esta en la espora que posee un volumen igual a la décima parte de la bacteria que la origino.

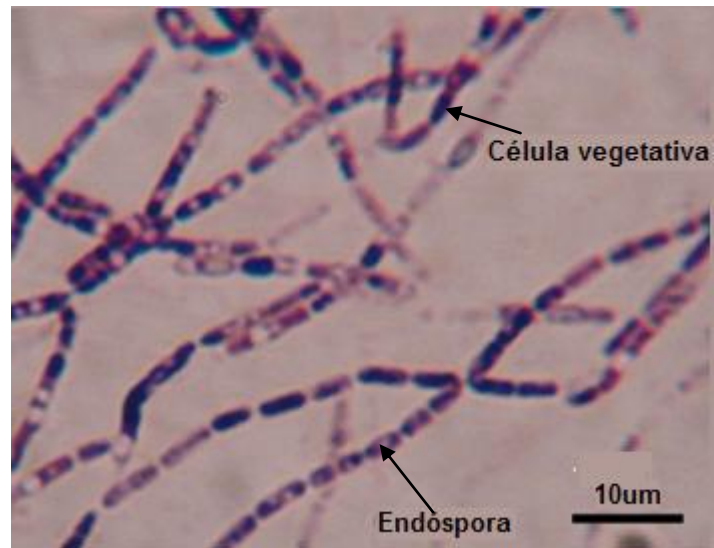
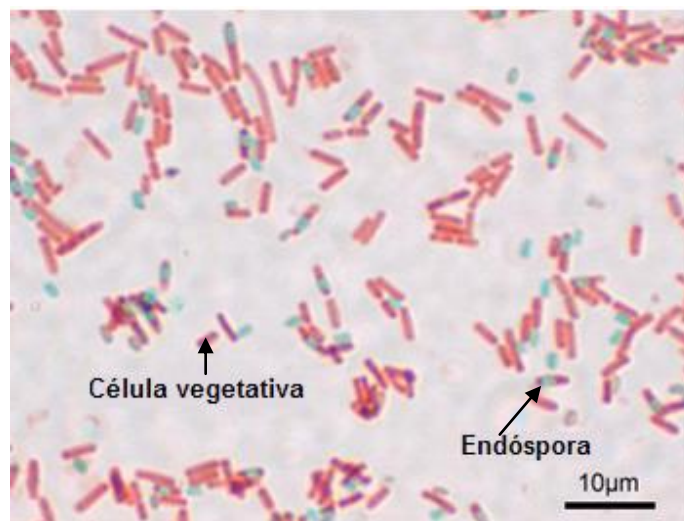


Figura 1.1 Bacteria Gram positiva formadora de esporas después de una tinción Gram.

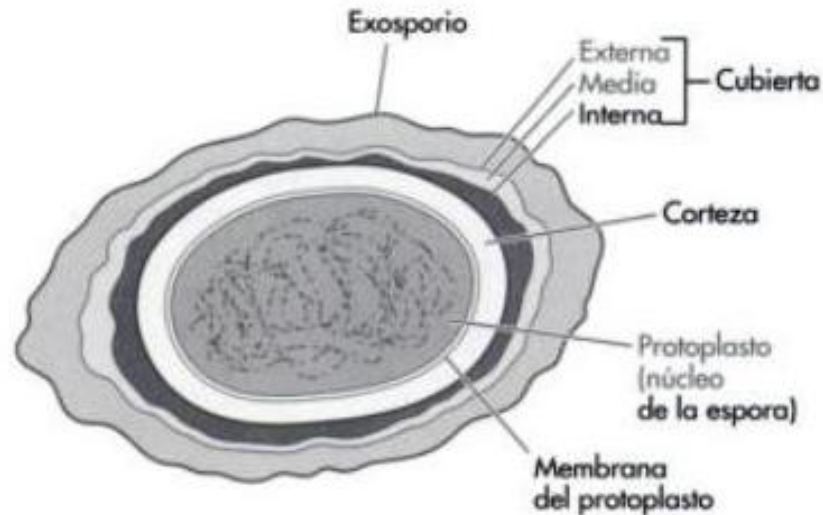
Las esporas pueden colorearse en caliente con carbolfucsina o verde malaquita (Fig. 1.2), y no se decoloran cuando el frotis es lavado con etanol (Raisman, 2007).



Fuente: Wikimedia, 2008

Figura 1.2 Bacterias formadoras de esporas después de una tinción con verde malaquita.

Como se puede observar en la Figura 1.3 la endóspora posee una triple capa que la protege de las condiciones externas y en su núcleo está presente toda la información genética protegida a su vez por la membrana del protoplasto y la corteza.

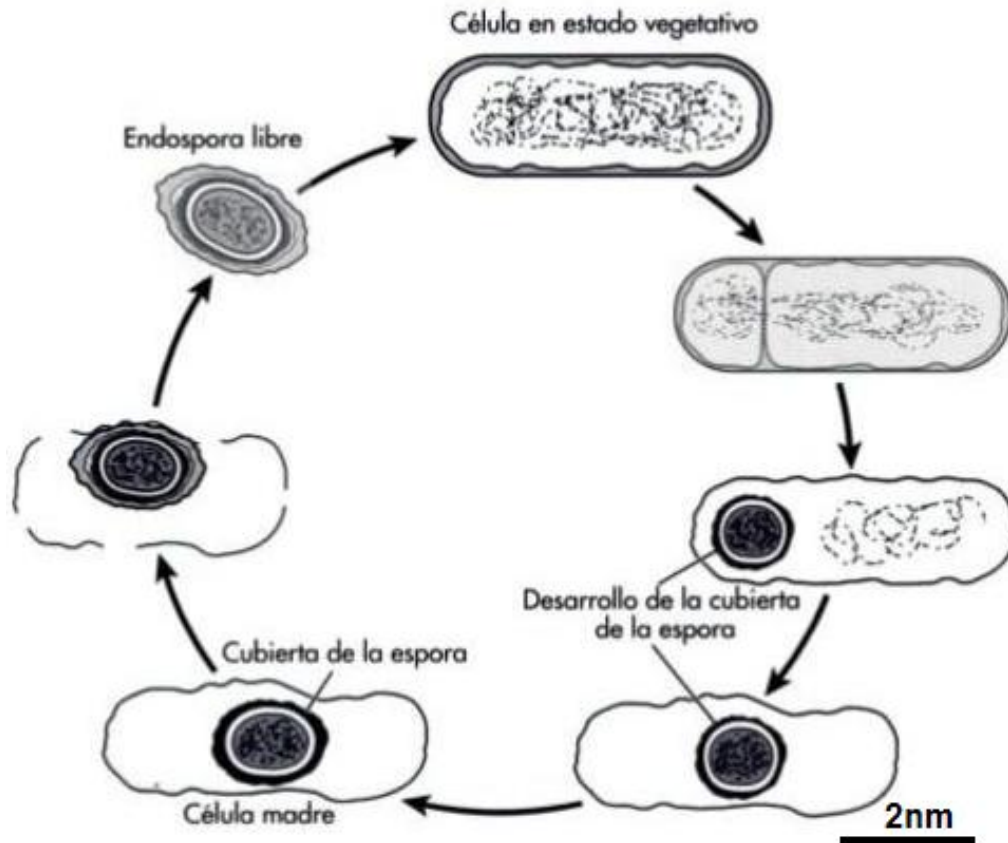


Fuente: Phillips *et al.*, 2004

Figura 1.3 Estructura de la endóspora bacteriana.

Una característica que ha sido utilizada para la identificación de las diferentes bacterias formadoras de esporas es la posición de la endóspora en la célula madre, así también el hecho de si produce o no una deformación en la célula vegetativa antes de ser liberada. De acuerdo a su posición en la célula vegetativa, la espora puede ser: central, terminal o subterminal.

En la Figura 1.4 se puede ver como se da la esporulación bacteriana. Se pueden diferenciar tres etapas: una división asimétrica, formación de la cubierta de la espora y la liberación de la espora.



Fuente: Phillips *et al.*, 2004

Figura 1.4 Proceso de esporulación bacteriana

En condiciones favorables los bacilos de las especies esporulantes se reproducen indefinidamente en su forma vegetativa, la esporulación no es una fase obligada del ciclo de vida de la bacteria. El proceso por el cual las esporas pasan a formar células vegetativas se denomina germinación. Ocurre cuando se las coloca en el medio adecuado y se requiere en muchos casos la disponibilidad, entre otros, de glucosa, aminoácidos y nucleósidos. Las bacterias pueden ser almacenadas en tierra seca y el 10% de sus esporas permanecen viables al cabo de 50 años (Raisman, 2007).

Hasta hace poco tiempo todo el grupo de bacterias aerobias formadoras de esporas se encontraba agrupado en el género *Bacillus*. Debido a investigaciones realizadas en los últimos años, se han propuesto 12 nuevos

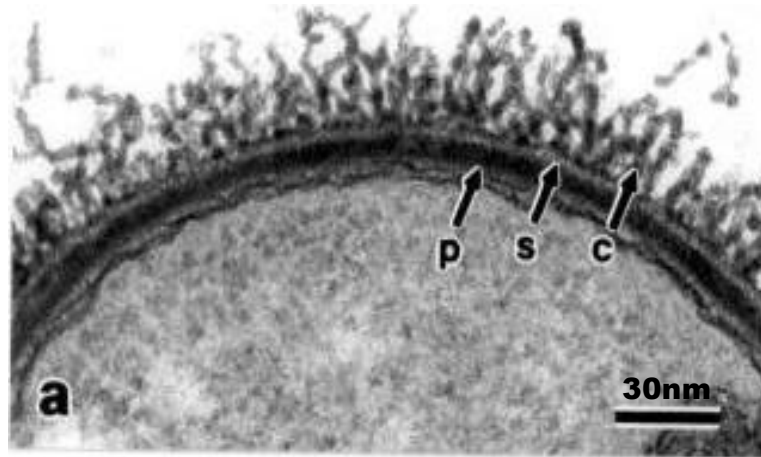
géneros que presentan características similares al género *Bacillus* (bacterias gram positivas aerobias o facultativas, formadoras de esporas), entre los cuales podemos nombrar: *Brevibacillus*, *Paenibacillus* y *Virgibacillus* (Reva *et al.*, 2001).

Las bacterias aerobias formadoras de esporas son ubicuas en la naturaleza por lo que el aislamiento de este tipo de bacterias puede realizarse a partir de distintas fuentes naturales (Peltier & Beckord, 1945). Pueden ser aisladas a partir de mostos pues están presentes y se desarrollan en la primera etapa (sacarificación) de procesos fermentativos para la elaboración de alcohol a partir de sustratos amiláceos como la yuca la papa o el maíz (Amund & Ogunsina, 1987). Debido a su capacidad de producir esporas pueden ser aisladas y cultivadas con cierta facilidad a partir del suelo en donde se pueden encontrar varias especies como: *B. circulans*, *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. alvei* entre otras (Vargas & Silver, 2002).

Entre estas bacterias existe una enorme diversidad fisiológica. Son capaces de desdoblar casi cualquier sustrato de origen natural como celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos entre otros. Además poseen la capacidad para la producción de antibióticos, nitrificación, denitrificación, fijación de nitrógeno (Todar, 2008). Las bacterias aerobias formadoras de esporas tienen un rol muy importante en el desarrollo del ecosistema en el cual habitan, pues son capaces de transformar muchos compuestos químicos, entre ellos, ciertos contaminantes ambientales (Reva *et al.*, 2001).

Los requerimientos nutritivos de estas bacterias son básicos por lo que la preparación de medios para su mantenimiento es simple. Un medio sólido para su siembra puede contener únicamente extracto de carne, peptona y agar.

La estructura externa del género *Bacillus* y bacterias relacionadas es compleja y posee propiedades de adherencia. La superficie de estas bacterias está compuesta de afuera hacia adentro por: la cápsula, una capa proteica denominada capa S, varias capas de peptidoglucano y las proteínas de la superficie externa de la membrana plasmática como se puede observar en la Figura 1.6 (Todar, 2008).

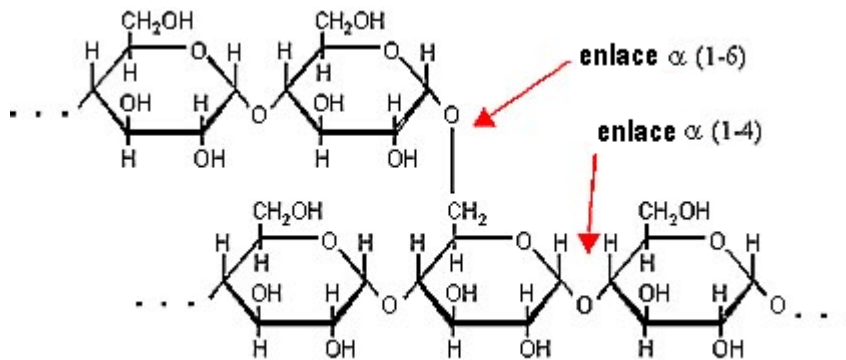


Fuente: Todar, 2008

Figura 1.5 Estructura externa de un *Bacillus*. c: cápsula, s: capa S, p: capas de peptidoglucano

La pared celular en este tipo de bacterias está compuesta por un peptidoglucano que contiene ácido diaminopimérico, muy común en bacterias Gram negativas. Además varias especies poseen flagelos para su movilización.

1.4.2 Almidón: La molécula de almidón es un polímero de glucosas unidas unas a otras por enlaces glucosídicos alfa 1-4 y alfa 1-6 (Fig. 1.6). Forma parte de los alfa glucanos debido al tipo de enlace anomérico que presenta (Battaner, 2008).



Fuente: Calvo, 2008

Figura1.6 Estructura molecular del almidón

El almidón está formado por dos tipos de cadenas: amilosa que es un polisacárido lineal formado por unidades de glucosa unidas en enlace α (1,4) (absorben iodo dando como resultado compuestos de color azul intenso) y amilopectina, que es un polisacárido ramificado cuyas cadenas principales son restos de glucosa unidos en enlace α (1,4), como en la amilosa, y que presentan esporádicamente (una media de cada 15 o 20 residuos) ramificaciones en α (1,6) (absorben iodo dando como resultado compuestos de color rojo púrpura). El grado de polimerización de la amilopectina es mucho mayor que en la amilosa, por lo que alcanza pesos moleculares muy elevados (Battaner, 2008).

En las células vegetales, el almidón se encuentra formando gránulos de entre 2 y 100 micras, dependiendo del vegetal, aunque en un mismo vegetal aparece una cierta heterogeneidad de tamaño. Los gránulos de almidón de arroz están entre los más pequeños, y los del almidón de patata, entre los más grandes. La forma suele ser redondeada, pero también aparecen gránulos de forma alargada o más o menos irregular (Calvo, 2008).

El almidón es el principal polisacárido de reserva de la mayoría de los vegetales y la principal fuente de calorías que utiliza el ser humano para su alimentación a nivel mundial. Es un importante constituyente de los alimentos en los que está presente, tanto desde el punto de vista nutricional como tecnológico.

Muchas de las propiedades de la harina, así como de los productos de panadería y repostería, pueden explicarse al conocer el comportamiento del almidón.

El almidón, aislado, es un material importante en diversas industrias, entre ellas la alimentaria, del papel o de tejidos. La técnica para su preparación se conocía desde la antigüedad pues se utilizaba para dar consistencia al papiro en el antiguo Egipto. Actualmente se utiliza en gran medida para la preparación de alimentos por ser el más barato de los materiales gelificantes.

El almidón más importante desde el punto de vista industrial es el de maíz. Al año se utilizan unos 60 millones de toneladas de maíz para fabricar almidón, bien para su uso como tal o como materia prima para la obtención de glucosa y fructosa (Calvo, 2008).

Otras propiedades del almidón que le otorgan interés a nivel industrial son: carecen de sabor dulce, las cadenas más cortas que resultan de la hidrólisis parcial del almidón (hidrólisis enzimática), son las dextrinas, que poseen un gran interés comercial, son insolubles en agua fría, y en agua caliente forman pastas y geles cuyas características varían con el tipo de almidón utilizado.

1.4.2.1 Fuentes de almidón: A nivel mundial, son importantes fuentes de almidón: el maíz, el trigo, la papa y la mandioca. A nivel local otras fuentes importantes son la achira y la yuca. Hay muchas diferencias entre los almidones de los distintos vegetales, hasta el punto que se pueden distinguir las diferentes especies según el tipo de almidón (FAO, 1998).

Las propiedades del almidón de una especie vegetal dependen del porcentaje relativo de amilosa o amilopectina. La amilosa abunda en las leguminosas y la amilopectina en los cereales. Las propiedades tecnológicas del almidón dependen mucho de su origen y de la relación amilosa/amilopectina, tanto

cuando forma parte de un material complejo (harina) como cuando se utiliza purificado, lo cual es muy frecuente (Calvo, 2008).

Una fuente poco usual para la obtención de almidón es el banano. En su estado inmaduro, el banano puede contener hasta un 25% de almidón. El tamaño del almidón de banano está entre 5 y 70 micras, un poco más pequeño que el almidón de papa pero más largo (International Starch Institute, 1999).

El gránulo de almidón de achira es el que posee mayor tamaño (entre 25 y 45 micras). Además, su porcentaje de amilosa le confiere propiedades de resistencia en comparación a otro tipo de almidones comerciales. En el Cuadro 1.1 podemos observar las características de algunos de los almidones comerciales. La pérdida de viscosidad se refiere al comportamiento de la pasta de almidón al ser calentada; los números negativos muestran una baja resistencia al calor.

Cuadro 1.1 Características físico-químicas de algunos almidones comerciales.

Tipo de almidón	Nombre Botánico	% Amilosa	Tamaño (µm)	T gel °C	Pérdida de Viscosidad %	Resistencia a:
Achira	<i>Canna Indica</i>	31 - 38	45 - 65	64 - 72	+10	Esterilización
Papa	<i>Solanum-tuberosum</i>	16 - 28	23 - 31	58 - 67	-100	Ninguna
Yuca	<i>Manihot esculenta</i>	13 - 15	11 - 12	62 - 68	-100	Congelación y acidez
Maíz	<i>Zea mays</i>	20 - 25	12 - 15	62 - 72	-20 -90	En menor grado a la esterilización
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	17 - 32	13 - 19	52 - 68	-40	Ninguna

Fuente: Achiras de Colombia, 2008

1.4.2.2 Almidón como sustrato: Los almidones pueden presentar variaciones que responden a diferentes estructuras y de ahí las diferencias que pueden presentar al utilizarlo como sustrato para el crecimiento bacteriano.

Un fenómeno importante que presenta el almidón es la gelatinización, al echar granos de almidón en agua, se produce una dispersión ya que no es soluble, pero los granos son capaces de embeber agua, este fenómeno aumenta con la temperatura. Es un proceso irreversible. A una determinada temperatura el grano se rompe y aparece la gelatinización. Cada almidón tiene un punto de gelatinización diferente (cuadro 1.1). Las dispersiones de almidón son viscosas y esta viscosidad varía con la temperatura. Los geles pueden cristalizar con el tiempo este fenómeno se llama retrogradación, la dispersión se calienta hasta una temperatura inferior a la gelatinización y se enfría. El almidón puede dar sinéresis, es decir el gel con el tiempo pierde agua, acentuándose con tratamientos extremos: congelación y fritura (Calvo, 2008). Estas características del almidón natural lo hacen inapropiado para la formulación de medios de cultivos por lo que requiere de un tratamiento previo para hacerlo menos viscoso.

En el comercio existe almidón natural y almidón cuya estructura ha sido modificada y por lo tanto tienen diferentes propiedades. Las modificaciones pueden hacerse por distintas técnicas (Calvo, 2008):

Pregelatinización.- El almidón pasa por unos rodillos calientes, así aumenta su capacidad para embeber agua incluso en frío.

Fluidificación.- El almidón se trata con HCl diluido a 50 grados centígrados, se disminuye la longitud de las cadenas de almidón; tiene la ventaja de que permite trabajar con mayor concentración de almidón para conseguir la misma viscosidad. Para incluir al almidón en un medio de cultivo bacteriano es necesario que sea soluble por lo que debe someterse primero a un proceso de fluidificación.

Reticulación.- Se pretende evitar que el gel de almidón cristalice, forma enlaces transversales entre las diferentes estructuras de almidón. De esta forma obtengo un almidón con propiedades gelificantes, espesantes, independientemente del tratamiento térmico.

Estabilización.- En el almidón natural los principales responsables de la cristalización son las cadenas ramificadas de la amilopectina. En este proceso se metilan; idóneo para salsas.

1.4.3 Amilasas: Las amilasas comprenden un grupo de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces alfa 1-1, alfa1-4 y alfa 1-6 presentes en el almidón o en residuos glucosídicos. Las amilasas pueden dividirse en dos grandes grupos las endoamilasas y las exoamilasas. Las endoamilasas catalizan la hidrólisis al azar de enlaces en el interior de la molécula de almidón produciendo cadenas de polisacáridos de diferentes longitudes. Las exoamilasas actúan en el extremo no reductor de la cadena produciendo azúcares de cadena corta (Reddy, Nimmagadda & Sambasiva, 2003).

Dentro de las endoamilasas las más importantes son las alfa amilasas (1,4-alfa-glucan-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) que rompen los enlaces alfa1-4 de cadenas de polisacáridos de 10 o más unidades y sus productos son cadenas de 5 a 7 unidades de glucosa. Esto demuestra un ataque preferencial a las ramificaciones de las cadenas de amilosa o amilopectina. Esta etapa en la hidrólisis del almidón se denomina liquefacción y tanto en la naturaleza como en la industria debe ser seguido de una etapa de sacarificación. La sacarificación se da por la acción de una exoamilasa como es la amiloglucosidasa ((1,4)(1,6)-alfa-D-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.3) la cual hidroliza los enlaces alfa-1,6 y alfa-1,4 del extremo no reductor de la cadena de polisacáridos produciendo glucosa libre (Spier *et al.*, 2006).

Sus aplicaciones biotecnológicas son muy variadas y pueden ir desde la producción de jarabes ricos en ciertos polisacáridos como maltodextrinas o glucosa hasta su utilización en la industria del alcohol y del papel (Ramachandran *et al.*, 2000).

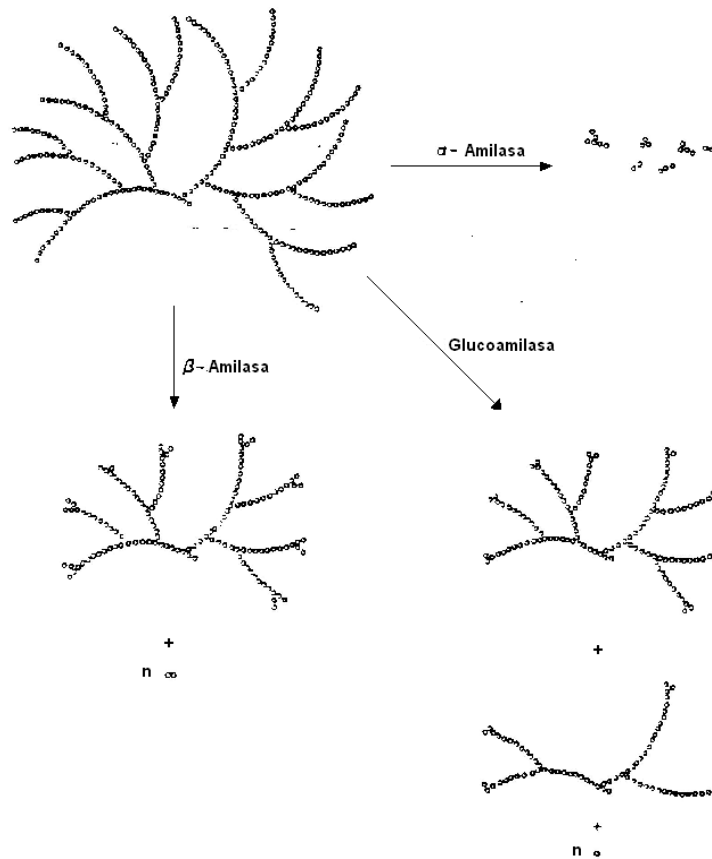
Para determinar las diferencias y capacidades de las amilasas producidas por distintos organismos se pueden determinar en el laboratorio ciertas características como actividad o efectos del pH y la temperatura (Wang, 2001; Ekunsaumi, 2007; Glikin, 2007). La actividad amilasa puede ser medida mediante varios métodos que están basados en la medición del aumento del poder reductor en la solución (debido a la presencia de azúcar reductor liberado por la enzima); del cambio en la coloración de la solución al contacto con el yodo (debido a la reducción de la cantidad de almidón en la solución gracias a la acción enzimática); o de la disminución en la viscosidad de la solución amilácea. De estos tres métodos el más recomendado es el primero debido a que es aplicable para toda la familia de amilasas. Una unidad de actividad amilasa (UA) se define como la cantidad en mg de maltosa liberada en 3 minutos a 20°C por 1 mL de la solución enzimática (Bernfeld, 1955).

1.4.3.1: Amilasas de origen microbiano: Las amilasas son producidas por una serie de organismos vivos, desde el hombre el cual la produce a nivel salivar y pancreático hasta las bacterias que pueden producir una gran variedad de estas enzimas que difieren en su tipo (endoamilasas o exoamilasas), condiciones óptimas de funcionamiento y en su actividad (Martins, Leal & Luciano, 2002). Tanto las bacterias como los hongos producen amilasa extracelular pues digieren su alimento fuera de la célula. Una vez que las cadenas largas e insolubles de almidón se rompen, forman cadenas cortas como glucosa o maltosa que pueden ser absorbidas por el microorganismo (Ekunsaumi, 2007). Varios microorganismos producen una mezcla de amilasas pues cada una de estas cumple con una función específica (Fig. 1.8):

α -amilasa.- Reduce la viscosidad del almidón pues rompe los enlaces alfa 1-4 al azar y forma cadenas de glucosa de distintos tamaños

β -amilasa.- Rompe los enlaces alfa 1-4 y forma cadenas de maltosa (unión de 2 glucosas)

Glucoamilasa (amiloglucosidasa).- Rompe tanto los enlaces alfa 1-4 como los enlaces alfa 1-6 desde el extremo no reductor para formar unidades de glucosa libre (Ekunsaumi, 2007).



Fuente: Glikin 2007

Figura 1.7 Acción de los diferentes tipos de amilasas en la molécula de almidón

Aunque son varios los microorganismos capaces de producir estas enzimas de manera eficiente, son pocas las cepas de hongos y bacterias que cumplen con los criterios de una producción industrial a gran escala, sin embargo, la constante aparición de nuevos microorganismos que presentan características favorables para la industria han abierto nuevas posibilidades, especialmente con el descubrimiento de nuevas amilasas termoestables (Reddy *et al.* 2003). Dentro de las bacterias productoras de amilasas encontramos a varios géneros como *Bacillus*, *Bacteroides*, *Micrococcus*, *Streptomyces* y *Thermoactinomyces* (Fogarty, 1973). El género *Bacillus* es sin duda el más prominente dentro de este grupo de bacterias degradadoras de amilasas.

Las amilasas de origen bacteriano son producidas a gran escala para su uso en la industria. Los usos más importantes de estas enzimas son:

1. Hidrólisis parcial del almidón para generar dextrinas que son utilizadas como espesantes.
2. Obtención de jarabe de alta maltosa (Glu-Glu) utilizados en la fabricación de la cerveza y confituras (dulces, helados, tortas).
3. Obtención de jarabes de alta glucosa utilizados en la fabricación de cerveza, panes y repostería, confituras y bebidas no alcohólicas.
4. Remoción del almidón utilizado como apresto en la industria textil.
5. Hidrólisis parcial del almidón en la industria panadera para la liberación de glucosa que es sustrato de fermentación de las levaduras para producir el leudamiento de la masa.

6. Hidrólisis del almidón para ser utilizado como fuente de carbono en diversas fermentaciones, entre ellas, la producción de etanol para uso alimenticio y combustible.

Las amilasas microbianas son generalmente estables en un amplio rango de pH (4-11). Su temperatura óptima de funcionamiento está relacionada con la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria que la produce. La termoestabilidad de la enzima está relacionada con la presencia de calcio, sustrato y otros estabilizadores (Reddy et al, 2003).

1.4.3.2 Producción de amilasas por bacterias aerobias formadoras de esporas: Se sabe que, dependiendo de su fuente, las amilasas difieren en ciertos detalles de su acción, por lo que, toda interpretación de resultados de cualquier investigación debe ser realizada individualmente (Swanson, 1947). Por esto, alrededor del mundo se han realizado sendas investigaciones con respecto a la producción de amilasas por bacterias formadoras de esporas. En cada lugar existen diferentes cepas a partir de las cuales se pueden lograr amilasas con distintas características.

Dentro de este campo de investigación, los primeros esfuerzos estuvieron dirigidos a establecer métodos para la producción a gran escala para la industrialización de la enzima, se utilizaron bacterias de las que se conocía tenían actividad amilasa y se encuentran en varios ambientes como *Bacillus subtilis* (Biodin & Effront, 1917). Años más tarde, se buscaron diversas fuentes bacterianas que pudieran ofrecer una buena actividad enzimática (Peltier & Beckord, 1945), aun así *B. subtilis* continuó siendo la bacteria predominante en la producción de amilasas. Pero, poco a poco, se encontraron nuevas cepas de este microorganismo y nuevas formas de hacerlo producir enzima (Shinsaku,, Yujiteramoto, & Takehiro., 1988; Zheng, Wang & Xiaolong, 2000).

En los últimos años los países en vías de desarrollo han tratado de explotar su riqueza microbiológica y se ha puesto especial interés en encontrar amilasas termoestables y que soporten un gran rango de pH debido a su posible aplicación industrial. Tal es el caso de la enzima producida por la bacteria *Bacillus licheniformis* SPT 27, obtenida a partir de los suelos alcalinos de Cambay India, en la que se realizó un estudio sobre la relación C:N óptima para que esta genere mayor cantidad de enzima. La relación C:N óptima fue 1:1 y su pH óptimo 9 (Dharani, 2004).

El descubrimiento de bacterias termófilas con actividad amilasa llevó al estudio de los parámetros cinéticos de las enzimas obtenidas. En Jordania se aisló la bacteria *Bacillus sphaericus* que crece en aguas termales para la cual se determinó los parámetros cinéticos del crecimiento celular y de la actividad amilasa. También se probaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como, la concentración óptima de almidón en el medio para la producción de amilasas (Al-Qodah, Daghtani, Geopel & Lafi, 2007).

En Colombia, un estudio comparativo para la producción de amilasas con células inmovilizadas y células libres de la bacteria *Thermus sp.* (autóctona de suelos colombianos), se llevó a cabo en un reactor para el cual se determinaron concentraciones óptimas de sustrato y nutrientes así como las condiciones apropiadas para la producción de la enzima. Se demostró que la mejor producción se obtiene al utilizar células inmovilizadas en alginato de sodio, lo que además facilita la recuperación del extracto así también como de las células (Sarmiento, Vargas, Pedroza, Matiz & Poutou, 2004). Mientras que en Perú, Vargas & Silver, (2002) llevaron a cabo un estudio en el que se aislaron bacterias a partir de suelos de plantaciones de cítricos en la localidad de Huaral. Se identificaron 46 cepas capaces de hidrolizar el almidón de las especies: *B. circulans*, *B. firmus*, *Faenibacillus spp.*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. Alvei* y *B. lentus*. Una cepa perteneciente a la especie *B. megaterium* fue la que mostró mayor actividad con 16,1 UA mL⁻¹.

Las condiciones físicas y nutricionales que afectan a la producción de amilasas para ciertas bacterias del género *Bacillus* fueron descritas por Sekar, Sivaprakasam y Karunasena en el 2005. Las mejores condiciones para la producción de amilasas fueron 37 grados centígrados para la incubación y pH 7. Lograron una actividad de 30 UA mL⁻¹ en matraces con agitación (200 rpm) que contenían un medio de producción (lactosa 40 g l⁻¹, extracto de levadura 20 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0.05 g l⁻¹, MnCl₂ · 4H₂O 0.015 g l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.25 g l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0.05 g l⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.01 g l⁻¹).

En los países desarrollados la investigación se enfoca en mejorar la producción de amilasas en reactores industriales. Debido a que dicha producción ha llegado a una fase en que ya se han determinado todos los factores físicos y químicos ideales (para bacterias conocidas desde hace tiempo), se han aplicado métodos estadísticos complejos para su optimización, como la cadena de Markov, utilizada en un reactor tipo batch con *Bacillus subtilis* en Inglaterra (Skolpap, Scharer, Douglas & Moo-Young, 2004).

1.5 Hipótesis:

En el bosque protector “Mindo-Nambillo” existen distintas bacterias aerobias formadoras de esporas que requieren condiciones específicas de pH, temperatura y fuente de almidón como sustrato para su crecimiento y producción de amilasas.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo por Francisco Flores, egresado de la carrera de ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército. Fue dirigido por M. Sc. Alma Koch y codirigido por Ing. Marco Taipe. La fase experimental comenzó con la toma de muestras el 8 de Agosto de 2007 y culminó el 29 de Marzo de 2008. Durante toda la investigación se utilizó el método experimental.

2.1 Toma de muestras.- La toma de muestras se realizó en el bosque protector Mindo-Nambillo, en un bosque secundario de 15 hectáreas perteneciente a la Fundación Amigos de la Naturaleza. El bosque ha estado en recuperación durante 25 años y en el mismo podemos encontrar dentro de su flora a especies como el cedro (*Cedrela odorata*), canelo (*Drymis winteri*), arrayán (*Myrcianthes* spp.), copal (*Bursera cuneata*), matapalo (*Ficus jacobii*), flor de mayo (*Cattleya* spp.), sangre de drago (*Croton lechleri*), palmito (*Chamaerops humilis*) y especialmente caña brava (*Gynerium sagittatum*).

Se tomaron nueve muestras de 500g cada una de diferentes zonas representativas del bosque:

- Orillas del río Mindo (3 muestras)
- Zona pantanosa (3muestras)
- Ladera empinada (3 muestras)

Las muestras fueron tomadas aleatoriamente hasta una profundidad de 15 cm y guardadas en fundas de polietileno hasta ser llevadas al laboratorio para su procesamiento.

2.2 Procesamiento de las muestras.- El procesamiento de las muestras y todos los análisis siguientes se realizaron en los Laboratorios de Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército. Las muestras llegaron al laboratorio 2 horas después de haber sido tomadas, aquí fueron tamizadas con un tamiz 10U.S. y homogeneizadas.

Se tomaron 10g de cada muestra homogeneizada y se disolvieron en 90 mL de agua estéril, de esta dilución se tomaron 10mL los que a su vez fueron disueltos en 90 mL de agua estéril. El procedimiento se repitió una vez más para lograr una dilución de 1:1000.

2.3 Aislamiento de cepas productoras de amilasas.- De cada una de las diluciones realizadas (1:10, 1:100 y 1:1000) para cada muestra, se tomaron 100µl (en la investigación, todos los volúmenes inferiores a 2mL fueron tomados con pipetas Biopette autoclavables, siempre con puntas estériles) que fueron colocados homogéneamente en cajas petri con agar almidón. Se sembraron 3 cajas por muestra con siembra superficial y 3 cajas por muestra con siembra profunda, lo que nos da un total de 54 cajas sembradas. Dependiendo de la procedencia de la muestra, su dilución y el tipo de siembra, se enumeraron las cajas con tres dígitos y una letra. El primer número correspondiente a la procedencia: (1) Pantano, (2) Río y (3) Ladera. El segundo correspondiente al número de muestra habiendo tres muestras por procedencia. El tercero correspondiente a la dilución: (1) 1:10, (2) 1:100 y (3) 1:1000. La letra corresponde al tipo de siembra: (s) siembra superficial y (p) siembra profunda. Así, a la caja sembrada por siembra profunda correspondiente a la dilución 1:100 de la segunda muestra tomada del pantano, le correspondería el código 1.2.2.p.

Las cajas fueron incubadas a 36°C en una incubadora Memmert type: BE200 (esta incubadora se utilizó durante toda la investigación) durante 24 horas, después de lo cual se realizó un screening inundando las cajas con yodo Gram para determinar donde se encuentran las colonias productoras de amilasas. Las

colonias con actividad amilasa se revelaron formando un halo de color amarillo mientras que el resto del medio se tiñó de color púrpura intenso.

Las cepas productoras de amilasas fueron resembradas en cajas petri con agar almidón modificado (Achi & Nijoku, 1992) utilizando el método de siembra por estrías. Se realizaron varias resiembras en cajas con agar almidón hasta obtener colonias individuales y puras que presenten actividad amilasa, se utilizó el mismo método de screening con yodo Gram anteriormente mencionado para seleccionar a las bacterias de interés. Una vez obtenidas las cepas puras, estas fueron sembradas en tubos con agar nutriente (Acumedia 7145A) que se incubaron a 36°C durante 24 horas. Luego fueron conservados en refrigeración para la realización de las pruebas de identificación bacteriana. Antes de caracterizar bioquímicamente a las bacterias, se sembraron en medio líquido y posteriormente en cajas para observar la forma de las colonias.

2.4 Caracterización bioquímica de las bacterias.- A todas las cepas aisladas se les asignó un código de cuatro letras FFMN (Francisco Flores, Mindo Nambillo) seguido de dos dígitos. Se les realizaron tinciones gram para verificar que pertenezcan al grupo de bacterias gram positivas formadoras de esporas mediante la observación al microscopio. A partir de este punto se llevaron a cabo una serie de pruebas bioquímicas que incluyen: Crecimiento en medio anaerobio, degradación de caseína, utilización de citrato, degradación de gelatina, fermentación de la glucosa, fermentación de manitol, prueba de Voges-Proskauer, reducción de nitrato, citocromo oxidasa, crecimiento a 50°C, degradación de la urea, fermentación de la lactosa, esporangios abultados y degradación de la tirosina, según la guía descrita por Reva *et al.* (2001). Todos los medios utilizados para las pruebas bioquímicas fueron esterilizados antes de la siembra en un autoclave All American Modelo N°25x-1, menos el medio para la prueba de la ureasa que fue filtrado en un filtro Millipore. La formulación de cada uno de los medios se encuentra en el Anexo A. Para todas las pruebas se realizaron controles negativos con medios sin inocular.

2.4.1 Crecimiento en medio anaerobio.- En tubos con agar nutriente horizontal se realizó una siembra por estocada y se incubó a 37°C durante un día, se observó el crecimiento. Para los tubos que presentaron crecimiento en la zona inferior o media del tubo la prueba se consideró positiva.

2.4.2 Degradación de caseína.- Se utilizó el medio agar leche (se usó leche descremada “Svelty” de Nestlé) esterilizado en cajas petri. Se sembró el microorganismo por estrías. Se incubó a 35°C durante 2 días. La degradación de la caseína se puede observar a simple vista sin la necesidad de revelar con ácido clorhídrico. La formación de un halo transparente alrededor de las colonias se consideró como resultado positivo para esta prueba.

2.4.3 Utilización de citrato.- Se utilizaron tubos de ensayo con agar citrato de Simmons (BBL Becton Dickinson) solidificado en posición inclinada. Se inoculó la bacteria y se incubó a 35°C durante 2 días. La reacción positiva se dio por un cambio de coloración del medio de verde a azul oscuro.

2.4.4 Degradación de gelatina.- Se realizó en tubos de ensayo con gelatina nutriente (Difco). Se inoculó el microorganismo y se incubó durante 2 días a 35°C. Para la lectura de resultados se introdujeron los tubos en agua helada hasta que el medio se gelifique. Si el medio se gelifica por completo la reacción es negativa y si no se gelifica todo el medio la reacción es positiva.

2.4.5 Metabolismo de carbohidratos.- Se prepararon diferentes tubos de agar inclinados que contenían medio con glucosa, lactosa, xilosa, maltosa, sacarosa y manitol como única fuente de carbono respectivamente. Se sembró superficialmente cada bacteria y se dejó incubar durante 48 horas. Después de la incubación se observó crecimiento y cambio de coloración en el medio. El cambio de color de púrpura a blanco amarillento es positivo para la fermentación del carbohidrato correspondiente a cada medio.

2.4.6 Prueba de Voges-Proskauer.- Las cepas aisladas se sembraron en tubos que contenían 5mL de medio MR-VP (Difco). Se incubaron los medios durante 3 días a 35°C. Después de la incubación se añade a los tubos 1,2mL (por tubo) de reactivo A de Voges –Proskauer que consiste en alfa naftol al 5% en alcohol etílico absoluto, el medio adquirió un aspecto lechoso. Después se agregó 0,4mL (por tubo) de reactivo B de Voges-Proskauer que consiste en KOH al 40%. Se agitó fuertemente los tubos. Se tomó como resultado positivo para esta prueba la transformación del medio a un color rosado violáceo después de cinco minutos.

2.4.7 Reducción de nitrato.- Se preparó medio nitrato (Difco) en tubos de ensayo en donde se inocularon las bacterias. El medio se incubó durante 1 día a 35°C. Una vez incubado se añadió 2 gotas de reactivo de Griess-Iloslav A que contiene 8g de ácido sulfanílico por litro de ácido acético 5N. A continuación se colocaron 2 gotas del reactivo de Griess-Iloslav B que consta de 5 g de alfa naftol por un litro de ácido acético 5N. La coloración roja es positiva para esta prueba, pues muestra una reducción de nitrato. Para confirmar un resultado negativo se colocó un poco de polvo de zinc en el medio. Si al añadir zinc, el medio cambia de color se confirma la negatividad de la prueba, si no cambia de color quiere decir que los nitratos se han reducido mas allá del estado de nitrito.

2.4.8 Citocromo Oxidasa.- Se utilizaron discos de papel especiales para esta prueba (DDO18-1VL, Hi media), en donde se colocó, con la ayuda de un asa, una colonia de la bacteria correspondiente. El cambio de coloración del disco, de blanco a azul, indica que la prueba es positiva.

2.4.9 Crecimiento a 50°C.- Se sembraron las cepas aisladas en tubos con caldo nutriente (Difco). Los tubos inoculados se incubaron a 50°C durante 1 día. La aparición de turbidez debido al crecimiento bacteriano en el medio indica que la prueba es positiva.

2.4.10 Degradación de la urea.- Para esta prueba se utilizaron tubos con medio para la prueba de la ureasa (Britania) a un pH inicial de 6,8. Se sembraron los tubos y se incubaron a 35°C durante 3 días. Si la prueba es positiva el medio cambia a un color rosado intenso debido al aumento del pH producido por la aparición de amoníaco a partir de la urea. Para cada cepa se utilizaron también tubos con caldo base como control para comprobar que el amoníaco se produce a partir de la urea y no de la peptona del medio.

2.4.11 Tinción de esporas.- Se emplearon cultivos de tres días de incubación para dar lugar a que las bacterias produzcan las esporas. Se prepararon frotis bacterianos, los mismos que fueron teñidos con verde de malaquita. Se colocó la muestra sobre una malla de amianto para calentarla sobre la llama del mechero, de forma que el colorante humee durante 5min, sin dejar que se evapore totalmente el colorante (es importante que la muestra no se seque). Se lavó con abundante agua el exceso de colorante. Se tiñó con safranina durante 1 min. Se lavó con agua el exceso de colorante. Finalmente se secó la placa y se observó al microscopio (Leica CME).

2.4.12 Degradación de la tirosina.- Se sembró un asa llena de cada cepa en caldo nutriente (Difco) y se sometió este medio a un calentamiento de 80°C durante 10 minutos. Posteriormente se incubó el medio a 30°C durante 18 h. Después de la incubación se tomó 10ul de cada cultivo y se sembró en cajas petri conteniendo agar tirosina (Edwards & Sheddon, 2000). Se incubó las cajas sembradas a 37°C durante 24 horas. La formación de un halo alrededor de la colonia es positivo para esta prueba.

2.5 Selección de las bacterias.- Se realizó una purificación de todas las bacterias aisladas, se sembró en caldo nutriente (Difco) y se calentó este medio a 80°C durante 15 minutos. El medio tratado se incubó durante 24 horas, de este, se tomó 10 µl con un asa calibrada (Nichrome loop D-9, Hi media) y se sembró en cajas petri con agar almidón. Se incubó las cajas sembradas durante 24 horas a 30°C,

obteniéndose como resultado unidades formadoras de colonias (UFC) separadas. El agar se inundó con lugol y se revelaron los halos de acción enzimática. Se midió tanto el diámetro del halo como el de la colonia de cinco colonias de cada bacteria, y las tres bacterias que presentaron una mayor relación diámetro del halo/diámetro de la colonia, fueron escogidas para realizar con ellas el diseño experimental.

2.6 Identificación molecular de las bacterias seleccionadas.- Para realizar una identificación molecular se preparó una suspensión celular en suero fisiológico, suspendiendo cinco asas (Nichrome loop D-9, Hi media) llenas de cada bacteria en 2mL de suero fisiológico. Estas suspensiones fueron llevadas al laboratorio de Biología Molecular Humana de la Escuela Politécnica del Ejército, donde se realizó una extracción de ADN y una amplificación del ADN ribosomal de la fracción 16S.

Para la amplificación se utilizó un protocolo descrito para aislamiento de DNA genómico de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de una suspensión celular, que se explica a continuación (la preparación de todas las soluciones está descrita en el Anexo B.1):

Se centrifugó la suspensión celular durante 10 minutos a 21255g y se desechó con cuidado el sobrenadante. Se adicionó al tubo 1mL de buffer TE pH 8 y se incubó a 80°C en termobloque (Thermomixer compact, Eppendorf) por 60 min, se dió un toque de vórtex cada 15 min. Se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y luego se añadió 20µl de solución I, 20µl de solución II y 20µl de solución III (cóctel lítico). Se agitó la suspensión en un vórtex y se incubó a 37°C por 60 min. Después, se añadió 76µl de solución B. Se agitó intensamente la mezcla con un vórtex y se incubó la suspensión a 65°C por 10 min. Se adicionó 100µl de NaCl 5M y se agitó en vórtex. Luego, se añadió 80µl de solución CTAB/NaCl y nuevamente se agitó vigorosamente los contenidos del tubo en el vórtex. Se incubó la suspensión resultante a 65°C por 10 min. Se adicionaron 700µl de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló en el vórtex

unos 15 segundos y luego se centrifugó el tubo eppendorf a 21255g por 5 min a temperatura ambiente. Se removió la fase superior con una pipeta (se debe tener cuidado de no perturbar o absorber la fase blanquecina intermedia) a un nuevo tubo de 1.5mL. Se completó el volumen con isopropanol. Se cerró el tubo y se lo invirtió varias veces para mezclar el contenido. Se incubó por 30 min a -20°C.

Los ácidos nucleicos se colectaron por centrifugación a 21255g por 30 min. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se añadió aproximadamente 1mL de etanol frío al 70% (v/v) con el cual se lavó el pellet. Nuevamente se colectaron los ácidos nucleicos por centrifugación a 21255g por 15 min. Se descartó el sobrenadante con cuidado y se evaporó el etanol restante al dejar reposar los tubos abiertos durante 30 minutos dentro de la cabina de bioseguridad (CSB120, C4), para evitar contaminación. Finalmente, se disolvió el pellet en 100µl de buffer TE pH 8 cuidando de que todo el precipitado se disuelva.

Para la amplificación se utilizó una master mix (Anexo B.2) con los primers Nf (5`TCC TAG GGG AGG CAG CAG T 3`, Tm: 60°C) y Nr (5`GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3`, Tm: 50°C). Las muestras se prepararon mezclando 45µl de la master mix con 5µl de ADN. Se preparó también un blanco con agua destilada en lugar de ADN. Las muestras fueron sometidas a los ciclos que se detallan a continuación en un termociclador Swiftmaxi de ESCO.

Denaturación inicial: 1 ciclo: 95°C por 4 min.

- **Ciclos PCR:** 40 ciclos: 95°C por 10 seg. 60°C por 1 min.
- **Extensión final:** 1 ciclo: 72°C por 4 min.
- **Final hold:** 4°C por 10 min.

Para comprobar que se obtuvo el producto deseado y cuantificar la concentración de ADN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con dos repeticiones de 8µl de cada una de las muestras junto con un indicador (low DNA mass ladder, Invitrogen) y un control negativo.

Este producto amplificado se envió a los laboratorios de Macrogen Inc. en Seul Corea del Sur en donde fueron purificados mediante precipitación con etanol y secuenciados con un secuenciador automático 3730xl. La secuencia fue comparada con las de las bases de datos de DDBJ, EMBL, GenBank y NCBI con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se tomó la secuencia correspondiente del ADNr 16S de las bacterias con mayor similitud así como la secuencia de las bacterias aerobias formadoras de esporas más conocidas para realizar un alineamiento total de bases (junto con las secuencias de las bacterias seleccionadas) con la herramienta ClustalW. Con las secuencias alineadas se creó un árbol filogenético utilizando Protdist-neighbor phylogenetic tree. Para las dos aplicaciones mencionadas se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

2.7 Obtención de las curvas de Absorbancia vs. UFC.- Para el desarrollo del diseño experimental, se estandarizó una concentración de células inicial de 2×10^6 UFC mL⁻¹ en el medio. Para poder determinar la cantidad de inóculo necesario para llegar a esta concentración, se generó una curva para cada bacteria en la que se relacionaron las medidas de absorbancia con la cantidad de UFC presentes en el medio. Para generar dicha curva se sembraron 3 asas llenas de la bacteria pura en 10 mL de caldo almidón modificado (Achi & Nijoku 1992) y se incubaron durante 24 horas. Con el medio saturado de bacterias se realizaron diluciones al 40% (1:2.5), 30% (1:3.33), 20% (1:5), 10% (1:10) y 5% (1:20) cuya absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Labomed UVS 2700 a una longitud de onda (DO) de 546nm que fue determinada mediante un espectro de absorbancia. Para todas las mediciones espectrofotométricas se utilizaron celdas de cuarzo QS 104.

Para lograr que la siembra de las diferentes diluciones no resulte en un crecimiento masivo, se diluyó aun más cada muestra, en un rango de 1:100 a 1:1000 dependiendo de la bacteria, para así obtener una dilución final con una concentración de bacterias adecuada para el conteo de UFC en placa. Para cada dilución final (incluyendo la del medio al 100%) se realizaron tres repeticiones de siembra profunda en agar para recuento de placa (Plate Count HiVeg Agar, HiMedia). Para realizar la siembra profunda se prepararon matraces que contenían 30mL de agar cada uno, los mismos que fueron autoclavados. Una vez esterilizados, los matraces con el medio fueron colocados en un baño maría (Dufnoff Metabolic Shaking Incubator, Precision) a 45°C y con una agitación de 70 rpm. Se esperó a que el medio adquiriera la temperatura indicada y se procedió a la siembra de 100µl de cada dilución final. Se dejó agitar durante 5 minutos y se colocó el contenido de agar PCA inoculado de cada matraz en cajas petri estériles. Las cajas se incubaron a 30°C durante 18 horas y se contaron las UFC en una cámara de conteo Leica modelo 3325. Los datos obtenidos de absorbancia y UFC mL⁻¹ fueron enfrentados en una curva (Sutton, 2006). La curva fue linearizada (Microsoft Excel 2008) para obtener una fórmula que nos permita calcular las UFC mL⁻¹ a partir de datos de absorbancia. Paralelamente, con los datos de absorbancia correspondientes a cada dilución, se obtuvo una curva de absorbancia vs. dilución la cual fue también linearizada (Microsoft Excel 2008).

2.8 Extracción de almidón.- Para la producción de la enzima se probaron tres fuentes distintas de almidón: papa (*Solanum tuberosum*) súper chola, banano (*Musa paradisiaca*) variedad Cavendish y achira (*Canna edulis*) almidonera. Para la extracción de almidón de cada una de estas fuentes se utilizó el método descrito por Flores *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se tomaron 500 g de tubérculo o fruto respectivamente a los que se les removió la cáscara y se los cortó en cubos de 2 a 3 cm de lado. Los trozos obtenidos fueron colocados en una solución de ácido cítrico al 0.3% en una relación p/v de 1:1,5 y fueron licuados en una licuadora Nowake N9998 a máxima potencia durante 5 minutos.

La pasta obtenida fue tamizada con una cernidora y lavada con agua destilada hasta que el líquido no mostró más presencia de almidón. Se descartaron los sólidos grandes y el líquido con el almidón se tamizó nuevamente en un tamiz 200 U.S. Se dejó en reposo el agua obtenida como producto del segundo tamizado durante 24 horas. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue secado en una estufa Preciso Oven model 45EG a 45°C durante 24 horas.

2.9 Obtención de almidón soluble.- En tubos Falcon® de 12 mL se colocó 3 gramos de almidón junto con 6 mL de una solución de etanol al 95% y ácido clorhídrico al 1.5% durante 15 minutos en un baño maría a 40°C, los tubos fueron volteados cada cinco minutos para que se homogenice la suspensión. Después, se centrifugaron los tubos a 3500g durante cinco minutos, el sobrenadante fue descartado y al almidón se dejó secar a 40°C durante 24h. Robyt, en 1997 describe este método pero manteniendo la suspensión en reflujo. Todo el almidón extraído de las distintas fuentes fue tratado de esta forma para hacerlo soluble. Se determinó contenido de azúcares, proteína y temperatura de solubilización para cada almidón comparándolos con el almidón comercial.

2.10 Preparación del inóculo.- Para preparar el inóculo a la concentración de 2×10^7 UFC mL⁻¹, establecida para el diseño experimental para las tres bacterias escogidas, se sembró la bacteria correspondiente en tres tubos de agar inclinado y se dejó incubar durante 24h a 37°C. Luego se pasó todo el contenido de bacterias de los tubos a 30 mL de un medio líquido (caldo almidón modificado) y se dejó incubar nuevamente durante 24h a 37°C. El inóculo resultante fue medido en un espectrofotómetro Labomed UVS 2700 a una DO de 546nm. Con la ayuda de la curva de absorbancia vs. UFC se calculó la absorbancia a la que debería estar el inóculo para tener la concentración requerida, y con la ayuda de la curva de absorbancia vs. dilución, se calculó la dilución del inóculo para lograr dicha absorbancia. Después de diluir el inóculo según lo calculado, se midió nuevamente la absorbancia para comprobar que era la correcta.

2.11 Determinación de condiciones óptimas de: pH, temperatura y fuente de almidón como sustrato.- Se utilizó un factorial 3x3x3x3 (BxPxTxS) en donde los factores fueron: las bacterias (B), el pH (P), la temperatura (T) y la fuente de almidón como sustrato (S) para la producción de amilasas.

Se evaluaron dos variables: el crecimiento bacteriano que se determinó según la absorbancia medida espectrofotométricamente, traducida a UFC mL⁻¹ mediante la curva obtenida para cada bacteria y la actividad enzimática. Se dispuso el factorial en un DBCA con 3 repeticiones.

Se prepararon tubos de ensayo con caldo almidón modificado según Achi & Nijoku (1992), en los que se utilizó el almidón de las distintas fuentes (papa, banano y achira). Para cada fuente de almidón se prepararon tubos correspondientes a las condiciones de pH de cada tratamiento.

El pH se ajustó con HCl y NaOH antes de añadir el almidón al medio. En tubos de ensayo se colocaron 9mL del medio para cada unidad experimental y se inoculó 1mL de la bacteria respectiva a la concentración de 2×10^7 UFC mL⁻¹ para llegar a una concentración final de 2×10^6 UFC mL⁻¹.

Los tubos inoculados se dejaron incubar por 42 horas a la temperatura determinada para cada tratamiento. Cada uno de los tratamientos realizados se pueden observar en la Tabla 2.1.

Para cada uno de los tratamientos se preparó también un blanco en el que no se inoculó la bacteria.

Tabla 2.1 Condiciones de pH, temperatura y fuente de almidón como sustrato de los medios preparados para la incubación de cada una de las tres bacterias aisladas.

Bacteria	Almidón					Achira					Banano					Papa								
	T	pH	6	7	8	T	pH	6	7	8	T	pH	6	7	8	T	pH	6	7	8				
1	30°C					3t	3t	3t	30°C					3t	3t	3t	30°C					3t	3t	3t
	35°C					3t	3t	3t	35°C					3t	3t	3t	35°C					3t	3t	3t
	40°C					3t	3t	3t	40°C					3t	3t	3t	40°C					3t	3t	3t
2	30°C					3t	3t	3t	30°C					3t	3t	3t	30°C					3t	3t	3t
	35°C					3t	3t	3t	35°C					3t	3t	3t	35°C					3t	3t	3t
	40°C					3t	3t	3t	40°C					3t	3t	3t	40°C					3t	3t	3t
3	30°C					3t	3t	3t	30°C					3t	3t	3t	30°C					3t	3t	3t
	35°C					3t	3t	3t	35°C					3t	3t	3t	35°C					3t	3t	3t
	40°C					3t	3t	3t	40°C					3t	3t	3t	40°C					3t	3t	3t

t: tubos de ensayo con 10 mL de medio

2.11.1 Medición del crecimiento bacteriano.- Se calculó la concentración celular final del cultivo obtenido después de la incubación al medir espectrofotométricamente a una DO de 546nm (UVS2700, Labomed) las muestras y los blancos. Se restó la medida de cada blanco de la de su respectiva muestra, y este dato fue transformado a UFC mL⁻¹ con la fórmula obtenida anteriormente para cada bacteria. Después, éste cultivo fue sometido a una centrifugación a 3857g durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga Hettich Universal 32R. El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático crudo, y el sedimento fue descartado. Se midió la actividad enzimática del extracto enzimático crudo para cada uno de los tratamientos.

2.11.2 Medición de la actividad enzimática.- Se midió la actividad enzimática según la técnica descrita por Bernfeld (1955), con algunas modificaciones.

Se incubó en un tubo de ensayo 0.5mL de extracto enzimático crudo junto con 0.5mL de solución de sustrato (1 g de almidón soluble en 100 mL de buffer citrato fosfato, pH6.5) durante 15 minutos a 40°C. La reacción enzimática fue interrumpida por la adición de 1 mL del reactivo de ácido dinitrosalisílico (1 g de ácido dinitrosalisílico en 20 mL de NaOH 2N y 50 mL de agua, 30 g de tartrato de Na y K, afordo a 100 mL). Se colocó el tubo de ensayo que contenía la solución, en agua hirviendo durante 5 minutos. A continuación, se dejó enfriar los tubos. Después de la adición de 10 mL de agua destilada en cada tubo, se midió la absorbancia espectrofotométricamente a una DO de 540nm (UVS2700, Labomed). Como blanco se utilizó un tubo que contenía los mismos reactivos pero sin incubar, por lo que, existió un blanco para cada muestra. También se realizaron blancos para cada tratamiento en los que no se inoculó la bacteria.

Para determinar la actividad amilasa en UA mL⁻¹ se restó la medición obtenida de cada muestra de la medición obtenida de su respectivo blanco. Esta medida de absorbancia se transformó a mg de dextrinas libres mL⁻¹ con la ayuda de una curva de calibración establecida con maltosa diluida a concentraciones entre 0,1 y 1 mg mL⁻¹ tratada de la misma forma que las muestras. El dato obtenido de mg de dextrinas libres mL⁻¹ se dividió para 0.342 mg que el peso de 1µmol de maltosa y se multiplicó por 2 (pues en el experimento se utilizó 0.5 mL de extracto enzimático crudo), ya que, se definió a una unidad de actividad amilasa (UA) como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de maltosa en 15 minutos a 40°C por 1 mL de la solución enzimática.

2.11.3 Análisis estadístico.- Los datos obtenidos fueron ingresados en el programa SAS V8 para Windows con el que se realizaron los análisis de variancia por temperatura de cada una de las dos variables medidas. Con los factores que presentaron significancia estadística se realizó la prueba de Tuckey para agruparlos y determinar los tratamientos que dieron mejores resultados para cada variable. También se analizó la correlación existente entre las dos variables medidas, utilizando las medias de cada tratamiento se determinó si existió o no una correlación con el programa Microsoft EXEL 2007.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Aislamiento de cepas productoras de amilasas.- Los resultados para la presencia de bacterias con actividad amilasa son los que se muestran en la Tabla 3.1. De todas las cajas se aislaron un total de 26 cepas, de las cuales se perdieron seis debido a que en la segunda siembra ya no presentaron actividad.

Tabla 3.1 Presencia de bacterias con actividad amilasa al sembrar las distintas diluciones de las muestras tomadas del suelo del bosque protector “Mindo-Nambillo”.

Caja	Actividad Amilasa	Caja	Actividad amilasa
1.1.1.s	No	1.1.1.p	No
1.1.2.s	No	1.1.2.p	No
1.1.3.s	No	1.1.3.p	No
1.2.1.s	No	1.2.1.p	No
1.2.2.s	No	1.2.2.p	Si
1.2.3.s	No	1.2.3.p	No
1.3.1.s	Si	1.3.1.p	No
1.3.2.s	Si	1.3.2.p	No
1.3.3.s	Si	1.3.3.p	No
2.1.1.s	No	2.1.1.p	Si
2.1.2.s	No	2.1.2.p	Si
2.1.3.s	No	2.1.3.p	No

2.2.1.s	No	2.2.1.p	No
2.2.2.s	No	2.2.2.p	No
2.2.3.s	No	2.2.3.p	No
2.3.1.s	Si	2.3.1.p	No
2.3.2.s	No	2.3.2.p	No
2.3.3.s	No	2.3.3.p	No
3.1.1.s	Si	3.1.1.p	Si
3.1.2.s	Si	3.1.2.p	No
3.1.3.s	Si	3.1.3.p	No
3.2.1.s	No	3.2.1.p	Si
3.2.2.s	No	3.2.2.p	No
3.2.3.s	Si	3.2.3.p	No
3.3.1.s	No	3.3.1.p	No
3.3.2.s	No	3.3.2.p	No
3.3.3.s	No	3.3.3.p	No

En la Tabla 3.2 podemos ver las características morfológicas tanto de las colonias como de las células de las cepas bacterianas aisladas. Notamos que existen diferencias a nivel morfológico entre todas ellas. Todas las bacterias aisladas fueron bacilos Gram positivos.

Tabla 3.2 Características morfológicas de cada una de las bacterias aisladas a partir de muestras de suelo del bosque Mindo Nambillo

Bacteria	Procedencia	Forma de la colonia	Ubicación de la espora	Abultamiento por la espora
FFMN01	Pantano	Redonda	Subterminal	No
FFMN02	Pantano	Irregular	Subterminal	No
FFMN03	Rio	Redonda	Terminal	Si
FFMN04	Ladera	Irregular	Central	No
FFMN05	Pantano	Redonda	Terminal	Si
FFMN06	Pantano	Redonda	Central	No
FFMN07	Pantano	Redonda	Terminal	Si
FFMN08	Ladera	Irregular	Central	Si
FFMN09	Ladera	Redonda	Subterminal	Si

FFMN10	Pantano	Redonda	Terminal	Si
FFMN11	Pantano	Redonda	Terminal	No
FFMN12	Pantano	Redonda	Central	No
FFMN13	Ladera	Redonda	Central	No
FFMN14	Ladera	Redonda	Central	Si
FFMN15	Ladera	Redonda	Terminal	Si
FFMN16	Ladera	Irregular	Central	No
FFMN17	Ladera	Irregular	Central	No
FFMN18	Ladera	Redonda	Central	No
FFMN19	Ladera	Irregular	Central	No
FFMN20	Ladera	Iregular	Central	No

3.2 Pruebas bioquímicas.- No se pudo determinar de forma acertada la especie a la que pertenece cada cepa pero se establecieron las características bioquímicas de estas.

En la tabla 3.3 observamos todas las pruebas bioquímicas para las cuales se obtuvieron los mismos resultados para todas las cepas.

Tabla 3.3 Pruebas bioquímicas con iguales resultados para todas las bacterias aisladas a partir de muestras de suelo del bosque Mindo Nambillo

Prueba	Resultado
Degradación de la caseína	Positivo
Degradación de la gelatina	Positivo
Voges Proskauer	Positivo
Reducción de nitrato	Positivo
Citocromo oxidasa	Positivo

Degradación de la urea	Negativo
Degradación de la tirosina	Positivo

Para el resto de pruebas bioquímicas existieron ciertas diferencias que nos permitieron determinar el género pero no la especie de las cepas analizadas (Tabla 3.4). Por los resultados podemos decir que las bacterias pueden pertenecer a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*.

Tabla 3.4 Pruebas bioquímicas realizadas a cada una de las cepas aisladas a partir de muestras de suelo del bosque Mindo Nambillo.

Bacteria	Prueba				Género
	Crecimiento Anaerobio	Crecimiento a 55°C	Utilización del citrato	Abultamiento por la espora	
FFMN01	P/N	NEG	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN02	P/N	NEG	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN03	NEG	NEG	NEG	Si	<i>Bacillus</i>
FFMN04	NEG	P/N	POS	No	<i>Bacillus</i>
FFMN05	POS	POS	NEG	Si	<i>Paenibacillus</i>
FFMN06	P/N	POS	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN07	P/N	NEG	NEG	Si	<i>Paenibacillus</i>
FFMN08	NEG	NEG	NEG	Si	<i>Paenibacillus</i>
FFMN09	P/N	NEG	NEG	Si	<i>Paenibacillus</i>
FFMN10	POS	POS	NEG	Si	<i>Paenibacillus</i>
FFMN11	P/N	NEG	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN12	POS	NEG	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN13	NEG	P/N	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN14	POS	P/N	NEG	Si	<i>Paenibacillus</i>
FFMN15	POS	POS	NEG	Si	<i>Paenibacillus</i>
FFMN16	NEG	NEG	NEG	No	<i>Bacillus</i>

FFMN17	NEG	NEG	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN18	NEG	NEG	POS	No	<i>Bacillus</i>
FFMN19	POS	P/N	NEG	No	<i>Bacillus</i>
FFMN20	NEG	NEG	NEG	No	<i>Bacillus</i>

P/N: no se pudo definir claramente el resultado. B. :Bacillus. P.: Paenibacillus

Se mantuvieron únicamente 15 cepas que fueron las que mostraron diferencias a nivel bioquímico y morfológico. Las pruebas de metabolismo de carbohidratos mostraron contadas diferencias entre las cepas aisladas. Todas las cepas fueron capaces de utilizar cada uno de los medios para su crecimiento. En la Tabla 3.5 podemos ver cuales de los carbohidratos utilizados fueron fermentados por las bacterias aisladas.

Tabla 3.5 Pruebas de fermentación de distintos carbohidratos para las cepas aisladas de muestras de suelo del bosque Mindo Nambillo.

Bacteria	Maltosa	Manitol	Xilosa	Lactosa	Sacarosa
FFMN01	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN03	POS	POS	POS	POS	POS
FFMN04	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN06	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN08	POS	NEG	POS	NEG	NEG
FFMN09	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN11	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN13	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN14	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
FFMN15	POS	NEG	POS	NEG	POS

FFMN16	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN17	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN18	POS	NEG	NEG	NEG	POS
FFMN19	POS	NEG	POS	NEG	POS
FFMN20	POS	NEG	POS	NEG	POS

3.3 Selección de las bacterias.- Los resultados de la relación diámetro de colonia/diámetro del halo se pueden observar en la Tabla 3.6. Se puede ver que las tres bacterias cuyo resultado de la relación es mayor son: FFMN01, FFMN03 y FFMN18, por lo que fueron escogidas para desarrollar el diseño experimental.

Tabla 3.6 Tamaños promedio del diámetro de halo de acción amilasa, diámetro de colonia y la relación entre ambos.

Bacteria	Promedio diámetro de la colonia (mm)	Promedio diámetro del halo (mm)	Relación de diámetros halo/colonia
FFMN01	3.2	6.4	2
FFMN03	4.4	7.4	1.68
FFMN04	6.6	9.6	1.45
FFMN06	3.4	5.4	1.59
FFMN08	7.2	10.2	1.42
FFMN09	7.2	10.2	1.42
FFMN11	3.0	5.0	1.67
FFMN13	7.4	11.4	1.54
FFMN14	6.2	9.2	1.48
FFMN15	6.4	9.4	1.47
FFMN16	6.2	9.2	1.48
FFMN17	7.8	10.8	1.38

FFMN18	5.6	9.6	1.71
FFMN19	6.0	10.0	1.67
FFMN20	7.4	11.4	1.54

3.4 Identificación molecular de las bacterias seleccionadas.- De la extracción de ADN y amplificación del fragmento 16S ADNr se obtuvo un producto de 476 pares de bases con una concentración aproximada de $50\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ para cada una de las muestras (Fig. 3.1). Además de las tres bacterias seleccionadas, también se amplificó el fragmento 16S ADNr de la bacteria FFMN11.



Figura 3.1 Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de la amplificación de un fragmento del ADNr 16S para las bacterias FFMN01, FFMN02, FFMN11, FFMN18. bp: pares de bases, cn: control negativo.

Las secuencias obtenidas para cada una de las tres bacterias en estudio se muestran detalladamente en el Anexo C. El árbol filogenético resultante nos muestra la distancia que existe entre las bacterias en estudio y varias bacterias aerobias formadoras de esporas que se encuentran identificadas molecularmente (Fig 3.2).

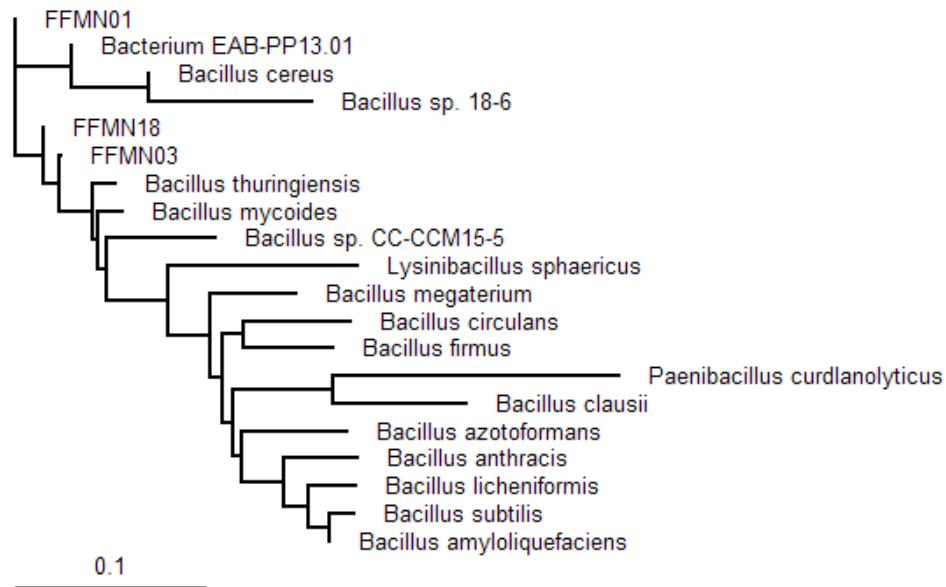


Figura 3.2 Árbol filogenético establecido utilizando la secuencia de una fracción del ADNr 16S de diferentes bacterias aerobias formadoras de esporas junto con la secuencia de las tres bacterias en estudio (FFMN01, FFMN03, FFMN18).

3.5 Obtención de las curvas de absorbancia vs. UFC.- De las relaciones existentes entre: dilución, medidas de absorbancia a una DO de 546nm y UFC en caja se pudo obtener dos curvas para cada una de las tres bacterias seleccionadas para el desarrollo del diseño experimental. La primera curva corresponde a la relación entre absorbancia y dilución, y la segunda a la relación entre absorbancia y UFC en caja petri. Dichas curvas se linearizaron para obtener las fórmulas necesarias para la preparación del inóculo en el diseño experimental.

En la Tabla 3.7 podemos apreciar los datos obtenidos de las siembras de las diferentes diluciones. Para cada repetición el conteo es diferente pero se puede sacar un promedio que nos dará un dato aproximado confiable para establecer la curva de absorbancia vs. UFC.

Tabla 3.7 Absorbancia y conteo al sembrar 100µl en caja de las diferentes diluciones del inóculo de la bacteria FFMN01.

Diluciones		Abs. 546 nm de la 1 ^{ra} dilución	Conteos en caja (UFC)			Concentración	
Primera	Segunda		Primero	Segundo	Tercero	Porcentaje	UFCx10 ⁵ mL ⁻¹
1.0	1:1000	1.653	300	300	290	100	303
1:2.5	1:2500	0.938	100	119	120	40	113
1:3.33	1:3333	0.736	55	56	93	30	68
1:5.0	1:5000	0.476	33	50	30	20	38
1:10.0	1:10000	0.236	21	17	23	10	20
1:20.0	1:20000	0.114	12	9	5	5	9

Al graficar la curva con los datos de absorbancia vs. UFC se aprecia una tendencia lineal con un R² de 0.94 (Fig. 3.3).

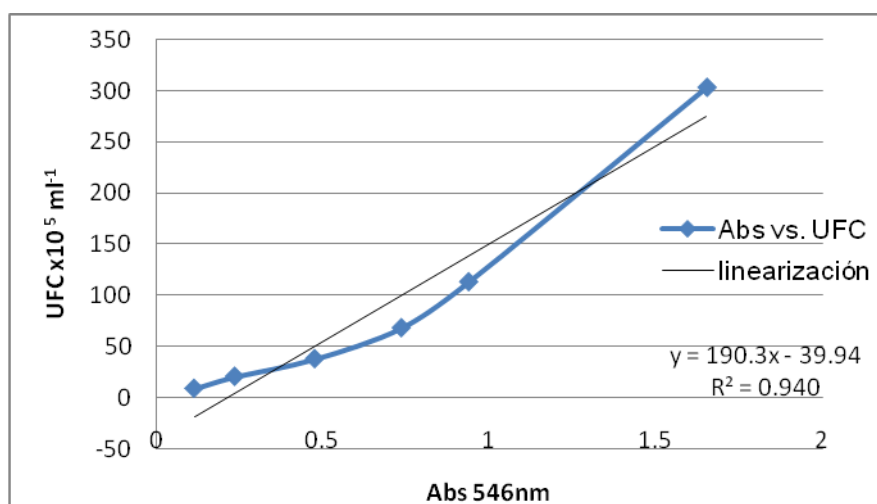


Figura 3.3 Absorbancia a una DO de 546nm vs. concentración bacteriana expresada en UFC mL⁻¹ para la bacteria FFMN01 y fórmula de la linearización de la curva.

Si generamos una curva entre absorbancia y porcentaje de dilución la tendencia a la línea recta aumenta mostrando una proporcionalidad directa entre ambas variables (Fig. 3.4).

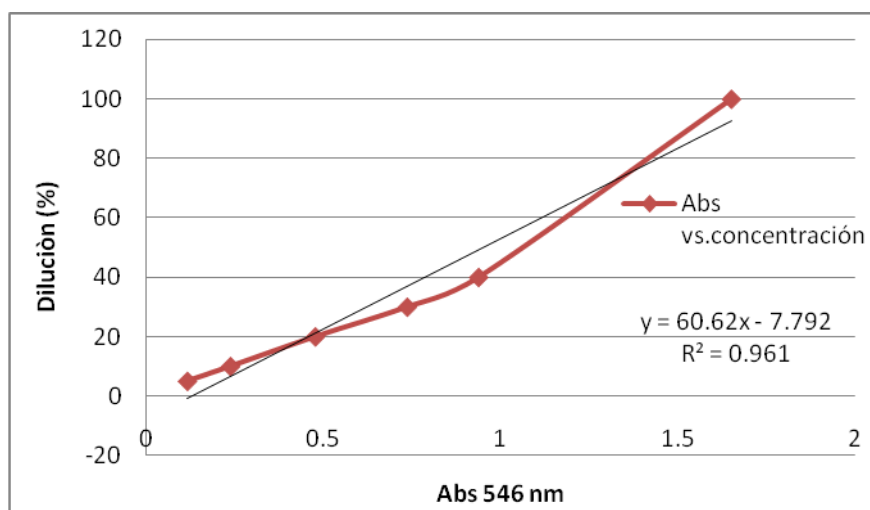


Figura 3.4 Absorbancia a una DO de 546nm vs. concentración bacteriana expresada en porcentaje para la bacteria FFMN01 y fórmula de linearización de la curva. 100%: inóculo preparado sin diluir.

En la Tabla 3.8 vemos como para la bacteria FFMN03 los conteos en caja aumentan, a una menor absorbancia existe una mayor cantidad de UFC, si lo comparamos con los datos obtenidos para FFMN01 (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Absorbancia y conteo al sembrar 100µl en caja de las diferentes diluciones del inóculo de la bacteria FFMN03.

Diluciones		Abs. 546 nm de la 1 ^{ra} dilución	Conteos en caja (UFC)			Concentración	
Primera	Segunda		Primero	Segundo	Tercero	Porcentaje	UFCx10 ⁵ mL ⁻¹
1,0	1:1000	1.442	375	410	425	100	403
1:2,5	1:2500	0.777	205	131	155	40	164

1:3,33	1:3333	0.57	140	138	148	30	142
1:5,0	1:5000	0.408	114	131	155	20	133
1:10,0	1:10000	0.221	60	75	56	10	64
1:20,0	1:20000	0.126	25	35	34	5	31

La tendencia de la curva obtenida para FFMN03 también es lineal. La forma de la curva es diferente a la de FFMN01 pero se mantiene una proporcionalidad directa entre los factores absorbancia y UFC (Fig. 3.5).

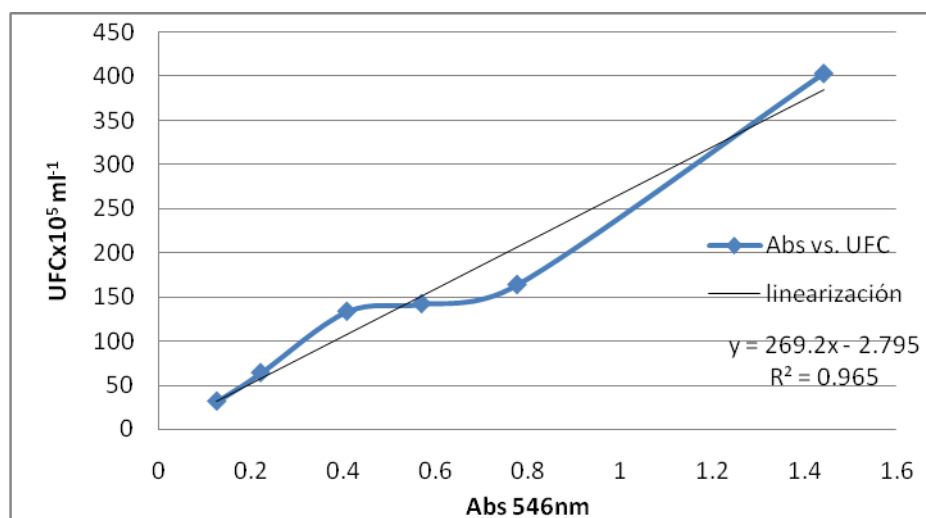


Figura 3.5 Absorbancia a una DO de 546nm vs. concentración bacteriana expresada en UFC mL⁻¹ para la bacteria FFMN03 y fórmula de la linearización de la curva.

Para FFMN03 la curva de absorbancia vs. concentración se acerca claramente a una recta (Fig. 3.6).

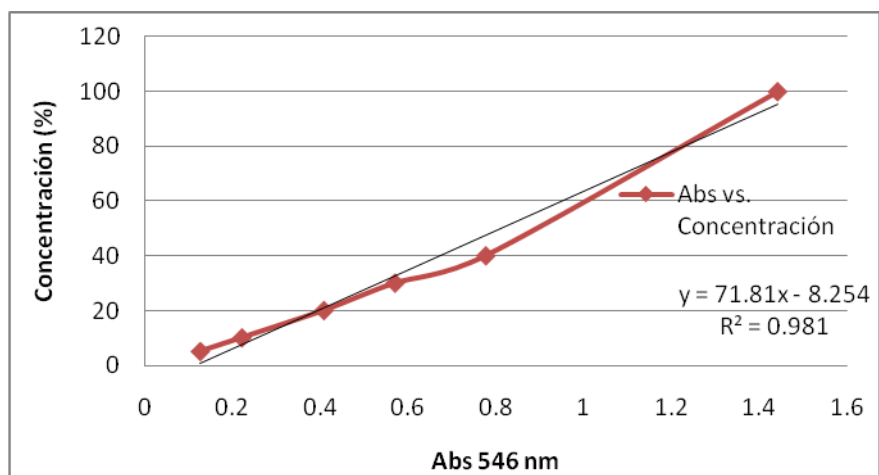


Figura 3.6 Absorbancia a una DO de 546nm vs. concentración bacteriana expresada en porcentaje para la bacteria FFMN03 y fórmula de linearización de la curva. 100%: inóculo preparado sin diluir.

Para la bacteria FFMN18 fue necesario diluir aun más las muestras antes de sembrarlas en caja. Podemos ver en la Tabla 3.9 como se lleva a las muestras, con un 5% hasta 40% de bacteria, a una dilución 10 veces mayor que lo que se llevó a FFMN01 y FFMN03. La muestra con un 100% de bacteria, fue diluida 100 veces más que las otras dos bacterias para que sea factible el conteo en caja. Aunque los conteos en caja se muestran menores que para FFMN01 y FFMN03 la concentración final en UFC mL⁻¹ en relación a la absorbancia es mucho mayor.

Tabla 3.9 Absorbancia y conteo al sembrar 100µl en caja de las diferentes diluciones del inóculo de la bacteria FFMN18.

Diluciones		Abs. 546 nm de la 1 ^{ra} dilución	Conteos en caja (UFC)			Concentración	
Primera	Segunda		Primero	Segundo	Tercero	Porcentaje	UFCx10 ⁵ mL ⁻¹
1,0	1:100000	1.606	124	122	113	100	11980
1:2,5	1:25000	0.806	172	164	183	40	1730
1:3,33	1:33333	0.6	169	160	140	30	1560
1:5,0	1:50000	0.393	80	79	67	20	750
1:10,0	1:100000	0.185	26	29	42	10	320
1:20,0	1:200000	0.095	23	19	24	5	220

La curva de absorbancia vs. UFC para la bacteria FFMN18 se muestra irregular y su tendencia a la línea recta es menor que la de FFMN01 y FFMN03, con un R^2 de 0.875 (Fig. 3.7).

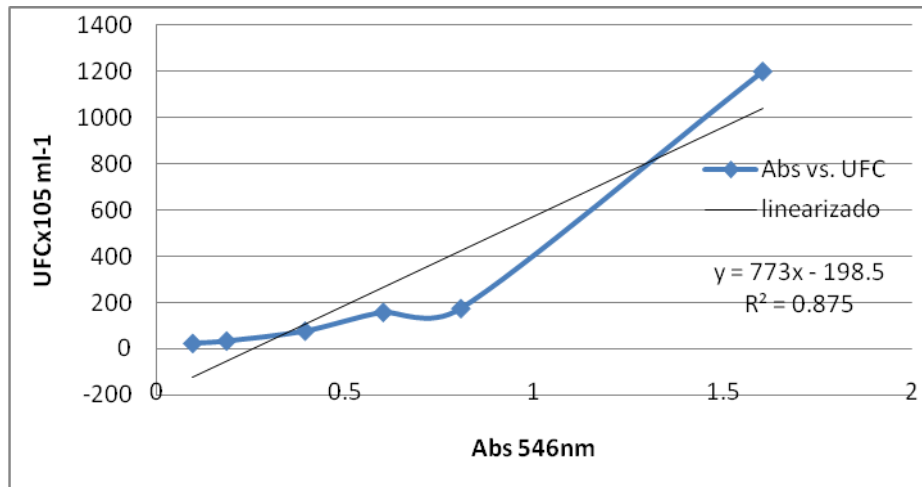


Figura 3.7 Absorbancia a una DO de 546nm vs. concentración bacteriana expresada en UFC mL⁻¹ para la bacteria FFMN18 y fórmula de la linearización de la curva.

Notamos en la Figura 3.8 que la curva de absorbancia vs. concentración de FFMN18 es la que más se acerca a la recta entre las tres bacterias analizadas.

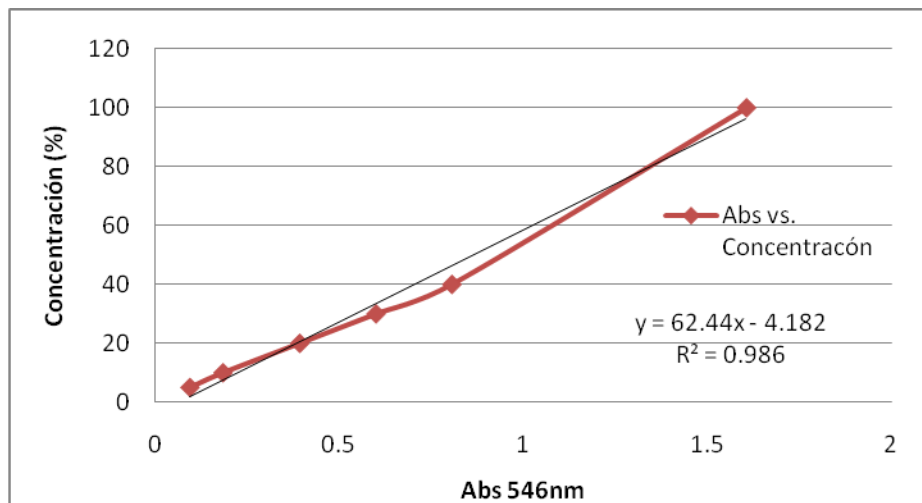


Figura 3.8 Absorbancia a una DO de 546nm vs. concentración bacteriana expresada en porcentaje para la bacteria FFMN18 y fórmula de linearización de la curva. 100%: inóculo preparado sin diluir.

3.6 Extracción del almidón.- Para la extracción de cada fuente de almidón se utilizó en primera instancia 500g de materia prima pelada. El rendimiento y tamaño promedio de cada almidón extraído se muestran en la Tabla 3.10. El almidón de banano mostró un oscurecimiento por lo que se supone experimentó una mayor oxidación y su contenido de impurezas pudo ser observada al microscopio, mientras que, el almidón de papa no mostró oscurecimiento ni presencia de impurezas. El almidón de achira mostró poco oscurecimiento y no mostró impurezas al observarlo al microscopio (Anexo E).

Tabla 3.10 Rendimiento y tamaño de gránulo de cada fuente de almidón utilizado como sustrato.

Fuente	Cantidad extraída (g)	Rendimiento	Tamaño del gránulo (µm)
Achira	24.8	4.96%	66
Banano	10	2%	40
Papa	56.7	11.34%	35

3.7 Obtención de almidón soluble.- Al solubilizar el almidón soluble el primer resultado que se pudo observar claramente fue la disminución drástica de la viscosidad mezclarlo con agua. Al observarlos al microscopio, los gránulos de almidón se mostraron parcialmente degradados debido a la hidrólisis ácida (Anexo E). También hubo cambios en la absorbancia y en el contenido de dextrinas libres (Tabla 3.11).

Tabla 3.11 Características de absorbancia, solubilización y contenido de azúcares de una solución al 2%, antes y después del tratamiento de solubilización, de los diferentes almidones extraídos.

Almidón	Absorbancia a 546nm	Temperatura de solubilización °C	Dextrinas libres (mg mL⁻¹)
Papa Comercial	0.310	50	1.898
Achira Insoluble	2.220	in	1.034
Achira Soluble	0.180	80	1.426
Banano Insoluble	2.250	in	1.101
Banano Soluble	0.883	85	1.426
Papa Insoluble	1.980	in	0.721
Papa Soluble	0.330	95	1.049

in: No es soluble.

3.8 Determinación de condiciones óptimas de: pH, temperatura y fuente de almidón como sustrato.- Para la variable UFC mL⁻¹ existieron notables diferencias entre las tres bacterias evaluadas por lo que los resultados obtenidos fueron transformados para ajustarse a una distribución normal. Para la transformación de datos se utilizó el logaritmo en base diez (Anexo G).

Con los datos transformados de la variable UFC mL⁻¹ se realizaron análisis de variancia para cada una de las bacterias en estudio y se obtuvo la Tabla 3.12 donde podemos notar la diferencia estadística existente para todos los factores e interacciones entre estos.

Tabla 3.12 Análisis de variancia para los tratamientos obtenidos de las interacciones entre pH (P), temperatura (T) y fuente de almidón como sustrato (S) con tres niveles cada uno, utilizados para medir UFC mL⁻¹ después de 42h de incubación en medio líquido a diferentes temperaturas de incubación.

Fuente de Variación	Grados de libertad	FFMN01		FFMN03		FFMN18	
		S C	F cal.	S C	F cal.	S C	F cal.
Repetición	2	0.0517	1.15 ^{ns}	0.0010	0.72 ^{ns}	0.0077	2.67 ^{ns}
pH	2	0.9430	20.97**	0.6385	481.42**	0.7082	247.09**
Temperat.	2	9.7187	216.18**	0.0134	10.08**	2.7524	960.29**
P*T	4	0.3546	3.94**	0.0152	5.75**	0.3322	57.94**
Sustrato	2	0.8504	18.92**	0.2511	189.35**	0.5530	192.93**
P*S	4	0.8532	9.49**	0.0229	8.64**	0.0737	12.85**
T*S	4	0.8156	9.07**	0.0392	14.79**	0.3233	56.4**
P*T*S	8	1.5383	8.55**	0.0146	2.75*	0.2744	23.93**
Error Exp.	52	1.1689		0.0345		0.0745	
Coeficiente de variación		2.17		0.35		0.44	

ns: no hay significancia, *, **, significativo a nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente.

Al existir significancia en todos los tratamientos se realizó la prueba de Tukey para cada fuente de variación. Los promedios de los datos transformados se ordenaron de mayor a menor y se establecieron los rangos de significancia.

En la Tabla 3.13 se puede observar la diferencia que existe en crecimiento para cada pH utilizado. Para FFMN01 existen tres rangos de significancia siendo el pH8 el que mejor funciona, mientras que, tanto para FFMN03 como para FFMN18, el pH7 y el pH 8 se encuentran dentro de un mismo rango. Se ve que el crecimiento se ve favorecido por un pH básico o neutro.

Tabla 3.13 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación al factor pH.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
P8	7.028	a	P7	7.394	a	P8	8.619	a
P7	6.899	b	P8	7.381	a	P7	8.605	a
P6	6.764	c	P6	7.200	b	P6	8.414	b

En la Tabla 3.14 notamos que en general el crecimiento de las tres bacterias se ve favorecido con una temperatura de incubación de 30°C y solo para FFMN01 se ve ligeramente superada por los 35°C, sin embargo, se encuentran dentro de un mismo rango de significancia.

Tabla 3.14 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación al factor temperatura.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
T35	7.142	a	T30	7.342	a	T30	8.720	a
T30	7.141	a	T35	7.320	b	T35	8.627	b
T40	6.407	b	T40	7.312	b	T40	8.291	c

Al combinar los factores pH y temperatura en la Tabla 3.15 vemos que las combinaciones entre los pHs 7 y 8, y las temperaturas 30°C y 35°C se encuentran en todos los casos como las que generan mejor crecimiento bacteriano. Esto se puede observar gráficamente en la Figura 3.9.

Tabla 3.15 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y temperatura.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
P8T30	7.214	a	P7T30	7.416	a	P7T35	8.771	a
P8T35	7.202	a	P8T30	7.415	a	P7T30	8.747	b c
P7T35	7.191	a	P7T35	7.396	b	P8T30	8.739	c
P7T30	7.181	a	P8T35	7.373	c	P8T35	8.728	c
P6T35	7.034	b	P7T40	7.371	c	P6T30	8.674	d
P6T30	7.029	b	P8T40	7.354	d	P8T40	8.388	e
P8T40	6.668	c	P6T40	7.211	e	P6T35	8.380	e
P7T40	6.324	d	P6T30	7.196	e f	P7T40	8.297	f
P6T40	6.228	d	P6T35	7.191	f	P6T40	8.188	g

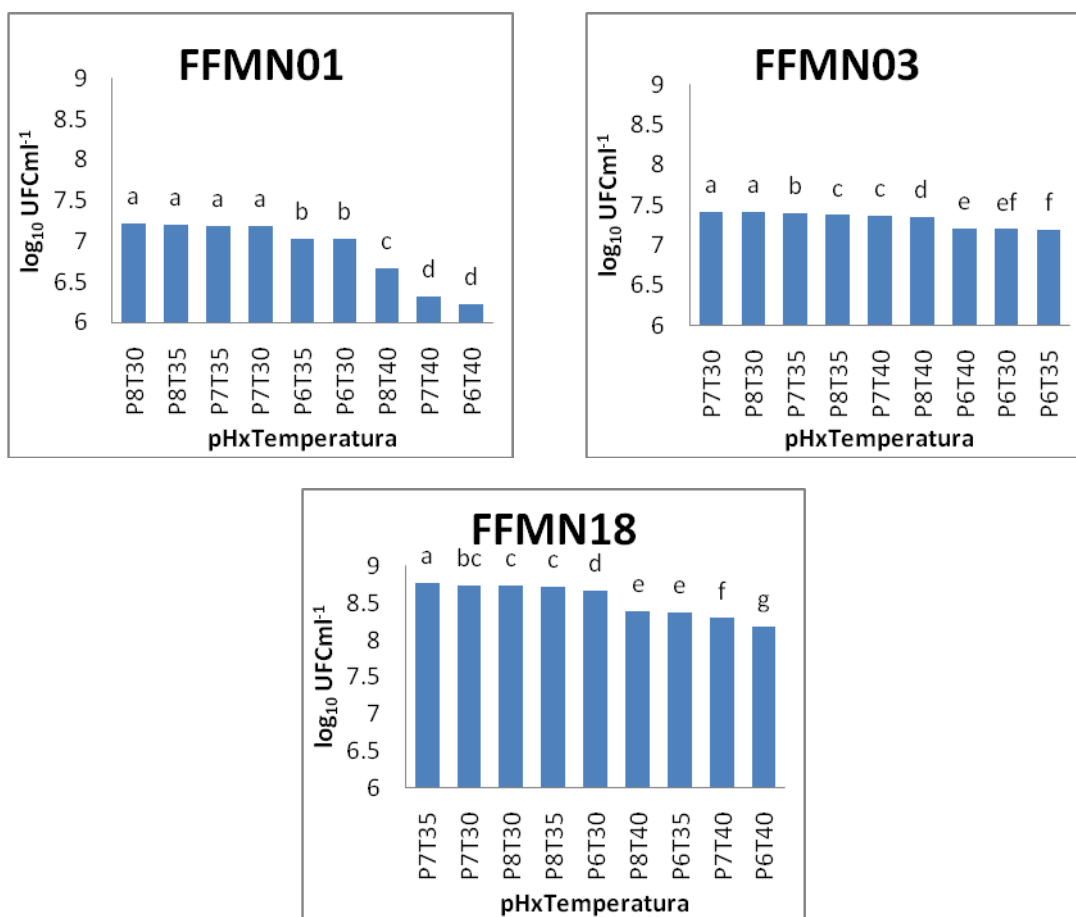


Figura 3.9 Promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y temperatura al evaluar las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 respectivamente. Las letras sobre las barras muestran el rango de significancia de acuerdo a la prueba de Tuckey.

En cuanto a los sustratos podemos constatar en la Tabla 3.16 que cada uno forma un grupo estadísticamente diferente, para todas las bacterias se mantiene una predominancia de la achira, seguido de la papa y finalmente el banano.

Tabla 3.16 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación al factor Sustrato.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
Sa	7.021	a	Sa	7.376	a	Sa	8.643	a
Sp	6.899	b	Sp	7.351	b	Sp	8.553	b
Sb	6.770	c	Sb	7.247	c	Sb	8.441	c

De la Tabla 3.17 podemos subrayar la predominancia de la achira como el mejor sustrato para el crecimiento de las tres bacterias. Dentro del primer rango de significancia, se encuentra la combinación de achira y pH8, asimismo, la combinación de pH6 y almidón de banano como sustrato se encuentra en el rango de significancia más bajo para los tres casos. La misma interacción entre factores pH y sustrato se puede observar gráficamente en la Figura 3.10.

Tabla 3.17 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y Sustrato.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
P8Sa	7.194	a	P8Sa	7.447	a	P8Sa	8.731	a
P7Sa	7.085	b	P7Sa	7.444	a b	P7Sa	8.708	a
P8Sp	7.020	b	P7Sp	7.429	a b	P8Sp	8.666	b
P7Sp	6.997	b	P8Sp	7.416	b	P7Sp	8.593	c
P8Sb	6.870	c	P7Sb	7.310	c	P7Sb	8.514	d
P6Sb	6.826	c	P8Sb	7.279	d	P6Sa	8.490	d
P6Sa	6.784	c	P6Sa	7.237	e	P8Sb	8.458	e
P6Sp	6.680	d	P6Sp	7.208	f	P6Sp	8.400	f
P7Sb	6.614	d	P6Sb	7.154	g	P6Sb	8.351	g

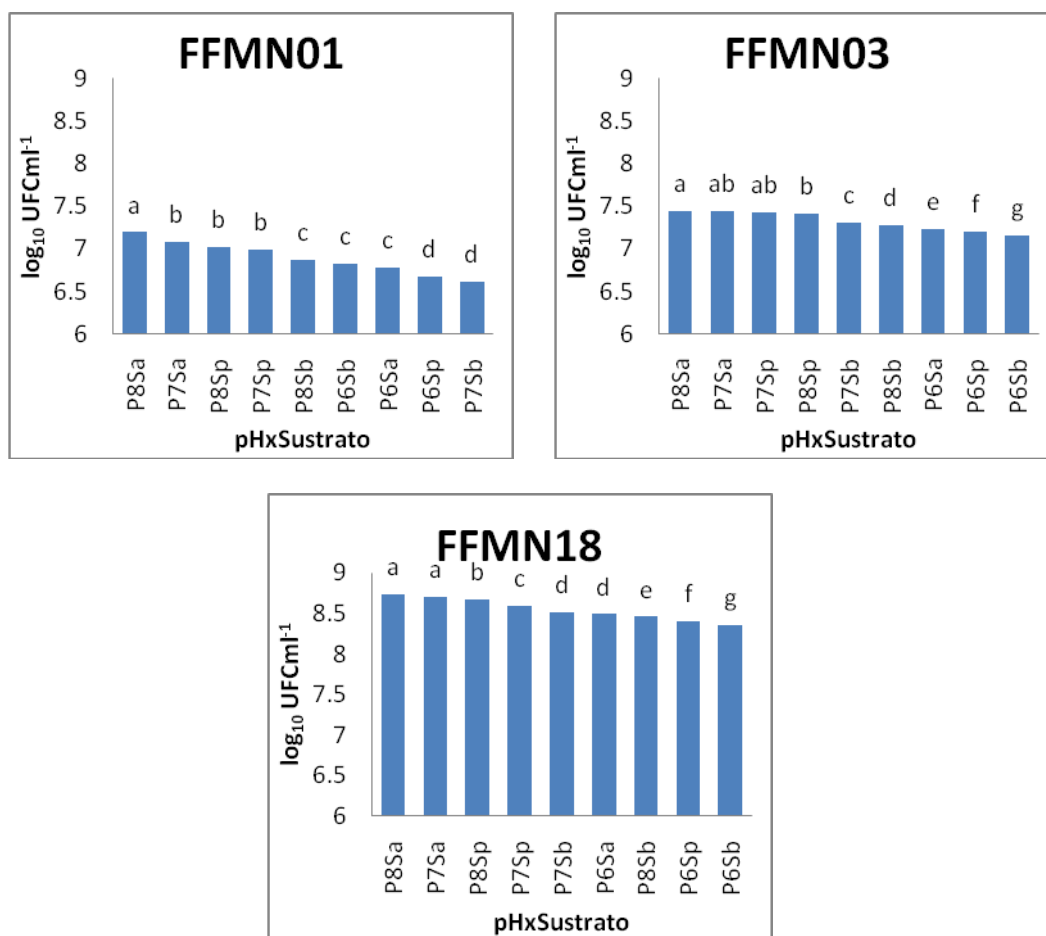


Figura 3.10 Promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y sustrato al evaluar las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 respectivamente. Las letras sobre las barras muestran el rango de significancia de acuerdo a la prueba de Tuckey.

Al combinar la influencia de la temperatura junto con el sustrato en la Tabla 3.18, la combinación del almidón de papa y temperatura 30°C se encuentra para todas las bacterias dentro del primer rango de significancia. Aunque para FFMN01 y FFMN18 el almidón de achira a 30°C se muestra como el mejor para el crecimiento bacteriano, para FFMN03 ha caído a un segundo rango de significancia. Esta misma interacción entre factores se puede observar gráficamente en la Figura 3.11.

Tabla 3.18 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores temperatura y sustrato.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R.de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R de S.
T30Sa	7.210	a	T30Sp	7.395	a	T30Sa	8.763	a
T30Sp	7.174	a	T40Sa	7.393	a	T30Sp	8.751	a
T35Sp	7.156	a	T35Sa	7.380	a	T35Sp	8.720	b
T35Sa	7.138	a	T30Sb	7.354	b	T35Sa	8.699	b
T35Sb	7.133	a b	T40Sp	7.330	c	T30Sb	8.647	c
T30Sb	7.039	b	T35Sp	7.328	c	T40Sa	8.469	d
T40Sa	6.715	c	T30Sb	7.278	d	T35Sb	8.461	d
T40Sp	6.368	d	T35Sb	7.251	e	T40Sb	8.216	e
T40Sb	6.138	e	T40Sb	7.213	f	T40Sp	8.188	f

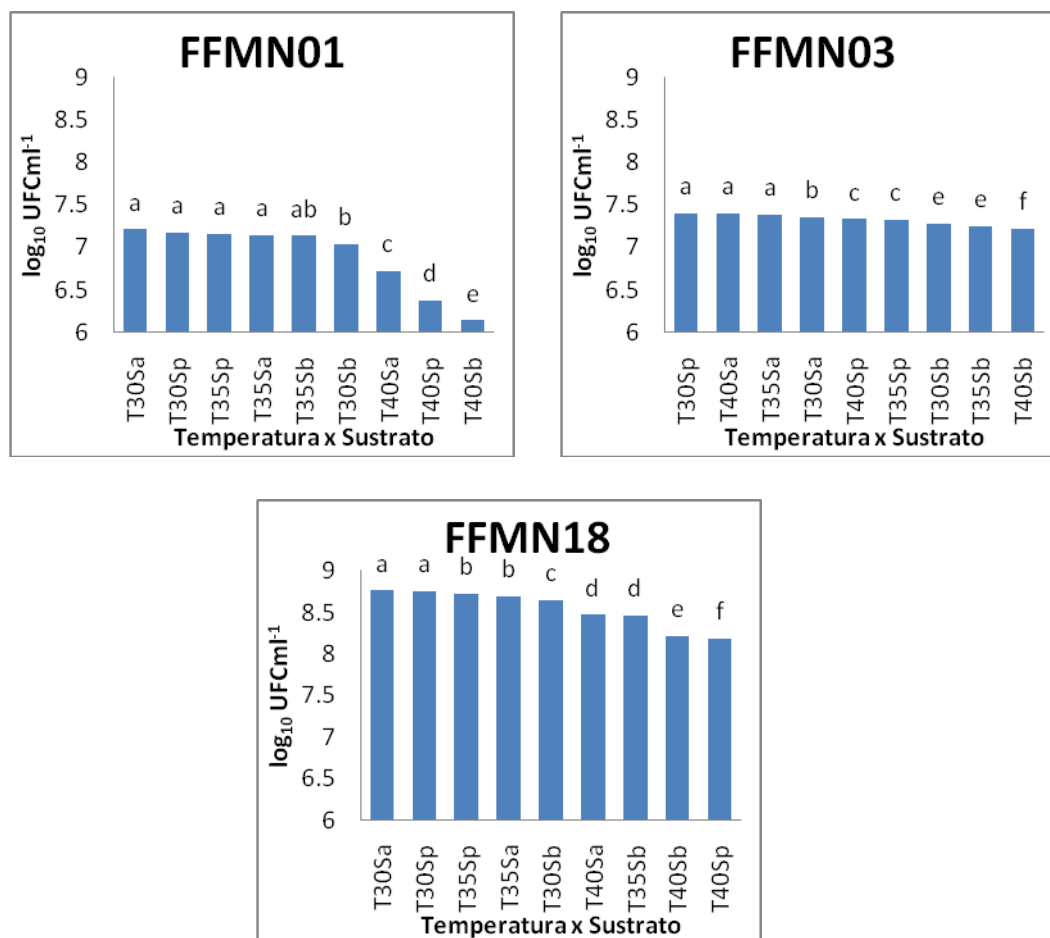


Figura 3.11 Promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores temperatura y sustrato al evaluar las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 respectivamente. Las letras sobre las barras muestran el rango de significancia de acuerdo a Tuckey.

Al combinar todos los factores (Tabla 3.19) la combinación de pH8 con papa como sustrato supera a todos con la bacteria FFMN18 a 35°C. Para la bacteria FFMN03 el mejor sustrato sigue siendo la papa pero ahora a pH7 y 30°C. Solo para la bacteria FFMN01 se presenta la achira como mejor sustrato a pH8 y 35 °C. En términos generales, las combinaciones de pHs 7 y 8, temperaturas 30°C y 35°C, y los almidones de papa y achira son los que mejor funcionan.

Tabla 3.19 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH, temperatura y sustrato.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
P8T30Sa	7.302	a	P7T30Sp	7.466	a	P8T35Sp	8.831	a
P8T35Sa	7.274	a b	P8T30Sp	7.464	a b	P7T35Sp	8.823	a b
P8T30Sp	7.248	a b c	P8T40Sa	7.460	a b c	P8T35Sa	8.803	bc
P7T30Sa	7.239	a b c	P8T30Sa	7.455	a b c	P7T35Sa	8.800	bc
P8T35Sp	7.219	a b c	P7T40Sa	7.449	b c d	P8T30Sa	8.798	bc
P7T30Sp	7.207	a b c d	P7T35Sa	7.447	c d	P7T30Sa	8.784	c d
P7T35Sp	7.201	b c d	P7T30Sa	7.436	d e	P7T30Sp	8.783	c d
P7T35Sb	7.200	b c d	P8T35Sa	7.426	e f	P8T30Sp	8.766	d
P7T35Sa	7.172	c d e	P7T35Sp	7.412	f g	P6T30Sa	8.706	e
P8T35Sb	7.112	d e f	P7T40Sp	7.409	f g	P6T30Sp	8.704	e
P7T30Sb	7.096	e f g	P8T35Sp	7.408	g	P7T35Sb	8.692	e f
P8T30Sb	7.092	e f g	P8T40Sp	7.377	h	P7T30Sb	8.675	f g
P6T30Sa	7.091	e f g	P7T30Sb	7.347	i	P8T30Sb	8.654	g
P6T35Sb	7.088	e f g	P7T35Sb	7.327	j	P6T30Sb	8.613	h
P6T30Sp	7.067	f g	P8T30Sb	7.325	j	P8T40Sa	8.594	h
P6T35Sp	7.047	f g h	P8T35Sb	7.285	k	P8T35Sb	8.551	i
P8T40Sa	7.005	g h i	P6T40Sa	7.271	k l	P7T40Sa	8.541	i
P6T35Sa	6.967	h i	P6T35Sa	7.269	k l	P6T35Sp	8.507	j
P6T30Sb	6.929	i j	P6T30Sp	7.256	l	P6T35Sa	8.494	j
P7T40Sa	6.844	j	P7T40Sb	7.255	l	P8T40Sp	8.401	k
P8T40Sp	6.593	k	P8T40Sb	7.226	m	P6T40Sb	8.302	l
P7T40Sp	6.583	k	P6T40Sp	7.204	n	P6T40Sa	8.272	m
P6T40Sb	6.462	l	P6T30Sa	7.170	o	P7T40Sb	8.176	n
P8T40Sb	6.407	l	P6T35Sp	7.165	o	P7T40Sp	8.174	n
P6T40Sa	6.295	m	P6T30Sb	7.162	o	P8T40Sb	8.170	n
P6T40Sp	5.927	n	P6T40Sb	7.159	o	P6T35Sb	8.139	o
P7T40Sb	5.546	o	P6T35Sb	7.140	p	P6T40Sp	7.989	p

En la Figura 3.12 apreciamos de forma más clara el comportamiento de cada una de las bacterias ante los diferentes factores evaluados. Para todas las bacterias, el crecimiento parece ser mayor a un pH entre 7 y 8. El crecimiento tanto para FFMN18 y FFMN01 disminuye drásticamente a una temperatura de incubación de 40°C, mientras que para FFMN03 se mantiene. En cuanto a la fuente de almidón como sustrato notamos que para todas las bacterias al utilizar el almidón de banano el crecimiento es menor.

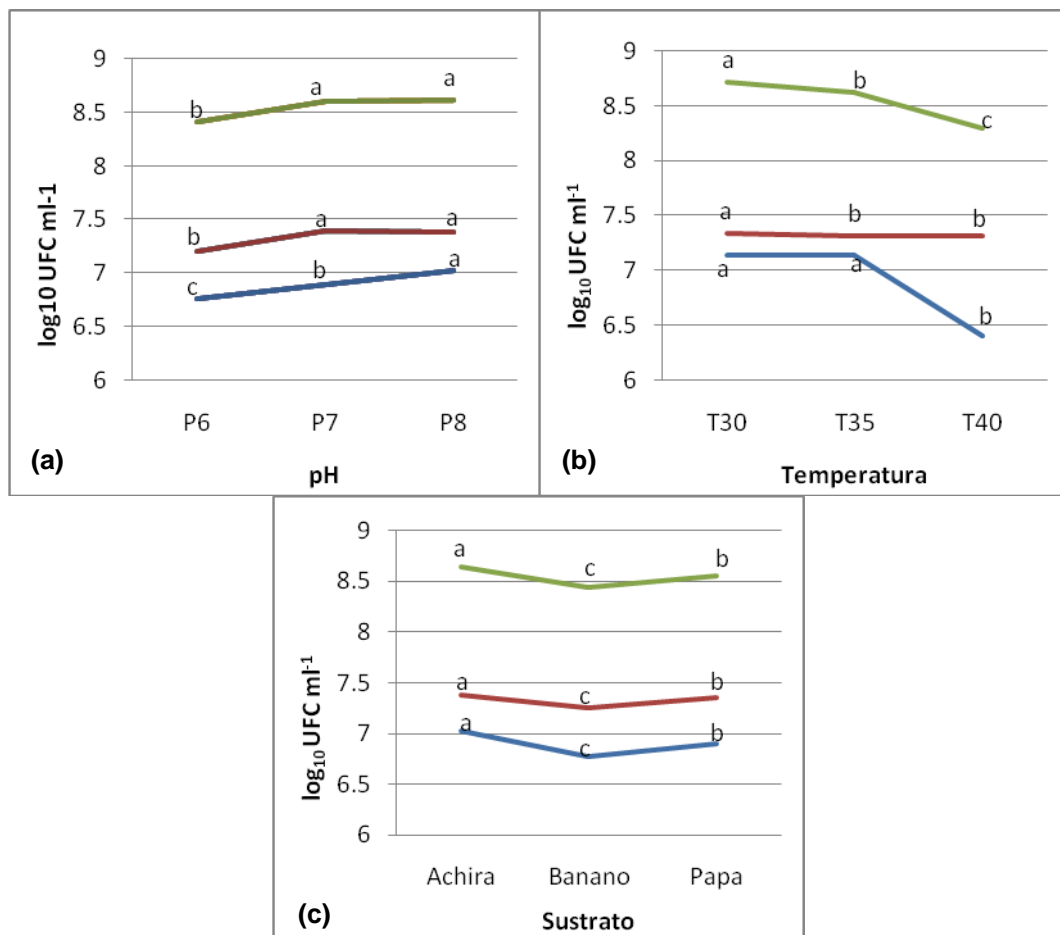


Figura 3.12 Crecimiento de las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 al evaluar (a) pH, (b) temperatura y (c) sustrato. Las letras sobre las líneas muestran el rango de significancia para cada factor de acuerdo a Tuckey.

— FFMN01 — FFMN03 — FFMN18

Los datos obtenidos para la variable UA mL⁻¹ se ajustaban a una distribución normal por lo que no fue necesario transformarlos. Los resultados de la medición de esta variable se presentan en el Anexo H.

Con los datos obtenidos de la variable UA mL⁻¹ se realizaron análisis de variancia para cada una de las bacterias estudiadas y se obtuvo la Tabla 3.20 donde se observa significancia estadística para el factor temperatura en todas las bacterias. FFMN01 no muestra significancia para la combinación entre temperatura y sustrato. FFMN03 no muestra significancia estadística para el factor sustrato. Mientras que, FFMN18 solo muestra significancia para los factores temperatura, sustrato y la combinación de estos. Al medir la variable UA mL⁻¹, se obtienen coeficientes de variación muy altos considerando que para experimentos en laboratorio se aceptan normalmente valores de hasta el 5%, este fenómeno se discute en el capítulo 4.

Tabla 3.20 Análisis de variancia para los tratamientos obtenidos de las interacciones entre pH (P), temperatura y fuente de almidón como sustrato (S) con tres niveles cada uno, utilizados para medir UA mL⁻¹ después de 42h de incubación en medio líquido a diferentes temperaturas de incubación.

Fuente de Variación	Grados de libertad	FFMN01		FFMN03		FFMN18	
		S C	F cal.	S C	F cal.	S C	F cal.
Repetición	2	0.0027	0.23 ^{ns}	0.0024	0.54 ^{ns}	0.0260	1.53 ^{ns}
pH	2	0.5629	47.88**	0.1735	39.34**	0.0513	3.01 ^{ns}
Temperat.	2	0.1060	9.02**	0.4483	101.6**	0.3538	20.75**
P*T	4	0.0670	2.85*	0.0829	9.39**	0.0302	0.89 ^{ns}
Sustrato	2	0.0622	5.29**	0.0022	0.5 ^{ns}	0.3536	20.74**
P*S	4	0.3520	14.97**	0.1445	16.38**	0.0164	0.48 ^{ns}
T*S	4	0.0060	0.25 ^{ns}	0.0804	9.12**	0.2300	6.75**
P*T*S	8	0.1428	3.04**	0.2490	14.11**	0.1028	1.51 ^{ns}
Error Exp.	52	0.3057		0.1147		0.4432	
Coeficiente de variación		14.96		9.86		20.08	

ns: no hay significancia, *, **, significativo a nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente.

Se realizó la prueba de Tukey para cada fuente de variación que presentó diferencias significativas. Los promedios de los datos se ordenaron de mayor a menor y se establecieron los rangos de significancia. Para las interacciones sin significancia estadística solo se ordenaron los promedios.

Al analizar el pH (Tabla 3.21) podemos notar que a pH7 y pH8 se obtiene una mayor actividad amilasa y se encuentran dentro de un mismo rango de significancia para FFMN01 y FFMN03. Para FFMN18 no existen rangos de significancia pero la mejor actividad se presentó a pH7.

Tabla 3.21 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de UA mL⁻¹ tomando como fuente de variación al factor pH, para FFMN18 no existe significancia estadística.

FFMN01			FFMN03			FFMN18	
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}
P8	0.581	A	P7	0.521	a	P7	0.494
P7	0.561	A	P8	0.496	a	P6	0.450
P6	0.395	B	P6	0.412	b	P8	0.435

Cada bacteria tiene una temperatura óptima para la producción de amilasas, esto se puede ver claramente en la Tabla 3.22. A 30°C funciona mejor FFMN01, a 35°C FFMN18 y a 40°C FFMN03. Es importante resaltar que la temperatura de incubación de 40°C se encuentra, para todas las bacterias, ubicada dentro del primer rango de significancia.

Tabla 3.22 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos de UA mL⁻¹ tomando como fuente de variación al factor temperatura.

FFMN01			FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
T30	0.545	a	T40	0.558	a	T35	0.528	a
T40	0.531	a	T35	0.493	b	T40	0.480	a
T35	0.462	b	T30	0.378	c	T30	0.371	b

Al combinar los factores temperatura y pH (Tabla 3.23) notamos que FFMN01 se ve afectada de una manera evidente por el factor pH, ubicándose los pHs 7 y 8 en niveles superiores al pH6 siguiendo un patrón definido. Mientras que, FFMN03 se ve afectada en mayor medida por la temperatura, vemos que a 40°C y 35°C existe una mayor actividad, disminuyendo claramente a los 30°C (temperatura que parece funcionar muy bien para FFMN01). Para FFMN18 no existe significancia estadística y el mejor promedio de actividad amilasa se da a pH7 y 35°C.

Tabla 3.23 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos UA mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y temperatura, para FFMN18 no existe significancia estadística.

FFMN01			FFMN03			FFMN18	
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}
P8T30	0.640	a	P8T40	0.611	a	P7T35	0.579
P7T30	0.609	a	P7T40	0.596	a	P6T35	0.526
P8T40	0.598	a	P7T35	0.583	a	P7T40	0.526
P7T40	0.592	a	P8T35	0.488	b	P8T35	0.480
P8T35	0.505	b	P6T40	0.467	b	P8T40	0.473
P7T35	0.483	b	P6T35	0.407	c	P6T40	0.442
P6T40	0.401	c	P8T30	0.388	c d	P6T30	0.382
P6T35	0.399	c	P7T30	0.383	c d	P7T30	0.378
P6T30	0.385	c	P6T30	0.363	d	P8T30	0.352

En la Figura 3.11 se puede observar gráficamente la influencia de la interacción entre los factores pH y temperatura.

En cuanto a los sustratos utilizados, al analizarlos por separado (Tabla 3.24), notamos que presentan rendimientos muy similares, funcionando de mejor manera el almidón de papa para FFMN01 y el de banano para FFMN18. Para FFMN03 no existe significancia estadística y en promedio la mejor actividad se logra con almidón de papa como sustrato.

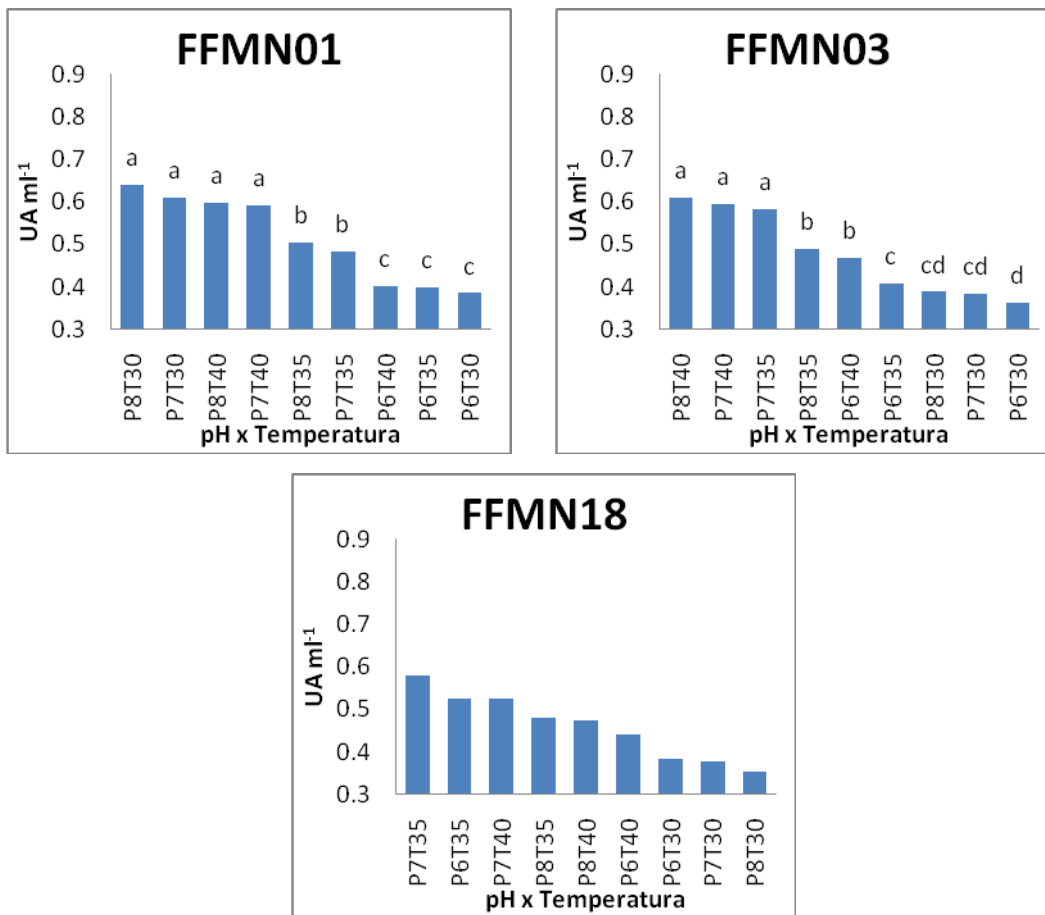


Figura 3.13 Promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y temperatura al evaluar las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 respectivamente. Las letras sobre las barras muestran el rango de significancia de acuerdo a la prueba de Tuckey. Para FFMN18 no existe significancia estadística

Tabla 3.24 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos de UA mL⁻¹ tomando como fuente de variación al factor Sustrato, para FFMN03 no existió significancia estadística.

FFMN01			FFMN03		FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	F. de V.	\bar{x}	R. de S.
Sp	0.551	a	Sp	0.484	Sb	0.553	a
Sb	0.500	b	Sa	0.473	Sp	0.419	b
Sa	0.487	b	Sb	0.473	Sa	0.407	b

Cuando el factor pH se combina con el factor sustrato (Tabla 3.25) desaparece la significancia para FFMN18, se puede notar como la combinación de pH6 con almidón de banano aparece como el segundo mejor promedio de actividad amilasa. Para FFMN01 y FFMN03 se muestran preferencias distintas para la producción de amilasas para la primera funciona mejor el almidón de papa a pH7 y para la segunda se encuentran dentro del primer rango la combinación de pH8 con almidón de papa y pH7 con almidón de banano. Ninguna de las dos bacterias presenta buena actividad a pH6. En la Figura 3.14 se pueden observar gráficamente estos fenómenos.

Tabla 3.25 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos de UA mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y Sustrato, para FFMN18 no existe significancia estadística.

FFMN01			FFMN03			FFMN18	
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}
P7Sp	0.718	a	P8Sp	0.567	a	P7Sb	0.608
P8Sa	0.640	b	P7Sb	0.564	a	P6Sb	0.549
P8Sb	0.561	c	P7Sa	0.525	b	P8Sb	0.502
P8Sp	0.542	c d	P8Sa	0.502	b c	P7Sp	0.446
P7Sb	0.501	d e	P7Sp	0.472	c	P7Sa	0.429
P7Sa	0.465	e f	P6Sb	0.434	d	P6Sp	0.409
P6Sb	0.438	f g	P8Sb	0.419	d e	P8Sp	0.403
P6Sp	0.393	g e	P6Sp	0.411	d e	P8Sa	0.401
P6Sa	0.355	e	P6Sa	0.391	e	P6Sa	0.391

Al combinar temperatura con sustrato (Tabla 3.26) se pierde significancia estadística para FFMN01, siendo los promedios de las combinaciones de almidón de papa como sustrato a temperaturas de incubación de 30°C y 40°C los que presentaron mayor actividad enzimática. Existe una influencia marcada de la temperatura sobre FFMN03, disminuyendo la actividad a medida que disminuye la temperatura de incubación. Para FFMN18 no existe un patrón definido pero podemos destacar que dentro del primer rango de significancia se encuentra el almidón de banano combinado con las temperaturas 40°C y 35°C.

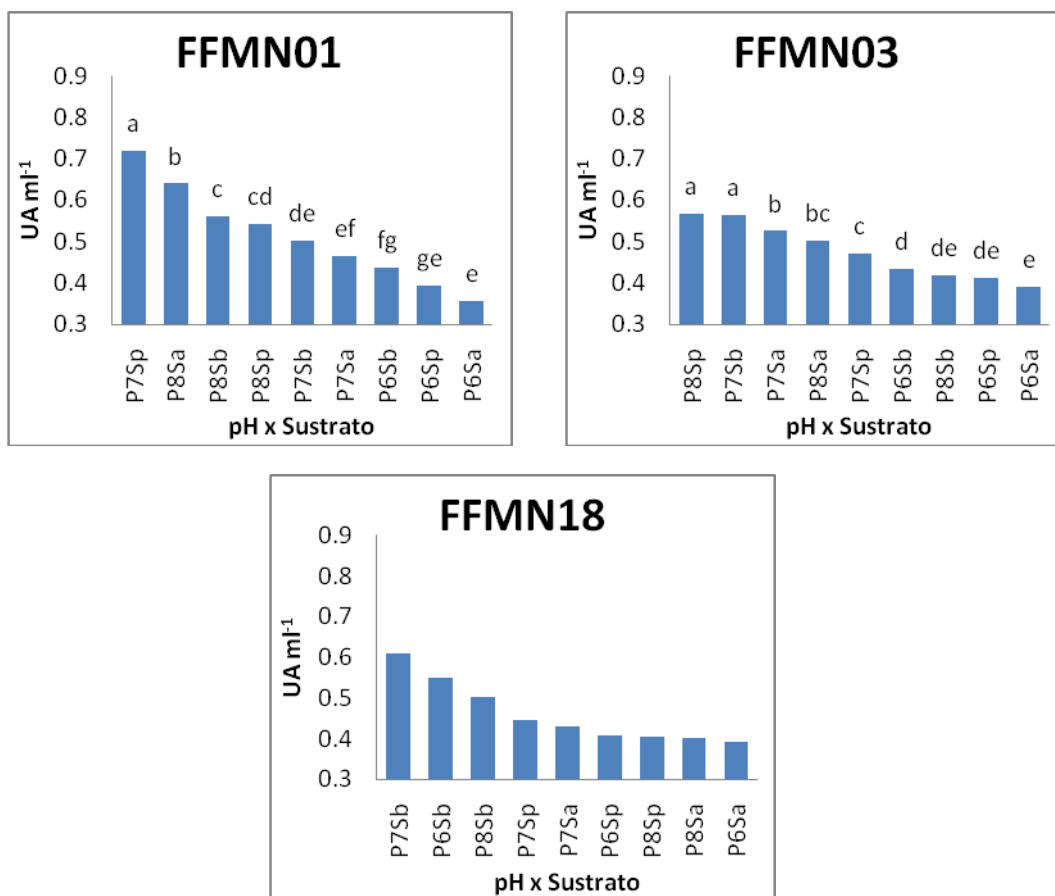


Figura 3.14 Promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH y sustrato al evaluar las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 respectivamente. Las letras sobre las barras muestran el rango de significancia de acuerdo a la prueba de Tukey. Para FFMN18 no existe significancia estadística.

Tabla 3.26 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos de UA mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores temperatura y sustrato, para FFMN01 no existe significancia estadística.

FFMN01		FFMN03			FFMN18		
F. de V.	\bar{x}	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R de S.
T30Sp	0.585	T40Sp	0.573	a	T40Sb	0.645	a
T40Sp	0.578	T40Sa	0.553	a b	T35Sb	0.623	a
T30Sb	0.543	T40Sb	0.548	b c	T35Sa	0.525	b
T40Sa	0.509	T35Sa	0.528	c	T40Sp	0.454	c
T30Sa	0.507	T35Sb	0.506	c	T35Sp	0.437	c d
T40Sb	0.505	T35Sp	0.444	d	T30Sb	0.391	d e
T35Sp	0.491	T30Sp	0.434	d	T30Sp	0.366	e
T35Sb	0.452	T30Sb	0.363	e	T30Sa	0.355	e

T35Sa	0.443	T30Sa	0.337	e	T40Sa	0.342	e
--------------	-------	-------	-------	---	-------	-------	---

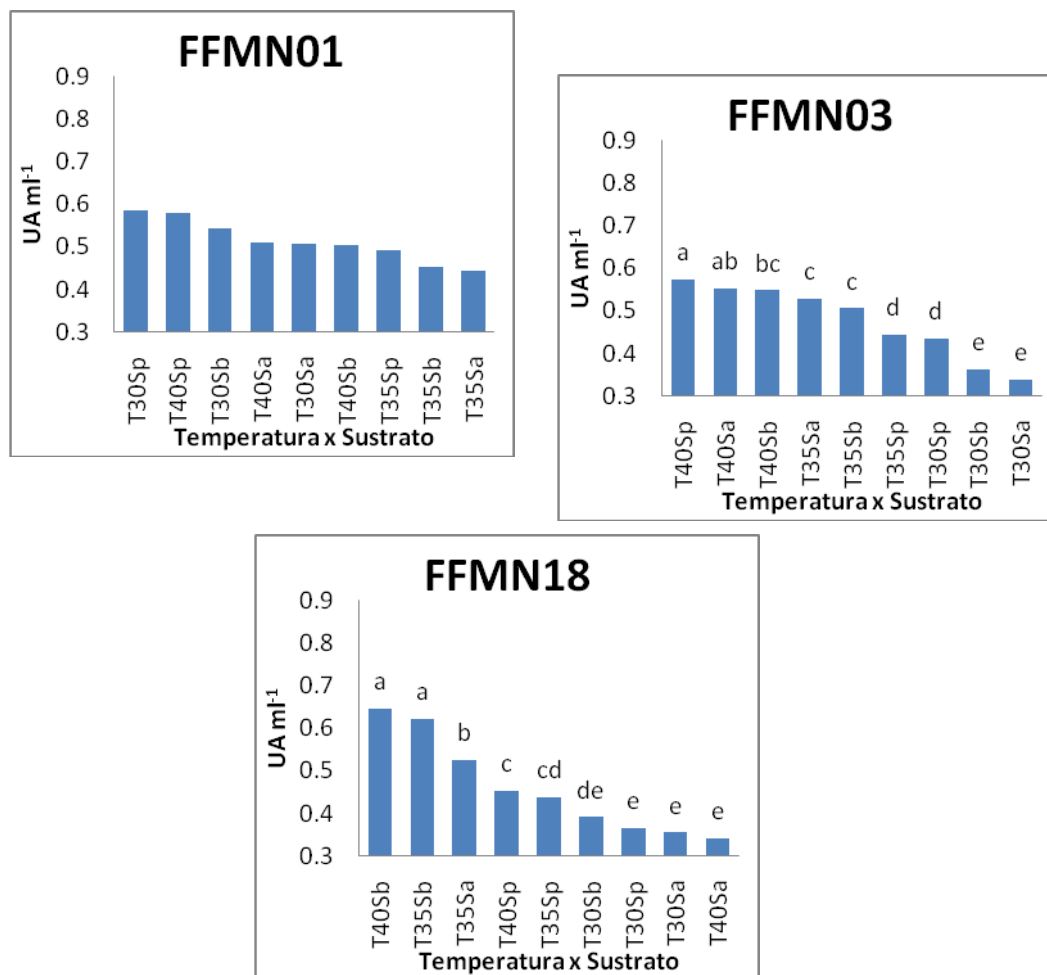


Figura 3.15 Promedios de los datos transformados de UFC mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores temperatura y sustrato al evaluar las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 respectivamente. Las letras sobre las barras muestran el rango de significancia de acuerdo a la prueba de Tuckey. Para FFMN01 no existe significancia estadística.

Si se combinan todos los factores evaluados (Tabla 3.27) se pueden determinar las mejores condiciones para la producción de amilasas para cada bacteria. El mejor tratamiento a nivel general, se obtuvo con la bacteria FFMN01 a pH7, utilizando almidón de papa como sustrato y a una temperatura de incubación de 30°C con una actividad de 0.832 UA mL⁻¹. La bacteria FFMN03 también presentó un mayor rendimiento con el almidón de papa pero a pH8 y 40°C de

temperatura de incubación con una actividad de 0.809 UA mL⁻¹. A esta misma temperatura tuvo su mejor rendimiento la bacteria FFMN18 a pH8 utilizando almidón de banano como sustrato con una actividad de 0.711 UA mL⁻¹. Aunque no existe una significancia estadística para FFMN18 notamos que los mejores promedios de actividad están asociados con el almidón de banano como sustrato.

Para FFMN01 se obtienen los mejores resultados de actividad al combinar las temperaturas 30°C y 40°C con los pHs 7 y 8. Para FFMN03 la temperatura 30°C no funciona ya de igual manera y al combinarla con cualquier pH presenta actividades bajas. Para ambas bacterias, la influencia del factor sustrato en la actividad amilasa se ve alterada tanto por las variaciones de pH como de temperatura por lo que no muestra ningún patrón.

Tabla 3.27 Rangos de significancia establecidos con la prueba de Tukey para los promedios de los datos de UA mL⁻¹ tomando como fuente de variación a la interacción entre los factores pH, temperatura y sustrato, para FFMN18 no existe significancia estadística.

FFMN01			FFMN03			FFMN18	
F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}	R. de S.	F. de V.	\bar{x}
P7T30Sp	0.832	a	P8T40Sp	0.809	a	P7T40Sb	0.711
P7T40Sp	0.760	b	P7T35Sb	0.714	b	P7T35Sb	0.692
P8T30Sa	0.755	b	P7T40Sa	0.691	b	P8T40Sb	0.688
P8T40Sb	0.635	c	P8T35Sa	0.597	c	P6T35Sb	0.684
P8T40Sa	0.609	c d	P7T40Sb	0.596	c	P7T35Sa	0.591
P8T30Sp	0.592	c d e	P6T40Sb	0.563	d	P6T40Sb	0.536
P7T30Sb	0.580	def	P7T35Sa	0.561	d	P8T35Sa	0.528
P8T30Sb	0.574	def	P8T40Sa	0.541	d	P7T40Sp	0.513
P7T35Sp	0.561	def	P7T40Sp	0.500	e	P8T35Sb	0.493
P8T35Sa	0.554	ef	P8T40Sb	0.484	ef	P6T35Sa	0.455
P8T40Sp	0.551	ef	P7T35Sp	0.475	ef	P7T35Sp	0.454
P7T40Sa	0.541	f	P8T30Sp	0.455	f g	P6T40Sp	0.440
P8T35Sp	0.483	g	P7T30Sp	0.441	g	P6T35Sp	0.439
P7T40Sb	0.476	gh	P8T35Sp	0.438	gh	P6T30Sb	0.426
P8T35Sb	0.476	gh	P8T35Sb	0.430	gh i	P7T30Sb	0.422
P6T30Sb	0.476	gh	P6T40Sa	0.427	gh i	P8T35Sp	0.420
P7T35Sb	0.448	gh i	P6T35Sa	0.426	gh i	P8T40Sp	0.409
P7T35Sa	0.439	gh ij	P6T35Sp	0.419	hi	P8T30Sp	0.379
P6T35Sb	0.433	gh ij	P6T40Sp	0.411	hij	P7T30Sp	0.371
P6T35Sp	0.427	hij	P6T30Sp	0.405	ijk	P6T30Sa	0.370
P6T40Sp	0.422	ijk	P7T30Sb	0.383	jkl	P7T40Sa	0.354
P7T30Sa	0.417	ijk	P6T35Sb	0.375	kl	P8T30Sa	0.352
P6T40Sb	0.405	ijk	P8T30Sa	0.367	lm	P6T30Sp	0.349
P6T40Sa	0.378	kl	P6T30Sb	0.365	lm	P6T40Sa	0.349

P6T30Sa	0.350		P8T30Sb	0.342	m n	P7T30Sa	0.342
P6T35Sa	0.336		P7T30Sa	0.323	n	P8T30Sb	0.324
P6T30Sp	0.330		P6T30Sa	0.321	n	P8T40Sa	0.323

En la Figura 3.16 podemos notar que no existe una tendencia en cuanto a la actividad amilolítica para todas las bacterias al evaluar pH, temperatura y fuente de almidón como sustrato.

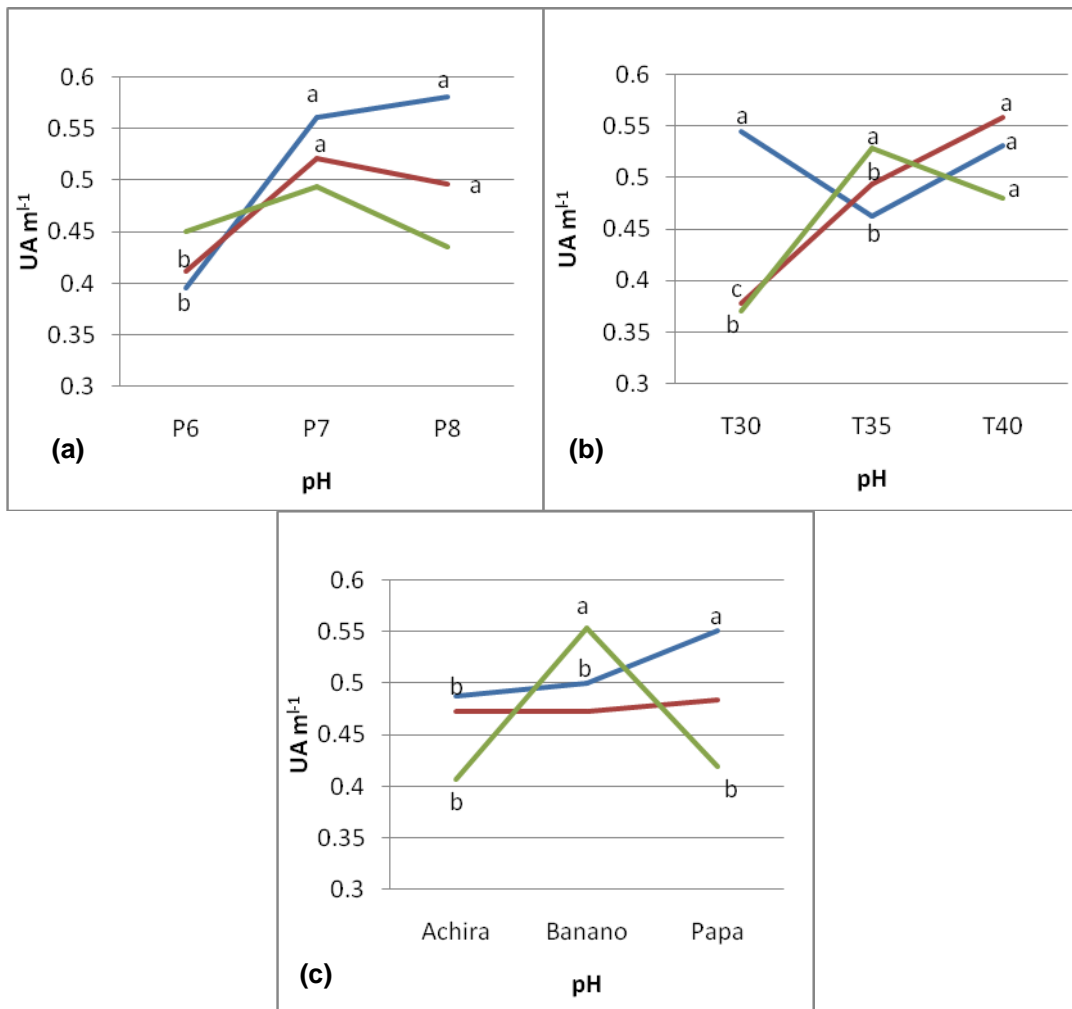


Figura 3.16 Actividad amilolítica de las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 al evaluar (a) pH, (b) temperatura y (c) sustrato. Las letras sobre las líneas muestran

el rango de significancia para cada factor de acuerdo a

Tuckey. — FFMN01 — FFMN03 — FFMN18

En la Figura 3.17 podemos ver el comportamiento de la actividad enzimática con respecto al logaritmo en base 10 de las UFC mL⁻¹. Se puede ver claramente que no existe correlación entre las dos variables obteniéndose un R² de 0.023.

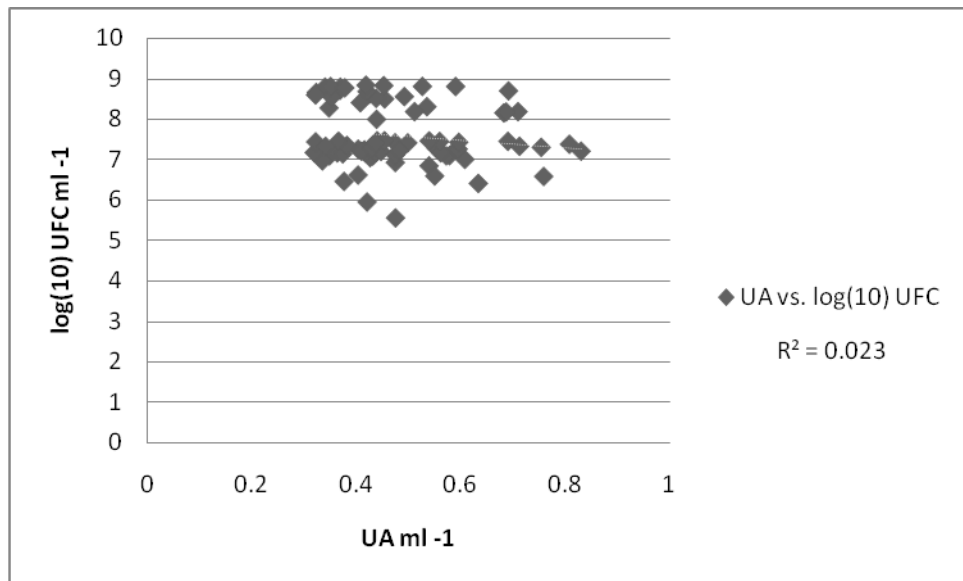


Figura 3.17 Relación entre UA y el log(10) UFC medidas para las bacterias FFMN01 FFMN03 y FFMN18 a las 42 horas de incubación.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Se recomienda la identificación y conservación de bacterias autóctonas en un cepario nacional que facilite la investigación para la explotación de nuestra riqueza microbiológica.

Para identificar bacterias aerobias formadoras de esporas, se recomienda las pruebas de metabolismo de carbohidratos y la identificación molecular, que pueden resultar más efectivas que las pruebas bioquímicas tradicionales.

Las bacterias aerobias formadoras de esporas poseen una notable capacidad para degradar varios compuestos por lo que las bacterias aisladas pueden ser investigadas más a fondo para encontrar utilidades en el campo industrial, ambiental o agrícola.

Para tener resultados claros y consistentes en el proceso de secuenciación la concentración del fragmento amplificado debe ser la correcta, de acuerdo a las especificaciones del laboratorio que presta el servicio. Cuando la concentración es muy baja, no se obtienen buenos resultados.

Para la identificación a nivel molecular de una bacteria puede ser más efectivo secuenciar todo el fragmento 16S de ADN_r, o en su defecto, secuenciar fragmentos altamente heterogéneos para poder así establecer claramente su taxonomía.

Se recomienda realizar la identificación molecular de todas las cepas aisladas, junto con otras pruebas como la de contenido de ácidos grasos y microscopía electrónica para poder establecer si estas cepas son especies nuevas.

Para mediciones espectrofotométricas de entre 200nm y 2500nm es mejor utilizar celdas de cuarzo que ayudan a obtener mediciones más precisas, sobretodo si el rango entre mediciones es muy pequeño.

Para obtener UFC al sembrar bacterias aerobias formadoras de esporas en caja petri, se recomienda utilizar la técnica de siembra profunda con previa agitación en matraz, con tiempos de incubación de entre 15 y 18 horas a 30°C.

Los almidones de banano y de achira se oxidan fácilmente por lo que es necesario incluir un antioxidante en el líquido de extracción.

Para poder preparar medios que permitan la evaluación de variables mediante espectrofotometría, es necesario que todos los componentes sean solubles para mantener una adecuada homogeneidad.

Al medir la actividad enzimática mediante el método de Bernfeld hay que controlar de forma exacta los tiempos de incubación y de exposición al calor de las muestras.

Se podría realizar otra investigación similar a la presente tomando en cuenta otros factores como agitación, tiempo de incubación, aireación y concentración del inóculo, utilizando matraces que contengan una mayor cantidad de medio, tomando como base los datos obtenidos, para ver si así se logra un aumento en la actividad enzimática.

Las amilasas del extracto crudo podrían purificarse mediante diálisis para obtener datos más precisos sobre su actividad.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de cepas productoras de amilasas.- Al sembrar 100µl diluciones de hasta 1:1000 de las muestras de suelo en caja se obtuvo crecimiento masivo con tan solo 24 horas de incubación, es decir que en estas muestras la presencia de UFC es superior a $4 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$. Por otro lado, se pudo comprobar la ubicuidad de las bacterias con actividad amilasa en los suelos de este bosque (Tabla 3.1). De la Tabla 3.1 también podemos notar que al realizar una siembra profunda es más probable obtener UFC en caja, pues puede darse una separación de células bacterianas y la muerte de ciertas bacterias sensibles al calor, al contrario que en la siembra superficial donde se obtuvo un crecimiento masivo en casi todas las cajas

Al sembrar las 26 cepas aisladas en agar nutriente, se pudo notar la pérdida de actividad enzimática de seis de ellas, este fenómeno pudo haberse dado por contaminación o por desactivación del sistema que desencadena la producción de enzima. La desactivación se pudo producir por la presencia de fuentes de carbono de menor tamaño que el almidón en el medio, haciendo innecesaria la producción de amilasas. Al hacer una resiembra posterior de las 20 cepas mantenidas se pudo notar la pérdida de actividad de tres cepas más, dicha actividad volvió al sembrar las bacterias en un medio líquido con almidón como única fuente de carbono. Esto concuerda con la investigación realizada por Dharani en 2004, en la que establece que la producción de amilasas depende de la naturaleza de la fuente de carbono, siendo la mejor el almidón.

En la Tabla 3.2 podemos ver que la mayoría de bacterias aisladas provienen del pantano y la ladera teniendo solo una cepa proveniente del suelo de las orillas del río. Este fenómeno puede deberse a que en las orillas del río la vegetación era muy escasa y, por lo tanto, la degradación de materia orgánica en el suelo también. Además se comprobó que las bacterias con actividad amilasa aisladas pertenecen al grupo de bacterias aerobias formadoras de esporas.

4.2 Pruebas bioquímicas.- Para poder realizar una identificación adecuada de género y especie de las bacterias aerobias formadoras de esporas es necesario aplicar técnicas nuevas como la identificación molecular. Sin embargo, la identificación bioquímica puede proporcionar una idea más o menos clara del organismo con el cual estamos trabajando (Reva *et al.*, 2001).

Existen todavía muchas especies que no han sido identificadas por lo que la determinación del género y especie mediante las características físicas y fisiológicas de la bacteria puede resultar complicada. En la Tabla 3.3 se encuentran todas las pruebas que dieron igual resultado para todas las bacterias aisladas, muchas de las que podrían pertenecer a la misma especie o simplemente ser especies taxonómicamente cercanas dentro de un mismo género debido a su procedencia común.

En la Tabla 3.4 se establece una posible identificación de las cepas basada en claves bioquímicas y morfológicas establecidas (Reva *et al.*, 2001; Health Protection Agency, 2007). Cabe recalcar que esta identificación no es definitiva pues algunas pruebas no fueron concluyentes, aunque fueron repetidas por varias ocasiones. Además, las características morfológicas tanto a nivel celular como a nivel de UFC mostraron marcadas diferencias entre bacterias que tenían características bioquímicas iguales lo que nos sugiere que se trata de especies diferentes.

En la Tabla 3.4 se ven los resultados para otro método de identificación que es el metabolismo de carbohidratos. Al parecer, todas las bacterias son capaces de utilizar maltosa, manitol, xilosa, lactosa y sacarosa para su crecimiento, sin embargo, no los fermentan a todos. Existe una mayor facilidad para la fermentación de azúcares simples de 6 carbonos como la glucosa y la fructosa que para azúcares de cinco carbonos como el manitol y la xilosa, debido a la procedencia de las mismas; los azúcares de 5 carbonos provienen de la hemicelulosa (xilosa) y de la hidrogenación de la manosa (manitol). Las bacterias

capaces de degradar la xilosa (FFMN03, FFMN19) podrían tener gran importancia en la producción de biocombustibles a partir de celulosa cuyo futuro es bastante prometedor (Wan-Ho, 2006).

4.3 Selección de las bacterias.- En la Tabla 3.5 podemos ver que en general el diámetro del halo es pequeño (entre 5mm y 11.4mm). Se han reportado diámetros de entre 21mm y 33mm de acción enzimática para bacterias aisladas de suelos de cultivo de cítricos (Vargas & Silver, 2002). La acción amilasa de las bacterias aisladas del bosque Mindo- Nambillo es menor.

Al no haber diferencias marcadas dentro del diámetro del halo de acción enzimática, se tomo en cuenta su relación con el tamaño de la colonia generadora de dicho halo. Así, se escogieron a las bacterias capaces de generar más enzima a partir de una menor cantidad de biomasa.

4.4 Identificación molecular de las bacterias seleccionadas.- Al observar las secuencias amplificadas para cada bacteria se puede notar que la diferencia es mínima al alinearlas. La similitud entre las secuencias de las bacterias FFMN01, FFMN03 y FFMN18 supera el 99%. Esto podría sugerir que se trata de la misma bacteria, pero al comparar este mismo fragmento de ADNr 16s con el de otras bacterias aerobias formadoras de esporas podemos notar que es un fragmento bastante conservado y las diferencias entre especies, dentro del género *Bacillus*, no superan el 0.5%. Además, las secuencias de las bacterias en estudio no coinciden con la secuencia de ninguna bacteria identificada anteriormente dentro de las bases de datos consultadas por la herramienta BLAST. La bacteria descrita que más similitudes presentó con FFMN01 fue *Bacillus sp.* 18-6, una bacteria aislada de la amazonía brasilera en las afueras de la ciudad de Manaus, donde las condiciones ambientales son muy similares a las del lugar de donde se tomaron las muestras. Tanto la Bacteria FFMN03 como la bacteria FFMN18 mostraron mayor similitud con la bacteria *Bacterium* EAB-PP13.01, la cual no posee una

descripción taxonómica y fue aislada del tracto digestivo de un escarabajo "*Agrilus planipennis*" de Wisconsin- Estados Unidos.

Al establecer el árbol filogenético podemos notar que las bacterias encontradas están relacionadas, y seguramente pertenecen al género *Bacillus*, son muy similares entre si, especialmente las bacterias FFMN18 y FFMN03. Con las pequeñas diferencias presentadas dentro de este fragmento altamente conservado, más las diferencias establecidas en la caracterización bioquímica, podemos afirmar que se trata de bacterias diferentes entre sí y que no han sido todavía descritas, o por lo menos no se encuentran secuenciadas en los bancos de datos a nivel internacional, por lo que se decidió mantener los nombres asignados desde un principio para su identificación.

4.5 Obtención de las curvas de absorbancia vs. UFC.- Para obtener estas curvas lo primero que se hizo fue estandarizar una longitud de onda con la cual trabajar. Se escogió la DO de 546nm pues mostraba medidas de absorbancia altas para las tres bacterias escogidas y es la DO utilizada de manera estándar para determinar concentración de bacterias utilizando la curva de Mc Farland (Anexo D). Esta curva de Mc Farland establecida para *E. coli* y especies cercanas es muy utilizada en microbiología, pero su aplicación en este caso no tenía sentido, ya que, las relaciones de absorbancia con UFC varían de acuerdo al tamaño de la célula, su composición o coloración (Sutton, 2006). Las curvas muestran una tendencia similar a la curva de Mc Farland pero con números de UFC entre 10 y 100 veces menores (Fig. 3.2, 3.4, 3.6), debido a que el volumen aproximado de una célula de *E. coli* es de alrededor de 0.8×10^{-15} litros (Sundararaj, S. et al., 2004) mientras que el volumen promedio aproximado de una célula de *Bacillus* es de 2×10^{-14} litros (Lamanna, 1940), es decir, es unas 25 veces más grande. Se pudo ver que las tres curvas presentaron una tendencia lineal por lo que se utilizó las fórmulas de la linearización para la transformación de las medidas de absorbancia a UFC en el desarrollo del diseño experimental.

Las curvas establecidas entre concentración bacteriana y absorbancia muestran una tendencia lineal muy marcada lo que indica que para este tipo de bacterias la concentración en una solución es directamente proporcional a la absorbancia.

Al establecer estas curvas, se pudieron notar más diferencias entre las bacterias escogidas, aún cuando estas mostraban mucha similitud en sus características bioquímicas. La diferencia de la relación entre absorbancia y UFC fue muy marcada (entre bacterias) especialmente para la bacteria FFMN18, la que tuvo que ser diluida a un factor de dilución diez veces mayor que las otras dos para posibilitar su conteo en caja (Tablas 3.6-3.8). Estas diferencias pueden deberse principalmente al tamaño de las bacterias. Aunque en las imágenes microscópicas se puede apreciar solo su longitud, esta es menor en el caso de FFMN18 comparándola con las de FFMN01 y FFMN03 (Anexo F). Otro motivo por el cual se dan las diferencias entre las bacterias analizadas es el tiempo de generación que para cada una puede ser distinto.

El hecho de que se tuvo que diluir aún más la bacteria FFMN18 pudo tener que ver con la tendencia de la curva al acercarse a valores de absorbancia mayores para los que muestra un aumento desproporcional de UFC. Aun cuando se tuvo mucho cuidado al homogenizar las muestras antes de diluirlas, mientras mayor es la cantidad de diluciones, mayor es el error que pueden generar en la transformación los datos de absorbancia a UFC mL⁻¹.

Las bacterias del género *Bacillus* y géneros relacionados poseen una estructura externa con notables propiedades de adherencia (Todar, 2008), lo que hizo muy difícil la obtención de UFC en placa. Se probaron varios métodos utilizando tanto siembra superficial como siembra profunda, logrando finalmente buenos resultados al aplicar siembra profunda previa agitación en matraces. Este método logró la separación de las células que se encuentran generalmente unidas dándonos un dato confiable de UFC al realizar varias repeticiones.

4.6 Extracción del almidón.- El rendimiento obtenido para las diferentes fuentes de almidón fue bajo en relación a lo reportado en literatura. Para papa se han reportado rendimientos de hasta un 40 % (Quilea, 2008) para achira 18% (Montalvo, 1997) y para banano no existen estudios realizados en el País, sin embargo, en plátano el rendimiento es del 11% (Flores et al, 2004). La diferencia en rendimientos al compararlos con los de la Tabla 3.9 es debido a que para la extracción de almidón realizada en esta investigación no se realizaron lavados exhaustivos de la pulpa. Mucho del almidón se perdió en el tamizado pero la cantidad obtenida fue suficiente para cumplir con los fines de la investigación.

El almidón obtenido tuvo problemas de oxidación, especialmente el almidón de banano pues al eliminar la cáscara la oxidación empieza en el fruto debido a la presencia de enzimas como la polifenoloxidasas (Flores *et al.*, 2004). Aunque se utilizó un antioxidante (ácido cítrico al 0.3%) no se pudo evitar la oxidación del almidón que se evidenció cuando, al suspenderlo en agua, adquirió una coloración café oscura. En el caso del banano, el tamizado no evitó el paso de impurezas, posiblemente gomas.

La consistencia de cada uno de los almidones aislados presentó características físicas diferentes tanto a nivel macroscópica como microscópica. Aunque todos estén formados por cadenas de amilosa y amilopectina, las características finales de cada almidón dependerán de su fuente, existiendo una gran variedad de estas (FAO, 1998).

El almidón extraído no fue soluble, al agregarlo a un medio líquido y por acción del calor se gelatinizó y posteriormente se sedimentó formando un medio inadecuado para desarrollar el experimento, por lo que existió la necesidad de solubilizar al almidón.

4.7 Obtención de almidón soluble.- Para transformar al almidón en almidón soluble es necesaria una hidrólisis ácida que transforma a la amilopectina, que es la fracción insoluble, en amilosa (Robyt, 1997). Pero a su vez puede transformar cierta cantidad de amilosa en dextrinas libres. El aumento de concentración de dextrinas libres se puede apreciar en la Tabla 3.10, aunque esta concentración aumentó seguía siendo menor que la del almidón comercial (Fluka, Biochemika). Se intentó medir la directamente la concentración de almidón mediante yodometría pero la coloración fue demasiado intensa, la solución adquirió una tonalidad azul al contacto con el yodo lo que confirmó la predominancia de amilosa.

Al tratar los almidones la absorbancia a una DO de 546nm disminuyó considerablemente, así mismo, la solubilidad adquirida del almidón lo hizo apropiado para la preparación de medios (Tabla 3.10). Tanto el almidón de papa como el de achira se solubilizaron totalmente con la acción del calor, mientras que en el de banano existieron impurezas debido a la oxidación y a la presencia de gomas. La extracción de almidón de banano se repitió tres veces utilizando tamices de distintos tamaños pero los resultados fueron siempre los mismos por lo que se estandarizó el método mencionado en el capítulo 2 para las tres fuentes.

Microscópicamente es también visible la acción del ácido. Al parecer los gránulos se rompen formando fracciones más pequeñas capaces de solubilizarse.

4.8 Determinación de condiciones óptimas de: pH, temperatura y fuente de almidón como sustrato.- Se obtuvo un total de 243 datos por cada una de las dos variables medidas. Se perdieron datos por varios motivos, estos datos fueron recuperados utilizando la media aritmética de las repeticiones restantes.

Las grandes diferencias existentes entre las bacterias para la variable UFC mL⁻¹ se dan porque los datos son tomados como medida de absorbancia y son transformados utilizando las fórmulas establecidas con las curvas de absorbancia vs. UFC.

La Tabla 3.12 pone en evidencia que los factores pH, temperatura, y fuente de almidón como sustrato tienen una marcada influencia en el crecimiento bacteriano. Como todos los seres vivos, las bacterias se ven afectadas por la variación en estos factores. Ha sido evidenciado desde los primeros estudios realizados con bacterias que cada una de estas puede crecer de manera óptima bajo condiciones específicas de pH, temperatura y sustrato. Los coeficientes de variación que se obtuvieron para cada bacteria son bajos, mostrando que los datos obtenidos son confiables.

De la Tabla 3.13 se puede apreciar una preferencia hacia los ambientes alcalinos por parte de las tres bacterias. El grupo de bacterias aerobias formadoras de esporas crecen en un amplio rango de pH y entre ellas existen varias que son alcalófilas como *B. licheniformis* SPT27 descrita por Dharani *et al.* en 2004, *B. oshimensis* descrita por Isao *et al.* en 2005 y *P. campinasensis* descrita por Yoon *et al.* en 1998. Al ser alcalófilas, estas bacterias y las amilasas que producen adquieren importancia en la industria de detergentes y la industria textil donde se manejan pHs básicos (Dharani *et al.*, 2004).

En la Tabla 3.14 se aprecia que la temperatura óptima de crecimiento de las tres bacterias está entre 30 y 35 °C, mostrando que, debido a su procedencia, las tres son bacterias mesófilas. Dentro del grupo de bacterias aerobias formadoras de esporas la mayoría son mesófilas pero existen ciertas excepciones que han sido aisladas de ambientes extremos como *Thermus* sp. aislada de fuentes termales cuya temperatura óptima se encuentra alrededor de los 65°C (Sarmiento *et al.*, 2003).

Al combinar los factores pH y temperatura (Tabla 3.15 y Figura 3.9) aparecen varios rangos de significancia lo que demuestra su influencia sobre el crecimiento bacteriano. Al combinarse con el factor temperatura, el pH óptimo para las tres bacterias oscila entre 7 y 8. El pH 6 y la temperatura de incubación de 40°C no son adecuados para el crecimiento de ninguna de las bacterias.

Cuando analizamos el factor almidón en la Tabla 3.16 notamos que el almidón de achira favorece el crecimiento de las tres bacterias. No se han realizado investigaciones en las que se utilicen las mismas fuentes de almidón como sustrato que en el presente trabajo, pero las marcadas diferencias estadísticas observadas para el crecimiento bacteriano coinciden con las conclusiones de Dharani *et al.* (2004) que expresa la importancia tanto del origen como de la cantidad de la fuente de carbono suministrada a la bacteria para su crecimiento. Aún cuando los almidones de achira, banano y papa son muy similares microscópicamente pueden poseer diferencias estructurales que los hacen en mayor o menor grado adecuados para cada bacteria.

Al combinar pH y sustrato (Tabla 3.17 y Figura 3.10) las bacterias FFMN03 y FFMN18 presentan una igualdad en el orden de las fuentes de variación lo que muestra que poseen necesidades similares de estos dos factores, esto puede relacionarse con la cercanía genética entre las dos bacterias que se puede apreciar en el árbol filogenético (Fig. 3.2).

En la Tabla 3.18 y la Figura 3.11 vemos como con el almidón de papa y el de achira se presentan mejores resultados que con el almidón de banano. Un motivo por el que el almidón de banano no funcionó adecuadamente puede ser la mencionada presencia de impurezas. Más que en el verdadero crecimiento bacteriano, estas impurezas tuvieron cierta influencia al momento de medir la variable UFC mL⁻¹ espectrofotométricamente, pues el blanco que contenía almidón de banano tenía siempre una mayor absorbancia que los que contenían papa y achira respectivamente. Al restar el valor obtenido de la muestra del valor obtenido para el blanco esa diferencia en absorbancia podría tener influencia en el resultado final.

Combinando todos los factores en estudio (Tabla 3.19) notamos que aunque cada bacteria posea condiciones óptimas específicas, las tres bacterias en estudio tienen una tendencia alcalófila, son mesófilas y crecen de mejor manera con almidones de achira y papa. Todo está relacionado con la procedencia de las bacterias, las tres bacterias vienen de zonas con el mismo ambiente, y por lo tanto, sus requerimientos para crecer son similares, pero, las diferencias encontradas evidencian que pertenecen a especies o cepas diferentes.

En la Figura 3.12 vemos de forma más clara el comportamiento de cada una de las bacterias en cuanto a su crecimiento, esta Figura está relacionada con las tablas 3.13, 3.14 y 3.16.

En la Tabla 3.20 lo primero que observamos es el alto coeficiente de variación existente especialmente para FFMN18 que llega a 20.08%. El alto coeficiente se debe a los bajos rendimientos presentados para la variable UA mL⁻¹. Al medir la variable mediante el método de Bernfeld (1955) se pudo notar que no era preciso cuando las actividades eran muy bajas. El método Bernfeld utiliza ácido dinitrosalisílico para evidenciar la presencia de dextrinas libres y por lo tanto la acción amilasa sobre un sustrato (solución de almidón al 1%) después de un tiempo de incubación y un tiempo de activación de la solución en agua hirviendo. Si el tiempo de ebullición de la solución variaba en apenas segundos, los cambios en las lecturas espectrofotométricas eran notables, por lo que, para lecturas muy pequeñas como las del presente trabajo fue necesario tener extremo cuidado en mantener los tiempos constantes.

Aunque no es posible comparar estos resultados con los obtenidos en otras investigaciones, se puede ver que de acuerdo a la Tabla 3.21 se obtuvo una mayor actividad amilasa entre pHs 7 y 8 (para FFMN01 y FFMN03 que muestran significancia estadística para este factor) lo que concuerda con los resultados para el crecimiento bacteriano. Dicha concordancia no se da al analizar las temperaturas en la Tabla 3.22, que para el crecimiento bacteriano se mostraba

como óptimo el rango entre 30°C y 35°C y aquí aparece la temperatura de 40°C dentro del primer rango de significancia para todas las bacterias. La producción enzimática a altas temperaturas concuerda con lo descrito por Al Qodah *et al.* (2007) donde la mayor producción amilasa se da a 50°C y pH7 para *B. sphaericus*, Vargas y Silver (2002) donde la mayor producción se da a pH7.5 y 45°C para *B. megaterium*, Martins *et al.* (2002) con mayor producción a pH7 y 55°C, entre otros.

Al combinar los factores pH y temperatura (Tabla 3.23 y Figura 3.13), la tendencia es la misma: los mejores resultados se dan en un rango de pH entre 7 y 8, mientras que la temperatura varía de acuerdo a la bacteria. FFMN18 no presenta significancia estadística para la combinación de los dos factores por lo que la presencia como segundo mejor promedio de la combinación de pH6 y 35°C podría atribuírsele al azar.

En la Tabla 3.24 se puede ver las preferencias de los microorganismos por los diferentes sustratos utilizados, de igual forma que en el trabajo de Vargas y Silver realizado en 2002, donde se puede apreciar las marcadas preferencias de este tipo de organismos por distintas fuentes de nutrientes para la producción de amilasas.

Se puede ver en la Tabla 3.25 y en la Figura 3.14 como se mantienen las mejores actividades para FFMN01 y FFMN03 en un pH entre 7 y 8, con almidón de papa como sustrato. FFMN18 no presenta aquí tampoco significancia estadística pero parece tener una mejor producción de enzima utilizando almidón de banano como sustrato.

Para las bacterias FFMN03 y FFMN18, que presentan significancia estadística para la combinación de los factores temperatura y sustrato (Tabla 3.26 y Figura 3.15), se mantiene 40°C como la mejor temperatura para la producción amilasa.

Al combinar todos los factores en la Tabla 3.27 vemos que aún el mejor rendimiento obtenido (0.832 UA mL^{-1}) es menor a los descritos en otras investigaciones que llegan hasta 863 UA mL^{-1} (Achi & Nijoku, 1992), por lo que, podemos afirmar que bajo las condiciones de estudio, las bacterias analizadas no servirían para producir amilasas a nivel industrial. Una opción para lograr una mejor actividad enzimática es utilizar las condiciones más favorables para cada bacteria descritas en esta investigación, e incluir otros factores como agitación, tiempo de incubación, aireación y concentración del inóculo. Otra es la purificación de la enzima a partir del extracto crudo, con lo que se lograría determinar de forma más precisa las diferencias entre las enzimas producidas por cada bacteria bajo las condiciones determinadas para el experimento.

En la Figura 3.16 vemos que no existe una tendencia para todas las bacterias, esto pone en evidencia sus diferencias en cuanto a la producción de amilasas. Esta Figura está relacionada con las tablas 3.21, 3.22 y 3.24.

Al observar la Figura 3.17 se nota de manera muy clara que no existe correlación alguna entre las dos variables que fueron medidas en esta investigación. Este fenómeno puede deberse a que las marcadas diferencias entre las tres bacterias o por la dificultad al medir actividades demasiado pequeñas que puede generar errores. Según Vargas y Silver (2004), la bacteria que analizaron (*B. megaterium*) comenzaba a producir amilasas a una concentración celular de $6.9 \times 10^{10} \text{ UFC mL}^{-1}$; en la presente investigación se alcanzaron crecimientos de hasta $6.8 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ lo que puede ser una causa para la obtención de menores rendimientos de actividad amilasa.