

1 9 8 5 - 2

REGISTRO: 078072067

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**



“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS  
AMILOLITICAS ENCONTRADAS EN DIVERSOS  
SUELOS DE JALISCO.

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

LUCIA BARRIENTOS RAMIREZ

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. SERGIO AGUILAR BENAVIDES.**

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL  
CENTRO DE INVESTIGACION CIATEJ, A.C. - -  
(Centro de investigación y asistencia -  
en tecnología y diseño del Estado de --  
Jalisco.

MI MAS PROFUNDO AGRADECIMIENTO:

Al Dr. Sergio Aguilar Benavides por su valiosa e inapreciable experiencia en la dirección de la elaboración de esta tesis.

A la Biol. Sally R. M. por su invaluable apoyo - en la conducción y culminación de una de las más grandes metas de mi vida.

Al Biol. Arturo Manzo. por su motivación en la -- realización, teórico- práctica de esta investigación.

A mis padres:

Forjadores de mi carrera, sembradores de gratitud honestidad y afecto, guías imperfectos de mi vida.

A todas aquellas personas que de una u otra manera ayudaron a la formación de esta tesis.

## I N D I C E

| CONTENIDO          | Página. |
|--------------------|---------|
| Introducción       | 4       |
| Objetivos          | 5       |
| Justificación      | 6       |
| Hipótesis          | 7       |
| Material y Métodos | 18      |
| Resultados         | 26      |
| Discusión          | 52      |
| Conclusiones       | 59      |
| Bibliografía       | 62      |
| Glosario.          | 65      |

## I.- ANTECEDENTES.

La Biotecnología hace referencia al uso de microorganismos - - vivientes para obtener productos comerciales.(17), donde se con- juntan tanto los procesos de la vida, como la diversidad de herra- mientas y técnicas que se utilizan para alcanzar un propósito es- pecífico. (9).

La Biotecnología se fundamenta principalmente en los descubri- mientos científicos realizados a partir de los años setenta en -- las áreas de Genética, Biología, Bioquímica, Microbiología y Enzí- mología.(17). En el futuro próximo, en el desarrollo de la biotec- nología, a ciertos niveles, su importancia e impacto estarán rela- cionados con la capacidad para establecer mecanismos específicos- que logren la integración de sectores agrícolas y su desarrollo - tecnológico, así como un financiamiento productivo. Las técnicas - derivadas de estos descubrimientos científicos han encontrado - - aplicación en una extensa gama de procesos de producción que inci- den sobre la agricultura, la producción de alimentos, la industria farmacéutica y la generación de energía (5). La lucha contra la - contaminación, la electrónica y la minería (5). Esta nueva revolu- ción tecnológica, que esta aceleradamente transformando la Geogra- fía económica mundial, puede ser si sabemos aprovecharla, una gran oportunidad para desarrollar una industria eficiente y altamente- competitiva. (17). La relación que se establece entre el desarro- llo económico de un país está determinado por múltiples factores- si bien, la biotecnología puede ser utilizada en la modificación- genética de microorganismos ya conocidos, en el desarrollo de pro- cesos biológicos alternativos para la obtención de nuevos produc- tos. (9).

En los últimos años se ha observado como las grandes empresas- farmacéuticas (17), han empezado absorber a las pequeñas nuevas -

Que han creado productos tales como vitaminas, esteroides, hormonas etc.

En el sector de alimentos y forrajes tenemos la elaboración de productos tales como; fuentes no convencionales de proteínas alimenticias, enriquecimiento protéico de materiales amiláceos y celulósicos, alimentos fermentados regionales (14).

En el campo de la productividad agropecuaria tenemos la elaboración de mejoramiento genético de especies animales y vegetales (5). Dentro del área de la contaminación tenemos la biogradación de residuos orgánicos sintéticos. (14).

Actualmente se cuenta con fertilizantes biológicos y bioinsecticidas. La biotecnología tiene un gran potencial en la realización de proyectos que ofrecen un desarrollo de importancia nacional (9), en particular en el sector agrícola. La flora y fauna microbiana existente en los suelos son de gran importancia debido a su potencialidad de crecimiento (7). La mayoría de los suelos agrícolas se denominan tierras francas, son de origen mineral con gran contenido de materia orgánica (7).

En estos suelos encontramos una gran variedad de microorganismos entre los cuáles tenemos aquellos que son capaces de degradar almidón (amilolíticas).

Estos microorganismos pueden ser tanto hongos como bacterias. La especie de hongo amilolítico terrestre mejor caracterizado es Aspergillus orizae y de las especies bacterianas Bacillus lequiniiformis y Bacillus amiloliquefaciens. (1).

En particular, las bacterias amilolíticas son las de mayor importancia en la industria almidonera, se utilizan principalmente en la elaboración de harinas, quesos, jarabes etc. (8).

Dichas Bacterias tienen la capacidad de desarrollarse en diferentes habitats, como suelos y aguas termales; crecen a temperaturas en el rango de 37°C. hasta 65°C.

Bordin y Effront, 1917 (3), reportan el primer método comercial de producción de amilasas, enzimas hidrofílicas, que son sintetizadas por estos Bacillus y son utilizadas para la producción de dextrinas y azúcares en la industria agroalimenticia.

El habitat natural de los microorganismos, el aislamiento y -- caracterización así como su conservación en colecciones permanentes, contribuyen no solamente al conocimiento de la microbiota autóctona de los nichos de donde se aislaron, sino también representan un potencial biotecnológico, ya que pueden ser utilizadas en la producción a escala industrial de los diversos metabolitos que ellos producen, Mitruka (1979). ( 5).

Los microorganismos Bacillus amiloliquefaciens y Bacillus lequeniiformis, están reportados como los de más alto índice de --- productividad de alfa amilasa (enzima amilolítica). A través de - estos microorganismos obtenemos almidón que a su vez está compuesto por dos elementos, uno que es un polímero de la glucosa la amilasa con enlace fucosídico alfa 1,4 y un polímero ramificado que es la amilopectina con enlace alfa 1,4 en la cadena lineal y residuos eslabonados por enlaces glucosídicos alfa 1,6. (12).

Debido a lo anterior se tomaron en cuenta los factores correspondientes para la formación de un cepario dentro del CIATEJ.A.C. (Centro de investigación y asistencia tecnológica para el Estado de Jalisco).

El presente trabajo muestra la producción de alfa amilasa de -- cepas de Bacillus amilolíticos que fueron aislados de terrenos -



De terrenos de Bosques de San Isidro, Balneario Agua Caliente, - - Balneario Chimulco y CIATEJ en el Estado de Jalisco.

Estos terrenos son principalmente campos agrícolas, el aislamiento de las cepas y la capacidad de producción de amilasas se realizó en las instalaciones del CIATEJ.

Los objetivos del presente trabajo consisten en:

- Identificación de poblaciones de bacterias amilolíticas a partir de poblaciones del suelo y aguas termales.
- Aislamiento y caracterización de bacterias amilolíticas a partir de poblaciones del suelo y aguas termales.
- Selección de bacterias amilolíticas con nivel más alto de producción de alfa amilasa.

Identificar por medio de dicha selección la colección de cepas de gradadoras de amilasa.

## 1.2- OBJETIVO GENERAL.

Aislamiento y caracterización de bacterias amilolíticas encontradas en diversos suelos del Estado de Jalisco.

## 1.3.-OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.-Determinar las poblaciones bacterianas residentes en diferentes suelos agrícolas y aguas termales del Estado de Jalisco.
- 2.-Seleccionar aquellas cepas a partir de muestras de suelo y -- agua.
- 3.-Identificar hasta especie aquellas cepas que presenten actividad amilolítica igual o mayor a la cepa de referencia, Bacillus subtilis ATCC.3366.

#### 1.4.- JUSTIFICACION.

De acuerdo a Cowan y Steel's (1979), (1), las amilasas de - - los hongos son importantes en la industria de alimentos. Su des-ventaja en comparación con las amilasas bacterianas es que estas últimas resisten temperaturas más elevadas y tienen una mayor re-sistencia a los cambios de pH.

Uno de los objetivos del CIATEJ es el de generar una colección de cepas bacterianas de importancia biotecnológica. En particular aislar y caracterizar bacterias productoras de enzimas amilolíti-cas de importancia en los procesos de fabricación de pan y harina

De igual manera el conocer el potencial biológico de los sue-los de Jalisco, que contribuyen al desarrollo agrícola y biotecnol-ógico del país.

### 1.5.- HIPOTESIS

En el Estado de Jalisco, una gran parte de los suelos agrícolas son productores de maíz, lo que nos permite aislar y caracterizar bacterias amilolíticas, cuyo habitat natural es característico de este tipo de suelo.

## II.- MATERIAL Y METODOS

### II.1.-MUESTREO DE SUELOS.

El muestreo de suelos agrícolas de donde se seleccionaron las cepas bacterianas para experimentación, fué al azar, y se realizó por un periodo de un año.

La frecuencia de muestreo fué durante, verano, otoño, invierno y primavera.

Para la selección de los terrenos agrícolas se tomaron en consideración los siguientes puntos.

- a).-Terreno agrícola cuyo principal grano de cultivo fuera el --  
maíz.
- b).-Las condiciones climáticas óptimas para el crecimiento del--  
maíz.
- c).-La aportación de agua al campo de cultivo fuera de temporal  
y de riego.

#### II.1.1.-MUESTREO EN BOSQUES DE SAN ISIDRO.

Se seleccionó porque es una región donde se cultiva maíz-  
en forma de monocultivo, con amplias posibilidades de conte-  
ner una gran cantidad de microorganismos; se utiliza el rie-  
go en épocas de secas; hay dos ciclos anuales de cultivo de-  
maíz; se fertilizan los terrenos periódicamente.

#### II.1.2.-MUESTREO EN BALNEARIO DE a) AGUA CALIENTE b) CHIMULCO.

Las características de estas zonas son suelos de temporal

Donde se cultivan tanto maíz como frijol. La aportación de agua, al campo es por medio de pozos termales.

Se seleccionaron estas zonas por tomar muestras tanto de suelo como de agua en los pozos termales.

## II.2.-MUESTREO DE LA FLORA BACTERIANA NATIVA EN SUELOS AGRICOLAS EN EL ESTADO DE JALISCO.

De la selección que se hizo al azar de las regiones agrícolas para el aislamiento de la microbiota nativa, los parámetros físico-químicos y exológicos se describen a continuación.

### II.2.1.- BOSQUES DE SAN ISIDRO:

- a).- Ubicado en la periferia de Zapopan, cuya latitud es -- 20·25'30 seg. y long. 103·19'30 seg; al Noroeste de la ciudad de Guadalajara.
- b).- El clima es semiseco; con invierno y primavera secos, y semicálido en verano y otoño. La precipitación anual media es: 906.m.m.
- c).- La temperatura media anual es de 23·5°C.
- d).- La clasificación del suelo es; regasol éutrico, Feozem háplico, Luvisol crómico, (ver glosario)'
- e).- La hidrología de la zona esta constituida por: El rio Santiago, arroyo blanco, arroyo San Isidro y arroyo la primavera.
- f).- Los ciclos agrícolas son; de Labor, de riego, de temporal.

El muestreo se realizó durante la estación de otoño, con un número total de muestreos de suelo de cuatro correspondientes a los diferentes niveles de profundidad en la capa arable.

#### II.2.2.- BALNEARIO DE AGUA CALIENTE:

En las regiones de Agua Caliente y Chimulco se tomaron muestras -- de agua, ya que esta tiene la particularidad de ser agua termal y constituye una fuente de riego a su vez, por su alto contenido mineral y su temperatura permite el crecimiento bacteriano termófilo. En la región de Agua Caliente.

Los parámetros son:

- a).- Clima semiseco, con invierno y primavera secos, semicálidos -- en invierno y otoño, estación invernal definida.
- b).- Precipitación pluvial media anual es; 771.7 m.m.
- c).- Temperatura media anual : 20.2°C.
- d).- Orografía: zonas accidentadas 16.0%  
   Zonas semiplanas      42.2%  
   zonas planas            42.2%
- e).- Clasificación del suelo es: regasol éutrico, vertisol pélico-luvisol crómico.
- f).- Hidrología Arroyo zarco, la compuesta. el Tecuán.
- g).- Clasificación agrológica: De labor, de riego, de temporal, de bosques, pastos improductivos.

#### II.2.3.- BALNEARIO CHIMULCO VILLA CORONA JAL.

Su latitud es de 20°25'00 seg. Su longitud 103°40'00 seg. La -- variabilidad de este muestreo y el anterior es que se localizan a un kilometro de distancia y el clima en esta zona es sin estación invernal definida, es semiseco.

II.2.4.- CIATEJ A.C.

- a).- Ubicado en la Ciudad de Guadalajara, en la zona Noreste.
- b).-Tipo de suelo; boscoso.
- c).- Su latitud es de 20°39'9 seg. y su longitud es de 103°18' -  
7 seg.

Durante las diferentes estaciones climáticas anuales se tomaron muestras de los suelos agrícolas, antes mencionados, en donde el principal cultivo es el maíz, así como, en aguas termales con la finalidad de seleccionar y caracterizar las bacterias presuntivamente amilolíticas.



### II.3.- FORMA DE MUESTREO.

#### a).- Muestras de suelo agrícola.

Se colectaron muestras de 500 grs. cada una en las diferentes zonas seleccionadas. las muestras se tomaron a distintas profundidades en el nivel correspondiente a la capa arable, como se indica a continuación:

- a) Superficie
- b) 5 cm. de profundidad
- c) 10 cm. de profundidad
- d) 15 cm. de profundidad
- e) 20 cm. de profundidad

Los parámetros físico-químicos de las muestras del suelo a nivel de campo que se tomaron fueron: Temperatura del suelo ( mediante un termómetro ambiental de 0-120 °C.) y el PH (con un potenciómetro de campo marca Conductronic).

Además se registraron datos ecológicos de la zona para complementar los parámetros antes mencionados, como son: Latitud, longitud, tipo de suelo, flora, fauna y temperatura.

El transporte de las muestras del suelo, se realizó mediante bolsas de plástico.

#### b).- Muestras de Agua. (Región Agua Caliente y Chimulco).

Se tomaron muestras de agua, de 250 ml cada una en frascos de vidrio, previamente esterilizados en 2 pozos termales naturales, a 2 niveles de profundidad.

- a) Superficial
- b) 3 Mts. de profundidad.

#### II.4.- ANALISIS DE LAS MUESTRAS DEL SUELO.

En el laboratorio, las diferentes muestras fueron puestas en una solución de fosfato de potasio monobásico, ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.5 M. Ajustado el pH a 6.0 (18). Esto con el propósito de conservar o mantener vivos los microorganismos presentes en el suelo.

Se tomó un gramo de muestra de tierra de cada uno de los muestreos de suelo, en un volumen de 9 ml. de solución fosfatada, haciendo 5 diluciones correspondientes:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , (26).

Para el muestreo de agua, se procedió con la misma técnica empleada para el caso del suelo.

Todos estos ensayos se realizaron en una campana de flujo láminar para mantener estéril el área de trabajo.

En la tabla I. Se especifica el diseño experimental a seguir para obtener un crecimiento bacteriano general, de tal manera de poder seleccionar a partir de los crecimientos microbianos obtenidos, aquellas cepas particularmente con capacidad amilolítica.

#### II.5.- MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS AMIOLITICAS.

Para el crecimiento en agar de bacterias amilolíticas se reporta en la literatura, los distintos medios de cultivo, Los más recomendados son: Sólidos, líquidos, blandos, ricos, mínimos y semisólidos. (2)

A continuación se describen los Medios: Rico Sólido, Mínimo. Los cuales se utilizaron en el presente trabajo con más frecuencia en el crecimiento bacteriano experimental.

| Estación climática | San Isidro   |   |   | Agua Caliente                |   |   | Chimulco                     |   |   | Ciatej       |   |   |
|--------------------|--------------|---|---|------------------------------|---|---|------------------------------|---|---|--------------|---|---|
|                    | A            | B | C | A                            | B | C | A                            | B | C | A            | B | C |
| Primavera          | _____        |   |   | _____                        |   |   | _____                        |   |   | d) 4 5(2) 40 |   |   |
| Verano             | 1) 4 5(2) 40 |   |   | _____                        |   |   | _____                        |   |   | _____        |   |   |
| Otoño              | _____        |   |   | d) 4 5(2) 40<br>d) 4 5(2) 40 |   |   | _____                        |   |   | _____        |   |   |
| Invierno           | _____        |   |   | _____                        |   |   | d) 4 5(2) 40<br>d) 4 5(2) 40 |   |   | _____        |   |   |
| Total de cajas     | 40           |   |   | 80                           |   |   | 80                           |   |   | 40           |   |   |

Tabla. 1.- Diseño experimental del muestreo de Suelos y agua para el aislamiento de las cepas bacterianas amilolíticas.

El muestreo se efectuó en 4 diferentes lugares durante las diversas estaciones climáticas, como se indica en material y métodos: A)-número de muestras tomadas por salida de -- campo.

B)-número de diluciones en solución fosfato -- 0.1N) realizados por duplicado por cada -- muestreo,  $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ ..

C) total de cajas petri sembradas en cada esta ción climática por lugar de muestreo.

d)-muestras de suelo

e)-muestras de agua.

II.5.1.- Medio rico sólido; " Medio LB elaborado por Luria y Bretonia (1925). (26).

| Sales ó componentes  | gr/lt    |
|----------------------|----------|
| Bacto triptona       | 10 gr/lt |
| extracto de levadura | 5 " "    |
| Nacl                 | 5 " "    |
| Agar                 | 2%       |
| pH                   | 7.0      |

II.5.2.- Medio Mínimo sólido: Medio mínimo utilizado generalmente para Bacillus lequeniiformis (26).

| Sales ó componentes          | gr/lt.    |
|------------------------------|-----------|
| $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ | 4.0 gr/lt |
| $\text{Na}_2\text{CO}_3$     | 0.5 " "   |
| $\text{MnSO}_4$              | 0.005 "   |
| $\text{k}_2\text{SO}_4$      | 0.2 "     |
| $\text{MgSO}_4$              | 0.5 "     |
| $\text{CaCl}_2$              | 0.5 "     |
| peptona biotriptasa          | 5.0 "     |
| extracto de levadura         | 2.0 "     |
| almidón                      | 10 grs.   |
| pH                           | 6.7       |

La ventaja que se tiene de utilizar medio rico inicialmente, es con el fin de favorecer el crecimiento de la mayor parte de las colonias bacterianas, que se muestrearon a partir de las diluciones del suelo, ya que este medio contiene componentes nutritivos abundantes.

La desventaja de utilizar el medio rico, es que crece cualquier tipo de microorganismos, es decir no es selectivo para colonias capaces de degradar almidón. Es por ello que se hace un subcultivo o resiembra.

En un medio mínimo conteniendo almidón como fuente de carbono, de manera tal que aquellas cepas con capacidad amilolítica crezcan mientras que las cepas que no degraden el almidón no tendrán la posibilidad de subsistir. (8).

En el primer medio se disolvieron todas las sales ó compuestos en el matraz, y se puso a calentar para su completa disolución y enseguida se procedió a la esterilización por espacio de 15 minutos a 115 libras en la autoclave. (14).

En el segundo medio se procedió a disolver todas las sales y los demás compuestos juntos, excepto el almidón que se disolvió por separado, para agregarlo, antes de meterlo a esterilización en autoclave de igual forma que el anterior. (14).

## II.6.- AISLAMIENTO Y SELECCION DE BACTERIAS AMIOLITICAS.

Las diluciones de suelo y agua antes mencionadas (ver tabla I) se sembraron en medio rico solidificado en cajas petri, siendo estas un total de 240. La siembra se llevó a cabo por medio de gota, utilizando una asa de vidrio para esparciar las colonias homogéneamente las cajas de petri sembradas, fueron incubadas en una estufa por espacio de 24 hrs. a una temperatura de 37°C. Al término del periodo de incubación, se aislaron las diferentes cepas bacterias en base a su morfología, color y consistencia de la cepa, tomándose un registro de cada una de ellas. (18).

De las cepas obtenidas en el medio rico se procedió a emplear, el medio mínimo para el crecimiento en particular de Bacillus amilolítico.

El género Bacillus de la microbiota bacteriana son las únicas capaces de degradar almidón (10). Estos medios se utilizaron en dos formas: líquida y sólida. El medio sólido es para mantener la viabilidad del microorganismo. (28). Y el medio líquido se utilizó para la determinación de la producción de la enzima amilolítica. (28).

Las condiciones de incubación fueron de 37°C, 45°C, hasta 65°C. durante el mismo periodo. (2).

## II.7.-PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE ESPECIES PRODUCTORAS DE AMILASAS.

Las colonias obtenidas en ambos medios (rico y mínimo) - después de haber sido aisladas en función a las características antes mencionadas,, se sometieron a la prueba de hidrólisis del almidón con el propósito de determinar su capacidad amilolítica.

### a)- PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE ESPECIES PRODUCTORAS DE AMILASAS.

La hidrólisis de almidón consiste en que aquellas cepas bacterianas capaces de sintetizar amilasas tienen la facultad de degradar el almidón, en la periferia de la colonia, presente en el medio de cultivo. Esta prueba se consideró la de mayor importancia debido a que por medio de ella se seleccionó a las bacterias productoras de almidón.

El ensayo se realizó utilizando la solución de lugol 2% de concentración (28) para la visualización de la hidrólisis de almidón en el medio solidificado siendo el almidón la única fuente de carbono en el medio de cultivo. Este ensayo utilizó el lugo, como colorante específico para el almidón, produciendo una tonalidad violácea, el lugol fue vertido en condiciones estériles en las cajas petri con el fin de teñir la matriz del gel (2). Las bacterias con capacidad amilolítica presentaron en su alrededor un halo transparente, lo que indica que existe una degradación del almidón, dicho halo se le nombra, halo de inhibición. (2).

## II.8.-PRUEBAS DE CARACTERIZACION BACTERIANA.

Una vez que se separaron las cepas bacterianas que presentaron el halo de inhibición, i.e. degradadores de almidón se procedió a caracterizar cada una de las colonias con el objeto de identificarlas en género y especie.

Las colonias que hidrolizaron el almidón se sembraron en diferentes medios (los indicados de acuerdo a la literatura), para hacer las observaciones bioquímicas pertinentes que nos permitieran su identificación.

Estas pruebas bioquímicas se tomaron como referencia del Manual de Bergey's (1974), las cuáles se describen como sigue.

a)- Observación microscopica: Se determinó el tipo de microorganismo en función a sus características morfológicas y morfológicas como: color, consistencia, estructura y tamaño. -- Las bacterias pueden presentar forma de bastón cadenas ó -- cocos (esfericos). Las bacterias amilolíticas son por lo general de forma bastonada (14).

b)- Movilidad:

La movilidad de estas cepas se observan al microscopio, las cuáles presentaron un movimiento bidireccional (14). tambien en esta prueba podemos observar que por medio de picadura - en tubos de ensaye utilizando, medio rico semisólido que -- favorece a la observación, de las bacterias amilolíticas -- que presentan movilidad bidireccional. (2). La literatura - reporta que todos los bacilos presentan movilidad a excepción de Bacillus anthracis (3).

c).- Tinción de Gram:

De las colonias obtenidas en medio rico se procedió a dividir las bacterias, haciendo una tinción llamada Gram que -- facilita la selección de aquellas bacterias que sean positivas o negativas (14). Esto se realizó colocando en un fro -- tis, las colonias seleccionadas y agregando primero el colorante Cristal violeta; y dejándolo reaccionar por 1 minuto

Lugol: se agregó para que reaccionara por espacio de un minuto y lavarlo.

Alcohol: se utilizó gota a gota para arrastrar el color, se lavó para detener la acción decolorante (2).

Safranina: se dejó reaccionar de 10 a 20 segundos se lavó - el exceso de colorante (2). Las bacterias amilolíticas son por lo gral. Gram positivas, habiendo cocos particulares -- Gram (negativos). (3). La literatura nos reporta que los ba ci los ami lo lít icos más import antes son: Bacillus subtilis - Bacillus lequeniformis, Bacillus amiloliquefaciens (3).

d).- Temperatura variable:

De los cultivos provenientes de medio rico cuya temperatura de incubación es de 37°C, se tomó una cepa y se resembró en el mismo medio variadno únicamente la temperatura de incubación de 45°C y 65°C. Después de 24 hrs. se observó el crecimiento, las bacterias amilolíticas generalmente son mesófilas, sin embargo hay bacterias amilolíticas capaces de -- crecer en condiciones de temperatura extremas. Las especies reportadas con más capacidad termofílicas que pertenecen a los bacilos son: Bacillus sterothermophilus (3).

e).- Crecimiento anaeróbico;

El objetivo de esta prueba fue la división de dos grupos de bacilos que son; anaeróbico y aeróbico, siendo el de -- de nuestro interés los bacilos aeróbicos.

El método empleado fue el de Gas Pak (14). En una campana o jarra anaeróbica se colocan las cepas y se pone un sobre germendorf de anaerobiosis. Las especies de bacilos reportados en la literatura dentro de las especies amilolíticas son: Bacillus anthracis (3).



f).- Hidrólisis de la caseína;

Después de realizar el cultivo en medio rico, el objetivo de esta prueba consistió igual que la prueba de almidón en observar el halo de degradación de la caseína (proteína de la leche) alrededor de la cepa. Lo benéfico de esta prueba para las bacterias amilolíticas transforman de proeuctos insolubles a productos solubles ejemplo: la caseinasa.

Dentro de las especies amilolíticas reportadas en la literatura que son capaces de degradar la caseína son: Bacillus polymixa, (3) Bacillus subtilis, Bacillus sterothermophilus -- (3).

g).-Hidrólisis de la gelatina.

De las colonias que se obtuvieron de un cultivo en medio rico sólido, se observó como se hidrolizó la gelatina, virtiendo-- sulfato de amonio saturado en la caja petri, formándose un halo de inhibición alrededor de la cepa bacteriana. Esto contri buye a mencionar que muchas bacterias hidrolizan la gelatina-- pasando del estado coloidal al cristaloiide. Las especies que-- reporta la literatura son: Bacillus subtilis, (3) Bacillus -- polymixa, Bacillus lechiniformis (3).

H).-Utilización del citrato:

Del cultivo previo realizado en medio rico, y dentro de esta prueba se observó la existencia de bacterias que utilizan citrato sódico como única fuente de carbono.(14) El crecimiento de los microorganismos indican positividad. Un inidcador acidobásico que ordinariamente contiene el medio, recupera su -- color alcalino a medida que se oxida el radical citrato. El -- medio que se utilizó fue agar citratado de Simmons(2). cuándo hay cambio de color azul la reacción nos indica positi vidad, cuándo el medio no se modifica hay reacción negativa.

Las bacterias amilolíticas no tienen la capacidad de utilizar citrato, excepto por dos especies, por lo que se usa esta determinación como control ó prueba negativa (14).

De las especies amilolíticas capaces de utilizar citrato que nos reporta la literatura son: Bacillus polymixa, (3). Bacillus cereus. (3).

i).- Hidrólisis de la Urea.

Después del cultivo en medio rico, se empezó a hacer la prueba donde las colonias bacterianas utilizan la transformación de urea a amoniaco. El medio utilizado contenía urea como única fuente de nitrógeno (14). Al absorber la urea se libera  $\text{NH}_3$  que alcaliniza el medio y se origina el cambio a color rosa fuerte indicando positividad. El medio de cultivo usado es agar urea hidratada Las especies bacterianas que reporta la literatura, dentro de los bacilos amilolíticos son: Bacillus subtilis, Bacillus megaterium. (3).

j).-recimiento en Cloruro de sodio al 7%.

Las cepas bacterianas crecidas en medio rico se observaron que tenían la capacidad de resistencia a la salinidad (14). El cultivo fue crecido en medio rico sólido. Las especies reportadas en la literatura son: Bacillus circulans, Bacillus cereus (3).

k).- Crecimiento en diferentes carbohidratos.

El crecimiento en los diferentes carbohidratos tienen como objetivo observar que mayor desarrollo puede haber tanto en glucosa sacarosa, xilol y manitol, utilizandolos como fuente de carbono (18). Algunas especies reportadas dentro de bacilos amilolíticos son: Bacillus polymixa, Bacillus subtilis, Bacillus sterothermophilus. (3).

## 1).- Crecimiento a pH de 5.7

Después del cultivo previo hecho en medio rico, en esta -- prueba se observó la variabilidad de crecimiento en un pH ligeramente ácido. Las bacterias capaces de crecer en condiciones de acidez son: Bacillus sterothermophilus, Bacillus megaterium (3).

## M).-Prueba de la catalasa.

Del cultivo previo que fue en medio rico, se paso a esta prueba, donde se demostró la existencia de bacterias que producen -- la enzima catalasa, (2), la cuál descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. Se observó la formación de burbujas alrededor del crecimiento bacteriano, algunas de las especies amilolíticas capaces de producir catalasa son: Bacillus sterothermophilus.

H).-Prueba de CO<sub>2</sub>

El objetivo de esta prueba es con el propósito de observar las bacterias que producen CO<sub>2</sub> en forma de burbújassobre la superficie del medio rico sólido (14).

Las especies reportadas son: Bacillus licheniformis, Bacillus polymixa (3).

## O).-Prueba de ácido sulfhídrico

El crecimiento de bacilos en un medio que contiene sales metálicas, lo que se conoce como medio de SIM (14). Observamos la existencia de ácido sulfhídrico en las colonias bacterianas por medio de un color negro correspondiente a sulfuro ferroso (2).

Las especies que nos reporta la literatura dentro de esta prueba como amilolíticas son: Bacillus polymixa, Bacillus subtilis (3).

## II.9.- CRECIMIENTO POBLACIONAL: " Cultivo líquido en matraz".

El objetivo del cultivo en matraz fue probar en medio líquido, el crecimiento bacteriano, para la prueba in vitro, de la actividad enzimática.

El medio de cultivo utilizado para el cultivo en fase líquida fue el medio mínimo para Bacillus lequeniiformis con la única diferencia de no contener agar. Con el objeto de medir la densidad de población se hizo la lectura en el espectrofotómetro marca LKB. La lectura fue tomada en un rango de 560 nanómetros donde el orden de conteo fue de  $8 \times 10^8$  cel/mililitro - - (20). Esta prueba se realizó dos veces para verificar que las lecturas nos dieran sin posibilidad de error.

## II.10.- DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se determinó la lectura de las proteínas por medio de la técnica llamadas Bradford (18). Se elaboró una curva de calibración proteica para poder tomar las lecturas que contenian las diversas muestras de las cepas bacterianas. Esta curva se elaboró con albúmina en concentraciones de 5,10,15 microlitros, -- de una solución madre a una concentración de 0.97 mg/ml. (4). A cada tubo marcado con el número de la cepa correspondiente-- le agregamos la solución Bradford, compuesta por:

| COMPUESTO      | g/l     |
|----------------|---------|
| Azul brillante | 100mg   |
| Etanol         | 50ml    |
| Ac. fosfórico  | 100ml   |
| aforar         | 1000ml. |

El azul brillante más el etanol se mezclan hasta disolverse -- bien (esto tarda aproximadamente un día). Después se agrega el ácido fosfórico y se hace un filtrado con un filtro sartorius - cuyo poro mide 0.45. micras. se aforó a un volumen final de - - 1000 ml guardandose en un frasco ámbar, para las lecturas en el espectrofotómetro a 595 nanómetros se tomó un ml. de solución - - Bradford más 100 microlitros de cada muestra a determinar.

#### II.11.- ENSAYO ENZIMATICO DE ACTIVIDAD AMILOLITICA.

La actividad amilolítica de las muestras se determinó de la siguiente manera: a cada tubo debidamente identificado se agregó 40 microlitros de almidón soluble al 1%, 3 ml. de solución - - amortiguadora de (citatos 0.05 microlitros con un pH de 5.0) - Y 10 microlitros de muestra; se incubaron 15 minutos exactamente a 40°C, utilizando siempre un blanco (sustituyendo la muestra por agua destilada con 1 ml. de HCl (1 N) y se aforó a - 10 ml. con agua destilada (18).

Por último para desarrollar color se agregó 100 microlitros -- de lugol, al 3% y se tomó lectura en un rango de 62) nanómetros contra el blanco preparado. La cantidad de almidón hidrolizado se calculó en la curva estandar de almidón (18). La lectura fue tomada en un espectrofotómetro Ultrospec II LKB Biochrom.

#### II.12.- CINETICA ENZIMATICA.

La cinética enzimática consistió en rastrear la amilasa en un periodo cronológico con intervalos de 8 hrs. por cada muestreo a partir de las muestras que se les hizo el ensayo enzimático con el propósito de observar la degradación de almidón que va haciendo la enzima en el transcurso del tiempo.

La temperatura que se utilizó fue de 37°C en un transcurso de 72 hrs. Se hicieron 8 tomas de las muestras con 10 ml. por cada una. Estas tomas se pusieron a congelar a -40°C para después

ser tratadas. Las lecturas que se tomaron fueron en un rango de 620 nanómetros tomando las cepas de mayor actividad enzimática, para gráficas y relacionar las lecturas de proteínas y de actividad enzimática, y nos den el resultado de coeficiente de correlación, y la actividad específica de la amilasa-- (4).

El tipo de crecimiento de un cultivo bacteriano es sumamente monitoreado para tomar alicuotas en varios tiempos y nos indican la densidad óptica (O.D) a un rango de 600 n.m.

La bacteria puede ser también crecida en frascos adecuados -- con especial designación de lectura en un espectrofotómetro en un rango de 1 O.D. (600 n.m)  $8 \times 10^8$  cel X ml. porque la exactitud relacionada entre la densidad óptica y el número de bacterias en una pequeña cepa requiere de la calibración de una curva relativa de números variable de bacterias a la O.D. (600 n.m en el cultivo. (20).

## II.- RESULTADOS

### III.- REGISTROS AMBIENTALES Y NUMERO DE CEPAS OBTENIDAS EN EL MUESTREO DE SUELOS.

#### a).-Muestreo en Bosques de San Isidro:

Los parámetros ambientales en la estación de otoño registraron los siguientes: Temperatura ambiente, 37°C -- temperatura del suelo, 36°C y pH 7.0.

Las muestras de suelo sometidas a distintas diluciones y sembradas en medio rico, como se describe en material y métodos, presentaron número variable de cepas bacterianas, como se observa en la Tabla número 2. Debido al abundante crecimiento bacteriano registrado en la dilución 10<sup>1</sup>, (al igual que en todos los muestreos siguientes), se descartó y se procedió a seleccionar las bacterias amilolíticas a partir de la dilución 10<sup>2</sup>.

En la región de San Isidro se obtuvieron un total de -- 42 colonias bacterianas de diferentes géneros no identificados. El total de cepas en cada dilución se basa en la apreciación que se hace de las cepas bacterianas de acuerdo a la observación con respecto a su morfología - estructura y color.

En el muestreo realizado en San Isidro se observó una - extensa diversidad de microorganismos en el campo visual

#### b).-Muestreo en el Balneario "AGUA CALIENTE" Mpio. de Villa Corona, Jalisco.

Los parámetros ambientales durante el invierno fueron - temperatura ambiente de 37°C; la temperatura tanto del suelo como del agua fue de 36°C; de las muestras de agua directas del pozo termal la temperatura registrada fue de 39°C; el pH de todas ellas (suelo y agua) fue de 7.8 la temperatura de la laguna fue de 24°C y pH 9.44 y de-

La alberca de 36°C y pH 7.9.

En esta región se detectaron 56 cepas bacterianas de -- diferente género encontradas solamente en los muestreos de suelo ( Tabla número 1). La diferencia que se tuvo -- de este muestreo y el anterior fueron las muestras de -- agua que se tomaron, ya que en el anterior se muestreó -- únicamente suelo.

La población bacteriana obtenida a partir de las muestras de agua se reporta en la (tabla número 2).

c).- Muestreo en el Balneario Chimulco " Mpio. Villa Corona,  
Jal.

Los resultados obtenidos en este muestreo, referente a los parámetros ambientales, durante el verano fueron: 37°C de temperatura ambiente; 37°C del suelo; 36°C del agua; -- de las muestras tomadas directamente del pozo la temperatura fue de 40°C para el suelo y del agua 38°C, ambas con -- pH de 7.9 la temperatura de la laguna fue de 26°C y pH 8.3- de la alberca 35°C y pH 6.2 .

De este muestreo no se tomó ninguna cepa bacteriana proveniente de agua, debido a que no, se observó un buen crecimiento en ninguna de ellas, al cultivarlas sobre agar.



| Dilucion        | San Isidro | Agua Caliente | Chimulco  | Ciatej    |
|-----------------|------------|---------------|-----------|-----------|
| 10 <sup>1</sup> | abundante  | abundante     | abundante | abundante |
| 10 <sup>2</sup> | 28         | 34            | 49        | 42        |
| 10 <sup>3</sup> | 10         | 17            | 23        | 36        |
| 10 <sup>4</sup> | 4          | 5             | 11        | 13        |

Total                                    42                                    56                                    83                                    95                                    =276

Tabla no.2 Número de cepas bacterianas obtenidas del muestreo de suelo.

Registro del número de cepas bacterianas obtenidas en cultivo en medio rico, a partir de diferentes diluciones realizadas - en el muestreo de suelos agrícolas de diversas regiones en el Estado de Jalisco.

| Dilución | San Isidro | Agua Caliente | Chimulco  | Ciatej    |
|----------|------------|---------------|-----------|-----------|
| $10^1$   | abundante  | abundante     | abundante | abundante |
| $10^2$   | ---        | 15            | 8         | ---       |
| $10^3$   | ---        | 9             | 5         | ---       |
| $10^4$   | ---        | 4             | 2         | ---       |

Total

28

14

Tabla No. 3.- Número de cepas bacterianas obtenidas del agua.

Registro del número de cepas bacterianas obtenidas en medio rico a partir de diferentes diluciones realizadas en el - - muestreo de aguas termales de las diversas regiones en el Estado de Jalisco.

(tabla número 3), a pesar que si se obtuvo un número considerable de ellas, las cepas bacterianas encontradas de los muestras de suelo fueron de un total de 83 cepas distintas como se observa en la (tabla número 2).

d).- Muestreo de CIATEJ, A.C. Guad, Jal.

Los parámetros ambientales durante la primavera fueron: la temperatura ambiente 37°C; la del suelo 36°C y pH 6.8 (el tipo de suelo se describió anteriormente en materiales y métodos). El total de cepas obtenidas fueron 95 las cuáles tuvie ron poco crecimiento, (tabla número 2).

III.2.- AISLAMIENTO Y SELECCION DE BACTERIAS AMIOLITICAS"

Del número global de cepas bacterianas obtenidas en cultivo en medio rico, a partir de las diferentes diluciones de las muestras de suelo y agua, se procedió a seleccionar las cepas que presentaron actividad amilolítica por medio de la tinción con lugol, como se describe en material y métodos.

Los resultados obtenidos por medio de dicha tinción a partir de las cepas provenientes de las muestras de suelo se mencio nan a continuación en la (tabla número 4). El número de cepas amilolíticas totales obtenidas se señala como porcentaje. De todas las muestras de agua solo 3 cepas presentaron un nivel medio de crecimiento, las cuáles pertenecían a la región de Agua Caliente. Sin embargo, ninguna cepa bacteriana de agua se consideró para las subsecuentes determinaciones ya que su desarrollo en agar o en medio rico fue menor que el obtenido de las cepas de suelo. Debido a esto, se proce dió al desarrollo experimental únicamente con las cepas mues treadas a partir del suelo con el propósito de aislar y sele ccionar las cepas amilolíticas.

| Origen        | # Cepas bacterianas obtenidas | # Cepas presuntivamente amilolíticas | % bacterias amilolíticas | # Cepas amilolíticas dudosas posibles | % bacterias dudosas |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| San Isidro    | 42                            | 8                                    | 19.05                    | 4                                     | 9.52                |
| Agua Caliente | 56                            | 11                                   | 19.64                    | 6                                     | 10.71               |
| Chimulco      | 83                            | 7                                    | 8.43                     | 8                                     | 9.64                |
| Ciatej        | 95                            | 5                                    | 5.26                     | 5                                     | 5.26                |
|               |                               |                                      | Total 31                 |                                       |                     |

Tabla.4.- Cepas bacterianas amilolíticas a partir de suelos.

Número y porcentaje de colonias bacterianas que resultaron presuntivamente amilolíticas de acuerdo al ensayo de degradación de almidón con lugol. Se describe el número y porcentaje de cada una de las regiones agrícolas muestreadas.

\* representa el 100% para cada región muestreada.

El número de cepas presuntivamente amilolíticas se sometió a diferentes pruebas subsecuentes para determinar con mayor pre cisión su capacidad para degradar almidón y poder caracteri-- zar, posteriormente dichas cepas en género y especie.

En la medida del halo de inhibición con respecto a la cepa -- control o bien igual o mayor al halo de inhibición de la cepa control para las presuntivamente, y menor para las dudosas, -- siendo este halo de aproximadamente 2 m.m. en la cepa control. También a las cepas dudosas se les hizo las pruebas de carac-- terización para su determinación.

### III.3.- PRUEBAS DE CARACTERIZACION BACTERIANA EN FUNCION A DETER-- MINACIONES QUIMICAS Y BIOQUIMICAS.

Al total de cepas bacterianas presuntivamente amilolíticas-- siendo estas de 31 cepas distintas (obtenidas a cada una de las regiones agrícolas muestreadas), se les sometió a prue-- bas de caracteriz ación bacteriana con el propósito de deter-- minar género y especie. .

Como se explicó anteriormente. las cepas se encuentran agru-- padas de acuerdo al lugar de origen de las muestras de sue-- lo.

En las tablas subsecuentes se observan los resultados de -- las diferentes pruebas realizadas en cada una de las regio-- nes agrícolas.

Dichas determinaciones nos indican capacidad de crecimiento a distintas variantes en el medio como; movilidad, inhibición, tinción, degradación de algún sustrato.

Se tomó como cepa testigo al Bacillus subtilis ATCC 3366. - parámetro de comparación en las pruebas realizadas del cultivo del suelo.

### III.3.1.- PRUEBA DE CARACTERIZACION DE LAS CEPAS AMIOLITICAS DE BOSQUES DE SAN ISIDRO.

En Bosques de San Isidro se registraron 8 cepas distintas-presuntivamente amilolíticas, de acuerdo a la hidrólisis--de lugol.

La (tabla 5). muestra los resultados de las determinaciones realizadas, por duplicado a cada una de estas cepas.

Además se efectuaron las mismas determinaciones realizadas-a 4 cepas adicionales (dudosas) que habían presentado un -halo de inhibición muy pequeño en la prueba de lugol.

### III.3.2.- PRUEBAS DE CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DEL BALNEA- RIO AGUA CALIENTE.

En Balneario Agua Caliente se registraron 11 cepas diversas presuntivamente amilolíticas, de acuerdo a la prueba de lugol.

La (tabla 6). nos muestra los resultados de las determinaciones realizadas que se hicieron a cada una de estas cepas donde el halo que presentaron todas estas fue igual o mayor al control por lo que se procedió con todas, fueron 6 cepas adicionales en este muestreo que presentaron halo de inhibición pequeño en la prueba de lugol, y a las que también se les hicieron las pruebas correspondientes.

### III.3.3.- PRUEBAS DE CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DE BALNEARIO CHIMULCO.

De la región de Chimulco se registraron 7 cepas diversas presuntivamente amilolíticas de acuerdo a la prueba de lugol.

Se citó en la (tabla no. 7) los resultados de las determinaciones realizadas por duplicado a cada una de estas cepas. Se les efectuaron las mismas pruebas a 8 cepas adicionales, (dudosas) ya que presentaron un halo -- muy pequeño en la prueba de almidón.

### III.3.4.- PRUEBAS DE CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DE CIATEJ, A.C

En la región de Ciatej, se registraron 5 cepas presuntivamente amilolíticas de acuerdo a la prueba de lugol todos los resultados se citan en la (tabla no. 8). Y-- se observan los resultados de las determinaciones realizadas por duplicado a cada una de estas cepas, además se adicionaron 5 cepas a las cuáles se les hizo la --- prueba de lugol, para observar el halo de inhibición - el cuál fue muy pequeño.

### III.3.5.- DESCRIPCION DE LAS TABLAS 5,6,7,8.

Las diferentes columnas indican las respuesta a cada una de las determinaciones realizadas, descritas por medio - de la siguiente simbología:

(3) Crecimiento, tinción, movilidad e inhibición, positivo.

(18) respuesta no favorable negativo.

Las "x" y "y" indican la forma de la espora siendo Espora ovalada y Espora redonda respectivamente.







37

| No. de caso | Tratamiento |             | Medicinas   |         | Exámenes de laboratorio |          | Hidrólisis |        | Productos    |             | Sintomas |       | Medios de cultivo |        | Crecimiento |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|----------|------------|--------|--------------|-------------|----------|-------|-------------------|--------|-------------|-------|
|             | Gram        | Microscópio | Antibiótico | Químico | Cultivo                 | Reacción | Urea       | Castro | Fermentación | Alcalinidad | Acididad | Forma | Reacción          | Medios | Reacción    | Forma |
| 1           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | +          | +      | +            | +           | +        | X     | +                 | V      | +           | -     |
| 2           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | -          | -      | -            | -           | -        | X     | +                 | V      | -           | -     |
| 3           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | +          | +      | +            | +           | +        | 0     | +                 | V      | -           | -     |
| 4           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | +          | +      | +            | +           | +        | X     | +                 | V      | -           | -     |
| 5           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | -          | -      | -            | -           | -        | X     | +                 | V      | -           | -     |
| 6           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | +          | +      | +            | +           | +        | 0     | +                 | V      | -           | -     |
| 7           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | +          | +      | +            | +           | +        | 0     | +                 | V      | +           | -     |
| 8           | +           | +           | +           | +       | +                       | +        | -          | -      | -            | -           | -        | X     | +                 | V      | -           | -     |

Tablas No. 37

Caracterización Bio química de las cepas  
Presuntamente de la familia  
Región de CHIMULCO (BATEMURIO)

\* Cent. Fin.

| No. de muestra | Tiempo de crecimiento |      | Hidrolisis |         |          |         |           | Sales Solubles |      |          |                  |       | pH |         |       |         |       |
|----------------|-----------------------|------|------------|---------|----------|---------|-----------|----------------|------|----------|------------------|-------|----|---------|-------|---------|-------|
|                | 30°C                  | 50°C | Almidón    | Glucosa | Celulosa | Caseína | Nitrogeno | Carbono        | Urea | Fructosa | Alc. de Glicerol | Forma |    | Carbono | Forma | Carbono | Forma |
| 1              | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 2              | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 3              | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 4              | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 5              | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 6              | -                     | -    | -          | -       | -        | -       | -         | -              | -    | -        | -                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 7              | -                     | -    | -          | -       | -        | -       | -         | -              | -    | -        | -                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 8              | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 9              | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |
| 10             | +                     | +    | +          | +       | +        | +       | +         | +              | +    | +        | +                | X     | V  | +       | +     | +       | +     |

Tabla No 18  
 Caracterización Bio química de las cepas  
 Presuntivamente *Amalificas* de las  
 Región de "CIATEN"

\* Control

Las letras "v" y "t" indican la posición de la espora respecto a la célula siendo Espora subterminal y Espora terminal. respectivamente.

El asterisco indica las condiciones control del crecimiento bacteriano inicial, explicado en material y métodos. --  
--todas las determinaciones se hicieron por duplicado en cajas sembradas..

#### III.4.- CULTIVO EN MATRAZ PARA HIDROLISIS DE ALMIDON.

Todas las 31 cepas presuntivamente amilolíticas fueron sometidas a cultivo líquido o en matraz, cuya fuente de carbono fue almidón con el propósito de observar densidad de población y la mayor degradación de almidón.

Las observaciones fueron realizadas de acuerdo a, incremento en turbidez del medio tomando los registros de (Densidad - óptica )D.O. en el espectrofotómetro, a 620 nm.(tabla No.9)-- y a la prueba de lugol, Esta última consistió en la pérdida del tono violáceo que adquirió el medio al adicionar el lugol pasando a un tono transparente o claro; la observación fue únicamente visual.

El crecimiento en matrás fu durante 72 hrs. tomando registros cada 8 hrs. de todas las 31 cepas se procedió a seleccionar únicamente 8 cepas para su identificación taxonómica - ya que estas fueron las que registraron una mayor densidad de población en vase a D.O y mayor índice de degradación --- de almidón, con respecto a las restantes. (tabla No.9\_).

Cabe aclarar que las cepas restantes presentaron escasa lectura de D.O. (i.e) abajo de una 1.0 a 620 nm). y la pérdida del tono violáceo fue mínima.

La lectura de D.O. fue convertida a actividad amilolítica, - de acuerdo a (18)..

La cepa testigo presentó una actividad amilolítica de 325 - - mg/ml/min. Como se puede observar en la tabla no.9). Las ce-- pas amilolíticas seleccionadas presentaron un índice de acti-- vidad amilolítica mayor a la de nuestro control. A las 23 ce-- pas restantes también se les determinó su D.O y, por ende, - su actividad amilolítica siendo esta menor a los 325 mg/ml/min. Con respecto a nuestra cepa testigo. Es necesario mencionar -- que estas 23 cepas no se descartaron por no ser amilolíticas, - sino que, por la dificultad de hacer la identificación taxonó-- mica de cada una de ellas, y a la escasez de recursos y tiempo por ello es que solamente se tomaron las de igual o mayor -- actividad amilolítica referente a la cepa testigo.

### III.5.- DETERMINACION DE PROTEINAS DE ACUERDO AL METODO DE BRA-- DFORD.

La determinación proteica se llevó a cabo en las 8 cepas sele-- ccionadas en el cultivo líquido, como se observa en la tabla -- (9). El contenido proteico se registró a las 36 hrs. de cultivo (6 de incubación ), con el objeto de hacer la correlación entre la actividad específica de D.O. y proteína.

### III.6.- IDENTIFICACION TAXONOMICA.

En el desarrollo de un microorganismo durante 2-4 días. cuándo-- es fermentada la dextrosa por ciertas bacterias. Debido a esto queda abierta la posibilidad de continuar el -- trabajo ya que las 31 cepas que están aisladas pueden hacerse-- les todas las pruebas para su completa identificación.

### III.7.- INTERPRETACION DE LAS GRAFICAS.

Las gráficas nos muestran la correlación que hay del micro-organismo tanto en su pH que va de 7.5, así como su D.O de crecimiento que fué mayor hasta 2.2.

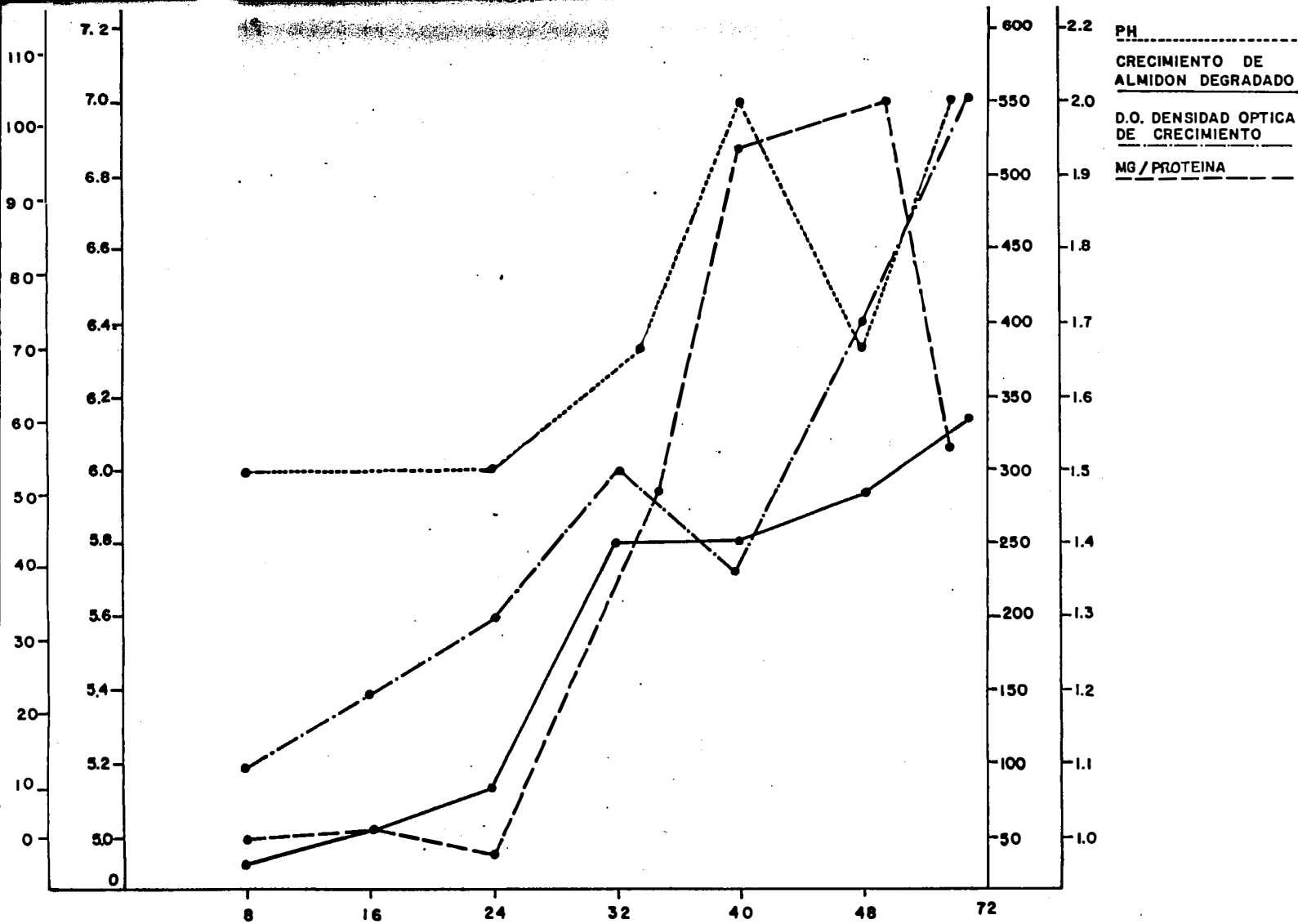
Su actividad enzimática fue de 50 la minima hasta la máxima de 500 mg/ml/min. así como de la protína que fue de 1 hasta 1.10 mg/ml como la máxima. En éstas gráficas se muestran - las de mayor actividad enzimática quedando 8 cepas como -- representativas por lo que las 23 restantes quedan a cargo del Centro de investigación donde se elaboró el trabajo.

| Región | #<br>Cepas  | Degradación<br>de almidón<br>por lugar | 48<br>Hrs | 72<br>Hrs | Act. ami-<br>lolítica<br>mg/ml/min | Proteína | Toxonómia  |
|--------|-------------|--|-----------|-----------|------------------------------------|----------|--|
| an     | 1(15)       | violáceo/<br>transparente              |           | 1.9       | 370                                | 30       | <u>Bacillus</u><br><u>sterother-</u><br><u>ophilus</u> |
| sidro  | 2(45)       | violáceo/<br>transparente              | 2.0       |           | 500                                | 40       | <u>Bacillus</u><br><u>subtilis</u>                     |
| gua    | 3(6)        | violáceo/<br>transparente              | 2.2       |           | 350                                |          | <u>Bacillus</u><br><u>megaterium</u>                   |
| alian  | 4(8)        | violáceo/<br>transparente              |           | 2.2       | 420                                | 40       | <u>Bacillus</u><br><u>firmus</u>                       |
|        | 5(a) ><br>3 | violáceo/<br>transparente              | 1.2       |           | 320                                | 40       | <u>Bacillus</u><br><u>firmus</u>                       |
| simul  | 6(a) ><br>5 | violáceo/<br>transparente              | 1.0       |           | 470                                | 30       | <u>Bacillus</u><br><u>firmus</u>                       |
|        | 7(d) ><br>5 | violáceo/<br>transparente              | 1.1       |           | 550                                | 50       | <u>Bacillus</u><br><u>subtilis</u>                     |
| RATEU  | 8(12)       | violáceo/<br>transparente              |           | 2.0       | 530                                | 35       | <u>Bacillus</u><br><u>subtilis</u>                     |
| estigo | 9(castigo)  |  |           | 2.0       | 325                                | 60       | <u>Bacillus</u><br><u>subtilis</u>                     |

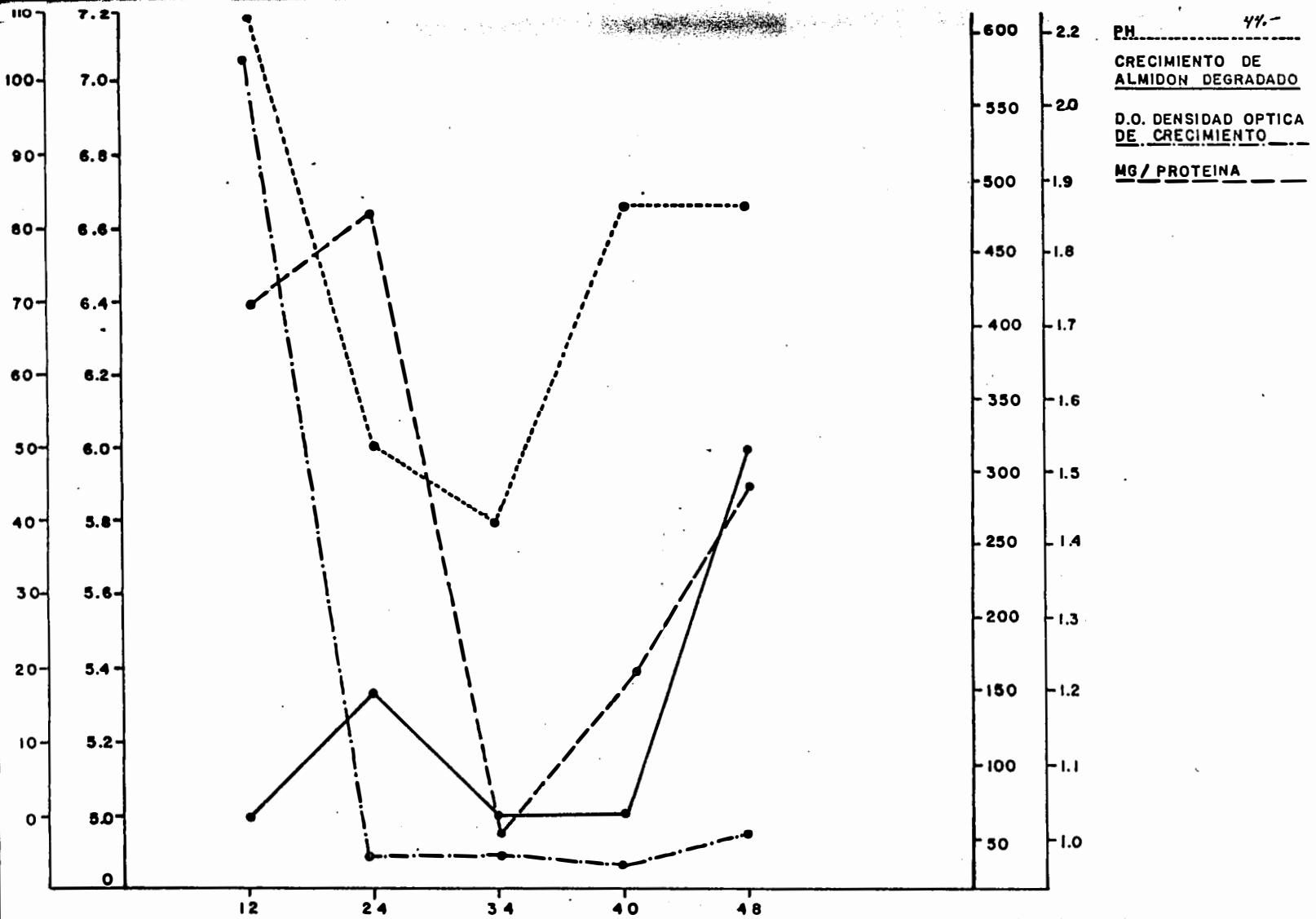
la.9.- Determinación de actividad amilolítica y proteínas de las capas bacterianas cultivadas en matraz.

En esta tabla se muestran las capas de mayor crecimiento poblacional por medio de 0.0. a 620 n.m. de proteínas(mg/lb).

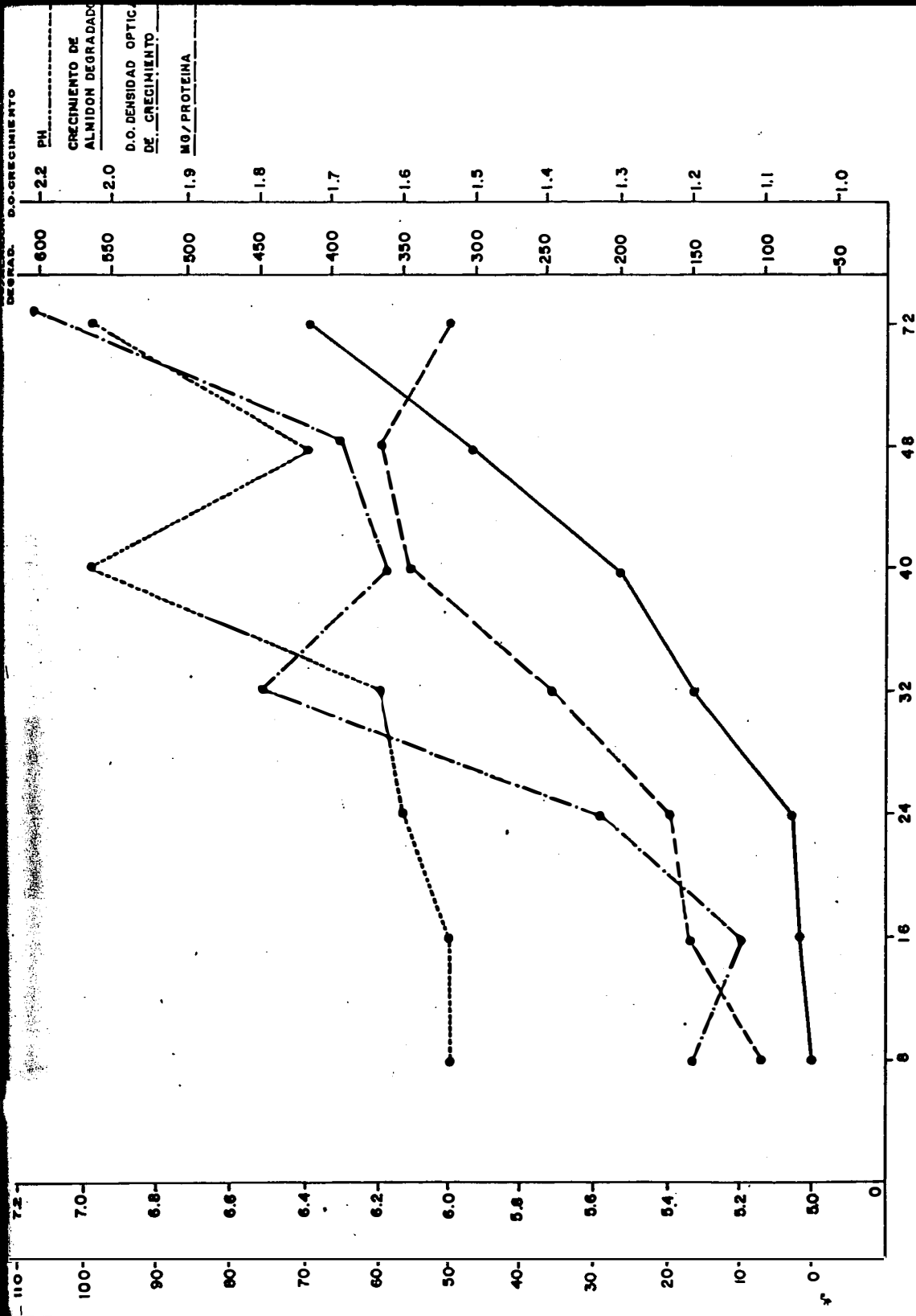
En la prueba de lugol nos indica el No. de capas registrado en las tablas de caracterización. La actividad amilolítica presente en la tabla corresponde a las 72 hrs. incubación la determinación de proteínas se efectuó a las 36 hrs. de incubación. La identificación taxonómica se realizó de acuerdo al Manual Bergey's (3).

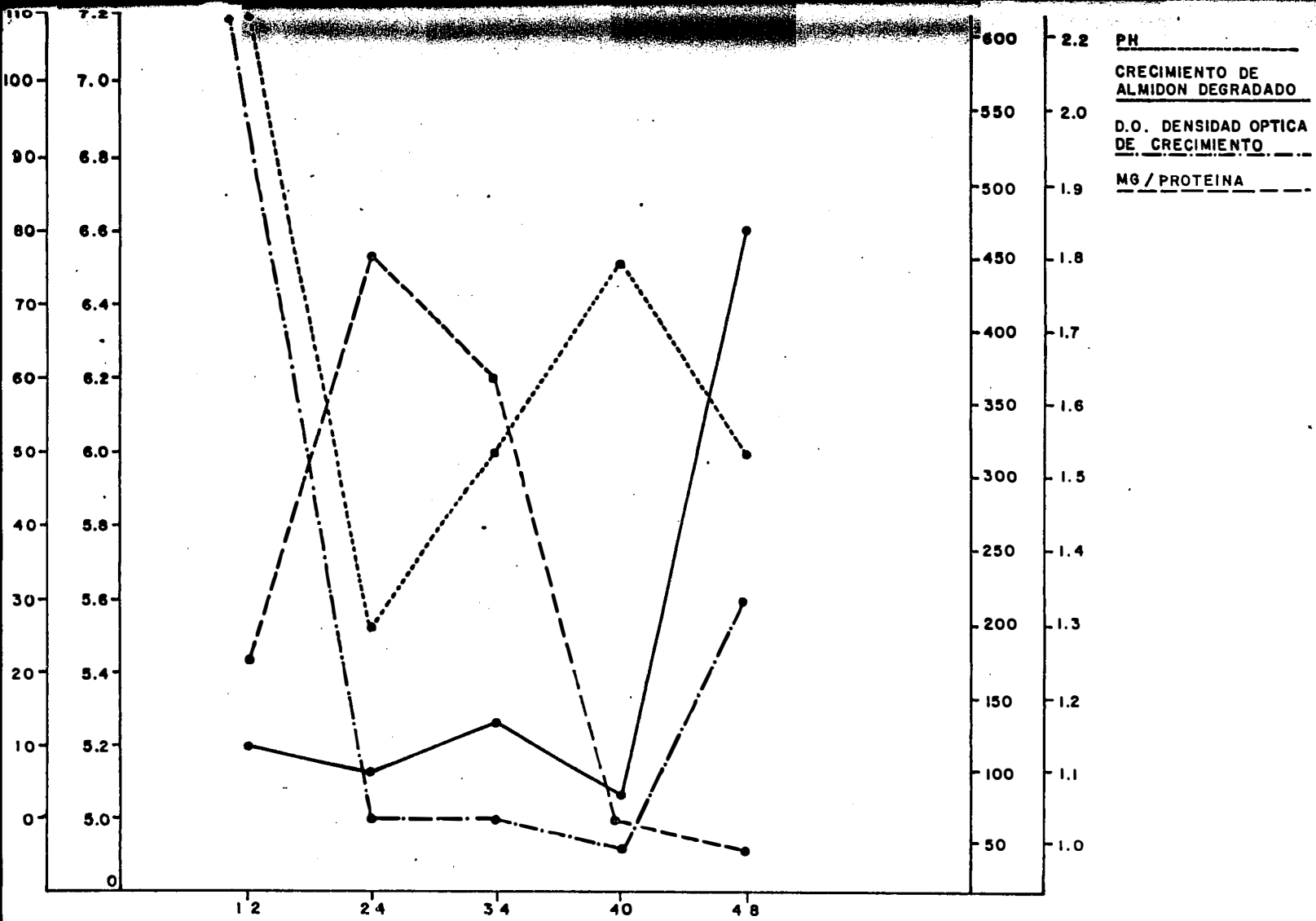


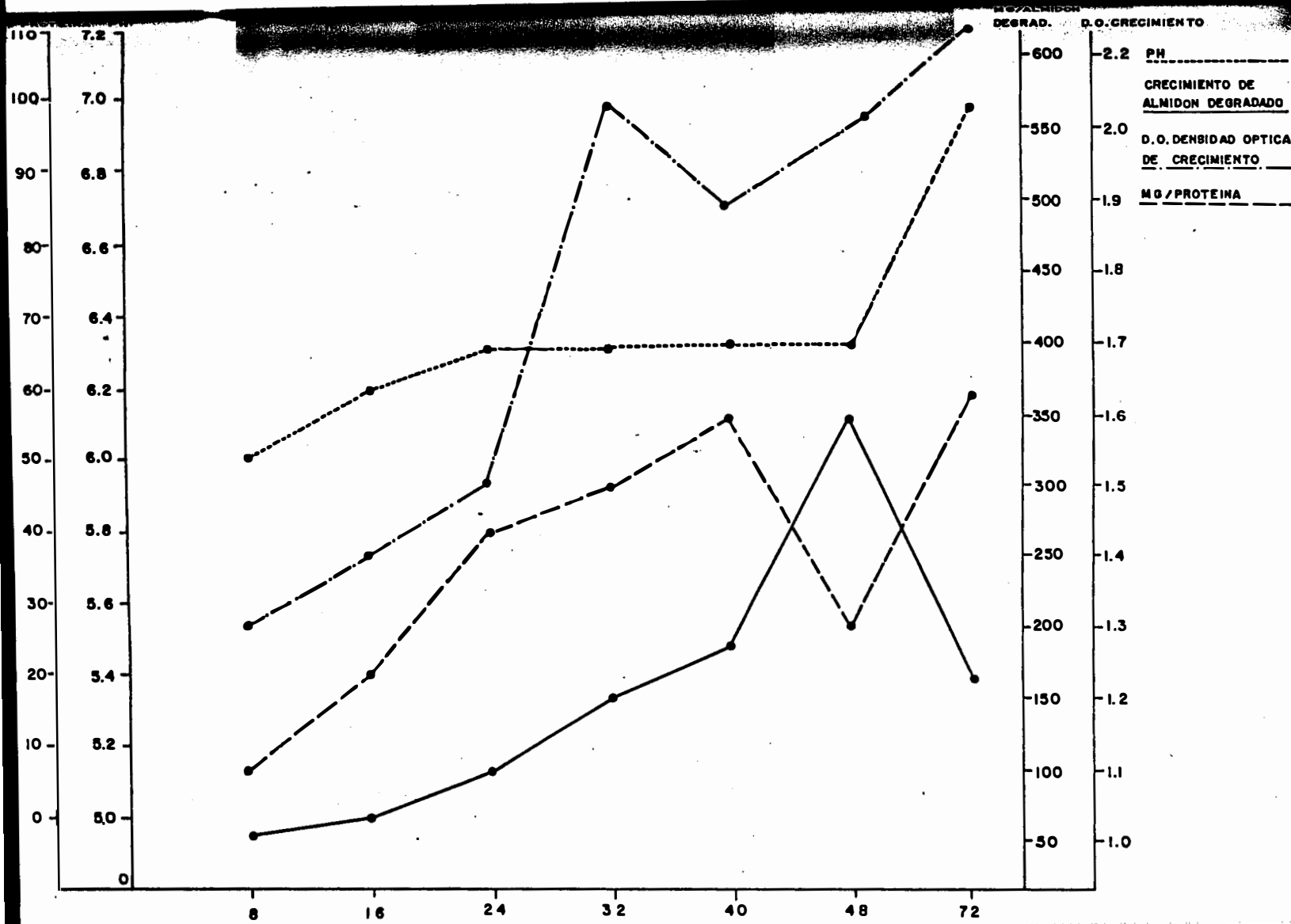


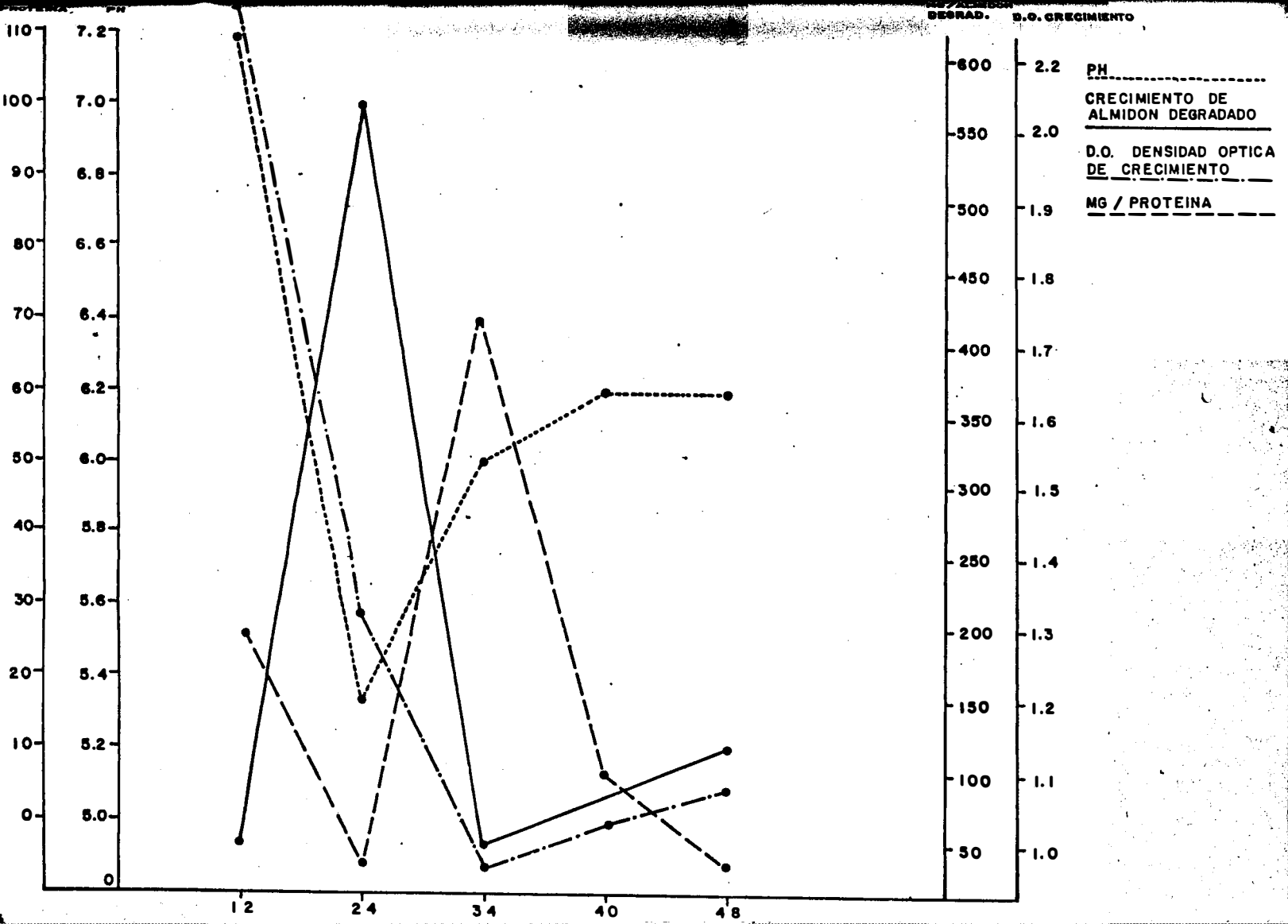


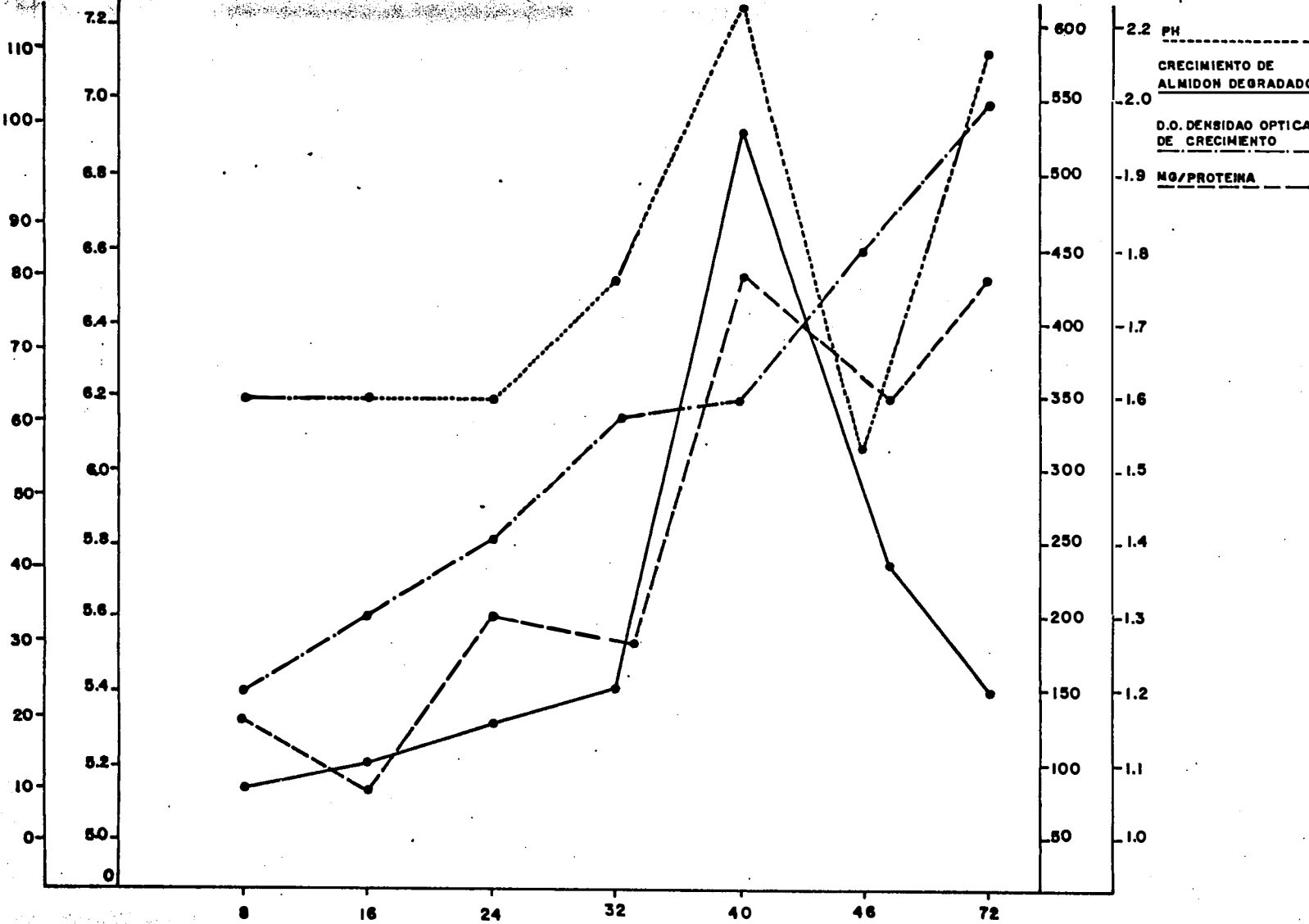
PH \_\_\_\_\_ 44-  
 CRECIMIENTO DE ALMIDON DEGRADADO  
 D.O. DENSIDAD OPTICA DE CRECIMIENTO  
 MG / PROTEINA \_\_\_\_\_

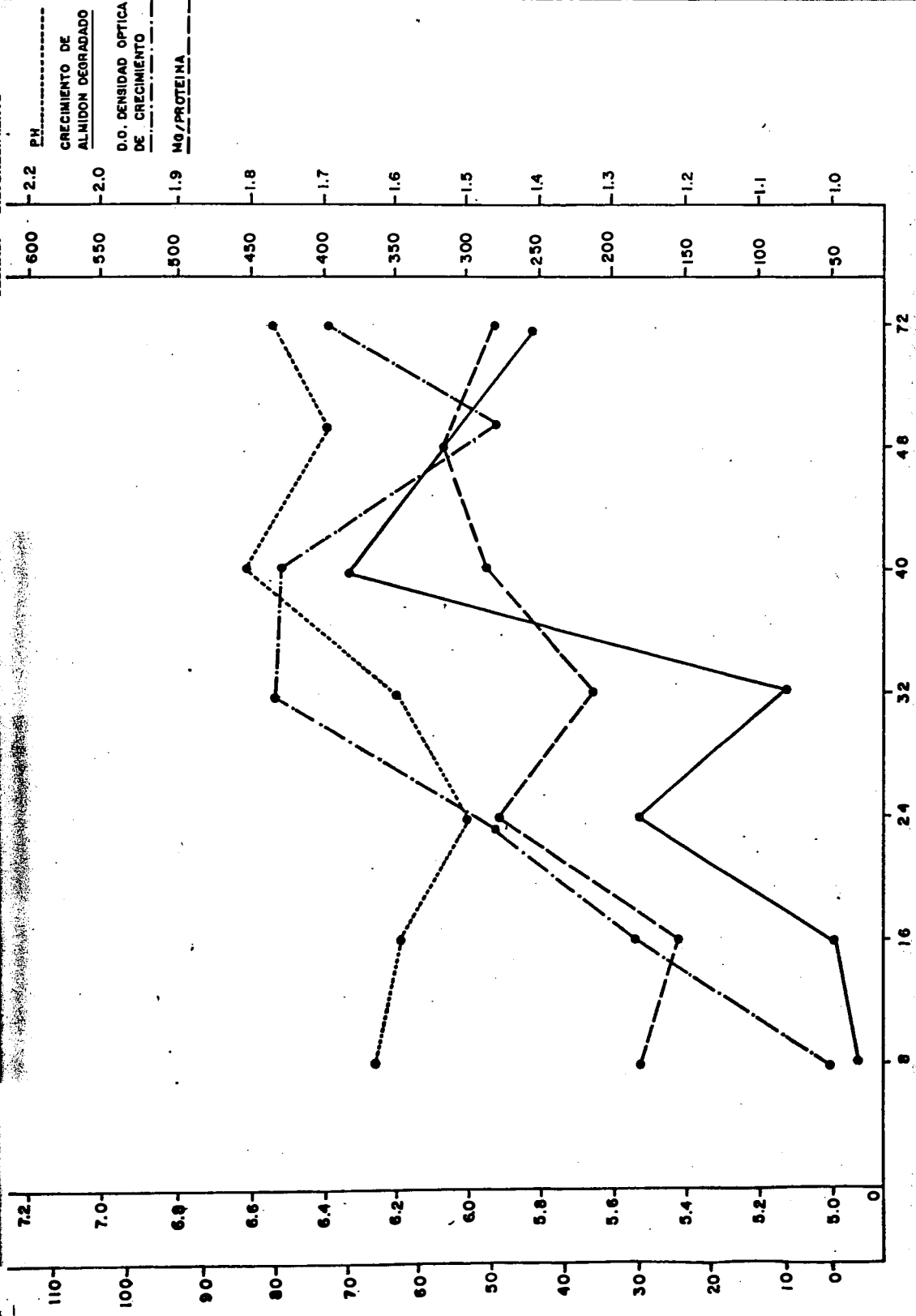


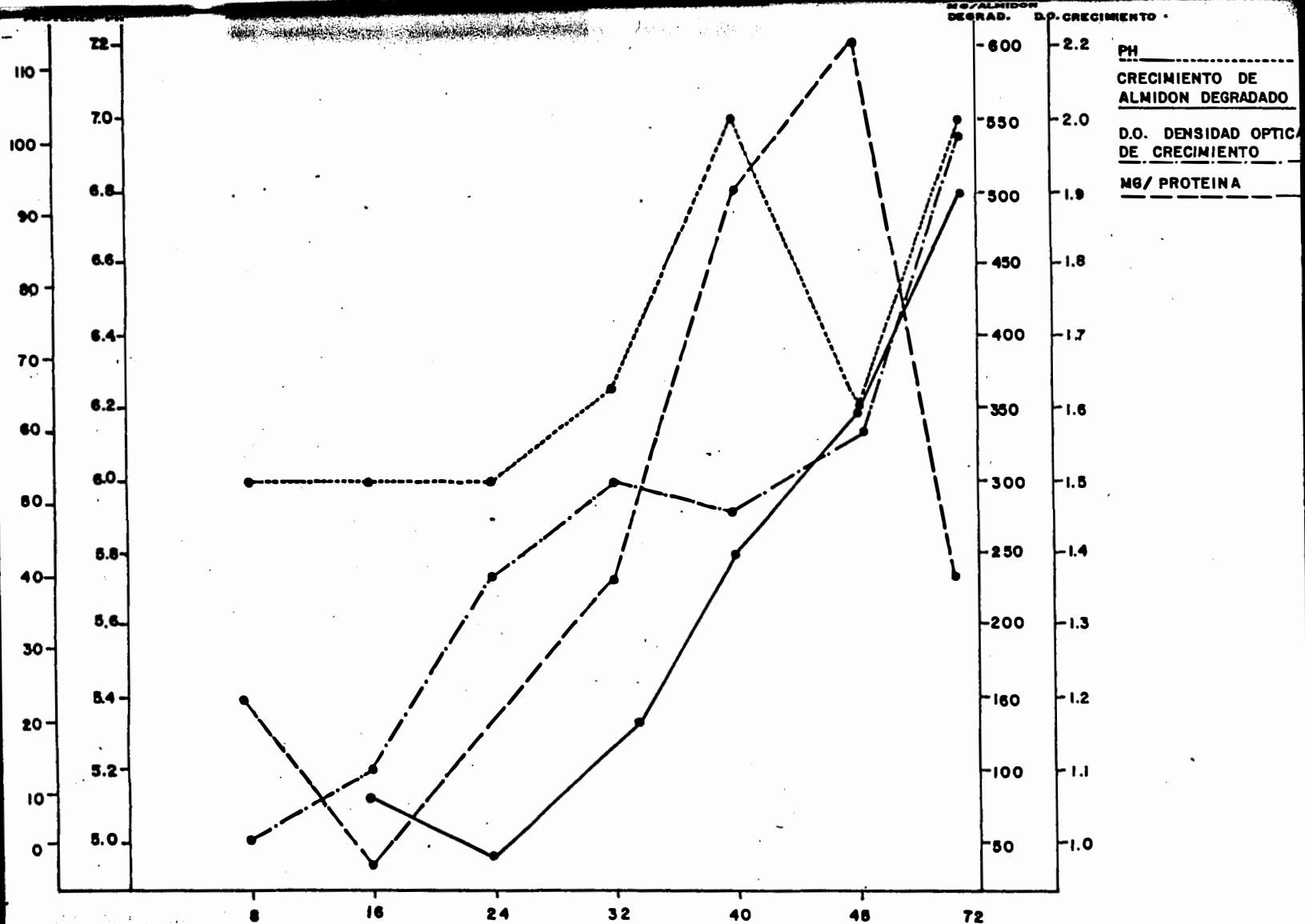














#### IV.- DISCUSION:

El hombre depende en gran medida del suelo para su alimentación. Hasta cierto punto, la fertilidad del mismo determina los niveles alimenticios del ser humano: dependiendo este a su vez, de los microorganismos presentes en el terreno agrícola, -- tanto así, que, sin hongos ni bacterias en el suelo no sería -- posible la agricultura ( 8).

El suelo no constituye un ambiente estático sino debe concebirse como un medio en cambio constante, activado por la acción recíproca de las vastas poblaciones macro y microscópicas de los diferentes formas vivientes.(25).

La aereación, humedad, pH, temperatura, presencia de minerales solubles y cantidad de materia orgánica, ejercen indudable influencia sobre el número de microorganismos en el suelo (21).

Los microorganismos representan un probable pre-requisito esencial para el desarrollo global del mundo biótico (18).

El suelo puede considerarse como un inmenso medio en el que la naturaleza produce cultivos mixtos de miles de especies microbianas. En particular, en los suelos de importancia agrícolas la presencia de microorganismos esta influída por el tipo de materia orgánica, de desperdicio (rastrojo) que es necesario procesar, de tal manera que al siguiente ciclo agrícola forme parte de los nutrientes requeridos por los vegetales en desarrollo ó crecimiento.

En el estado de Jalisco, en un gran porcentaje de los suelos agrícolas el cultivo principal es el maíz, por lo que estos suelos son ricos en microorganismos amilolíticos, (i.e) degradadores de almidón. En el presente trabajo, las bacterias amilolíticas fueron de particular interés, ya que estas ayudan a la degradación del rastrojo de maíz que nos sirve como fertilizante natural.

El muestreo en diversas zonas agrícolas productoras de maíz nos permitió obtener una amplia variedad de bacterias amilolíticas, las cuáles fueron analizadas en el laboratorio, Una de las finalidades de este estudio fue, por un lado, aislar y --

Caracterizar las bacterias obtenidas del suelo, comparando con una cepa control de Bacillus subtilis ATCC 3366. Productora de alfa - amilasa, enzima degradadora de los enlaces alfa 1,4.

En orden de mayor actividad amilolítica se presentaron las características de las cepas presuntivamente identificadas tomando como parámetros de comparación a la cepa de referencia antes mencionada.

Una vez realizadas todas las pruebas Bioquímicas se seleccionaron 8 de las 31 cepas, ya que presentaron mayor actividad amilolítica que el control, como a continuación se menciona Bacillus polymixa, tuvo mayor actividad que la cepa antes mencionada. A estas se les identifico en función a nuestra cepa de referencia, como se describe anteriormente.

A las 23 cepas restantes se les determinaron las pruebas de caracterización, Bioquímica y actividad amilolítica, pero no se realizó su identificación taxonómica debido a que el halo de inhibición fue menor al control.

En escala de importancia, en el presente trabajo, la prueba de la hidrólisis del almidón, fue la más utilizada para detectar y determinar en forma general las bacterias amilolíticas y asimismo se separaron dichas bacterias de acuerdo, a la prueba de temperatura, en mesófilas y termófilas: de las cepas que fueron mesófilas tenemos a las 7 cepas ya identificadas, mientras que solamente una cepa fue termófila y esta fue identificada como: Bacillus sterothermophilus; la cuál presentó las características de temperatura a 65°C.

Seguidamente, la prueba de tinción al Gram, para determinar las bacterias Gram positivas que fueron con las que se trabajaron en estos experimentos.

Las demás pruebas restantes dieron información más particular sobre las 31 cepas bacterianas, lo que permitió poder clasificarlas en las distintas especies a que corresponderían de acuerdo al Manual de Bergey's (3).

De las 31 cepas que presentaron el halo de inhibición del almidón (i,e). Bacterias amilolíticas pertenecieron al género Bacillus por presentar forma bastonada.

La cepa control tiene las siguientes características la cuál - se comparó con la cepa de mayor actividad amilolítica.

Bacillus subtilis: presenta que su tipo de colonias tienen un color opaco, cremosas, son aeróbicas en medio que contenga glucosa, como fuente de carbono: Gram positiva; produce ácido y gas; crecimiento de 37°C, hasta 55°C. hidroliza la caseína, la forma de la espora -- es elíptica y central.

Bacillus polymixa vs. Bacillus subtilis ATCC 3366. A ésta se le identificó taxonómicamente, en función a nuestra cepa control - B polymixa presentó mayor actividad amilolítica (550 mg/ml/min) - respecto a la cepa control. Ambas hidrolizaron la caseína y presentaron una estructura similar de acuerdo a su morfología, son - Gram positivas, producen ácido y gas a partir de carbohidratos - como xilol, manitol, arabinosa, las esporas son predominantemente -- centrales. La diferencia particular en Bacillus polymixa es que no crece a temperatura de 45°C. También no crece la primera en -- medio que contenga NaCl al 7% mientras que B subtilis es aeróbica es por ello que es una especie distinta a nuestra cepa control, - aunque las dos sean cepas amilolíticas. (9).

En las demás cepas identificadas se tiene que en orden decreciente, de la actividad amilolítica presentada, esta la cepa que fue encontrada en CIATEJ, A.C. La cuál reporta 530 mg/ml/min. de actividad de almidón degradado. Identificada presuntivamente como - Bacillus polymixa, la cuál tiene las mismas características que la cepa anterior y su orden de magnitud de actividad amilolítica es - similar a la cepa de Chimulco la cuál reportó gran actividad.

Seguidamente se tiene a la cepa identificada como Bacillus subtilis, la cuál reporta 500 mg/ml/min. que fue encontrada en Bosques de San Isidro; esta cepa presentó características morfológicas y fisiológicas similares a la cepa control, a excepción de la actividad amilolítica la cuál fue mayor.

La cepa identificada como Bacillus coagulans; presentó las siguientes características; tiene pH de 7.0 hidróliza el almidón - crece en temperaturas de 37°C hasta 45°C, lo que la hace diferente de Bacillus polymixa. en NaCl al 7% contrario a B polymixa; Hidróliza la caseína produce ácido y gas a partir de los siguientes -- carbohidratos, xilol, manitol, arabinosa, Difiere de la cepa control por pertenecer a la división anaeróbica es lo que hace que sea en particular B. coagulans.

Una cepa encontrada en el Balneario "Agua Caliente" reportó una actividad amilolítica de 420 mg/ml/min. identificandose como B.firmus, la cuál tiene las siguientes características de acuerdo a la cepa control; forma ácido y gas a partir de diversos carbohidratos - tiene pH de 7.0; tiene movilidad, la temperatura de crecimiento va de 37°C hasta 45°C. hidróliza el almidón y la caseína, difiere de B. subtilis; ATCC 3366 en la estructura morfológica de la cepa, ya que la colonia presentó forma estrellada mientras que en la cepa --- control la colonia es redonda.

A continuación se tiene a la cepa que fue presuntivamente identificada como B. sterothermophilus: la cuál reporta 370 mg/ml/min. de almidón degradado y es originaria de Bosques de San Isidro. - - tiene las siguientes características de acuerdo a la cepa control; -- hidróliza el almidón, crece en NaCl al 7% tiene movilidad, produce ácido y gas a partir de diversos carbohidratos. Difiere en que es -- cepa anaeróbica, la hidrólisis de la catalasa es variable y como punto más particular es la única cepa que crece en una temperatura de - 65°C. como anteriormente se mencionó.

Se obtuvo otra cepa identificada como B. megaterium, originaria de "Balneario Agua Caliente" la cuál reporta una actividad de 350 mg/ml/min. y presentó las siguientes características de acuerdo a la cepa control. son colonias opacas, tiene crecimiento en un pH de 7.0 son Gram positivas, tiene movilidad, hidróliza la caseína y la catalasa, la temperatura es de 37°C. La diferencia con la cepa control es que es una cepa anaeróbica. Y no crece más allá de los 45°C. mientras que B. subtilis si puede crecer en incubación de 55°C.

Por último, la cepa identificada presuntivamente como B. circulans, presentó similitud con la cepa control en la mayoría de sus características, difiere de la cepa control, en que es una cepa con bajo desarrollo de actividad amilolítica, la cuál está por debajo de la cepa control además de que crece en NaCl al 7% ya que presentó 320mg/mo/min.

## IMPORTANCIA DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACION NO REALIZADAS.

### Prueba de Indol;

Es importante para los microorganismos que se estuvieron -- trabajando debido, a, que aprovechan por medio de esta prueba - el aminoácido triptófano que pocos organismos aprovechan directamente.

El indol es desechado de acuerdo a como el microorganismo - asimila el triptofano. (el indol es un indicador).

### Prueba de Vogues Proskawer.

Se tomó como una prueba confirmativa, de anaeróbiosis, y si - las bacterias producen una fermentación alcohólica, ó ácida, si es positiva es ácida, negativa es alcohólica, en el ácida cambia de color.

### Prueba de Reducción de Nitratos a nitritos.

Es confirmativa si hay anaeróbiosis o no, ya que los microorganismos reducen los nitratos a nitritos, ejemplo de respiración -- aeróbica.

## INTERPRETACION DE LAS GRAFICAS.

Las gráficas muestran la relación de la actividad amilolítica - y la cantidad de proteína que hay en las bacterias, durante su -- crecimiento en cultivo en matraz, y los cambios de pH del medio - que tienen las diversas cepas.

La cepa testigo Bacillus subtilis ATCC 3366 tiene un pH igual al cabo de las 72 hrs. de incubación, se puede ver que tiende a - ser igual que en las 40 hrs. La D.O. es logaritmica o exponencial a todo lo largo de la incubación, a las 72 hrs. el valor de D.O - fue de 2.0 como se describe en material y métodos.

Una unidad de D.O. es igual a  $8 \times 10^8$  celX ml. observandose en - la concentración de almidón degradado, y a partir de 8 hrs. hasta 24 hrs. la degradación ascendente hasta las 72 hrs. llegando hasta 325 mg/ml/min.

Referente a la cantidad de proteínas que tiene el microorganismo se observa que de las 8 hrs. hasta las 24 hrs. no hay variación -- (i.e. en fase logaritmica que a las 32 hrs. se dispara hasta 50 - mg/ml. incrementandose hasta llegar a las 40 hrs. a 95 mg/ml. para en las 72 hrs. decaer lo que indica que el microorganismo a las - 72 hrs. tiene más alto degradación de almidón que de proteína.

La relación que hay de las gráficas restantes se tomaron tres -- parámetros en función a la cepa control.

- a).- parámetro de pH
- b).- D.O
- c).- Actividad amilolítica.

## V.- CONCLUSIONES.

Una de las observaciones que valdria la pena mencionar del presente trabajo, es lo extenuante de las determinaciones de asilamiento y caracterización bacteriana, debido a la carencia de objetivos bien definidos en el diseño experimental.

Es decir, aislar bacterias del suelo al azar, sin conocer bien-detalladamente una cepa que nos sirviera como testigo ó de referencia al mismo tiempo, no teniendo la certeza de que los microorganismos amilolíticos obtenidos experimentalmente, se comporten igual que nuestro control, resulta en un alto costo e inversión de tiempo en la elaboración de dicha selección y caracterización.

Considero que para trabajos de aislamiento y caracterización -- de microorganismos sería más recomendable primeramente caracterizar, Bioquímicamente y fisiológicamente al microorganismo obtenido del suelo y agua, y someterlas a determinaciones Bioquímicas en -- función al control.

Esto evitaría el alto gasto de materiales ya que con 26 3 cepas-encontradas sería suficiente para llegar a una identificación bien detallada de los microorganismos encontrados y ñ dejando tantas - cepas no identificadas. Así como tener un mejor manejo de las cepas tanto de referencia como de las encontradas en suelo y agua.

No se puede mencionar que los lugares elegidos, hayan sido los-más representativos del Estado de Jalisco, ya que como anteriormen-te se mencionó fueron tomados al azar por lo que probablemente se-tengan mejores lugares aquí en el Estado con buenas posibilidades-de encontrar bacterias altamente degradadoras de almidón.

Por lo que se requiere de un mejor diseño experimental.

referente a la presuntiva identificación, como anteriormente --- se mencionó en discusión, se deja la posibilidad de continuar un -segundo trabajo, a partir de las cepas aisladas que fueron amilolí-ticas y que se quedan almacenadas en el cepario del CIATEJ A.C. -- Ya que no se llegó a la plena identificación por la falta de 3 prue-bas, que requerian de reactivos y se podría llegar a la plena - -



Identificación, de las 23 cepas restantes, para terminar estas -  
investigación.

La observación que se hace de los cuatro muestreos es la va-  
riabilidad, que se obtuvo de microorganismos, ya que en Bosques  
de San Isidro siendo lugar agrícola se encontro menor incremen-  
to poblacional que en otros muestreos, como en el caso de CIATEJ  
donde se tuvo mayor variabilidad de microorganismos sometidos a  
selección para después observar que en Bosques de San Isidro se-  
obtuvieron cepas degradadoras, de almidón con alto porcentaje --  
de actividad amilolítica. En CIATEJ a pesar de que se encontra-  
ron gran cantidad de microorganismos solamente uno fué el que -  
presentó buena actividad amilolítica, por lo que hace suponer -  
que debido a que esta localizado en terreno urbano hubo mayor--  
posibilidad de contaminación del suelo.

De los muestreos de los Balneario de Agua Caliente y Chimulco  
no se obtuvo ninguna cepa amilolítica, proveniente de aguas ter-  
males, por lo que en resumen el presente trabajo, de bacterias-  
extraídas del suelo.

En algunos casos como se muestra en la tabla No. 9 llegarían-  
alcanzar actividades amilolíticas mayores que la cepa de referen-  
cia, llegando a tener actividades amilolíticas mayores que la -  
cepa de referencia, llegando a tener hasta 550 mg/ml/min. contra  
la de referencia que es de 325 mg/ml/min.

La ventaja que se tiene al realizar este trabajo de investiga-  
ción, es darnos cuenta que el Estado de Jalisco, tiene lugares--  
ricos en microorganismos capaces de que al ser llevados al labo-  
ratorio y someterlos a diversas técnicas sean importantes para -  
ser procesados y llevados a nivel industrial, tal como en este -  
caso, a la industria almidonera para la elaboración de panes. --  
harinas, jarabes etc.

La realización de esta investigación aunque fue muy elaborada  
dió la satisfacción de que 2 de las cepas extraídas del suelo --

E identificadas como Bacillus polymixa y Bacillus subtilis - (No. 15 y 45) fueron procesadas a nivel de planta piloto.

En la parte del proyecto de alfa amilasa bacteriana que fue este trabajo, los resultados obtenidos se encuentran citados - - en las publicaciones de alfa amilasa que tiene este CENTRO CIATEJ

Como importancia de este trabajo es saber que quizás en tiempos futuros se pueda contar con un cepario altamente variado en - cuánto a microorganismos tanto bacteriales como fungales, y aunque en una minima parte este trabajo contribuyó a la formación del - - cepario.

Por lo que se puede mencionar que las desventajas que se tuvieron a lo largo de este trabajo, se pueden corregir para trabajos posteriores.

## VI.-BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Akabori, S., et.al., (1956). Studies on Bacterial amylase  
Biochem. 43,: 751-748
- 2.- Bradshaw, B.M., et.al., (1976) Microbiología de Labora--  
torio, Editorial, el Manual moderno. p 98-115
- 3.- Bergey's et.al. (1974) Bergey's Manual of Determinative--  
Bacteriology Buchanan, R.E. Gibbons. Eds. 8a. Ed. Williams  
and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. 2 531-543
- 4.- Clowes, R.C. et.al. (1968) Experiments in Microbial Genetics  
Blackwell Scientific publications, p. 184-198
- 5.- Crueger, W. and Crueger, A., (1984). Biotechnology: a texto  
book of industrial Microbiology. Editor of the English edi  
tion, Thomas D. Broak, University of Wisconsin, Madison, -  
U.S.A. p. 425-510
- 6.- Coleman, G. and Elliot, W.H. (1961) Studies on alfa amylase  
formation by Bacillus subtilis, Biochem. 83: 741-748
- 7.- Donahue, R.L., et.al. (1983) An Introduction to Soils and -  
plant Growth, Editorial Practice. Hall, Inc. Englewod Cliff  
5a.edición. p. 115-137
- 8.- Dunn, C.G., et.al. (1959). Production og amylolitic Enzymes  
in Natural and Synthetic media. Edito. appl. Environm. Micro  
biol. 27: 212-219
- 9.- Demain, A.L., (1985). Biology Industrial Microorganism. Bio-  
technology series Ed. Solomon and Menico, the Benjamin - -  
Cumming Publishing Company. Inc. Calif. p. 305-322
- 10.- Fuwa, H., (1954) A New Method for microdetermination of amyla-  
se as the substrate. J. Biochem. 41: 583-603

- 11.-Fogarty, W.M. and Kelly, (1980) Amylases and Amyloglucosidases and related Glucanases, Economic Microbiology. in Rose-A, H. 3 125-132
- 12.-Godfrey, T. (1983) Industrial Enzymology, the application of enzymes industry, Ed. the Nature Press, New York p. 121-226
- 13.-Hidetsugu, F. (1954). A New Method for Microdetermination of Amylose activity by the use of amylase as the substrate, appl. Environm. Microbiol. 41: 538-603
- 14.- Jawetz, E. M. (1974). Microbiología Médica editorial El Manual Moderno. p. 217-238
- 15.-Kick, M. P., et. al. (1985). Numerical Taxonomy of alfa amylase, producing. Bacillus species Academic, press. 26 34-58
- 16.-Kirsop. B.E. j.j. (1984) Maintenance of microorganism a Manual of Laboratory Methods. Academic Press London p. 33-36
- 17.-López, A.M. (1985). Enzimas libres e inmovilizadas de aplicación Industrial, prospectivas de la Biotecnología en México, Editorial Conacyt. p. 215-325
- 18.-Manual de Tecnología enzimática (1986) Cursos de Biotecnología de CIATEJ.
- 19.-Mitruka, B.M. et. al. (1976) Methods of detection and identification of bacteria J. Bacteriol. 17 : 13-24
- 20.-Maniatis, T. et.al. (1982). Growth. Maintenance and preservation of bacterial strain. Molecular cloning a Laboratory Manual. cold spring Harbor. p 61
- 21.-Nomura, M. H. et. al. (1958) Studies on amylose formation by Bacillus subtilis, Biochem. 45 : 238-240

- 22.- Pretorius, J.S. et al. (1985) Numerical Taxonomy of alpha amylase producing Bacillus species. J. Appl. Bacteriol. 60: 351-360.
- 23.- Priest, F.G. (1985) Synthesis and Localization of alpha amylase y glucosidase in Bacillus licheniformis Grow in batch and continous culture. J. Appl. Bacteriol. 58: 381-390
- 24.- Saito, N.Y. (1975) Regulatory Factors affecting alpha-amylase production in Bacillus licheniformis J. Bacteriol.: - - 848-856.
- 25.- Robyt, J.F. (1984) Enzymes in the Hidrolysis and the Synthesis of starch Academic press. J. Bacteriol. 621-632
- 26.- Rusell, T.P. (1986) Selective, Process for efficient Isolation of soil Bacillus Spp. Appl. Envirom. Microbiol. 1266-1285.
- 27.- Welker, N.E. and Leon Campbell (1967) Unrelatedness of Bacillus amiloliquefaciens and Bacillus subtilis J. Bacteriol. 94 : 1124-1130

## VII.- GLOSARIO.

- Feozem háptico: Estos suelos tienen tendencia a la erosión, es un suelo oscuro rico en materia orgánica se utilizan estos suelos en agricultura de riego ó de temporal.
- Luvisol crómico: Son suelos lavados son fértiles rojos o claros aunque hay algunos pardos, se usan en México con fines agrícolas.
- Regasol éutrico: Son suelos que se caracterizan por no presentar capas distintas, son claros en general y se parecen bastante a la roca que tiene -- debajo, cuándo son profundos, se encuentran en playas ó en labores.
- Vertisol pélico, Son suelos que se revuelven se caracterizan por las grietas anchas y profundas que aparecen en las sequías, son suelos amarillosos frecuentemente negros, son pegajosos húmedos claros aveces salinos, son suelos susceptibles a la baja erosión.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**Facultad de Ciencias**

Expediente .....

Número ..... 294/87

Srita. Lucía Barrientos Ramírez  
Presente. -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -  
tema de Tesis "Aislamiento y caracterización de Bacterias amilolíticas-  
encontradas en diversos suelos de Jalisco" para obtener la Licenciatura  
en Biología con Orientación Docencia.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como -  
Director de dicha tesis el Dr. Sergio Aguilar Benavides.




ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Marzo 24 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

  
Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El Dr. Sergio Aguilar Benavides, Director de Tesis.-pte.  
c.c.p. El expediente de la alumna.

Al contestar este oficio sirvase citar fecha y número

Guadalajara, Jal., a 15 de Noviembre de 1987.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.  
P r e s e n t e .

Estimado Doctor Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que la señorita: LUCIA BARRIENTOS RAMIREZ, pasante de la Licenciatura en Biología con número de registro 078072C67, - ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulada: Aislamiento y caracterización de Bacterias Amilolíticas encontradas en diversos suelos de Jalisco. Estudio realizado en el Centro de Investigación (CIATEJ). Asimismo le informo que he revisado el manuscrito, de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e .

Dr. Sergio Aguilar Becerra.  
Director de Tesis.