

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS**

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS:

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DE SUELOS IMPACTADOS POR
LIXIVIADOS DEL RELLENO SANITARIO CAJAMARCA**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL

Presentada por:

Bachiller: OSIAS CUEVA GUEVARA

Asesor:

M.Cs. MARCO ALFREDO SÁNCHEZ PEÑA

Cajamarca – Perú

2022

COPYRIGHT © 2022 by
OSIAS CUEVA GUEVARA
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS APROBADA:

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DE SUELOS IMPACTADOS POR LIXIVIADOS DEL RELLENO SANITARIO CAJAMARCA

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL

Presentada por:

Bachiller: OSIAS CUEVA GUEVARA

JURADO EVALUADOR

M.Cs. Marco Alfredo Sánchez Peña
Asesor

Dr. Edin Edgardo Alva Plasencia
Jurado Evaluador

M.Cs. Atillio Cadenillas Martínez
Jurado Evaluador

M.Cs. Giovana Chávez Horna
Jurado Evaluador

Cajamarca – Perú

2022



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 11:30 horas, del día 21 de abril de dos mil veintidós, reunidos en el Aula 1-Q 207 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. EDÍN EDGARDO ALVA PLASENCIA, M.Cs. ATILIO CADENILLAS MARTINEZ, M.Cs. GIOVANA CHÁVEZ HORNA**, y en calidad de Asesor el **M.Cs. MARCO ALFREDO SÁNCHEZ PEÑA**, Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada “**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DE SUELOS IMPACTADOS POR LIXIVIADOS DEL RELLENO SANITARIO CAJAMARCA**”, presentada por el **Bach. en Ingeniería Ambiental, OSIAS CUEVA GUEVARA**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó...APROBAR...con la calificación de CATORCE (BUENO)...la mencionada Tesis; en tal virtud, el **Bach. En Ingeniería Ambiental, OSIAS CUEVA GUEVARA**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, con Mención en Gestión Ambiental.

Siendo las 13 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....
M.Cs. Marco Alfredo Sánchez Peña
Asesor

.....
Dr. Edín Edgardo Alva Plasencia
Jurado Evaluador

.....
M.Cs. Attilio Cadenillas Martínez
Jurado Evaluador

.....
M.Cs. Giovana Chávez Horna
Jurado Evaluador

A:

Dios, por fortalecer cada minuto de mi vida profesional.

Mis padres, brindarme su desinteresado apoyo moral.

Mi apreciado hijo para convertirse el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Manifiesto mi agradecimiento:

A Dios, que me permitió alcanzar mi objetivo.

Al Doctor Berardo Escalante Zumaeta por su apoyo incondicional en la conducción y culminación del presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Nacional de Cajamarca, por otorgar las facilidades, el espacio y material biológico, además del apoyo del personal técnico

Ing. Teresita del Niño Jesús Moreno Huamán. Para el desarrollo del presente trabajo de estudio.

A mi familia y amigos que me apoyaron a cumplir con las metas trazadas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1. CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1.1. <i>Objetivo General</i>	3
1.1.2. <i>Objetivos Específicos</i>	3
2. CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
2.1.1. <i>Antecedentes</i>	4
2.2. MARCO REFERENCIAL.....	6
2.2.1. <i>Constitución Política del Perú</i>	6
2.2.2. <i>Ley N°28611. Ley General del Ambiente (2008)</i>	7
2.2.3. <i>DL N° 1013. Creación del Ministerio del Ambiente</i>	7
2.2.4. <i>DS. N° 012-2009-MINAM que aprueba la Política Nacional del Ambiente (23.05.09)</i>	7
2.2.5. <i>Plan Nacional Estratégico de Ciencia, Tecnología e innovación para la Competitividad y el Desarrollo Humano (PNCTI 2006-2021)</i>	8
2.2.6. <i>Zonificación ecológica y económica (ZEE) de la región Cajamarca</i>	8
2.3. MARCO NORMATIVO.....	8
2.3.1. <i>Reglamento del Decreto Legislativo N° 1278, Decreto Legislativo que aprueba la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos Decreto Supremo N° 014- 2017-MINAM</i>	8
2.3.2. <i>Ley N° 27972. Ley Orgánica de Gobiernos Locales (06.05.03)</i>	9
2.3.3. <i>Ley N° 27867. Ley Orgánica de Gobiernos regionales (18.11.02)</i>	9

2.4.	BASES TEÓRICAS.....	10
2.4.1.	<i>Suelo</i>	10
2.4.2.	<i>El Suelo y los Servicios Ecosistémicos</i>	11
2.4.3.	<i>Parámetros fisicoquímicos de suelo</i>	11
2.4.4.	<i>Los dominios de la vida y la taxonomía</i>	14
2.4.5.	<i>Las Bacterias y su taxonomía</i>	15
2.4.6.	<i>Clasificación de los microorganismos por tinción Gram</i>	18
2.4.7.	<i>Otras formas de clasificación de bacterias</i>	20
2.4.8.	<i>Microorganismos del suelo</i>	21
2.4.9.	<i>Identificación Bioquímica</i>	24
2.4.10.	<i>Tecnología Colorimétrica Avanzada para la identificación de bacterias Gram negativas.</i>	40
3.	CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1.	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	47
3.2.	METODOLOGÍA	49
3.2.1.	<i>Recolección de muestras de suelo</i>	49
3.2.2.	<i>Caracterización fisicoquímica del suelo aledaño al relleno sanitario en el Distrito de Jesús de Cajamarca</i>	52
3.2.3.	<i>Metodología para el análisis microbiológico</i>	53
3.3.	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN	71
3.4.	TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	71
3.5.	EQUIPOS, MATERIALES E INSUMOS	71
3.5.1.	<i>Equipos e instrumentos</i>	72
3.5.2.	<i>Materiales para la preparación de medios de cultivo, aislamiento de bacterias y diluciones seriadas</i>	72
3.5.3.	<i>Materiales para siembra y pruebas bioquímicas</i>	73

4.	CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1.	ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL SUELO IMPACTADO POR EL LIXIVIADO DEL RELLENO SANITARIO CAJAMARCA.....	77
4.2.	RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	78
4.2.1.	<i>Medios selectivos y diferenciales</i>	80
4.2.2.	<i>Pruebas Bioquímicas</i>	82
4.2.3.	<i>Confirmación de especies mediante el VITEK 2 Compact</i>	101
4.3.	CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	105
5.	CAPÍTULO V CONCLUSIONES	106
6.	CAPÍTULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
7.	CAPÍTULO VII ANEXOS.....	129
7.1.	PANEL FOTOGRÁFICO	129
7.2.	FICHA REGISTRO DE CAMPO.....	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Categorías usadas en la clasificación taxonómica de microorganismos.....	15
Tabla 2 Clasificación de filos del dominio bacteria.....	16
Tabla 3 Código de reacciones resueltas con la prueba de TSI.....	26
Tabla 4 Codificación de los resultados bioquímicos LIA.....	37
Tabla 5 Estaciones de muestreo aplicadas en el muestreo de suelos georreferenciada en el sistema wgs 84	50
Tabla 6 Equipos y materiales empleados.....	73
Tabla 7 Equipos, materiales y reactivos empleados en las pruebas bioquímicas	74
Tabla 9 Propiedades fisicoquímicas del suelo impactado por el lixiviado del relleno sanitario Cajamarca.....	78
Tabla 10 Resultados de Tinción Gram.....	79
Tabla 11 Características de las colonias sembradas en medios sólidos.....	81
Tabla 12 Principales pruebas bioquímicas aplicadas.....	83
Tabla 13 Identificación de la cepa BRS1	84
Tabla 14 Resultados de prueba bioquímica de Staphylococcus aureus	84
Tabla 15 Identificación de la cepa BRS2.....	85
Tabla 16 Resultados de prueba bioquímica de Bacillus subtilis.....	85
Tabla 17 Identificación de la cepa BRS3.....	87
Tabla 18 Resultados de prueba bioquímica de Enterococcus faecalis.....	87

Tabla 19 Identificación de la cepa BRS4.....	88
Tabla 20 Resultados de prueba bioquímica de <i>Bacillus cereus</i>	88
Tabla 21 Identificación de la cepa BRS5.....	89
Tabla 22 Resultados de prueba bioquímica de <i>Roseomonas gilardii</i>	90
Tabla 23 Identificación de la cepa BRS6.....	92
Tabla 24 Resultados de prueba bioquímica de <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	93
Tabla 25 Identificación de la cepa BRS7.....	95
Tabla 26 Resultados de prueba bioquímica de <i>Pseudomonas stutzeri</i>	95
Tabla 27 Referencias de literatura sobre la caracterización bioquímica de <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Roseomonas gilardii</i> y <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	98
Tabla 28 Identificación de la cepa BRS8.....	99
Tabla 29 Resultados de prueba bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	99
Tabla 30 Confirmación colorimétrica mediante Vitek 2 Compact de <i>Roseomonas gilardii</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> y <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	101
Tabla 31 Clasificación taxonómica de las cepas aerobias y anaerobias facultativas aisladas mediante pruebas fenotípicas de microorganismos del suelo impacto por lixiviados del relleno sanitario de Cajamarca.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura del género Enterobacteriaceae.	18
Figura 2 Representación de la composición celular de las bacterias: a) Gram positiva y b) Gram negativas.....	19
Figura 3 Procesos mediados por los microorganismos en el ciclo de nitrógeno.	23
Figura 4 Ruta metabólica seguida en la identificación de la enzima nitrato reductasa.	32
Figura 5 Ruta metabólica seguida por microorganismos con actividad amilolítica.	33
Figura 6 Ruta metabólica seguida por las bacterias que liberan indol, cuando existe indol, éste se combina con el aldehído produciendo una coloración roja.....	34
Figura 7 Vía de la L-lisina descarboxilasa se muestra en el centro.....	36
Figura 8 Sistema: a) Equipo Vitek 2 Compact, b) set de tarjetas y c) sistema integrado.	42
Figura 9 Ubicación del relleno sanitario Cajamarca.....	48
Figura 10 Mapa de distribución de las estaciones de muestreo establecidas para la recolección de suelos.....	49
Figura 11 A 1) Lixiviados discurriendo por la superficie del suelo, a 2) recolección de muestra de suelo.....	51
Figura 12 Preparación de medios de cultivo: a) pesada de medio en polvo. b) disolución, c) esterilización. d), e) y f) vertido del medio de cultivo en placas Petri.....	54
Figura 13 Aislamiento de microorganismos: a) muestra de suelo en agitación b) suspensión de microorganismos, c) dilución seriada, d), e) y f) Siembra en medios de cultivo contenidos en placas Petri (incoloro: agar nutritivo y rojo: Agar Mac Conkey y sangre).	55

Figura 14 Tinción Gram: a) Placas petri con cepas bacterianas aisladas. b) reactivos-colorantes aplicados, e) probando el cristal violeta, e) y f) set de aislamientos por el metodo de dilución seriada.	57
Figura 15 Prueba bioquímica de TSI: a) Pesado del Agar TSI, b) color rojo del medio agar TSI preparado. c) muestras dispuestas en tubos de prueba para la prueba de pico. d) inóculo de la cepa en el medio TSI agar y e) códigos de resolución TSI.	58
Figura 16 Prueba bioquímica aplicando MR/VP: a) reactivos para la preparación del medio, b) y c) preparación del medio, d) medio esterilizado, e) y f) separación de 2.5 ml en tubos de ensayo.....	59
Figura 17 Prueba bioquímica aplicando rojo de metilo: a) y b) preparación del indicador, b) y c) aplicación del indicador en la superficie del tubo de prueba conteniendo la cepa.	60
Figura 18 a) Solución peróxido en portaobjetos, b) Cultivo y c) prueba de catalasa en portaobjetos.	61
Como control de calidad se aplicó una prueba positiva con una cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	61
Figura 19 Prueba de reducción de nitratos: preparación de medio agar nitrato, b) reacción positiva (nitritos), c) reacción negativa.	62
Figura 20 Prueba bioquímica de almidón: a) adición de lugol (morado), sobre la superficie de un tubo con almidón sembrado por picadura.	63
Figura 21 Respuesta negativa a la prueba del indol, Motilidad y H ₂ S (tubo encerrado en color amarillo). Para el control de calidad positivo se usó la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	64

Figura 22 Prueba bioquímica de LIA: a) y b) preparación de medio LIA, c) disposición de solución LIA en tubos de prueba, d) y e) inoculación de cepas en tubos.	65
Figura 23 Prueba bioquímica de gelatina: a) y b) preparación de medio agar de gelatina, c) y d) disposición de solución gelatina en tubos de prueba.	66
Figura 24 Tubos de ensayo recientemente inoculados en la prueba de coagulasa.	67
Figura 25 Prueba bioquímica de citrato de Simmons: a) pesada de reactivo b) solución del medio, c) separación del medio en tubos de prueba, d) esterilización y e) algunos resultados obtenidos (cambio positivo: azul).	68
Figura 26 Prueba bioquímica de agar urea: a) preparación del medio y b) solución del medio ya inoculado.	69
Figura 27 a) Micro-inoculación de suspensión bacteriana desde tubos de ensayo a tarjetas, b) y c) pantallas mostrando resultados de las lecturas ópticas para la identificación bacterias. ..	70
Figura 28 Procedimiento final aplicado para identificar un consorcio bacteriano a partir de un suelo impactado por el lixiviado del relleno sanitario del Distrito de Jesús en Cajamarca.	76
Figura 29 Porcentajes de grupos bacterianos hallados en el extracto de suelo lixiviado.	80
Figura 30 Medios de cultivo a) agar-agar (medio general), b) agar sangre c) tinción Gram en medio agar-agar, d) agar Mac Conkey, e y f) agar nutritivo (medio general), para la identificación de bacterias de suelo impactado con lixiviado de relleno sanitario.	82
Figura 31 Coloración gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	85
Figura 32 Coloración gram <i>Buscillus subtilis</i>	86

Figura 33 Coloración gram <i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>).....	88
Figura 34 Coloración gram <i>Bacillus cereus</i>	89
Figura 35 <i>Roseomonas</i> sp: a) microfotografía de un cultivo de bacteriano <i>Roseomonas mucosa</i> efectuada por Han, Pham, Tarrand, Rolston, Helsel y Leven (2003), especie muy similar a la identificada, b) Aislamiento de <i>Roseomonas gilardii</i> efectuada por Sahar (2013).	91
Figura 36 a) Aislamiento de la especie <i>Roseomonas gilardii</i> en agar nutritivo esta investigación b) Tinción Gram negativo observada en microscopio 100x efectuada en la investigación c) Tinción Gram negativo de <i>Roseomonas mucosa</i> efectuada por Kimura, Ha.	92
Figura 37 a) Aislamiento de la especie <i>Sphingomonas paucimobilis</i> en agar nutritivo y b) Tinción Gram positivo.	94
Figura 38 Especie <i>Pseudomonas stutzeri</i> : a) microfotografía tomada por Lalucat, Bennasar, Bosch, Garcia- Valdes y Palleroni (2006) y b) microfotografía 100x de la especie identificada en esta investigación.....	96
Figura 39 a) Cultivo de la especie <i>Pseudomona stutzeri</i> en agar nutritivo y b) tinción Gram. ...	97
Figura 40 Colocarción gram <i>Escherichia coli</i>	100

LISTA DE ANEXOS

Panel fotográfico.....	129
Ficha de registro de campo.....	133

LISTA DE ABREBIACIONES

Universal Transverse Mercator	UTM
Longitud Este	LE
Longitud Norte	LN
Instituto Nacional de Estadística e informática	INEI
Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica	CIDETEQ
Ministerio del Ambiente	MINAM
Sistema Nacional de Evaluación de impacto Ambiental	SEIA
Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental	OEFA
Dirección General de salud Ambiental	DIGESA
Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología	SENAMHI
Gobierno Regional de Cajamarca	GORE
Zonificación Ecológica Económica	ZEE
International Union of Soil Sciences	IUSS
Food and Agriculture Organization of the United Nations	FAO
United States Environmental Protection Agency	EPA
Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México	REC NAT
United States Department of Agriculture	USDA
Norma Oficial Mexicana	NOM
Plan Nacional Estratégico de Ciencia, Tecnología e Innovación	PNCTI
Millennium Ecosystems Assessment	MEA
American Type Culture Collection	ATTC
Quantum Geographic Information System	QGIS

Global Positioning System	GPS
Demanda Bioquímica de Oxígeno	DBO5
Demanda Química de Oxígeno	DQO
Conductividad eléctrica	CE
Capacidad intercambio catiónico	CIC
Materia Orgánica	MO
Humedad	H
Benceno, Tolueno y Xileno	BTX
Evapotranspiración potencial	EPT
Evapotranspiración	EVT
Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal	ARNr
Ácido desoxirribonucleico.	ADN
Agar con azúcar triple y hierro	TSI
Trifosfato de adenosina	ATP
Sulfuro Indol Movilidad	SIM
Lysine - Iron Agar	LIA

RESUMEN

Toda comunidad microbiana del suelo constituye la unidad de vida básica en la dinámica de las transformaciones que ocurren en su hábitat y presenta un potencial para su aplicación biotecnológica en la eliminación o mitigación de contaminantes, por lo tanto, es importante evaluar su composición y funcionalidad. La investigación ha tenido como objetivo caracterizar bacterias de suelos impactados por lixiviados del relleno sanitario de Cajamarca. La metodología incluyó la colección de muestras en campo, la extracción, aislamiento e identificación del consorcio microbiano mediante la aplicación de diluciones seriadas y su cultivo en medios nutritivos, medio selectivo y diferencial. La prueba de tinción de Gram se usó para separar las cepas según la constitución de su pared celular en Gram negativas y Gram positivas. Se efectuaron pruebas bioquímicas como TSI, LIA, hidrólisis de almidón, licuación de gelatina, citrato de Simmons, Voges Proskauer, entre otros. Como resultado se logró la separación e identificación de ocho cepas bacterianas presentes en los suelos contaminados por lixiviados, las cuales fueron: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Roseomonas gilardii*, *Pseudomonas stutzeri* y *Escherichia coli*.

Palabras clave: Caracterización de bacterias, potencial biorremediador, lixiviado, vertedero sanitario.

ABSTRACT

Every soil microbial community constitutes the basic unit of life in the dynamics of the transformations that occur in its habitat and presents a potential for biotechnological application in the elimination or mitigation of contaminants; therefore, it is important to evaluate its composition and functionality. The objective of this research was to characterize bacteria from soils impacted by leachate from the Cajamarca sanitary landfill. The methodology included the collection of samples in the field, the extraction, isolation and identification of the microbial consortium through the application of serial dilutions and their culture in nutrient media, selective and differential media. The Gram staining test was used to separate the strains according to the constitution of their cell wall into Gram-negative and Gram-positive. Biochemical tests such as TSI, LIA, starch hydrolysis, gelatin liquefaction, Simmons citrate, Voges Proskauer, among others, were performed. As a result, the separation and identification of eight bacterial strains present in the leachate contaminated soils were achieved: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Roseomonas gilardii*, *Pseudomonas stutzeri* and *Escherichia coli*.

Key words: Characterization of bacteria, bioremedial potential, leachate, sanitary landfill.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La estructura de las comunidades microbianas y sus interacciones con otras propiedades del suelo y condiciones ambientales determinan la funcionalidad de la microbiota conducente al inicio de procesos catabólicos aerobios, que los convierten en un poderoso motor de la biodegradación de residuos, sin embargo, su actividad y composición puede también ser reprimida por la incorporación masiva e irracional de los agentes contaminantes en el suelo (NO_3 , Pb, Mn y Fe, entre otros) (León, Cruz, Dávila, Velasco y Chapa, 2015).

En el Perú, los rellenos sanitarios en la mayoría de los casos, representan un problema ambiental y de salud pública, porque no se controlan totalmente las emisiones y descargas, las cuales terminan escurriendo y contaminando a las fuentes superficiales de agua o infiltrándose en las capas inferiores de los suelos para finalmente contaminar a los acuíferos (Navarro y Torretta, 2019). Según Espinosa (2010), en los tiraderos a cielo abierto cerca del 25% de las precipitaciones terminan conformando el lixiviado, con alta carga contaminante y elevado riesgo de contaminación ambiental (Méndez, Cachon, Sauri y Castillo, 2002).

La Municipalidad Provincial de Cajamarca cuenta con una infraestructura para tratamiento y disposición final de residuos, usada como relleno sanitario, localizado en el distrito de Jesús, con un área de 9.95 hectáreas y 1404.77 m. de perímetro. Esta unidad de tratamiento fue diseñada en el año 2009 y al 2017 atendió los residuos generados por una población de 245 137 pobladores del distrito de Cajamarca como beneficiarios directos (INEI, s.f), así como de otras comunidades y distritos de la zona, lo cual asegura una carga permanente de 140 toneladas métricas diarias de residuos sólidos en el relleno sanitario, que son dispuestas en una celda impermeabilizada de 1000 m³, que solo cuenta con una cobertura temporal tipo techo para evitar el ingreso de las aguas

de lluvia (Municipalidad Provincial Cajamarca, 2008). El lixiviado es colectado en pozas y posteriormente utilizado para humedecer a la basura que diariamente es depositada en las celdas de tratamiento (recirculación); así estos flujos cuando hay excesos drenan desde el relleno sanitario hacia el exterior como filtraciones, transportándose a los suelos y aguas sub-superficiales y poniendo en riesgo la salud de los ecosistemas (Lloyd y Macaskie, 2000).

Los microorganismos del suelo son los responsables directos de la dinámica de transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos de su entorno, facilitando la vida a especies superiores de la cadena trófica hasta llegar al hombre. Las bacterias del suelo son numerosas, diversas y se clasifican por su funcionalidad fisiológica como autótrofos y heterótrofos; sin embargo, un suelo impactado podría carecer de esta elevada diversidad y podría cargarse con micro biota más versátil y de tipo patógena (Núñez, 2015). En esta perspectiva, la evaluación de algunas alternativas biotecnológicas que impliquen el uso de sistemas eco-amigables para el ambiente y la salud humana, está plenamente justificada, pero además de una previa identificación y caracterización del microbiota que habita en los suelos impactados por los lixiviados del relleno sanitario Cajamarca, para luego utilizar las poblaciones nativas de bacterias como agentes degradadores de contaminantes.

La identificación de bacterias se sustenta en la aplicación de pruebas bioquímicas normalizadas de carácter bioquímico relacionadas con su desarrollo en medios de cultivo específicos cuyos constituyentes son enzimáticamente degradados por los microorganismos para obtener la energía necesaria para su crecimiento y desarrollo, acción que debe ser colorimétricamente comprobada.

La Ley General del Ambiente (MINAM. s.f., 2017a) considera el derecho que tiene el ciudadano a disfrutar de un “ambiente saludable”, lo cual involucra un desarrollo sostenible. En este contexto, el cuidado de la calidad ambiental involucra el desarrollo de una mejor calidad de

vida, mandato que concuerda con los principios y fines de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, la cual, a través de su programa de posgrado en ciencias con mención en Gestión Ambiental y de los Recursos Naturales, promueve la concientización y emprendimiento de sus estudiantes y profesionales para diseñar y poner en práctica soluciones ambientales adecuadas a una diversa y compleja problemática ambiental. Esta filosofía ha motivado el desarrollo de la presente investigación, que tiene como objetivo la caracterización de bacterias nativas de suelos impactados por lixiviados del relleno sanitario Cajamarca, esto se logró aislando la comunidad de microorganismos presentes en el suelo por diferentes técnicas.

La investigación se desarrolló en dos etapas. La primera, se efectuó a nivel de campo, con la prospección de los suelos adyacentes impactados con los lixiviados del relleno sanitario. La segunda, se desarrolló a nivel de laboratorio. En la segunda fase, se aislaron e identificaron las cepas bacterianas nativas, mediante pruebas bioquímicas, tinción de Gram, observaciones microscópicas y confirmación de los resultados preliminares por técnicas colorimétricas, mediante el proceso Vitek 2 Compact.

1.1. Objetivos de la Investigación

1.1.1. Objetivo General

Caracterizar bacterias nativas presentes en los suelos impactados por lixiviados del relleno sanitario Cajamarca.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Aislar las bacterias nativas del suelo impactado por los lixiviados del relleno sanitario Cajamarca.
- Caracterizar morfológica y bioquímicamente a los componentes las bacterias aisladas.
- Identificar las especies bacterianas presentes en el suelo impactado por el lixiviado del relleno sanitario.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

2.1.1. Antecedentes

Gallego (2017), en la tesis “Caracterización microbiológica del lixiviado producido por la planta de composta de Bordo Poniente”, determinó la presencia de bacterias, actinomicetos y metanógenos. Encontró bacterias fermentativas y hongos productores de ácidos orgánicos, siendo una de las bacterias, las acetogénicas como el Clostridium y microorganismos metanógenos los capaces de degradar compuestos orgánicos y producir biogás.

Espinosa (2010), efectuó una caracterización de los lixiviados de un vertedero de la Habana Cuba y halló microorganismos patógenos conformados por coliformes totales y fecales, asociados con altos niveles de componentes orgánicos y sólidos disueltos.

Vásquez (2017), en su tesis “Efecto de los microorganismos eficaces en la calidad fisicoquímica y microbiológica de los lixiviados del relleno sanitario municipal de Cajamarca”, obtuvo resultados exitosos especialmente para el desarrollo de las lactobacterias (67.1 %), seguida de las levaduras (48.4%), tuvo como resultado el incremento del contenido de sólidos suspendidos, disminuyendo la concentración de oxígeno.

Nájera, Castañón, Figueroa, y Rojas-Valencia (2009), clasificaron los lixiviados de acuerdo al tiempo de disposición, los del tipo 1 (<5 años), al ser más recientes poseen una carga orgánica biodegradable expresada en función de la DBO₅ mayor a la DQO; por lo que, una relación DBO₅/DQO de aproximadamente 0.5, se considera aceptable para un bio- tratamiento. Sin embargo, cuando la proporción disminuye a 0.1, generalmente se trata de lixiviados viejos (< 10 años), como es el caso del lixiviado del relleno sanitario de Cajamarca. Esto señala la presencia de

material orgánico recalcitrante; es decir, que el lixiviado se ha estabilizado, por lo que se requiere otro tipo de tratamiento. Según Sancha (2013), la relación DBO_5/DQO en los vertederos más antiguos, tiene un valor de 0.05 a 0.2, debido a su riqueza de ácidos orgánicos que presentan dificultad en el proceso de biodegradación, pero cuando los lixiviados son recientes entonces hay mayor contenido de material biodegradable reflejado en un mayor contenido la DBO_5 , ya que una relación baja de DBO_5/DQO , indica la presencia de materia orgánica persistente y difícil de tratar. Los vertederos de 3 a 5 años, tienen abundante compuesto orgánico, donde la relación DBO_5/DQO es elevada y el pH de tendencia ácida debido a la alta cantidad de ácidos grasos volátiles. En suma, mientras los vertederos se van haciendo más viejos, la relación DBO_5/DQO va bajando por la estabilización de los residuos.

Más de 200 compuestos orgánicos se han identificado en los lixiviados, entre los cuales se encuentran los hidrocarburos con anillos bencénicos, cíclicos y polinuclearomáticos, entre otros; éteres cíclicos, esterés, fenoles, material inorgánico y compuestos orgánicos volátiles (BTX) entre otros contaminantes (Sancha, 2013). Por su parte, Christensen et al. (2001), indicaron que los lixiviados formados tras la evacuación del agua durante la degradación de los residuos sólidos, contienen materiales biológicos y constituyentes químicos.

Castillo (2012), en su investigación sobre “Identificación de bacilos Gram negativo no fermentadores para aplicación en celdas de combustible microbianas y en biorremediación”, aisló cepas a partir de los lodos contenidos en biorreactores, aplicando la metodología fenotípica, para lo cual preparó caldos de pre- enriquecimiento, seguidos de agares selectivos para separar cada cepa según sus propiedades bioquímicas. Las bacterias aisladas fueron integrantes de la familia Enterobacteriaceae, específicamente *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei* y *Proteus*

vulgaris. Asimismo, reconoció que las pruebas bioquímicas, que, aunque están siendo superadas por otras de mayor rapidez y confiabilidad, constituyen una metodología pionera de amplio uso.

Benavides y Hernia (2008), en su investigación sobre “Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guazca (Cundinamarca), Bogotá”, colectó muestras de suelo y realizó la extracción de bacterias para luego aplicar la metodología fenotípica basada en la placa de conteo directo Warcup que no resultó aceptable, asimismo aplicó la técnica de cultivo líquido para nutrir a las bacterias, que luego serían aisladas en agar soya, e identificadas macroscópica y microscópicamente. Aisló 123 cepas de un suelo rico sin problemas de contaminación e identificó 40 cepas, centrándose en la cadena metabólica generada por los procesos bioquímicos a causa de las baterías de reactivos usadas, teniendo como respuesta la generación de enzimas que dieron positivo en cada prueba de manera específica. Así logró identificar coco bacilos no espora-formadores Gram positivos, además de los géneros *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Sacharococeus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* entre otros.

2.2. Marco Referencial

2.2.1. Constitución Política del Perú

“Toda persona tiene el derecho irrenunciable a vivir en un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida, y el deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y de proteger el ambiente, así como sus componentes, asegurando particularmente la salud de las personas en forma individual y colectiva, la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y el desarrollo sostenible del país” (PCM. s.f).

2.2.2. Ley N°28611. Ley General del Ambiente (2008)

En el Perú, la Ley General del Ambiente, determina el marco normativo para legislar la gestión ambiental. En este documento se establecen una serie de principios con la finalidad

de asegurar una acción efectiva, equilibrada y plena en el manejo ambiental, para el desarrollo de la vida humana y la protección del ambiente. Posee una serie de componentes orientados a mejorar la calidad de vida del ciudadano de manera paralela al desarrollo sostenible del país (MINAM, s.f. a).

2.2.3. DL N° 1013. Creación del Ministerio del Ambiente

El Ministerio del Ambiente es un ente gubernamental creado para garantizar el cumplimiento del principio constitucional de conservación y uso sostenible de cada recurso natural en el país. Como ente rector en el cumplimiento de la política ambiental, asume la organización de la gestión nacional en todos los niveles, de manera armoniosa, así, establece, ejecuta, supervisa y regula su función para promover la conservación y preservación de los recursos (MINAM. s.f. b)

2.2.4. DS. N° 012-2009-MINAM que aprueba la Política Nacional del Ambiente (23.05.09)

La política ambiental es una filosofía estatal, su objetivo está relacionado con el derecho fundamental de que el ciudadano goce de una calidad de vida digna. Para ello, todos debemos garantizar la conservación y preservación de ecosistemas saludables, dinámicos y funcionales en el marco del desarrollo sostenible. En la Política ambiental se incluye el manejo sostenible de los residuos sólidos, dentro del eje 2. Este, pretende reforzar la gestión de estos materiales desde la gobernanza local y regional que asegure mejores ingresos económicos para el manejo permanente de los residuos y servicios, arbitrios, sensibilización y una educación respecto al cuidado ambiental, entre otros factores. Otro aspecto relevante, es la formalización de grupos humanos que

segregan y reciclan los residuos revalorizándolos y transformándolos en insumos para nuevos procesos en el ciclo de vida de los materiales (MINAM, 2009).

2.2.5. Plan Nacional Estratégico de Ciencia, Tecnología e innovación para la Competitividad y el Desarrollo Humano (PNCTI 2006-2021)

“Propone la creación de una serie de programas que canalicen las líneas de acción en las áreas identificadas como prioritarias para satisfacer las demandas en Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI) del país, orientados a atender áreas productivas, sociales y ambientales, área temática, los institutos de investigación, universidades y programas académicos, investigadores, publicaciones y patentes y Ciudades Sostenibles” (CONCYTEC, 2012).

2.2.6. Zonificación ecológica y económica (ZEE) de la región Cajamarca.

Clasifica a las zonas territoriales en función de la dinámica natural del ecosistema y de las actividades humanas, promoviendo su desarrollo dentro del contexto de desarrollo sostenible. La ZEE, señala el potencial económico de los suelos del distrito de Jesús con aptitudes para cultivos en limpio. Sin embargo, presenta fuertes limitaciones climáticas como las heladas que afectan a la zona, lo cual pone en evidencia recomendaciones de cuidado e investigaciones orientadas al desarrollo sostenible (Gobierno Regional de Cajamarca-GRC, 2011).

2.3. Marco Normativo.

2.3.1. Reglamento del Decreto Legislativo N° 1278, Decreto Legislativo que aprueba la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos Decreto Supremo N° 014- 2017-MINAM

Es una normativa actualizada que define con claridad a las entidades que brindan las certificaciones ambientales y a la fiscalización en la gestión de residuos sólidos. Uno de los aspectos resultantes, es la obligación de contar con los seguros ambientales obligatorios para diversas actividades de manejo, también permite que los municipios establezcan convenios con

entidades de servicios públicos como los de agua o electricidad para que se incluyan los pagos municipales en los recibos de agua o luz. De otro lado, en caso de que un relleno sanitario sirva a más de un distrito, el certificado ambiental lo concede la municipalidad Provincial, pero si el relleno sirve a más de una provincia, entonces el certificado lo otorga el gobierno regional, pero a su vez cuando el servicio se entiende entre regiones, entonces el SEIA lo otorga. Respecto a la fiscalización de los rellenos botaderos, es OEFA la responsable. La fiscalización a nivel distrital está a cargo del municipio provincial, mientras que a nivel provincial lo ejerce el gobierno regional. Finalmente, el transporte de residuos peligrosos está a cargo del ministerio de Transporte y Comunicaciones, mientras que los transportes locales a cargo de las municipalidades provinciales (MINAM. 2017a).

2.3.2. Ley N° 27972. Ley Orgánica de Gobiernos Locales (06.05.03)

Norma una gestión autónoma considerando a los gobiernos locales como unidades institucionales fundamentales que rigen el orden territorial y recogen la voluntad inmediata de la participación ciudadana en los asuntos públicos. Es el alcalde, así como los regidores y empleados públicos los convocados a mantener el cuidado de la salud, ambiente y educación mediante normas locales enmarcadas con la política ambiental y nacional dirigidas a su propio desarrollo local, de manera armónica y consensuada con los intereses públicos y privados que enmarcan el desarrollo sostenible (MEF, 2003).

2.3.3. Ley N° 27867. Ley Orgánica de Gobiernos regionales (18.11.02)

Establece la finalidad del gobierno regional, fomentando su propio desarrollo en el marco sostenible, mediante la promoción de la inversión de las empresas y de la entidad estatal con un ejercicio pleno e igualitario de sus ciudadanos en armonía con los planes y políticas nacionales de desarrollo. Norma la participación de la gestión regional la cual debe desarrollarse usando

estrategias concretas considerando a la participación ciudadana como la principal fuerza que formula, acompaña, fiscaliza y evalúa la calidad o eficacia de la gestión del gobierno de turno, considerando el manejo económico, educativo, salud y ambiental dentro de los principales factores que se cumplan en el manejo presupuestario, también se considera la inclusión a través de políticas que el gobierno regional debe desarrollar para lograr promover la inclusión económica social, política y cultural, sin distinción, especialmente a los discapacitados, excluidos y marginados (MIMP. 2003).

2.4. Bases Teóricas

2.4.1. Suelo

La pedología lo define como un cuerpo natural y lo describe y clasifica de acuerdo a su evolución respecto al paisaje circunscrito; pero la edafología, lo estudia en función de aquellas condiciones que lo afectan como son los factores climáticos o fisiográficos como el agua, entre otros pudiendo impactar el crecimiento de las plantas (Ulery, 2005).

FAO (s.f. a), describe el suelo como una capa delgada compuesta por minerales, materia orgánica, diminutos organismos, vegetales y animales, aire y agua. Es formado durante siglos, a través de la meteorización de las rocas superficiales ante las propiedades del agua, clima y el viento, así la biota se desarrolla y muere en el interior y encima del suelo siendo luego desintegrados por los microorganismos, transformados en materia orgánica y mezclados con el suelo. Se distinguen cinco componentes principales:

- i. Minerales, formados por la disgregación de la roca madre y por acción del aire y el agua.
- ii. Materia orgánica, representada por la carga orgánica; es decir, detritus, material biogénico muerto que se descompone. Contiene humedad y minerales o nutrientes.

iii. Microorganismos, representados principalmente por hongos y bacterias presentes dentro del suelo, los cuales descomponen la materia orgánica para reciclar los minerales y nutrientes liberados por las plantas, también accionan y pulverizan rocas favorecidos por las condiciones ambientales. Existen otros organismos como lombrices e insectos, los cuales se encargan de crear agujeros y airean los suelos, almacenan agua favoreciendo el crecimiento de las raíces.

iv. Agua y aire ocupando los espacios entre las partículas de suelo que se producen por las irregularidades de su forma y tamaño.

v. La textura define la distribución y tamaño de los poros. Los poros demasiado pequeños no permitirán un buen desarrollo de las raíces de las plantas porque no proveerán de oxígeno ni agua que solubiliza a los minerales requeridos por la planta. Los poros muy grandes filtrarán el agua impidiendo que ésta sea retenida por las plantas.

2.4.2. El Suelo y los Servicios Ecosistémicos

“Millennium Ecosystems Assessment” (MEA. s.f.), sostiene que los bienes y servicios dados por los ecosistemas a la sociedad, se agrupan en cuatro categorías: i) servicios de sustento (alimentación, fibras, combustible), ii) servicios de regulación (clima, calidad del agua y del aire), iii) servicios culturales (diversidad, cultura, religión) y iv) servicios de soporte (formación de suelo, fotosíntesis).

2.4.3. Parámetros fisicoquímicos de suelo

2.4.3.1. pH y potencial redox (Eh)

El pH del suelo determina la generación de las reacciones biogeoquímicas y es responsable de la fertilidad del suelo (Hong, Gan y Chen, 2019). Sin embargo, la química de los organismos vivos depende aún más de las reacciones redox, reflejado en la transferencia de electrones (Falkowski, Fenchel, y Delong, 2008). De acuerdo a Husson (2013), se producen reacciones químicas

reductoras y oxidantes en las proteínas de los seres vivos por la presencia del oxígeno como oxidante y del hidrógeno como el principal agente reductor, además se debe tener en cuenta cuatro elementos básicos en los procesos de óxido-reducción como el “carbono (IV en CH₄ a + IV en CO₂), nitrógeno (-III en NH₄⁺ a +V en NO₃) fósforo (- III en PH₃ a +V en PO₄³⁻) y el azufre (- II en H₂S a + VI en SO₄²⁻) y oxidación se evalúan mediante el potencial redox (Eh), expresado en voltios, sin embargo, el Eh y el pH determinan el tipo de metabolito que se produce en una comunidad bacteriana debido a su actividad biológica, el pH influye en el desarrollo de microorganismos y su crecimiento, de manera que cada tipo de microorganismo se adapta a condiciones específicas de Eh en un rango determinado; así las bacterias anaerobias se desarrollan con valores muy bajos de Eh y los aerobios como el Actinomiceto ssp. Y Azotobacter spp. Requieren un Eh más alto. Asimismo, las bacterias son más abundantes que los hongos cuando Eh <0 mV y las bacterias autóctonas del suelo están muy adaptadas a los regímenes redox fluctuantes.

En el suelo, el “Eh fluctúa entre -300 y + 900 mV. Así, los suelos anegados tienen un Eh de < + 350 a +250 mV y los suelos secos de >+380 a +4(X) mV, los suelos aireados tienen un Eh > + 400 mV; suelos moderadamente reducidos entre + 100 y +400 mV; suelos reducidos entre - 100 y +100 mV; y suelos muy reducidos entre -100 y - 300 mV” (Husson 2013).

El pH y Eh están correlacionados negativamente en los suelos, ambos varían con las estaciones del año y las inundaciones afectan drásticamente tanto a Eh como a pH, especialmente en suelos orgánicos. Balakhnina y Borkowska (2013), informaron de la variación de Eh en cuestión de horas con las inundaciones.

2.4.3.2. Conductividad eléctrica

La salinidad y el contenido de agua en el suelo afectan a los microorganismos de manera osmótica y iónica debido a las altas concentraciones de sales solubles que aumentan el potencial

osmótico (más negativo), lo cual podría matar microbios y raíces a través de la plasmólisis (Gessner, Swan, Dang, McKie, Bardgett, Wall et al., 2010). Con altos valores de CE (525 uS/ cm), se produce una reducción del 50% en la respiración del suelo, así las actividades de la ureasa, la fosfatasa alcalina y la β -glucosidasa, serían fuertemente inhibidas por la salinidad, mientras que la deshidrogenasa y la catalasa serían menos afectadas por la acumulación de sales inorgánicas. Las diferencias en la tolerancia a la salinidad entre los microbios generan cambios en la estructura de la comunidad en comparación con los suelos no salinos (Yan, Marschner, Cao, Zuo y Qin.2015). La FAO (s.f. b) describe un valor de 400 uS/cm para dificultar la asimilación de nutrientes por las plantas y la actividad microbiana del suelo.

2.4.3.3. Capacidad intercambio catiónico (CIC)

Es un parámetro básico en la evaluación de suelos, representa la presencia de las cargas negativas de los minerales y materia orgánica del suelo, así como la cantidad de cationes que los suelos pueden retener sobre su superficie (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ entre otros). Estos cationes pueden ser intercambiados por otros, incluyendo hidronios presentes en la solución del suelo y aquellos que sean liberados desde la base radicular, esto implica la capacidad del suelo para retener cationes y con ello favorecer la disponibilidad de nutrientes para los cultivos, así un suelo con un CIC bajo posee poca disponibilidad de retener nutrientes. Generalmente estos son suelos arenosos o con bajos niveles de materia orgánica. La CIC puede expresarse en unidades de mili-equivalentes de carga en 100 g de suelo (meq/ 100g de suelo) (FAO. s.f. c).

2.4.3.4. Material orgánico

El carbono orgánico presente en el suelo define la calidad del suelo ya que permite mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo. La materia orgánica fija a los distintos componentes químicos, necesarios para el desarrollo de la vida y de un suelo fértil, tales como el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre

(S) considerados como macronutrientes esenciales (Dhaliwal, Naresh, Mandal, Singh y Dhaliwal, 2019).

2.4.4. *Los dominios de la vida y la taxonomía*

El término dominio corresponde a los tres grandes tipos de organismos: Eucarya, Bacteria y Archaea. El nombre Archaea (arqueas), se relaciona con la aparente naturaleza primitiva de estos organismos distintos a las bacterias reales, mientras que Eubacteria corresponde a Bacteria (Otero, 2017).

En general, la forma de clasificar cada microorganismo u organismo que forma parte de los seres vivos debe efectuarse bajo la fórmula descrita en la Tabla 1.

Tabla 1

Categorías usadas en la clasificación taxonómica de microorganismos

Categoría	Definición
Dominio:	Categoría taxonómica aplicada para clasificar los taxones: Arqueas (Archaea), Bacterias) y Eucariontes (Eukarya)
Filo:	Categoría inmediata inferior usada en los reinos Animalia, Protista y en los dominios Bacteria y Archaea.
Clase:	Categoría inmediata interior a la anterior refiere a un grupo taxonómico que comprende y varios órdenes de plantas o animales con muchos caracteres comunes.
Orden:	Categoría taxonómica entre la clase y la familia.
Familia:	La familia es una categoría inmediata a la anterior que destaca determinados rasgos comunes y las relaciones de parentesco de las bacterias.
Género:	Es una categoría taxonómica intermedia entre la línea familia: especie; así, en realidad es un grupo de microorganismos conformados por una serie de especies inclusive las especies se subdividen en sub-especies.
Especie:	Es una categoría mediata inferior a la de género que representa la mínima unidad fundamental de clasificación biológica, así una especie representa un sistema de microorganismos o poblaciones naturales con capacidad de crecer y multiplicarse logrando una sucesión fértil.

Fuente: G.J. Olsen y C. R. Woese. "Ribosomal RNA: 1993.

2.4.5. Las Bacterias y su taxonomía

Las proteobacterias representan a todas las bacterias que son capaces de reproducirse a través de la "fisión binaria" y que desarrollan fisiológicamente alcanzando tres formas: bacterias de forma esférica, denominadas cocos; de forma de varillas o alargadas, también denominadas bacilos y finalmente, bacterias con forma de curvas o espirilos que pueden ser también tipo comas, espirales y vibrias. Otros cocos, reciben el nombre de cocobacilos por ser aplanados (*Young et al., 2001*).

La clasificación y nomenclatura de las bacterias ha sufrido un cambio radical durante las últimas tres décadas. En la actualidad, el análisis de secuencia de regiones altamente conservadas del genoma bacteriano, como el gen de ARNr de subunidades pequeñas, ha proporcionado información muy valiosa sobre los numerosos cambios taxonómicos y la realineación de diferentes grupos taxonómicos (Thind, 2020). El dominio bacteria está dividido en 24 filos y 32 clases y es mucho más grande y complejo que el otro dominio procarionta, el tamaño de las vías filo, difiere considerablemente y el orden taxonómico en el que se describe una bacteria viene dado por la Tabla 2.

Tabla 2.

Clasificación de Filos del Dominio Bacteria

Nº de Filo	Nombre Filo	Nº de Filo	Nombre Filo
B1	Aquificae	B13	Firmicutes
B2	Thermotogae	B14	Actinobacteria
B3	Thermodesulfobacteria	B15	Planctomycetes
B4	Deinococcus-Thermus	B16	Chlamydiae
B5	Chrysiogenetes	B17	Spirochaetes
B6	Chloroflexi	B18	Fibrobacteres
B7	Thermomicrobia	B19	Acidobacteria
B8	Nitrospirae	B20	Bacteroidetes
B9	Deferribacteres	B21	Fusobacteria
B10	Cyanobacteria	B22	Verrucomicrobia
B11	Chlorobi	B23	Dictyoglomi

Fuente: Madigan et al., 2015

De este grupo el filo proteobacterias corresponde a las bacterias con paredes celulares Gram negativas, compuestas por lipopolisacáridos (Holst y Molinaro, 2010). Posee formas desde bacilos hasta cocos, flagelos en forma de cuerpos fructíferos, generalmente son anaerobias y heterótrofos,

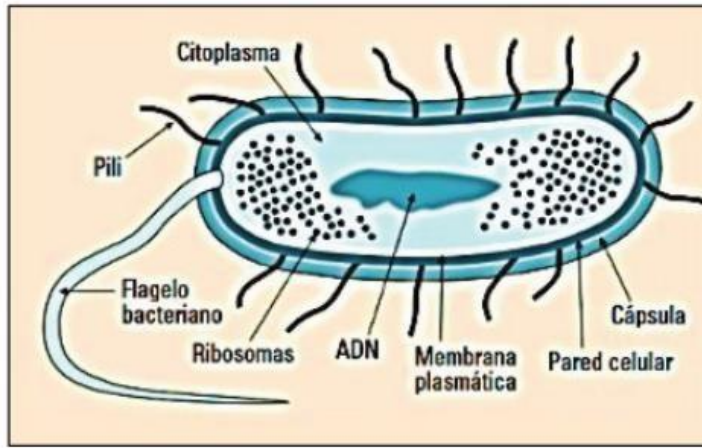
habitan superficies acuáticas, inclusive el océano. Se dividen en seis clases α , β , γ , δ , ϵ , ζ ; siendo las alphaproteobacterias las que en su mayoría constituyen los fotótrofos, aunque también son conocidos patógenos peligrosos (Busse, 2011), tales como las Roseomonas spp. y las Sphingomonas spp. De otro lado, las Gammaproteobacterias, están conformadas por muchos microorganismos de interés en investigaciones en tratamientos: medicamentos, ecológicos y especialmente científicos, destacando las enterobacterias como “*Escherichia coli*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Klebsiella pneumoniae*”.

En el caso específico de la familia Enterobacteriaceae está conformada por bacterias Gram negativas, que normalmente habitan en los aparatos digestivos o intestinos humanos y animales, como la especie *Escherichia coli*, se alimentan de detritos o residuos muertos. También se encuentran en el ambiente como en el suelo, el agua y la vegetación.

(Busse, 2011) manifiesta que estas tienen forma de varilla de 1- 3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro como Gram negativas, su envoltura celular tiene estructura multicapas la membrana interna (o citoplasmática) tiene doble capa & los fosfolípidos (lipopolisacáridos-LPS), que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La Figura 1, muestra la capa externa, es un peptidoglucano delgado con un espacio periplásmico que concentra proteínas, poseen en el exterior los flagelos, estructuras que se usan para la locomoción las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido.

Figura 1.

Estructura del género Enterobacteriaceae.



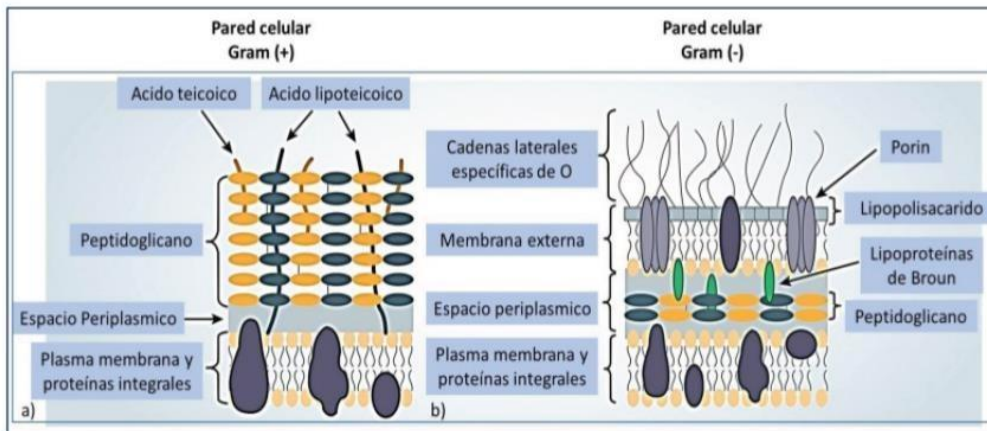
Fuente: Puerta-García y Mateos Rodríguez (2010).

2.4.6. Clasificación de los microorganismos por tinción Gram

Las diferencias físicas o estructurales radican en el grosor de la capa de peptidoglucano y la presencia o ausencia de la membrana lipídica externa en las bacterias, esto se debe a que la estructura de la pared afecta la capacidad de la célula para retener la mancha de cristal violeta utilizada en la prueba de tinción de Gram que luego se puede visualizar con un microscopio óptico. Las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa de cadenas de péptidos y no tienen capa lipídica por fuera, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una pared fina de las cadenas peptídicas y tienen una capa lipídica por fuera (Salton y Kwang-Shing). La Figura 2, muestra las diferencias celulares de la estructura de la pared y membrana celular.

Figura 2

Representación de la composición celular de las bacterias: a) Gram positiva y b) Gram negativas.



Fuente: Steward (s.f.).

En general, dentro de las Gram negativas, se observan el grupo cocos (esféricos), espirilos (en forma de espiral) y bacilos (bastones).

2.4.6.1. Bacilos Gram negativos

2.4.6.1.1. Glucosa-fermentativos, pero no fermentadores de lactosa

En este grupo se cuenta con los géneros *Shigella*, *Salmonella*, *Hafnia*, *Morganella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Vibrio* (oxidasa, positivo), *Aeromonas* (oxidasa, positivo) y *Plesiomonas* (oxidasa positivos) (Salton y Kwang-Shing, 1996)

2.4.6.1.2. No fermentadores de glucosa ni lactosa.

En este grupo se cuenta con las *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Roseomonas* y *Shingomonas*, todas oxidasas- positivos (Salton y Kwang-Shing, 1996).

Las bacterias Gram negativas por su morfología se agrupan en dos grandes grupos de bacilos y cocos, distribuidos por su actividad aerobia, anaerobia y facultativa y son fermentadoras y no fermentadoras de glucosa entre otras propiedades.

2.4.6.2. Bacterias Gram positivas

Son aquellas que en la tinción de Gram adoptan una coloración violeta/azul debido a su estructura molecular. Poseen una capa muy gruesa compuesta por peptidoglicano (Salton y Kwang-Shing, 1996). Las bacterias Gram positivas, son divididas en dos grupos, esporulados y no esporulados.

Los bacilos Gram positivos, representan un género aerobio grande. Están organizados en cadenas. Aunque mantienen relación estrecha, difieren fenotípicamente y en sus propiedades patogénicas, tanto para el ser humano como para los insectos. La mayoría es saprófita y vive en la tierra, el agua y el aire, así como en la vegetación como el *Bacillus subtilis* y el *B. cereus*. Se reproducen en los alimentos y causan intoxicación alimentaria (Pérez, 2012).

2.4.7. Otras formas de clasificación de bacterias

También se pueden dividir en función del pH en que se desarrollan, así se tiene a las acidófilas, neutrófilas y basófilas (Mollinedo y Gonzáles, 2014). Asimismo, las bacterias pueden dividirse en relación a su permanencia o ausencia de oxígeno:

- a) Bacterias aerobias estrictas, como los bacilos espirales curvados y móviles
- b) Bacterias anaerobias estrictas
- c) Bacterias anaerobias facultativas.

La Temperatura como factor de clasificación de bacterias

Además de la disponibilidad de sustrato, la temperatura y la humedad suelen ser los factores ambientales más importantes que determinan el crecimiento y la actividad microbiana en el suelo (Kirchman, 2018). La tasa de crecimiento bacteriano del suelo durante el crecimiento exponencial, depende de la temperatura. Conforme a la temperatura se incrementa, la cinética de las reacciones se acelera (Nicola y Baath, 2019). Los microorganismos proliferan entre los -8° a $+90^{\circ}\text{C}$, con

temperatura óptima de 35°C, para casi todos los patógenos. La temperatura influye en la fase latente, también define el ritmo de crecimiento. Sin embargo, cada microorganismo presenta sus propios requerimientos de nutrición, lo cual define la composición química y la producción de enzimas de las bacterias. De todas formas, algún microorganismo puede permanecer viable durante un gran periodo, especialmente en alimentos congelados y en temperaturas cálidas como el *Staphylococcus aureus*, un microorganismo muy recalcitrante ya que puede mantenerse a 60°C cuando no supera los 15 minutos. En relación a la temperatura, los microorganismos se clasifican en: Psicrófilos: son los que se desarrollan mejor en temperaturas bajas (15°C a 20°C y una mínima de 0 °C. Siempre se encuentran en ambientes fríos y mueren rápidamente si se exponen a mayores temperaturas inclusive la ambiental. Ambientales: temperatura óptima entre 10 y 25°C

- Mesófilos: temperatura óptima alrededor de 35 a 37°C
- Termófilos: temperatura óptima superior a 45 °C

Los microorganismos psicrófilos son menos resistentes que los ambientales, que a su vez son menos resistentes que los mesófilos y estos últimos son menos termorresistentes que los termófilos” (D’Amico, Collins, Marx, Feller y Gerday, 2006).

2.4.8. *Microorganismos del suelo*

La actividad microbiana en los suelos es intensa hasta un metro de profundidad y produce transformación de los desechos orgánicos y componentes inorgánicos, como los minerales, mejorando la asimilación de nutrientes. La transformación se relaciona con la diversidad y la presencia o ausencia de oxígeno, que depende de la porosidad y grado de saturación hídrica del suelo (Benavides y Hermida, 2008).

En presencia de oxígeno, la descomposición de los materiales es rápida ya que los organismos respiran al principio hasta el 60% del carbono orgánico como dióxido de carbono, luego la mayor

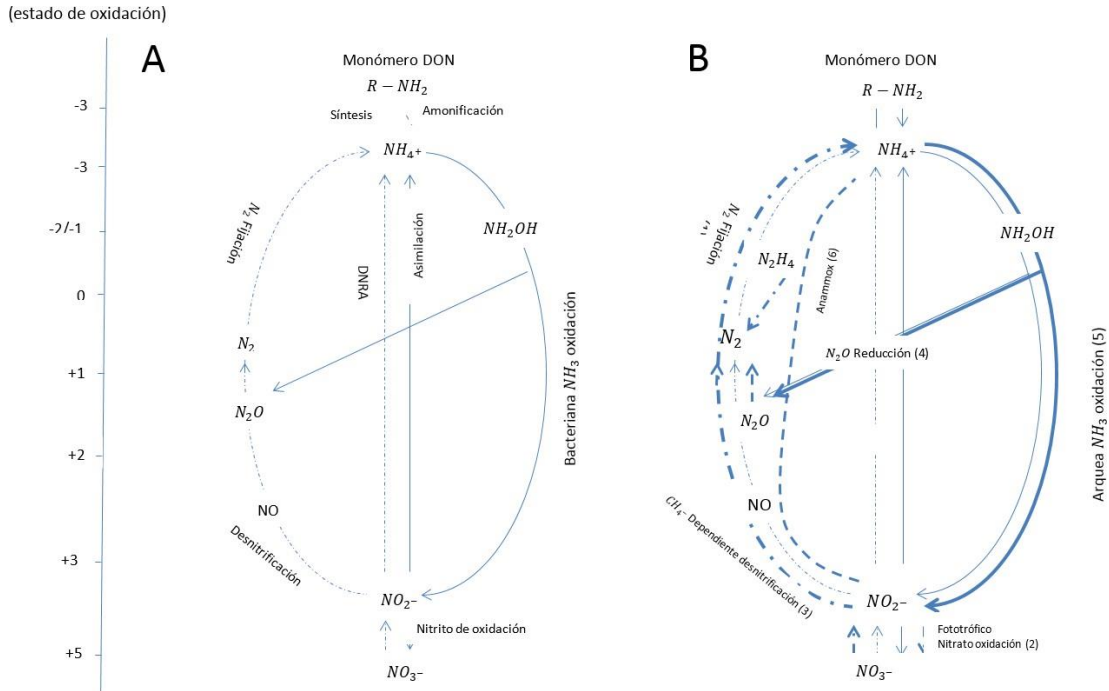
parte se incorpora a las células microbianas y el resto se respira al disminuir la población (Gerba, 2005).

La Figura 3, muestra el ciclo del nitrógeno llevado a cabo por los microorganismos del suelo, en las etapas, los microorganismos se encuentran asociados el ciclo del nitrógeno ya que estos fijan el N_2 atmosférico y lo transforman en formas asimilables para otros organismos, el N_2 presenta en distintas formas se transforman en el ciclo por microorganismos amonificantes, proteolíticos, oxidantes de amonio, oxidantes de nitrito, denitrificantes (Cañon-Cortazar. Avellaneda-Torres y Torres-Rojas 2012; Isobe y Ohte. 2014).

Al-Yaqout y Hamoda (2003), indican que “los consorcios microbianos son asociaciones naturales de dos o más especies de microorganismos que actúan como una comunidad, beneficiándose cada uno de ellos de la actividad de los demás. Es decir, se trata de sistemas naturales en los que, microorganismos de distintas especies, a menudo de distintos géneros, coexisten espacialmente y cooperan, posibilitando así su propia supervivencia”. Complementariamente, Bermúdez (2016), sostiene que “...la asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos (que significa “comiendo juntos”) en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales”.

Figura 3

Procesos mediados por los microorganismos en el ciclo de nitrógeno.



Fuente: Isobe y Ohte (2014).

Salazar y Sánchez (2011), indican que: “los consorcios microbianos degradan desechos orgánicos complejos en forma más eficiente que las cepas individuales. Sin embargo, existen casos de mezclas de cepas microbianas en las cuales las interacciones presentadas no conservan una estabilidad como comunidad al someterse a condiciones ambientales adversas” No obstante, la vida en asociación brinda una mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promueve la estabilidad de los miembros, en el tiempo. Estas características especiales dependen de dos aspectos: 1) “la comunicación” ya que los miembros del consorcio se comunican entre ellos a través de señales químicas o moleculares y 2) facilidad para desarrollar funciones que necesitan demasiados pasos, porque se encarga de limitar el número de elementos externos en cada población, lo cual los protege de un desequilibrio metabólico y la división del trabajo simplificará la optimización de cada reacción en la conversión (Ochoa y Montoya, 2010).

2.4.9. Identificación Bioquímica

Las pruebas bioquímicas consisten en una serie de análisis fisicoquímicos aplicados sobre medios de cultivos para determinar espacios de la ruta metabólica de una cepa pura de microorganismos de tal manera que es posible identificarlos y clasificarlos con un alto porcentaje de acierto.

2.4.9.1. Pruebas de fermentación

2.4.9.1.1. Prueba TSI (Agar con azúcar triple y hierro)

El agar TSI contiene glucosa al 0,1%, así como lactosa y sacarosa al 1%. Estos son los carbohidratos que logran fermentar en presencia de las bacterias. Adicionalmente, este medio contiene extracto de proteínas (carne) y pluripectona, como fuente de nutrientes para el crecimiento del microbiota, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, que es el alimento usado en la generación de H_2SO_4 , Sulfato de Amonio Ferroso $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como fuente de Fe^{3+} , que al combinarse con el H_2SO_4 produce FeS , de color negro. Además, el medio incluye al indicador de pH rojo de fenol, cloruro de sodio para mantener el balance osmótico y agar como agente solidificante. Normalmente este medio se usa para diferenciar enterobacterias, aprovechando su capacidad para fermentar la glucosa, lactosa y/o sacarosa, con producción o no de gases, como medio que evidencia la posible producción de ácido sulfhídrico (Alcaráz, Satorres, Mattana, Centorbi, Aliendro y Echenique, 2017). Los microorganismos pueden desarrollar las siguientes rutas bioquímicas:

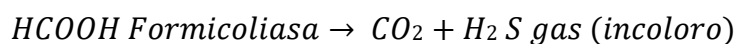
a) Fermentar sólo la glucosa (alcalino/ácido). Entonces en el tubo de prueba se observa el pico de flauta alcalino (rojo) y la columna ácida (amarilla) ya que los microorganismos utilizan primero la glucosa, acidificándose todo el medio y virando el indicador a amarillo. Generalmente, después de 18 a 24 horas, la glucosa (0.1%) es consumida y el organismo comienza a usar las

peptonas aeróbicamente alcalinizando el pico (vira nuevamente a rojo) por liberación de NH_3 , indicando que estos microorganismos son incapaces de fermentar la lactosa y/o sacarosa.

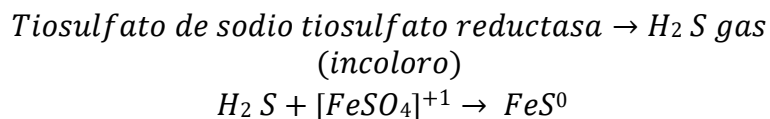
b) Fermentar los tres componentes, lactosa, sacarosa (si o no) y la glucosa (ácido/ácido).

En este caso, la lactosa y la sacarosa se preparan en proporciones mayores a la glucosa; de tal forma que los microorganismos consumen primero a la glucosa hasta agotarla totalmente y luego prosiguen con la lactosa y/o sacarosa. Debido a esto en el tubo se aprecia un pico de flauta y una columna ácida, lo cual permanece así, inclusive hasta las 24 horas debido a que la lactosa no se ha terminado de consumir, manteniéndose la acidez en todo el tubo. Es bien sabido que las reacciones de fermentación de azúcares producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido.

c) Existen microorganismos que, al no poder fermentar los carbohidratos (alcalino/sin cambio), utilizan las peptonas en la superficie del pico. Mientras que en el fondo de la columna no habrá cambio de color (alcalino/sin cambio). Durante la fermentación de la glucosa puede producirse ácido fórmico, el cual, por acción de la formicoliasa, se descompone en gases Como CO_2 e H_2 (FCN.UNP, 2019):



d) El tiosulfato sódico añadido en medio neutro o alcalino llega a generar ácido sulfhídrico. Cuando esto ocurre, la sal de amonio ferroso, también añadida, reacciona con el gas para producir sulfuro de hierro como precipitado de color negro (Luna. 2012):



En la Tabla 3 se presentan los códigos establecidos para identificar las reacciones producidas:

Tabla 3

Código de reacciones resueltas con la prueba de TSI.

Pico	Columna	Superficie/Profundidad	Resultado
Rojo	Amarillo+	K/A H ₂ S – CO ₂ -	Fermentación sólo de glucosa, peptona catabolizada
Amarillo+	Amarillo+	A/A H ₂ S – CO ₂ -	Fermentación de glucosa y lactosa/sacarosa
Amarillo+	Ennegrecimiento +	A/A con H ₂ S+CO ₂ +	Producción de H ₂ S
Amarillo +	Amarillo + Gas	A/A con H ₂ S – CO ₂ +	Hay producción de gas a partir de glucosa. No hay fermentación de azúcares
Rojo -	Rojo -	K/K H ₂ S-CO ₂ -	Sin embargo, la presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que la bacteria produce gas De otro lado la formación de color negro en el medio indica que la bacteria produce ácido sulfhídrico

K= Reacción Alcalina (rojo) A = reacción Acida (amarillo).
Fuente: FCN UNP (2019)

2.4.9.1.2. Prueba de Voges Proskauer (VP) y Rojo de Metilo (RM)

La prueba de Voges-Proskauer es “una prueba bioquímica que se utiliza para la identificación de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente para diferenciar cepas de *Escherichia coli* de *Klebsiella Enterobacter*, entre otras. La prueba se realiza en el medio de cultivo líquido llamado rojo de metilo -Voges Proskauer (RM/VP), el cual está compuesto por polipeptona tamponada, glucosa, fosfato dipotásico y agua destilada” (Aslanzadeh, 2006. p. 104) y mide la capacidad que tiene la bacteria para emplear la glucosa y degradarla formando ácido pirúvico por la ruta “butiléngríclica” para sintetizar el 2,3- butanediol, el cual se oxida y forma acetoína en un proceso reversible en medio aerobio (Murray, Baron, Jorgensen, Pfaller y Tenenbaum, 2003) y pH alcalino.

Las enterobacterias anaerobias facultativas pueden utilizar la glucosa en 2 fases: la primera, indica un metabolismo aerobio (respiración oxibióntica). Por lo tanto, usan oxígeno del entorno; y la segunda, implica al metabolismo anaerobio (fermentación) que define dos tipos de rutas derivadas de los compuestos finales, así cuando la reacción es ácido-mixta tiene como productos terminales ácidos orgánicos (fórmico, acético, láctico y succínico) y etanol. Entonces el pH desciende porque hay liberación de ácidos orgánicos que generan una marcada caída del pH. Esto se detecta mediante la aplicación del indicador rojo de metilo (rojo a pH 4.0) ya que la fermentación produce acetoina la cual es identificada vertiendo al medio, hidróxido de potasio y alfa-naftol para que reaccionen con esta sustancia y generen una coloración roja. De esta manera, las pluripeptonas y en especial la glucosa del medio, proveen el alimento básico para el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, cuando no se presentan cambios de color, la prueba indicará VP- negativo. Respecto a la revelación de esta reacción intermedia se usan los reactivos de Barrit, también denominados como Voges A y Voges B. El Voges A, es una solución al 5% de α -naftol, y el Voges B, es un preparado de hidróxido de potasio al 40% (hidróxido de sodio al 40%).

El reactivo A, (α -naftol), actúa como un catalizador que incrementa la tonalidad del color de la reacción, siendo una prueba muy sensible ya que debe agregarse antes, se agita el tubo para homogeneizar y oxigenar, entonces la acetoina generada se transforma por oxidación a diacetilo, y el 2,3-butanediol se oxida formando acetoina, derivándose luego a diacetilo, luego el reactivo A se unirá al diacetilo que a su vez se une al núcleo guanidina que conforma el aminoácido arginina, el color que toma al final es rojo (Fernández, García, Saéz y Valdezate, 2010).

El reactivo Voges B (hidróxido de potasio o de sodio), absorbe CO₂ y reacciona con las peptonas, se forma un color rosado-salmón, cuando se agita intensamente el tubo y se mezclan los componentes exactos tales como diacetilo, peptona y a naftol. Sin embargo, a veces hay que

esperar al menos un cuarto de hora para interpretar, Aunque en la mayoría de los casos la prueba es inmediata, tomando un color rojo, pero si se deja reposar por más tiempo, incluso hasta 60 minutos, la coloración será de un tono muy pronunciado. Contrariamente, si la coloración es amarilla y persiste, será una respuesta negativa (después de 1 h), aun cuando es posible lograr un color cobrizo debido a su reacción con el KOH sobre el u-naftol (Alcaráz, Satorres, Mattana, Centorbi, Aliendro y Echenique, 2017).

2.4.9.1.3. Pruebas de oxidación

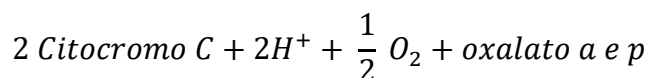
Oxidasa

Esta prueba se usa para determinar la presencia de la enzima citocromo oxidasa en las bacterias que es un componente de la cadena respiratoria, reduce al oxígeno molecular y forma peróxido de hidrógeno como aceptor final de hidrógeno de tal manera que logra transferir los electrones de las reducciones que se producen en las oxidaciones celulares. Las bacterias aerobias respiran para generar energía y lo hacen oxidando distintos tipos de sustratos (Fernández, García, Saéz y Valdezate, 2010).

Los electrones eliminados del sustrato entran en la cadena respiratoria y se produce su transporte a través de una serie de transportadores que se oxidan y reducen, aceptando electrones de compuestos reducidos para transferirlos finalmente al O₂. Cada transferencia de electrones se asocia con una disminución de la energía libre, que permite la síntesis de ATP, así los citocromos actúan secuencialmente, oxidándose y reduciéndose (dependiendo del estado del átomo de Fe contenido en su molécula) transportando electrones de la coenzima Q al O₂.

El citocromo oxidasa en medio aerobio con O₂ atmosférico, citocromo y en presencia de oxidasa, esta enzima logra la reacción produciendo un tono coloreado. Los diferentes indicadores usados para esta reacción de oxidasa son captadores de electrones. De esta forma se determina la

existencia y actividad de las enzimas oxidasas. Es importante destacar que la oxidasa reacciona debido a la existencia del sistema citocromo oxidasa la cual promueve la Oxidación del citocromo al ser reducido en medio aerobio produciendo finalmente agua o H₂O₂ según sea los microorganismos actuantes. Por lo tanto, en esta reacción el oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. El sistema citocromo oxidasa lo presentan los microorganismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y excepcionalmente en algún microaerófilo, pero los anaerobios estrictos, carecen de actividad oxidasa” (Lopardo, 2016, p 41).



– *amino dimetilanilina (reactivo) citocromo oxidasa* → *compuesto coloreado*.

2.4.9.1.4. Prueba de Catalasa

La catalasa es una enzima generada por las bacterias que contienen citocromo, es decir que los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos deberían poseerla, esta enzima es categorizada como una hidroxidasa, esto significa que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es usado por las bacterias como sustrato. Además, esta enzima es considerada una oxidoreductasa debido a la actuación de un componente como un donante de electrones o reductor. La catalasa es una proteína que contiene un grupo prostético con cuatro átomos de hierro trivalentes (Fe⁺⁺⁺), por tanto, es una homoproteína.

El ión férrico se mantiene oxidado durante la reacción. La catalasa, también es considerada como una enzima de tipo desintoxicante, debido a su función de eliminar sustancias tóxicas producidas durante las reacciones metabólicas. Uno de estos agentes tóxicos es el peróxido de hidrógeno formado por la descomposición aerobia de los azúcares que son asimilados por las bacterias (Lopardo, 2016) en forma de glucosa generando el ión superóxido (O₂⁻) (radical libre) que también es otro tóxico intermedio, factible de ser eliminado por la enzima superóxido

dismutasa que lo transforma en oxígeno gaseoso y peróxido de hidrógeno, siendo finalmente, eliminado mediante la enzima catalasa que lo desdobla en agua y oxígeno, como se observa en la siguiente reacción química:



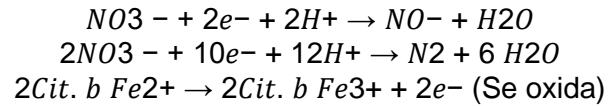
La catalasa puede actuar sobre otros sustratos diferentes al peróxido de hidrógeno, como alcoholes, aldehídos, ácidos, aminos aromáticas y fenoles. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno puede ser utilizado también por la catalasa para oxidar otros compuestos tóxicos como el alcohol metílico y etílico. Así mismo, la catalasa está presente en las células fagocíticas, protegiéndola de acciones tóxicas.

Gran parte de las bacterias aerobias poseen catalasa y su acción de descomposición del H₂O₂ en H₂O y O₂ es observado por el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno (positiva), lo cual resulta ser una metodología rápida y fácil para diferenciar el *Streptococcus* del *Staphylococcus*, ambas poseen citocromos, pero el primero es catalasa negativa y el segundo es catalasa positivo, es decir existen excepciones, el *Streptococcus* es una de ellas, que a pesar de ser microorganismos anaerobios facultativos no poseen la enzima catalasa. Así mismo, el género *Bacillus* (catalasa positiva) se distingue del género *Clostridium* (catalasa negativa), entre otros (Lopardo, 2016).

2.4.9.1.5. Prueba de reducción de nitratos

Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo de respirar nitrato reduciéndolo a nitrito o, a nitrógeno libre. Se trata de la incorporación de una solución “A” compuesta por alfa-naftil amina y de ácido acético y una solución “B” conformada por ácido sulfanílico- ácido acético, adicionados sobre cultivos bacterianos en agar nitrato o glucosa nitrato, para diferenciar los bacilos Gram negativos que poseen la enzima nitrato reductasa que, en condiciones anaerobias efectúan

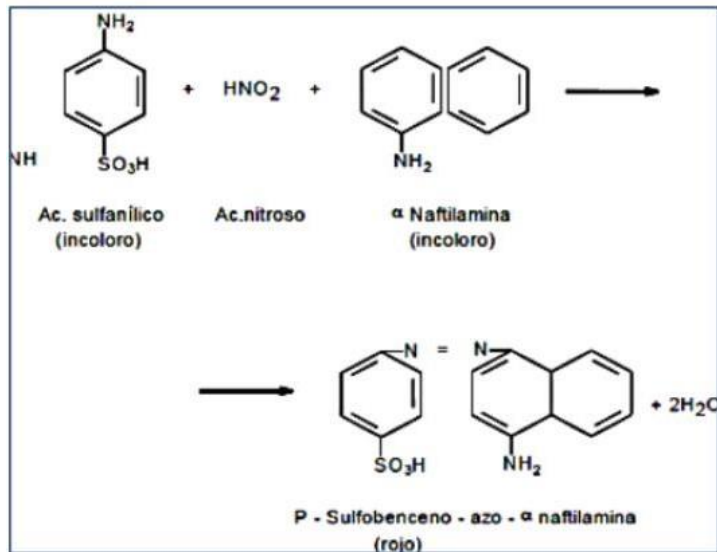
la reducción porque el organismo utiliza nitrato como aceptor de electrones de tal manera que el nitrato actúa como el oxidante final en los sistemas citocromo (González, 2007):



La Figura 4, muestra el procedimiento descrito en la formación del color a causa de la acción enzimática: Cuando el medio inoculado adquiere un color fuertemente rojo, significa que el nitrito reaccionó con el ácido sulfanílico y el alfa naftilamina formando el p-sulfo benceno- azo alfa naftil amina (sal diazoica), pero cuando el resultado es negativo (sin cambio de color), se puede hacer una confirmación agregando polvo de zinc, si con esto no hay desarrollo de color, entonces se considera que el microbio redujo el nitrato en nitrito y redujo luego el mismo nitrito, pero si cambia a un color rosado o rojo intenso, entonces el nitrato no logró ser reducido por el microorganismo y se considera una respuesta negativa de confirmación.

Figura 4

Ruta metabólica seguida en la identificación de la enzima nitrato reductasa.



Fuente: Fernández. García, Saéz y Valdezate, 2010).

2.4.9.1.6. Hidrólisis de Almidón

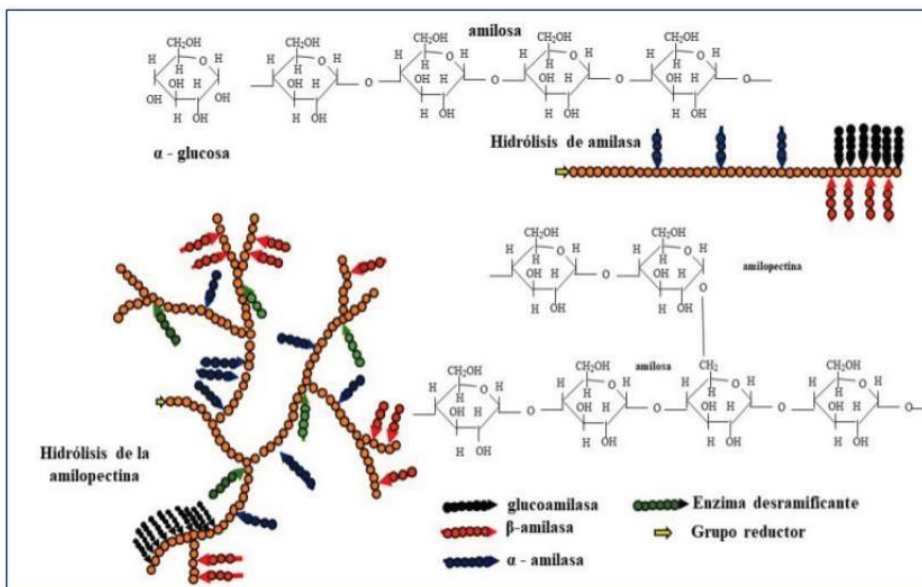
Esta prueba permite determinar la capacidad de un organismo para hidrolizar el almidón por acción enzimática debido a que el almidón es un homopolisacárido, formado por muchos monómeros de alfa-D-glucosa. Las bacterias pueden usar alimentos macromoleculares; para ello, es necesario una hidrólisis extracelular preliminar, igual que sucede en los animales superiores. Las distintas bacterias elaboran para este fin una cierta variedad de enzimas extracelulares que se segregan al medio. El almidón es un carbohidrato complejo producido principalmente por plantas superiores. Está compuesto de amilosa y amilopectina que es degradado por microorganismos que contienen amilasas (Koneman, 2001).

La estructura básica del almidón es una mezcla de dos moléculas de polisacáridos poliglucosa: la amilosa que es lineal y forma una estructura helicoidal enrollada, que es la responsable del color azul que se produce frente al reactivo jedado, forma entre un 10 a un 20 % del almidón. La otra molécula es la amilopectina que es mayor que la amilosa y está muy ramificada, se encuentra entre

un 80 a un 90%. La hidrólisis de la amilopectina (Fig. 5) produce dextrinas que conforman una serie de moléculas de almidón parcialmente digeridas, son moléculas grandes que constan de un número pequeño de polímeros de glucosa. Las dextrinas sufren degradación más o menos completa a maltosa y a una pequeña cantidad de glucosa. Cuando se hace la prueba se distribuye en placas o en tubos y se siembra en estrías un cultivo puro de 18-24 horas (Aslanzadeh, 2006). En la Figura 5, muestra el proceso de hidrolización.

Figura 5

Ruta metabólica seguida por microorganismos con actividad amilolítica.



Fuente: Echevarría (2011)

Con el propósito de verificar la hidrólisis del almidón, se adiciona unas gotas de solución iodada de Gram sobre la siembra cultivada en base de almidón. La amilosa y la amilopectina se comportan diferente frente al Iodo. La amilosa se combina más fuertemente con el Iodo que la amilopectina y produce un color azul intenso (púrpura) o permanecer incoloro, si el almidón ha sido hidrolizado. La amilopectina lineal que solo aporta glucosa (glucosan), da un color rojo con el yodo ya que no se une efectivamente y puede virar hacia el incoloro si se encuentra presentes acrodextrinas.

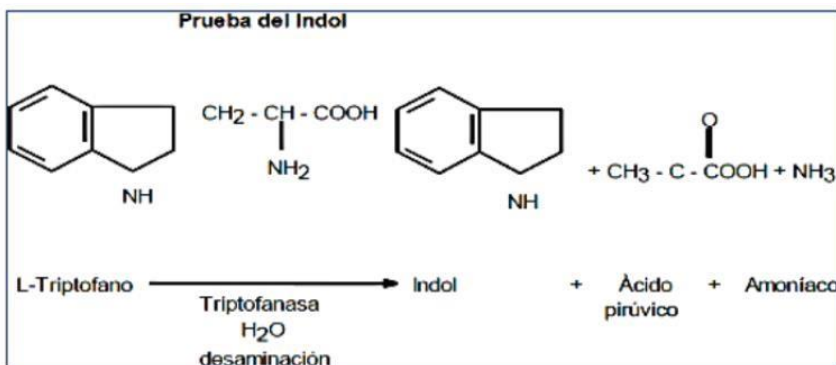
2.4.9.1.7. Acción de los microorganismos sobre proteínas y aminoácidos

Prueba del Indol (medio de cultivo SIM)

Esta prueba mide la capacidad de una bacteria para desdoblar al indol de la estructura del triptófano (Fig. 6). El medio está conformado por peptona de caseína, peptona de carne, citrato ferriamónico, tiosulfato de sodio y agar. El triptófano como un aminoácido logra ser oxidado por algunos microorganismos formando indol, metilindol e indolacético, pero es la enzima triptofanasa la que cataliza la reacción de desaminación, atacando a la molécula de triptofano solamente en su cadena lateral, pero no toca el anillo aromático en la forma de indol, esta desaminación del triptófano es del tipo reductor, entonces el NH₂ es extraído y liberado como NH₃ más la energía que es utilizada por la bacteria (Mac Faddin, 2000). La Figura 6, muestra la ruta metabólica seguida por las bacterias que liberan indol.

Figura 6

Ruta metabólica seguida por las bacterias que liberan indol, cuando existe indol, éste se combina con el aldehído produciendo una coloración roja.



Fuente: Mac Faddin (2000).

Por un lado, este medio completo (SIM), permite determinar la movilidad, así como la generación de ácido sulfhídrico, sin embargo, antes de añadir el reactivo, se debe observar la movilidad cuando se produce un crecimiento externo a la zona de punción y por otro lado el H₂S

de aminoácidos por acción enzimática se puede observar gracias al citrato de ferriamónico que reacciona con este gas para formar un precipitado negro.

Esta prueba es característica en la identificación positiva de *Escheareichia coli*, pero cuando no hay cambio de coloración la prueba resultara negativa.

Prueba LIA (Descarboxilación Lisina)

Esta prueba requiere de un medio de cultivo que contiene peptona de gelatina, levadura (extracto), $C_6H_{12}O_6$, $C_6H_{14}N_2O_2$, $C_6H_5+4yFexNyO_7$, $Na_2S_2O_3$, un indicador púrpura de bromocresol y agar. El pH es regulado a 6.7 ± 0.2 . Este es un medio de cultivo muy aplicado en pruebas de distinción de especies bacterianas, principalmente para la *Salmonella* spp. El proceso comprende la descarboxilación y desaminación de la lisina y la generación de ácido sulfhídrico (Aslanzadeh, 2006).

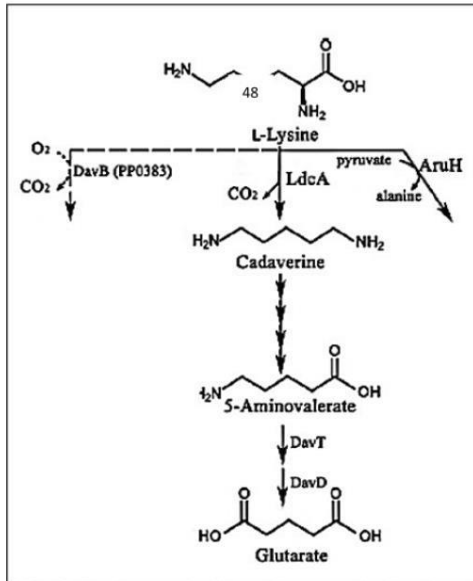
En este medio, la peptona y el extracto de levadura brindan los materiales nutrientes que promueven el crecimiento de los microorganismos. La glucosa como carbohidrato fermentable y la lisina, representan los sustratos básicos aplicados para determinar la presencia de grupos de carboxilasas que son las enzimas responsables (Figura 7) y enzimas desaminasas.

Es importante destacar la aplicación de $C_6H_{11}FeNO_7$, y el $Na_2S_2O_3$ como indicadores que permiten visualizar la formación de H_2S , mientras que el viraje de pH es observable por la adición de púrpura de bromocresol. Una respuesta positiva presenta un color amarillo (cuando el pH resulta ser igual o menor a 5.2) y color violeta, cuando el pH es igual o mayor a 6.8, no fermenta.

Así, el medio ácido favorece la dinámica enzimática descarboxilasa entonces se metaboliza la usina formando cadaverina esto aumenta el pH cambiando el color violeta (Mac Faddin, 2000).

Figura 7

Vía de la *L*-lisina descarboxilasa se muestra en el centro.



Fuente: Ting, Hegazy y Chung-Dar (2010)

Las bacterias fermentadoras de la glucosa cuando no metabolizan la lisina, mediante la descarboxilasa, generan un color amarillo al cambiar totalmente el tono del medio de cultivo.

Así cuando se produce una respuesta positiva, dentro de las 24 horas de incubación, en el fondo del tubo se observa un color amarillo, mientras que en la superficie se produce una coloración violeta que ocurre cuando las peptonas son consumidas, produciendo alcalinidad. Además, la producción de H₂S, se observa por el ennegrecimiento del medio, esto se debe a la nueva generación de FeS. Las bacterias de los géneros *Proteus*, *Providencia* tienden a desaminar la usina produciendo un ácido alfa-cetocarbónico (Fernández, García, Saéz y Valdezate, 2010). En la Tabla 4 se presentan los códigos usados para expresar los resultados de esta prueba.

Tabla 4.*Codificación de los resultados bioquímicos LIA.*

Descarboxilación lisina	Resultado positivo: K/K Superficie alcalina / profundidad alcalina (pico violeta / fondo violeta)	Resultado negativo: Superficie alcalina /profundidad ácida (pico violeta / fondo amarillo).
Fermentación glucosa. Descarboxilación lisina	Resultado positivo: K/A la descarboxilación se verifica como alcalinización (K) del medio de cultivo con un viraje hacia el púrpura en todo el tubo, o como medio de cultivo neutro. A: fermentación de glucosa es amarillo.	Resultado negativo: A/A fermentadores de glucosa que no tienen actividad lisina carboxilasa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al color amarillo (A).
Desaminación lisina. Fermentación glucosa	Resultado positivo: R/A: Superficie rojiza / profundidad ácida.	Resultado negativo. negativo: ausencia de color rojo granate
Producción de H ₂ S	Resultado positivo Ennegrecimiento del medio de cultivo (especialmente en el límite entre la superficie y profundidad)	Resultado negativo El medio de cultivo permanece sin cambio de color (ausencia de color negro)

Nota: A: Reacción ácida. Color amarrillo K: Reacción alcalina Color violeta. R: Reacción alcalina: color rojo. (Castro, 2008)

Licuefacción de Gelatina

Esta prueba determina la capacidad de un organismo para producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas), que licuan la gelatina. Para tal efecto, el microorganismo es cultivado en un medio compuesto por extracto de carne, peptona, gelatina y agua destilada (Mac Faddin, 2000). Este medio esterilizado se distribuye en un volumen de 3 a 4 ml en cada tubo de ensayo, en cuya superficie se inocula el microorganismo por punción, manteniéndolo en incubación por 24 horas o más.

En este periodo las bacterias metabolizan a las proteínas transformándolas en partes o componentes asimilables de menor tamaño. Con este propósito, las bacterias sintetizan y liberan a los medios enzimas exocelulares de tipo proteolítico (gelatinasas), que desdoblan a las proteínas hasta la formación de aminoácidos (Mac Faddin, 2000):

Proteínas + gelatinas proteinasas → polipéptidos

Polipéptidos + gelatinas proteinasas → aminoácidos

Al final de la prueba, los resultados serán positivos cuando todo se vuelve líquido y negativo, cuando el medio permanece sólido.

Coagulasa

Esta prueba permite comprobar la facultad de un organismo para coagular al plasma, por secreción de la enzima coagulasa cuya fórmula no es aún conocida. La enzima logra metabolizar al fibrinógeno, transformándolo en fibrina, de esta forma se desencadena la formación de un coágulo. Es probable que la coagulasa actúe formando una barrera en el lugar infectado por el microbiota. Esta enzima posee dos formas, ‘libre’ y ‘fija’ con diferentes propiedades, por ello hay dos técnicas para demostrar su presencia: a) para la coagulasa fija se realiza una prueba en porta objeto. Conocida como “factor de aglutinación”. Para esto se coloca unos microlitros de agua destilada en un portaobjeto, se emulsiona suavemente una suspensión del organismo en agua, luego se coloca una gota del plasma estéril reconstituido junto a la gota de la suspensión bacteriana, se mezcla y se inclina el portaobjeto hacia uno y otro lado, para observar la formación inmediata de un precipitado granular, debido a la formación de hilos de fibrina entre las paredes celulares de la microbiota suspendida en el plasma (fibrinógeno), (Mac Faddin, 2000), que provocan su aglutinación. Esto es observado en el portaobjetos por la presencia de agregados; y, b) para la coagulasa libre, se realiza una prueba en tubos. Para iniciar la prueba se coloca asépticamente el plasma reconstituido en el tubo estéril y se añade el cultivo puro, se espera entre 18 y 24 horas para que el cultivo bacteriano, mezclado por rotación suave, se incube en baño maría a 37° C hasta obtener un coágulo visible. En este caso, los microorganismos suspendidos que generan esta

enzima (coagulasa) se mezclan en partes iguales con el plasma dentro del tubo de ensayo, para formar el coágulo visible.

Acción de microorganismos sobre el citrato de Simmons

El citrato de Simmons es un medio utilizado para diferenciar enterobacterias que usan al citrato como única fuente de carbono y energía. El medio se compone de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaCl , K_2HPO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, MgSO_4 , azul de bromotimol (indicador) y agar. Esta mezcla toma un color verde profundo. Una vez inoculada la cepa, ésta requerirá del $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como única fuente de N mientras que el $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ representa la única fuente de carbono para el desarrollo microbiano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es el cofactor enzimático, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino y el agar es el agente solidificante, La prueba se realiza por incubación aerobia a 35-37°C por 24 horas a 72 horas, aunque hay reacciones que requieren mayor tiempo.

En esta prueba actúan aquellos microorganismos que presentan la enzima citrato permeasa, que desdobla al citrato mediante el ciclo del ácido tricarboxílico, el cual genera constantemente oxalacetato y piruvato. En medio alcalino, se forman ácidos orgánicos utilizables por el microbiota como fuente de carbono, llegando a formar CO_3^- y HCO_3^- - el cultivo luego cambia al color azul señalando la generación de citrato permeasa (Mac Faddin, 2000).

Cuando el cultivo, al final del periodo, toma un intenso color azul en el pico de flauta del tubo de ensayo, entonces la prueba resulta positiva, pero si el cultivo permanece de color verde, el resultado será negativo.

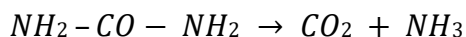
Acción de microorganismos sobre la urea

Este agar se usa con la finalidad de determinar la presencia de la enzima ureasa en los microorganismos mediante la hidrólisis de la urea para formar dos moléculas de amoníaco por la

acción de esta enzima. Una vez preparado el medio y esterilizado, se enfría a 45 °C, se agregan 50 ml de una solución de urea estéril al 40% y se distribuye en tubos en forma de pico de flauta. Luego se siembra un cultivo de 24 horas, estriando sobre la superficie del medio y se incuba a 37° C durante 24 -48 horas (FCN.UNP, 2019).

La ureasa es una enzima multimérica de alto peso molecular que contiene níquel. Su ubicación citoplasmática requiere que la urea ingrese a la célula para su utilización en algunas especies se han detectado sistemas de absorción de úrea dependientes de la energía. Los microorganismos eucarióticos poseen una ureasa homopolimérica, análoga a la enzima vegetal, compuesta de seis subunidades idénticas y las bacterias Grampositivas también pueden poseer ureasas homopoliméricas, pero la evidencia de esto no es concluyente, sin embargo, las ureasas de las bacterias Gram negativas estudiadas hasta ahora poseen claramente tres subunidades distintas (Fernández, García, Saéz y Valdezate, 2010).

Como la urea es hidrolizada por la enzima ureasa, produciendo CO₂ y NH₃ la reacción es alcalina, lo cual se observa por el viraje del indicador (rojo fenol) de amarillo a fucsia indicando reacción positiva, pero cuando el color amarillo se mantiene, la reacción es negativa (Fernández, García, Saéz y Valdezate, 2010).



2.4.10. Tecnología Colorimétrica Avanzada para la identificación de bacterias Gram negativas.

En la actualidad se cuenta con distintos métodos de cultivo y aislamiento de bacterias Gram negativas fermentadores o no fermentadores, destacando la colorimetría avanzada gracias a dos componentes principales, el primero: un sistema óptico de transmitancia que utiliza luz visible para medir directamente el crecimiento del organismo; y el segundo, tarjetas analíticas de nueva

generación que contienen pocillos donde se inoculan los medios de cultivo que interaccionan con el sistema óptico, el cual genera una lectura de luz inicial en un pocillo de base, antes de producirse un crecimiento bacteriano significativo. El muestreo de transmitancia de luz en el mismo pocillo se efectúa en tiempos cortos permitiendo medir el crecimiento del organismo mediante la cantidad de luz a la que se impide pasar a través del pocillo, para ello se aplican longitudes de onda diferentes.

Un sistema eficiente ha resultado ser VITEK 2 Compact el cual posee unas tarjetas analíticas con 64 pocillos haciendo lecturas cada 15 minutos (Fig. 8).

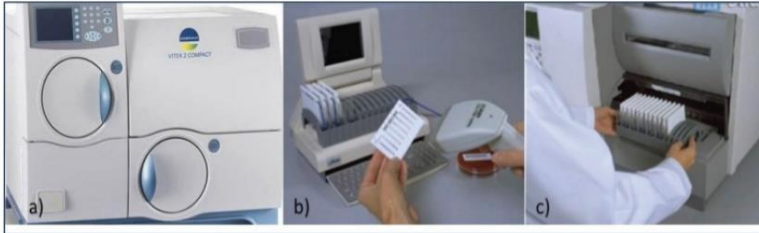
Las tarjetas Gram negativas desarrollan métodos bioquímicos estandarizados, en ella se aplican sustratos como fuente de carbono y se evalúa sus actividades enzimáticas. Como parte del proceso de identificación, el software compara el conjunto de reacciones previstas de cada organismo o grupo de organismos que se pueda identificar con la tarjeta (Pincus, s.f.).

La identificación de los microorganismos depende de la inoculación de una suspensión de las bacterias en tarjetas electrónicas que poseen paneles de reacciones bioquímicas. Se usan tarjetas con sustratos, la suspensión estandarizada de la colonia se inocula en la tarjeta y esta es sellada e incubada en el equipo donde se mide el desarrollo microbiano mediante un lector óptico que mide por colorimetría en un periodo de 5 a 15 horas.

Se calcula un valor cuantitativo (lo cual es el porcentaje de probabilidad) que compara el nivel de reacción observada y las reacciones habituales de cada organismo. Una concordancia perfecta entre el patrón de reacción de la prueba y la reacción única del organismo determinado mostraría un 99% de porcentaje de probabilidad. El intervalo de porcentajes de probabilidad en el caso de una opción es de 85% a un 99%. Los valores más cercanos a 99% indican una concordancia más estrecha al patrón habitual de un organismo determinado.

Figura 8.

Sistema: a) Equipo Vitek 2 Compact, b) set de tarjetas y c) sistema integrado.



Fuente: página especializada en equipamiento analítico labmedica.es

Descripción de Cada uno de las ocho Bacterias Encontrados

Gram positivos

Staphylococcus aureus

Su descubridor el médico Alexander Ogston en 1880, desde entonces ha sido considerado un inquilino porque se aloja en un ente biológico determinado con alto potencial para causar múltiples infecciones en humanos y animales. *Staphylococcus aureus* es una especie de las gran positivas considerada la más virulenta, causando varias enfermedades que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan la vida. En el ser humano se vuelven resistentes a muchos antibióticos, especialmente a la meticilina. A lo largo de los años ha causado morbilidad y mortalidad a pesar que se trata con gran cantidad de antibióticos disponibles. *Staphylococcus aureus* es parte de la flora humana normal, y del 25% al 50% de las personas sanas están colonizadas por esta bacteria, lo que representa un riesgo de propagación. El contagio se produce por el contacto con otras personas o la exposición al medio ambiente. Según el centro de enfermedades infecciosas en el 2005 este logro infectar a 94,360 personas en Estado Unidos, resistiendo a la meticilina. En los últimos años, *S. aureus*, ha ido provocando grandes infecciones afectando a personas sanas sin exposición previa a hospitales o clínicas de salud. Estas infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad pueden

desarrollar diferentes enfermedades, más comúnmente en la piel y los tejidos blandos. Gracias a los estudios de epidemiología molecular se ha ido observando el comportamiento evolutivo, así como conocer el origen de las clonas.

Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Rev Mex Patol Clin Med Lab. 2014.

Streptococcus faecalis

Streptococcus faecalis produce antibióticos que son activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Esta sustancia existe en medios sólidos y líquidos, así como en medios básicos definidos. Esta bacteria es propensa a proteasa, pronasa o tripsina, tiende a calentarse a 70 °C, su pH es ácido o neutro, se vuelve resistente cuando se trata con lipasa, lisozima, fosfatasa alcalina, ADNasa, ARNasa, además se puede someter a tratamientos de temperaturas inferiores (60 °C). Esta bacteria a comparación de otras ha sido purificada parcialmente mediante filtración en gel seguida de cromatografía de intercambio iónico. Tiene un peso molecular aproximadamente 2000. Este antibiótico combate contra cepas indicadoras seleccionadas de *Streptococcus faecalis* S-47 y *Escherichia coli* U-9. Las propiedades de esta sustancia, originalmente clasificada como bacteriocina, sugieren que se trata de un péptido antibiótico.

Ehling-Schulz, M., Knutsson, R., & Scherer, S. (2010).

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis, tiene capacidad natural para captar ADN extracelular, es por eso que dentro todas las especies de los bacillus es la más estudiada, al tener esa capacidad permite la modificación genética simple y la existencia esporulación, lo cual estas esporas sobreviven al calor, sequedad, radiación ultravioleta y gamma, a la depredación de microbios y macrobióticos, además se aísla a condiciones extraterrestres, desde el suelo hasta los hábitats marinos, se utiliza

en varios ámbitos como la producción de enzimas y la fermentación de alimentos hasta el control biológico de las plantas. *B. subtilis* es utilizado para estudiar la división celular, la secreción de proteínas, la motilidad de la superficie (natación, enjambre y deslizamiento), desarrollo de biopelículas, la unión a la raíz de la planta o las hifas fúngicas, la producción de metabolitos secundarios, el intercambio de citoplasma a través de nanotubos intercelulares, la liberación de vesículas extracelulares y discriminación por parentesco.

Ike, Y., Hashimoto, H., & Clewell, D. B. (1984).

Bacillus cereus

Al pasar los años ha ido evolucionado con un beneficio de prevención y control de enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por *Bacillus cereus*. En este capítulo se tendrá presente la información genómica de "cepas limítrofes", estas se centran en el genoma pan, el genoma central, el genoma accesorio y el mobiloma del grupo *B. cereus*. Lo cual servirá para el estudio de la especie en el grupo *B. cereus* que sugiere que el mobiloma de este grupo de especies es importante no solo para modelar su evolución, sino también para diferenciar y detectar los diferentes patotipos. Las cepas de *B. anthracis* y *B. cereus* son esenciales para la investigación de la patogenicidad, la ecología y la adaptación al huésped y al medio ambiente.

Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*.

Gram negativas

Sphingomonas paucimobilis

El género *Sphingomonas* está formado por 13 especies de bacilos gramnegativos no fermentadores, aerobios estrictos, oxidasa y catalasa positiva. Pertenecen a la familia Sphingomonadaceae, siendo *Sphingomonas paucimobilis* a la que se le asocia a varias infecciones en pacientes con defensas naturales debilitadas y a la utilización de medicamentos contaminados,

sistemas de agua hospitalarios. Entre las bacterias infecciosas se tiene a las bacteriemias, artritis, osteomielitis, peritonitis, infecciones cutáneas, endoftalmitis y brotes de neumonías. En cambio, a la *Sphingomonas* spp. Se le caracteriza por las bajas infecciones y mortalidad.

Sphingomonas paucimobilis su habitad de esta bacteria está entre los 25° a 36° C, donde se puede observar en clados y a temperaturas ya descritas, se cultiva en medios de cultivo, su crecimiento se limita en agar McConkey, pero no en el agar sangre y en agar tripticasa soya se caracterizan por ser planas y de 2 a 4 mm respectivamente lo cual adquieren un color amarillo durante la incubación.

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. (2006).

Roseomonas gilardii

Entre las bacterias ya descritas anteriormente esta es una de las más raras causando infecciones, es un cocobacilo gramnegativo. Desde 1991 (CDC) detecto esta bacteria en ocho pacientes causando infecciones policrobianas del catéter, lo cual 7 de estos *Roseomonas* fueron aislados en hemocultivos y uno en una lesión cutánea. La detección de esta bacteria se hizo mediante criterios de Rihs et al. Se caracterizan por ser susceptibles a muchos antibióticos, pero resistentes a la cefoxitina, ceftazidima y piperacilina. Se intento separar mediante electroforesis para llegar a la conclusión que era de la misma cepa, pero en el análisis se demostró que eran de una cepa única.

Alcalá, L., et al. Revista de bacteriología ambulatorio 35.10 (1997).

Pseudomonas stutzeri

Pseudomonas stutzeri descubierto en 1895 se caracteriza por crecer en temperaturas de 36° y 4°, se cultivan en medios de caldo de lisogenia, pueden duplicarse al pasar unos 53 minutos, es una bacteria del suelo Gram -negativa que es móvil, aislada como patógeno oportunista en humanos. En los últimos 15 años ha recibido una atención debido a su evolución, haciéndose

estudios de desnitrificación, algunas de ellas tienen la capacidad de transformación natural, algunas de estas cepas fijan nitrógeno; otros tienen la función de degradación de contaminantes o la interacción con metales tóxicos. Cuando se encuentran en medios sólidos estas se adhieren de una manera muy fuerte por lo cual es fácil de eliminarlo a todas las colonias.

Martínez, M. A., & Ovalle, A. (2013).

Escherichia coli

Enterobacteria pertenece al género de *Escherichia*, solo hay una especie la *coli* bacteria de gran negativa es decir si se tiñe con arte de gran se vuelve color rosa, puede vivir en bajas condiciones de oxígeno, su mecanismo de supervivencia es la fermentación de lactosa, no tiene la enzima oxidasa, vive en nuestro intestino, varias de las infecciones son endógenas son causadas por la misma flora del paciente, estas también desarrollaron la capacidad de causar enfermedades en el sistema nervioso central, urinario o gastrointestinal incluso en los huéspedes humanos más robustos. A estos microorganismos se le asocia a las infecciones gastrointestinales como las diarreas, causadas en todo el mundo.

En el ser humano al poco tiempo de nacer estos microorganismos coloniza el tracto gastrointestinal, estas permanecen inofensivamente en el intestino, pero en personas con baja capacidad de combatir infecciones la *E. coli* pueden causar infección incluso personas robustas o sanas pueden padecer de estas infecciones.

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

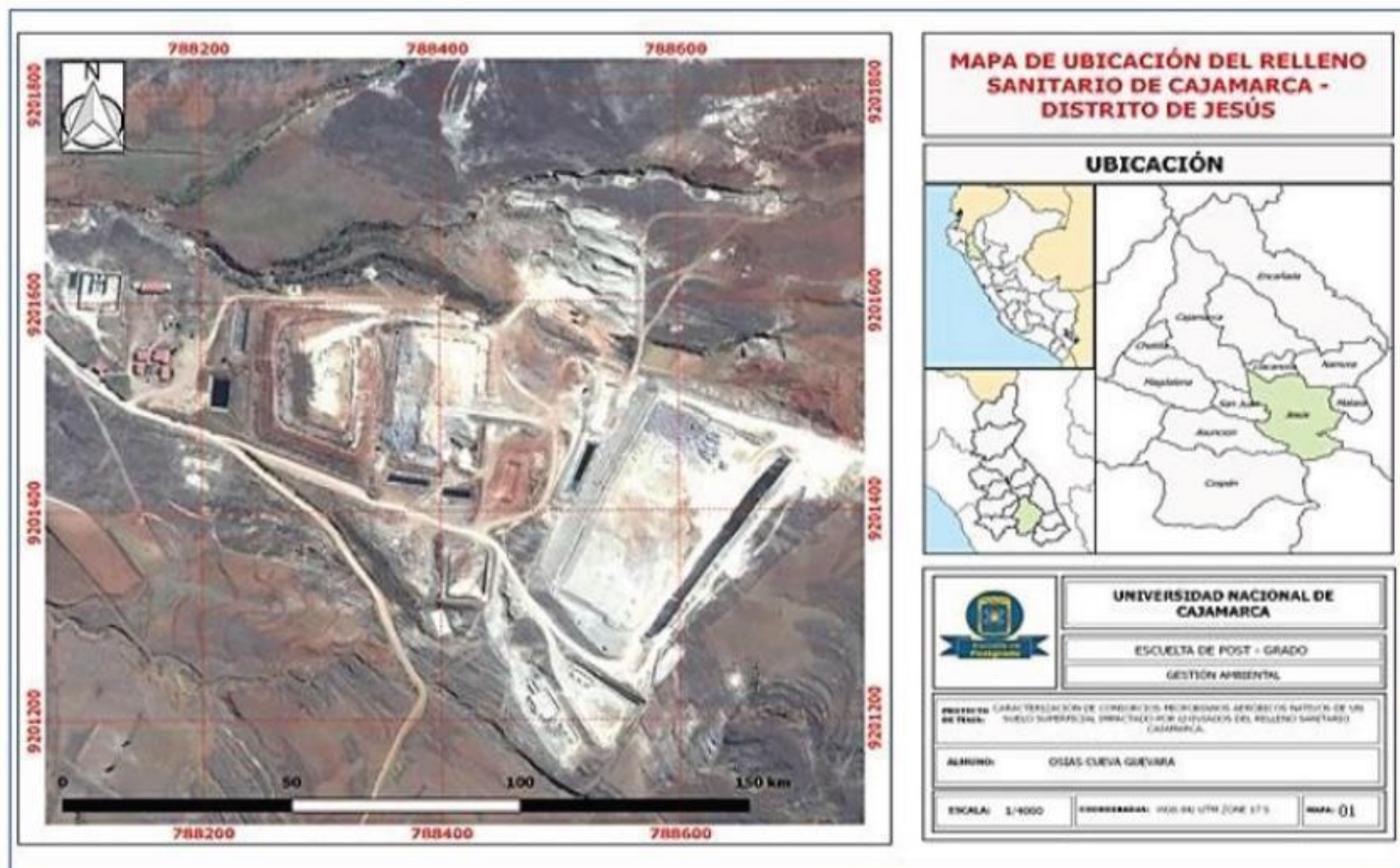
3.1. Ubicación geográfica

La zona muestreo se localizó en el área adyacente al Relleno Sanitario del Distrito de Jesús, Provincia y departamento de Cajamarca, ubicado a 2800 msnm, en el Km 13.8 de la carretera Cajamarca-Namora, a 1.9 km, Coordenadas UTM E 789377.69 - N 9197889.99 de Palturo y Atupampa (poblaciones más cercanas) y a 20 km de la Ciudad de Cajamarca. Durante el periodo experimental de doce meses, la temperatura ambiental en el área de muestreo registró un promedio 23.4°C con una máxima de 27.7°C y mínima de 19.1°C. La humedad relativa promedio fue de 33.5% y el fotoperiodo a 16/8 horas de iluminación y oscuridad, respectivamente. DIGESA 2009.

El área de estudio (Fig. 9), es un área de transición a las tierras de cultivo y pastoreo. La topografía es semi plana, con vegetación típica de la sierra, formaciones geológicas de origen fluvio-glaciar y rocas oxidadas en su superficie.

Figura 9

Ubicación del relleno sanitario Cajamarca.



Fuente: Elaboracion Propia.

3.2. Metodología

3.2.1. Recolección de muestras de suelo

Previo a la recolección de muestras de suelo, se realizó una visita al relleno sanitario y a los suelos aledaños con la finalidad de establecer las estaciones de muestreo del área de estudio. En esta visita, se constató la presencia de un significativo volumen de lixiviado discurriendo por la superficie del suelo (Fig.10). Se establecieron un total de siete estaciones que se georreferenciaron en sistema WGS 84 (Tabla 5). Ver anexo 2 ficha de campo.

Figura 10

Mapa de distribución de las estaciones de muestreo establecidas para la recolección de suelos.



Fuente: Propia.

Tabla 5

Estaciones de muestreo aplicadas en el muestreo de suelos georreferenciada en el sistema

wgs 84

Código de estación	Coordenada cuadrante 17 M	Altitud	descripción
M1	788519.00, 9201512.00	2832	A 50 metros de la poza de lixiviación del pit activo
M2	788510.00, 9201483.00	2835	A 70 metros de la poza de lixiviación del pit activo
M3	788503.00, 9201458.00	2833	A 40 metros de la poza de lixiviación del pit activo
M4	788519.00, 9201383.00	2834	En la zona de recolección de lixiviado del pit activo
M5	788443.75, 9201444.24	2836	A 20 metros de la poza de lixiviación de la zona aplicación del pit 2
M6	788344.00, 9201576.00	2833	En la franja derecha del pit (2) ya en cierre del área de ampliación
M7	788345.56, 9201448.42	2834	En la franja izquierda del pit (2) ya en cierre del área de ampliación

Figura 11

A 1) Lixiviados discurriendo por la superficie del suelo, a 2) recolección de muestra de suelo.



Fuente: propia

Las muestras del suelo impactado por los lixiviados fueron tomadas siguiendo las recomendaciones técnicas establecidas en la guía para muestreo de suelos consistente con el Decreto Supremo N° 002- 2013 MINAM, Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo (MINAM, 2017b), para áreas de contaminación de forma regular menores a 1 000 m², con un total de 7 muestras equidistantes, las cuales fueron mezcladas para lograr una muestra compuesta. De las muestras de suelo recolectadas se extrajeron 500 g de cada estación las y se almacenaron en frío a 4 °C para su posterior transporte a la ciudad de Lima, donde se realizaron los análisis físico-químicos y microbiológicos. En los laboratorios de la UNC se pesaron y homogenizaron las muestras para mezclar uniformemente los suelos. El resto de las muestras obtenidas se utilizaron para realizar el cultivo de microorganismos como se detalla líneas abajo para ejecutar la coloración gran. En el anexo uno se muestran más imágenes de los análisis realizados en campo y laboratorio.

3.2.2. Caracterización fisicoquímica del suelo aledaño al relleno sanitario en el Distrito de Jesús de Cajamarca

Las pruebas físico-químicas y microbiológicas del suelo se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Servicios Externos de la Universidad Cesar Vallejo de la sede San Juan de Lurigancho-Lima.

La determinación de pH se efectuó aplicando el método de pH -EPA SW 846-9045 D (EPA, 2015), para lo cual se pesaron 10 g de suelo en un frasco de vidrio y se adicionó 20 ml de agua destilada. Seguidamente, se introdujo un magneto y colocó el frasco en un agitador magnético durante 15 minutos. Luego de la agitación, la muestra quedó en reposo y se introdujo el electrodo para registrar la lectura de pH.

El valor de pH se calcula mediante el logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio, expresado en un rango de valores entre 0 y 14.

$$pH = - \log [H +]$$

La medición de la conductividad eléctrica (CE), se hizo mediante la norma EC-C 1 -A-3 (New South Wales, s.f.), para ello se pesó 10,0 g de suelo en un vaso de precipitación de 50 mL y se agitó a 15 rpm, durante 1 hora, para disolver las sales solubles. La agitación fue realizada utilizando un agitador magnético provisto de un magneto colocado en la solución. Posteriormente, la solución fue filtrada utilizando una bomba de vacío y papel filtro Whatman N° 42. La conductividad eléctrica fue medida de manera directa en el filtrado.

La medición del potencial de oxidación-reducción, se desarrolló por el método potenciométrico en unidades de mV, para lo cual se mezclaron 25 ml de la muestra de suelo secada al aire con 50 ml de agua destilada dispuesta en un matraz. Este sistema se colocó sobre un agitador magnético durante 5 minutos y se dejó reposar durante 40 minutos, al cabo del cual, se leyó directamente en

el potenciómetro en unidades de mV. La capacidad de intercambio catiónico (CIC), se midió aplicando el método de saturación con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), a pH 7. La humedad se determinó por el método gravimétrico, poniendo a secar 50 g de suelo original en la estufa hasta registrar peso constante. La materia orgánica se determinó mediante el método de pérdida por ignición en horno, primero a $110 \pm 5^\circ\text{C}$ y luego en mufla, a una temperatura continua de $445 \pm 10^\circ\text{C}$ hasta registrar peso constante, este parámetro se expresó en porcentaje.

La textura del suelo fue determinada por el método de Bouyoucos, para lo cual se pesaron 60 g de suelo tratado con 20 ml de H_2O_2 (8%) y secado al ambiente. Posteriormente se pesó 50 g de muestra y se la trató con 5 ml de oxalato de sodio (5 %) y 5 ml de meta silicato de sodio. Después se colocó la mezcla en una probeta, completando el volumen a 1 000 mL, con agua destilada. Finalmente, la mezcla fue agitada por 40 segundos y se colocó el hidrómetro.

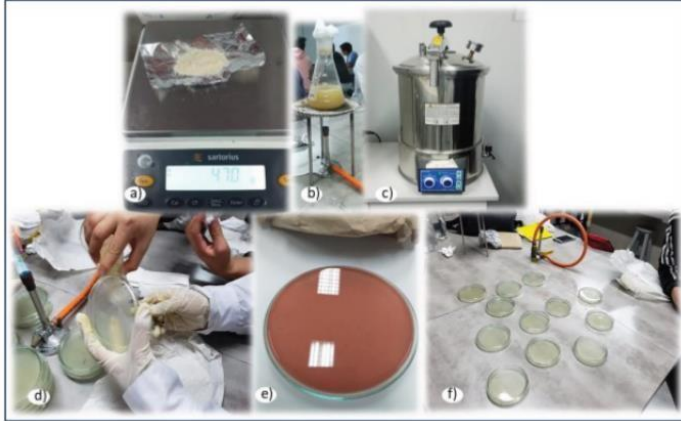
3.2.3. Metodología para el análisis microbiológico

3.2.3.1. Preparación del caldo nutritivo

Se pesaron 25 g de agar nutritivo y se disolvió en 1 litro de agua estéril para preparar el caldo nutritivo, que luego fue esterilizado en la autoclave a 121°C por 15 min. Un set de placas Petri fueron también esterilizadas y una vez frías, se procedió a verter el medio en la base de las placas Petri la cual fue tapada inmediatamente dejando al medio solidificarse. De la misma forma se preparó el agar Mac Conkey y el Agar Sangre (Figura 12).

Figura 12

Preparación de medios de cultivo: a) pesada de medio en polvo. b) disolución, c) esterilización. d), e) y f) vertido del medio de cultivo en placas Petri.



Fuente: Elaboración Propia

3.2.3.2. Aislamiento de microorganismos de las muestras de suelo y diluciones seriadas

Diez gramos de suelo fueron agregados en un frasco conteniendo 90 ml agua destilada estéril y, mediante un agitador magnético, la mezcla fue mantenida en agitación durante 30 minutos para extraer los microorganismos y lograr que estos queden suspendidos en el agua.

La primera dilución en serie (10^{-1}), fue preparada extrayendo con una pipeta volumétrica estéril, 1 ml estéril, 1 ml de la suspensión bacteriana, la cual fue depositada en un tubo de ensayo cargado con 9 ml de solución peptonada. Luego, se agitó para su inmediata homogenización y se separó 1 ml de la solución (10^{-1}) para verterla en un segundo tubo que contenía 90 ml de agua peptonada preparando así la segunda dilución 10^{-2} . Bajo esta metodología se prepararon las demás diluciones hasta alcanzar la dilución 10^{-6}

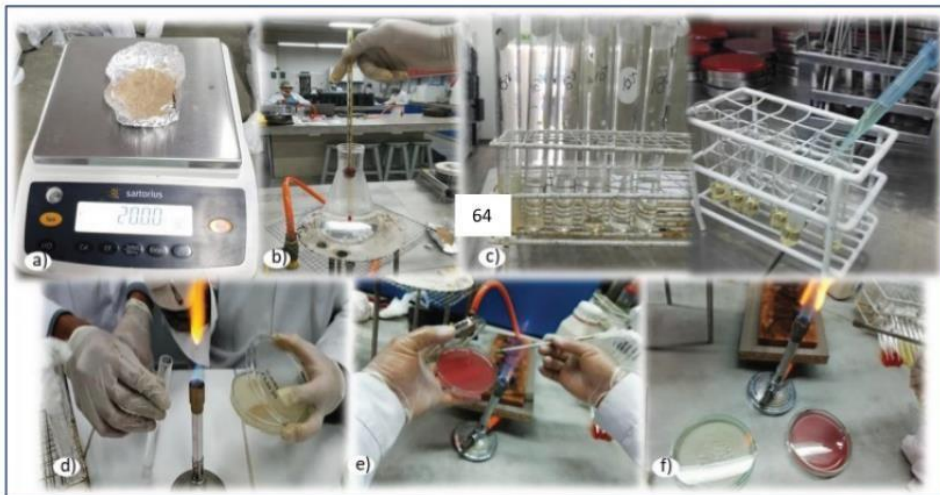
Una vez preparadas las diluciones seriadas, se procedió a sembrar 100 μ l de cada una de ellas en la superficie del medio de cultivo previamente preparado y dispuesto en cada placa Petri, con tres réplicas. Las placas una vez sembradas se incubaron durante 48 horas a 37 °C, generalmente se observaron las placas del orden de dilución de 10 donde se apreció con mayor nitidez la presencia

de los grupos bacterianos, según la metodología seguida por Benavides, y Hermida (2008), con diluciones adicionales 10^{-5} , 10^{-6} .

Una vez separadas las placas, se procedió a realizar una tinción Gram de cada una de las cepas, así como a identificar su crecimiento o ausencia en cada medio y se dio inicio a las pruebas bioquímicas (Figura 13).

Figura 13

Aislamiento de microorganismos: a) muestra de suelo en agitación b) suspensión de microorganismos, c) dilución seriada, d), e) y f) Siembra en medios de cultivo contenidos en placas Petri (incoloro: agar nutritivo y rojo: Agar Mac Conkey y sangre).



Fuente: Elaboración Propia

Aquellas cepas que resultaron ser Gram negativas fueron separadas para prueba de confirmación colorimétrica mediante el sistema Vitek 2 compact.

3.2.3.3. Tinción Gram

Este proceso ha requerido una serie de aplicaciones de colorantes, fijadores de color y de enjuagues consecutivos a la cepa bacteriana dispuesta en un portaobjetos, con la finalidad de que la cepa adopte un color en sus tejidos celulares para su identificación. A continuación, se detalla el procedimiento seguido según Covadonga, De Silóniz y Serrano (2010). Se preparó un frotis con

cada cepa aislada, para el efecto, sobre un portaobjetos esterilizado, se añadió una gota de agua estéril y sobre ella se dispuso una pequeña muestra de la cepa usando un asa y frotándola en la superficie del portaobjetos húmedo. Luego, el portaobjetos fue secado, haciéndolo pasar cerca a la llama del mechero “mirando hacia arriba”. Terminado el secado, se agregó colorante cristal de violeta sobre la superficie del frotis, se dejó reposar durante un minuto para su adsorción celular y con agua estéril para eliminar el colorante residual, se adicionó lugol (solución yodada), dejando reposar 30 segundos para fijar el colorante en las bacterias, luego se enjuagó nuevamente y se le aplicó alcohol- acetona de 80 grados, mientras la muestra permanecía en reposo por 15 segundos, lo cual permitió que las bacterias Gram positivas permanecieran de color violeta. Nuevamente, se lavó la muestra con abundante agua y se le agregó safranina, manteniéndolo en reposo por 1 o 2 minutos para teñir las bacterias Gram negativas. Seguidamente, la muestra fue enjuagada con agua destilada estéril y secada en mechero. Finalmente, a cada cepa tratada en el portaobjeto se le adiciono una gota de aceite de inmersión para luego observarla en un microscopio con resolución 100x (Fig. 14).

Figura 14

Tinción Gram: a) Placas petri con cepas bacterianas aisladas. b) reactivos-colorantes aplicados, e) probando el cristal violeta, e) y f) set de aislamientos por el metodo de dilución seriada.



Fuente: Elaboración Propia

La interpretación de los resultados, depende de los colores adquiridos por la cepa y se clasificaron como Gram+ o Gram-, distinguiendo, además, su morfología y su agrupamiento como: bacilos Grampositivos en cadenas, coco Grampositivo en tétradas, coco Grampositivo en racimos, bacilo Grampositivo aislado o en parejas, bacilo Gram negativo aislado, cocobacilo Gramnegativo.

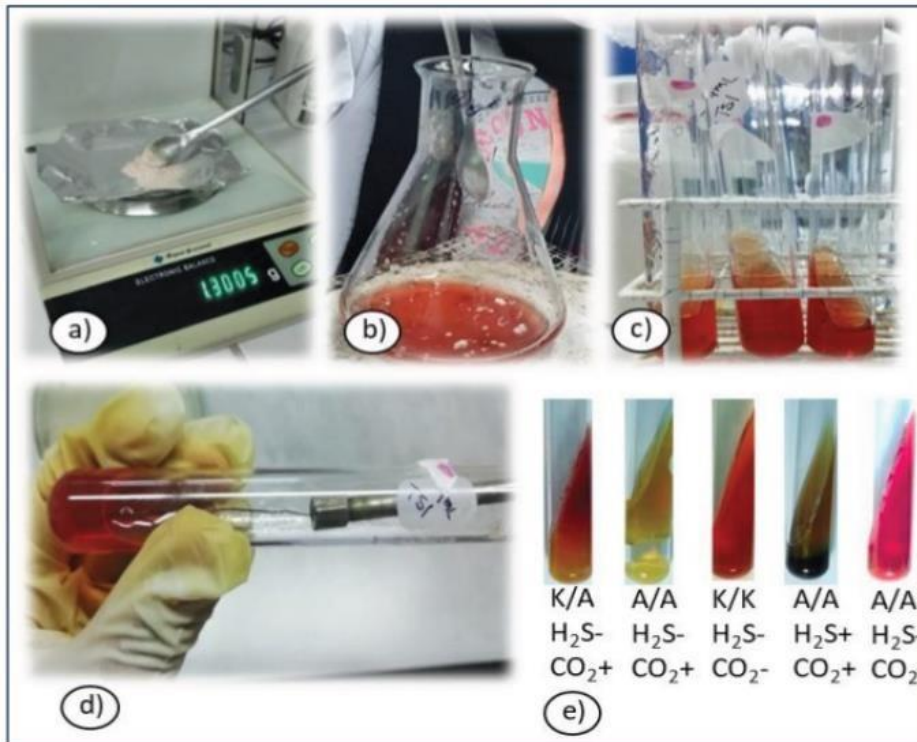
3.2.3.4. Pruebas de fermentación

Prueba TSI (Agar con azúcar triple y hierro)

Se preparó una solución de agar TSI a 65 por mil (solución de color rojo), para luego separar alícuotas de 4mL y colocarlas en tubos de ensayo para su posterior esterilización (121°C por 15 minutos). Posteriormente, se inocularon las cepas bacterianas e incubaron a 37°C por 24 horas. Finalmente, se observaron, macroscópicamente, los cambios ocurridos. La figura 15 muestra la metodología aplicada en la evaluación de cada cepa aislada (Benavides y Hermida, 2008).

Figura 15

Prueba bioquímica de TSI: a) Pesado del Agar TSI, b) color rojo del medio agar TSI preparado. c) muestras dispuestas en tubos de prueba para la prueba de pico. d) inóculo de la cepa en el medio TSI agar y e) códigos de resolución TSI.



Fuente: Elaboración Propia

Para el control de calidad (positivo), se preparó el cultivo de *Salmonella typhimurium* A TCC 14028 (K/A superficie/profundidad), con producción de gas (-) y H₂S (+). El control negativo se efectuó mediante el cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922, (superficie/profundidad A/A, producción de gas positivo y H₂S negativo).

Prueba de Voges Proskauer y Rojo de Metilo

En un recipiente apropiado, se pesó y agregó peptona 7g, fosfato di potásico 5g, glucosa 5g y se llevó a 1L de solución con agua destilada. Luego, se esterilizó en condiciones estándar y después se procedió a separar alícuotas de 9 ml del medio de color amarillo a fin de depositarlas en tubos

de ensayo, en los cuales se inoculó cada cepa aislada. Posteriormente las siembras fueron incubadas por un periodo de 48 a 72 horas, a 37 °C. Los resultados se obtuvieron al contacto con el alfa-naftol e hidróxido de potasio que mantienen el color amarillo y bajo el indicador rojo de metilo (Benavides y Hermida 2008), (Figura 16).

Figura 16

Prueba bioquímica aplicando MR/VP: a) reactivos para la preparación del medio, b) y c) preparación del medio, d) medio esterilizado, e) y f) separación de 2.5 ml en tubos de ensayo.

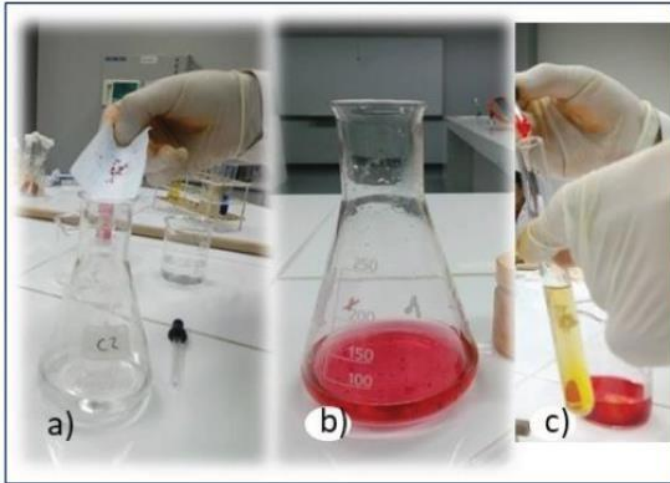


Fuente: Elaboración Propia

El indicador rojo de metilo fue preparado en una concentración de 0.1 g/L con 30 ml de alcohol etílico y agua destilada cuya solución tomó un color rojo intenso, esta solución fue adicionada (5 gotas) a los tubos incubados con cada cepa, dejando reposar entre 5 - 10 minutos. La reacción sería positiva siempre y cuando el cultivo cambiara del color amarillo al rojo o rosado por el indicado (Figura 17).

Figura 17

Prueba bioquímica aplicando rojo de metilo: a) y b) preparación del indicador, b) y c) aplicación del indicador en la superficie del tubo de prueba conteniendo la cepa.



Fuente: Elaboración Propia

Una vez preparado el caldo, se procedió a examinar los tubos y revelar las pruebas bioquímicas. Para el control positivo del rojo de metilo se usó la cepa *Escherichia coli* ATCC 2592 que viró a rosado/rojo y de VP, se usó el cultivo de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

3.2.3.5. Pruebas de oxidación Oxidasa

La metodología dispone depositar la colonia en la zona activa de la tira oxidasa y frotar con el asa, los resultados deben ser interpretados al cabo de 10-30 minutos.

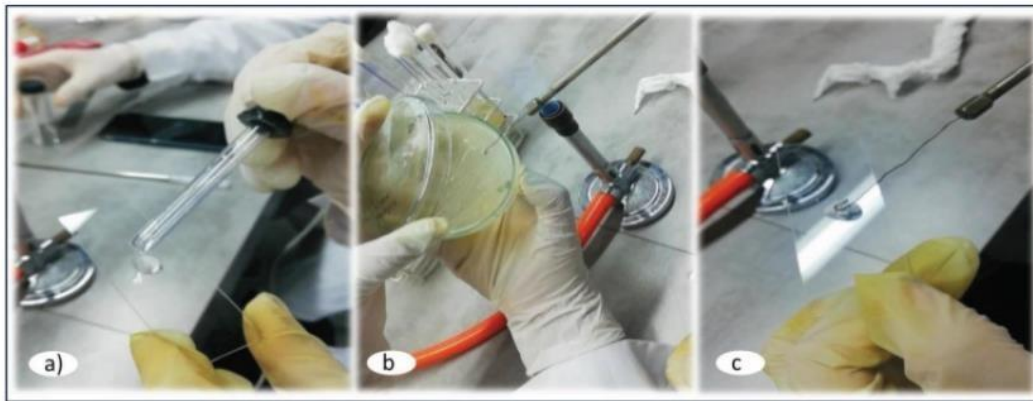
Prueba de Catalasa

La prueba de la catalasa es un método rápido para diferenciar la presencia de *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Todas las especies de *Streptococcus* son catalasa negativa y *Staphylococcus* son catalasa positiva” (Fernández, García, Saéz y Valdezate, 2010 p. 6). Para esta diferenciación, se empleó una placa de agar que contenía colonias bacterianas que demostraron ser cocos Gram positivos. Se depositó una gota de peróxido de hidrógeno (3% de solución), en un portaobjeto.

Luego, se separó con el asa una porción de las cepas la cual fue colocada en la placa portaobjetos para observar la formación de burbujas (Figura 18).

Figura 18

a) Solución peróxido en portaobjetos, b) Cultivo y c) prueba de catalasa en portaobjetos. Como control de calidad se aplicó una prueba positiva con una cepa de Staphylococcus aureus ATCC 25923.



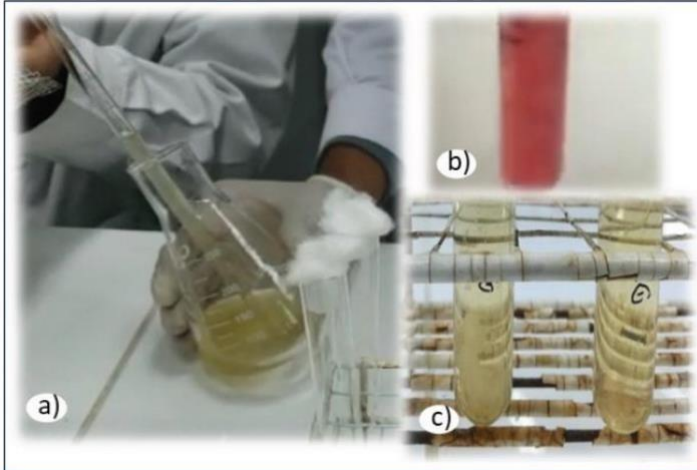
Fuente: Elaboración Propia

Prueba de reducción de nitratos

Con el uso de un asa bacteriológica, el medio de cultivo agar nitrato líquido, fue inoculado con la cepa en estudio de consorcios bacterianos e incubó a 37°C, durante 4 horas. Posteriormente, se añadieron dos gotas de los reactivos A y B de nitratos para revelar la ausencia o presencia de nitritos en el medio. La prueba de reducción de nitratos a nitritos es positiva cuando el medio cambia su color al rojo intenso, lo cual se debe a la presencia de nitrito. De otro lado, si se forma gas N₂, se observa la aparición de burbujas. La Figura 19, muestra la preparación del agar nitrato y los resultados positivos (18b) y negativos (18c).

Figura 19

Prueba de reducción de nitratos: preparación de medio agar nitrato, b) reacción positiva (nitritos), c) reacción negativa.



Fuente: Elaboración Propia

Para el control positivo se aplicó el cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2.3.6. Hidrólisis de Almidón

Esta prueba requiere de la preparación de un medio basal usando 20g de almidón, 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 5g de NaCl y 20 g de agar nutritivo, disueltos en 1 L de agua destilada estéril. Seguidamente, se le adiciona 1 g de almidón y se calienta el medio hasta disolver el reactivo (ebullición). Luego, una vez enfriado (60°C), se extraen alícuotas de 20 ml y se depositan en tubos de ensayo para su esterilización en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Finalmente, los medios estériles, son extraídos de la autoclave, puestos en posición inclinada y enfriados a temperatura ambiente (formación del pico de flauta). En la superficie del pico de flauta de los medios de cultivo, se siembran las muestras de las cepas bacterianas extraídas con un asa bacteriológica. Luego de la siembra se procede a la a la incubación por 48 horas a 35 °C, condiciones que favorecen el crecimiento bacteriano. Finalmente, se aplican dos gotas de lugol

para identificar la colonia bacteriana (Mendo, 2014). La Figura 20 muestra el procedimiento aplicado. Para el control de calidad (positivo) se usó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Figura 20

Prueba bioquímica de almidón: a) adición de lugol (morado), sobre la superficie de un tubo con almidón sembrado por picadura.



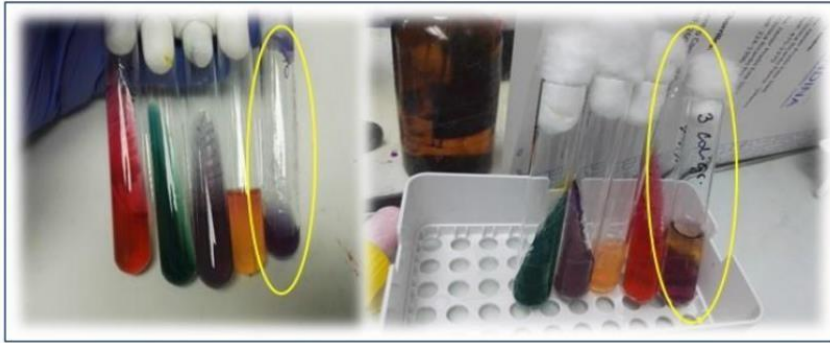
Fuente: Elaboración Propia

3.2.3.7. Acción de los microorganismos sobre proteínas, aminoácidos y motilidad Prueba del indol -medio de cultivo SIM (Movilidad)

La prueba de movilidad se efectuó en los tubos con medio SIM disuelto, al cual se le adicionó unas gotas del reactivo de Kovács y observó su desarrollo en la zona previamente picada donde se inoculó la cepa. La movilidad bacteriana se visualizó por los cambios desde el punto de siembra hacia toda la longitud extendida en el medio observado por la formación de una turbidez a lo largo de las estrías de crecimiento con un aspecto veloso (positivo), pero cuando la línea de siembra permanencia invariable, la prueba resultaba negativa. La prueba del indol, se desarrolló cuando se adiciono unas gotas del reactivo de Kovács sobre la parte superficial del cultivo SIM, la formación de un halo rosa conforma la producción de componentes indólicos (Benavides y Hermida, 2008). La Figura 21, muestra uno de los casos revelados de motilidad y reacción negativa ante la prueba del indol que aparece encerrado en amarillo.

Figura 21

Respuesta negativa a la prueba del indol, Motilidad y H₂S (tubo encerrado en color amarillo). Para el control de calidad positivo se usó la cepa Escherichia coli ATCC 25922.



Fuente: Elaboración Propia

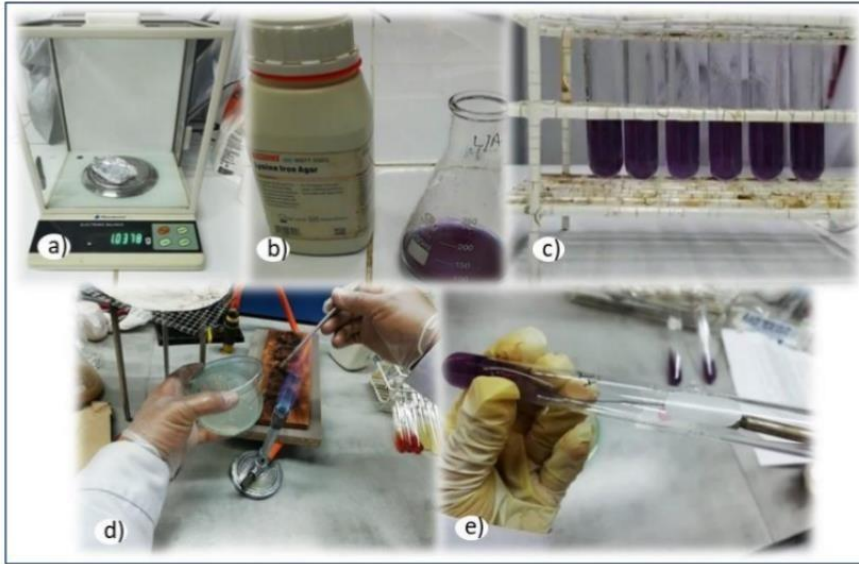
Prueba LIA (Descarboxilación Lisina)

Se pesó 34.56 g de agar LIA para ser disueltos en un litro de agua destilada (color de la solución: morado). La mezcla fue homogenizada por calentamiento en el mechero Bunsen, por unos minutos, para, luego extraer alícuotas de 4 ml de solución y depositarlas en tubos de ensayo inclinado. En esta posición, los medios enfriaron, solidificaron y formaron el pico de flauta, en cuya superficie se inocularon, por estriado, las bacterias. Luego de la siembra, los medios fueron incubados durante 24-48 horas, a 37°C (Benavides y Hermida, 2008). La Figura 21 muestra el procedimiento seguido en esta prueba bioquímica.

La cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 fue usada como parte del control de calidad, la cual, al descarboxilar a la lisina produce una coloración púrpura en el fondo del medio de cultivo (positivo). Contrariamente, la reacción se considera negativa cuando la superficie del medio de cultivo mantiene el mismo color púrpura, además, no produce H₂S.

Figura 22

Prueba bioquímica de LIA: a) y b) preparación de medio LIA, c) disposición de solución LIA en tubos de prueba, d) y e) inoculación de cepas en tubos.



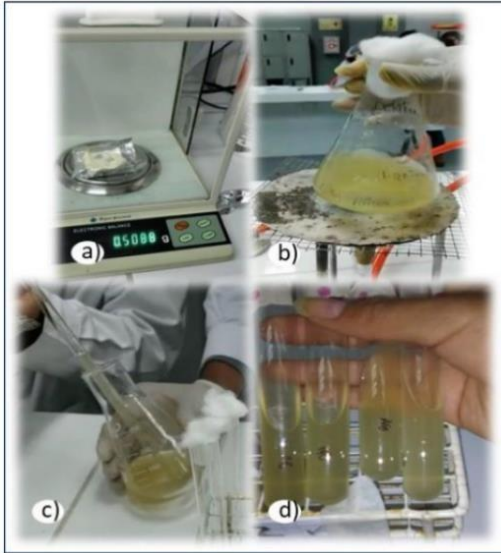
Fuente: Elaboración Propia

Licuefacción de Gelatina

Para esta prueba se preparó un medio de cultivo a base de 3g de extracto de carne, 5g de peptona y 120 g de gelatina. La mezcla de estos constituyentes fue homogenizada por calentamiento en un mechero Bunsen. Luego se vertieron 4 ml de medio en cada tubo de prueba, cuyo conjunto fue esterilizado en autoclave por 15 minutos a 121 °C (Mendo, 2014). Acto seguido, cada set de tubos se dejó solidificar en forma inclinada a fin de formar el pico de flauta. Luego, mediante el método de punción, se realizó la siembra de las bacterias. Finalmente, las siembras fueron incubadas a 37 °C de temperatura durante 48 a 72 horas para ver los resultados del crecimiento bacteriano (Figura 23).

Figura 23

Prueba bioquímica de gelatina: a) y b) preparación de medio agar de gelatina, c) y d) disposición de solución gelatina en tubos de prueba.



Fuente: Elaboración Propia

Para el control de calidad se usó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.2.3.8. Coagulasa

A partir del polvo de plasma liofilizado de conejo, liofilizado y conservado entre 28°C. El medio de cultivo para esta prueba fue preparado a base de 0.5 g de polvo de plasma liofilizado de conejo, el cual fue depositado en un vial y disuelto con 10 ml de oxalato sódico (plasma reconstituido), movimientos lentos para evitar la formación de burbujas. Luego, sobre un volumen de 0.5 ml de plasma reconstituido, se inocularon las cepas de interés. Finalmente, los inóculos fueron incubados durante 18 horas a 37°C (Figura 24), (Fariña, Carpinelli, Samudio, Guillén, Laspina, Sanabria et al.2013).

Figura 24

Tubos de ensayo recientemente inoculados en la prueba de coagulasa.



Fuente: Elaboración Propia

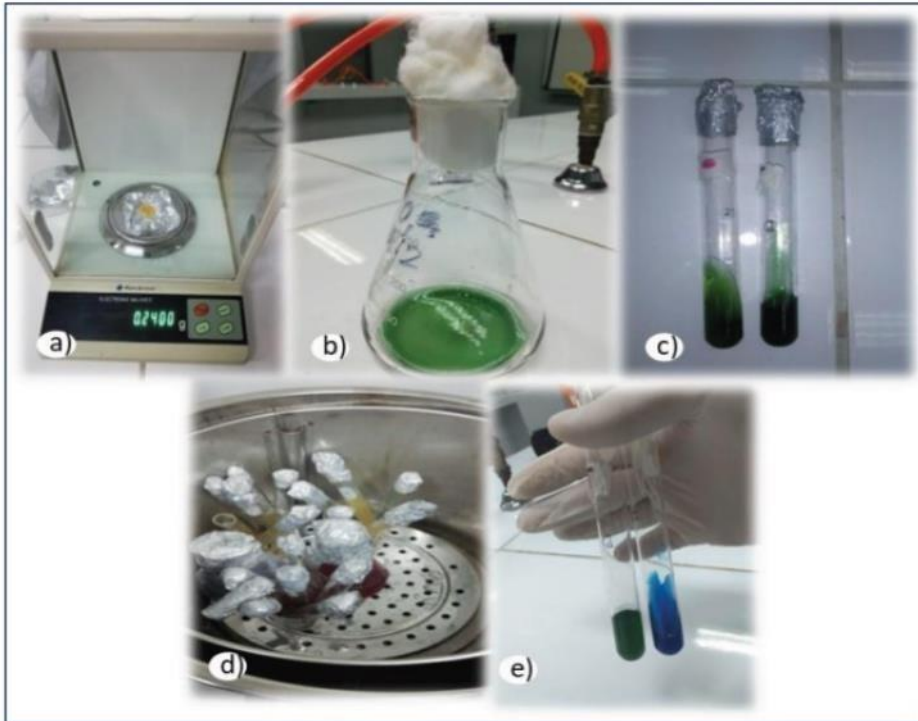
3.2.3.9. Acción de microorganismos sobre el citrato de Simmons

Para preparar el medio de cultivo, se pesó 24.2 g de citrato de Simmons, el cual fue disuelto en un litro de agua destilada y homogenizado por calentamiento con un mechero bunsen. Luego, alícuotas de 4 mL de solución fueron depositadas en tubos de prueba y esterilizadas en autoclave por 15 minutos, a una temperatura de 121 °C (Mendo, 2014).

Los medios estériles fueron enfriados a temperatura ambiente y en posición inclinada para formar el pico de flauta, en cuya superficie se practicó la siembra de las cepas bacterianas, utilizando el método de punción. Finalmente, las siembras fueron incubadas a 37°C durante 24 a 72 horas, para observar si había crecimiento bacteriano (Figura 25). Para el control de calidad se usó la cepa *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Figura 25

Prueba bioquímica de citrato de Simmons: a) pesada de reactivo b) solución del medio, c) separación del medio en tubos de prueba, d) esterilización y e) algunos resultados obtenidos (cambio positivo: azul).



Fuente: Elaboración Propia

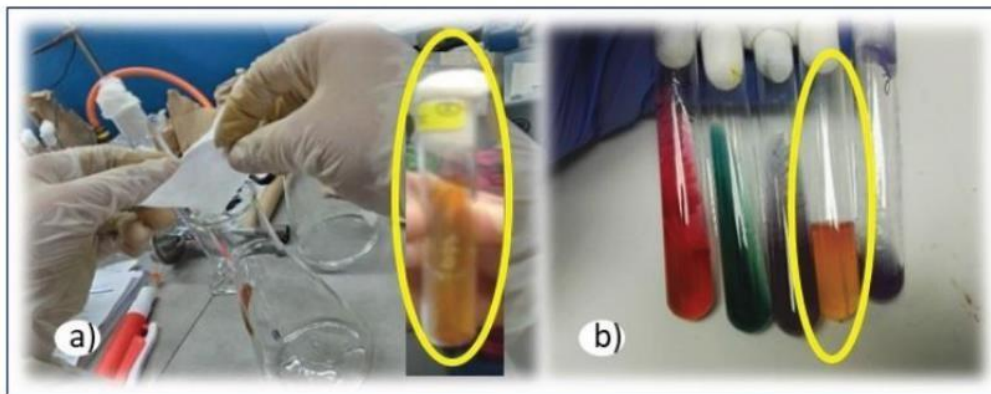
3.2.3.10. Acción de microorganismos sobre la urea

Esta prueba necesitó de la preparación de un caldo agar urea de Christensen, a una concentración 3.87 gr/L, el cual fue esterilizado en condiciones estándar y se dejó reposar hasta los 50°C. Alcanzada esta temperatura se añadió 23.5 g de urea estéril en polvo y propició su solubilización. Luego, el caldo se dividió en partes de 5ml (color amarillo), las cuales fueron depositadas en tubos de ensayo. Luego de su enfriamiento, se sembraron las colonias bacterianas utilizando el método del estriado e hizo la inoculación de las siembras a 37°C por un tiempo de 24 a 48 horas (Mendo, 2014).

Como control de calidad se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 cuyo crecimiento negativo (-), fue evidenciado por el color amarillo del medio. También se usó la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 cuyo crecimiento positivo (+), fue reconocido por el cambio de color hacia el rosado (Figura 26).

Figura 26

Prueba bioquímica de agar urea: a) preparación del medio y b) solución del medio ya inoculado.



Fuente: Elaboración Propia

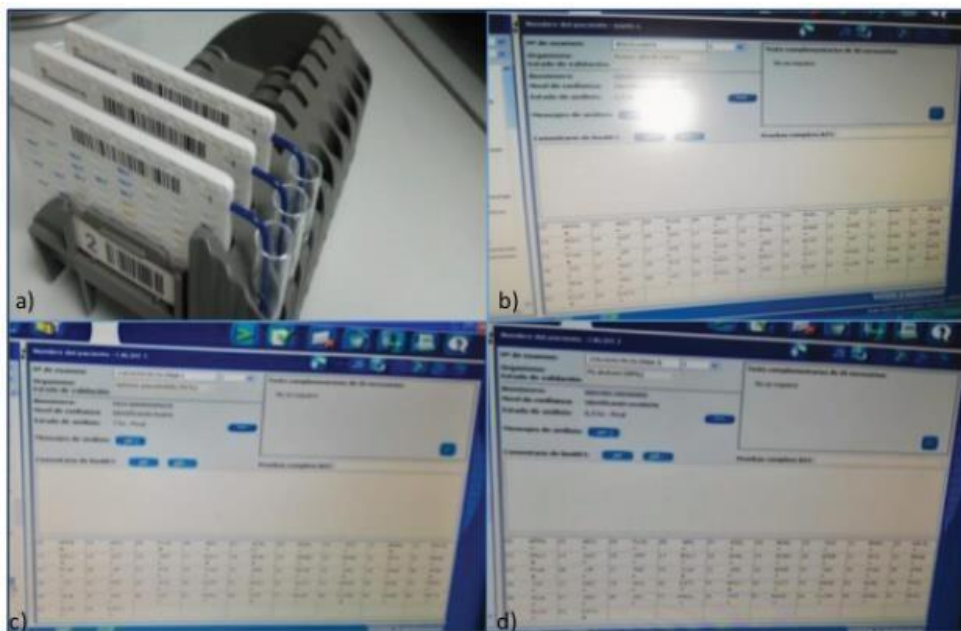
3.2.3.11. Tecnología Colorimétrica avanzada para la identificación de bacterias Gram negativas

Este análisis fue efectuado en el Laboratorio Universidad Cesar Vallejo, ubicado en la ciudad de San Juan de Lurigancho Lima. Laboratorios externos de servicios. Para cumplir con nuestro propósito, las cepas aisladas durante los cultivos destinados a la tinción Gram y pruebas bioquímicas, fueron separadas y puestas en un tubo de ensayo de plástico transparente conteniendo 3 mL de una mezcla de sales estériles (solución acuosa compuesta de 0.45 a 5% de cloruro de sodio y pH comprendido en el rango de 4.5 a 7.0), con un rango de turbiedad de 0.50 a 0.63 unidades en la escala de McFarland, medido con el densitómetro DensiChek™.

El tubo con la suspensión bacteriana se dispuso en el casete y este a su vez conteniendo las muestras incorporadas al sistema VITEK 2, el cual desarrolló un proceso interno de inoculación hacia los micro canales que llenaron los pocillos de la tarjeta. Una vez efectuado esto, se cortó la transferencia de inóculo sellándose el sistema para iniciar la carga en el interior del “carrusel-incubador” en línea, a $35.5 \pm 1.0^\circ \text{C}$. Luego, cada tarjeta fue removida en 15 minutos, conducida hacia el sistema óptico de medición en unidades de transmitancia, donde se aplicó un barrido de distintas longitudes de onda, todas en el espectro visible, interpretándose las reacciones de turbiedad o de color producidos por las bacterias. Este proceso duró 6 horas y media para el análisis de dos cepas bacterianas y 7 horas para la tercera cepa con una confiabilidad del 90%. La Figura 27 muestra el proceso de micro- inoculación hacia las tarjetas dispuestas y los resultados en la pantalla del procesador del equipo Vitek 2 compact.

Figura 27

a) Micro-inoculación de suspensión bacteriana desde tubos de ensayo a tarjetas, b) y c) pantallas mostrando resultados de las lecturas ópticas para la identificación bacterias.



Fuente: Elaboración Propia

3.3. Técnicas e instrumentos de recopilación de información

Los datos fueron recolectados haciendo uso de las técnicas de observación, mediciones y su correspondiente registro en fichas las que se muestran en los resultados. La confiabilidad de los datos depende de las calibraciones realizadas en cada equipo, previo a las mediciones de cada parámetro fisicoquímico.

3.4. Técnicas, instrumentos y análisis de la información

- Se aplicaron imágenes satelitales de uso libre (Google Earth), para la elaboración de mapas georreferenciados mediante el GPS, haciendo uso del software QGIS 2.4 (Q GIS, s.f.), para determinar la carta de posiciones de los suelos adyacentes al relleno sanitario del distrito de Jesús en Cajamarca.
- Registro en bitácora como consecuencia de la observación directa durante la prospección en campo, la colecta de muestras de suelos y el levantamiento de información sobre el estado ambiental. Ver anexo 2, Registro de campo.
- Registro fotográfico de la condición real detectada en los suelos aledaños durante la colecta de muestras de suelo para su caracterización fisicoquímica y microbiológica.
- Registro bibliográfico mediante fichas resumen de la literatura revisada respecto a las condiciones del relleno sanitario y el lixiviado generado en dicha infraestructura.

3.5. Equipos, Materiales e insumos

Para el muestreo de suelos se empleó una pala muestreadora de suelo, se utilizó un (GPS) y materiales como bolsas de cierre hermético ziploc de 1kg y espátulas de acero inoxidable para la colecta de muestras.

El análisis de las características fisicoquímicas del suelo, se efectuó mediante un equipo pHmetro para la determinación de pH y potencial redox, conductímetro para medir la conductividad eléctrica. Material de vidrio.

3.5.1. Equipos e instrumentos

- pH-metro HANNA / HI 8424
- Balanza Analítica Sartorius (0.0001 g) QUINTIX224 -1S/34650280
- Estufa de secado de convección natural digital RAYPA DAF 43/53039
- Cámara de flujo laminar ESCO Ductless ADC - AC 3
- Equipo automatizado Vitek compact 2
- Conductímetro BASIC / D70 12292
- Autoclave KINTEL YX 18HDJ

3.5.2. Materiales para la preparación de medios de cultivo, aislamiento de bacterias y diluciones seriadas

En la Tabla 6 se presenta los materiales e insumos usados en las pruebas microbiológicas.

Tabla 6

Equipos y materiales empleados.

Equipos y materiales por actividad		
Aislamiento de bacterias	Medio de cultivo	Diluciones seriadas
10g de suelo	Mechero	Rotor
Matraz	Rastrilla	Agua estéril
Agua estéril	Placas Petri	Mechero
Mechero	Plumón indeleble	Rastrilla
Rastrilla	Estufa	Plumón indeleble
Placas Petri	Algodón	Gradilla
Plumón indeleble	Agar Nutritivo	Algodón
Estufa	(Agar-Agar) Agar	Tubos (5)
Algodón	Mac Conkey Agar	Pipetas de 1000 ul - 100 ul
Pipetas de 1000 ul	Sangre Agar	
	Chromo Agar	
	Tubos (5)	
	Pipetas de 1000 ul - 100 ul	

Fuente: Elaboración Propia

3.5.3. *Materiales para siembra y pruebas bioquímicas*

La Tabla 7 resume los materiales y reactivos empleados en cada una de las pruebas bioquímicas realizadas.

Tabla 7*Equipos, materiales y reactivos empleados en las pruebas bioquímicas*

Prueba bioquímica	Equipos, materiales y reactivos
Tinción Gram	Mecheros Bunsen cargados con gas, filtros, portaobjetos, placas petri con cultivos bacterianos sembrados en medio de agares, asa de siembra, pipetas, agua destilada, lugol, mezcla de alcohol/acetona 1:1, safranina, cristal violeta, microscopio óptico.
Catalasa	Solución de H ₂ O ₂ al 3% para el resto de bacterias y asas o bastones de plástico desechables (almacenado en refrigeradora entre 2 y 8°C y en total oscuridad).
Oxidasa	Cintas de papel reaccionante conteniendo dicloruro de N, N- dimetil -1,4- fenilendiamonio 0.1 μmol; 1-naftol 1,0 μmol y asas de inoculación.
Coagulasa	Tubos de ensayo: plasma-coagulasa, EDTA, asas de inoculación, pipetas Pasteur, agua destilada.
Voges Proskauer Rojode metilo	Agar MR-VP, asas de inoculación, Rojo de metilo y Voges Proskauer(alfa naftol).
LIA (descarboxilación de lisina)	Agar Lisina Hierro en polvo, agua destilada estéril, asas.
TSI (Agar con azúcar triple y hierro) H ₂ S	Medio en polvo de agar con azúcar triple y hierro.
Glucosa D	Tubos de prueba, medio de Hugh-Leifson, medio agar semisólido, que contiene una solución peptonada al 0,2% glucosa al 1% y azul de bromotimol (usado como indicador de pH). Aceite de parafina estéril. Asas de inoculación.
Ureasa	Agar urea de Christensen (con el medio en pico de flauta). Asas para inoculación, agua destilada estéril. Tubos de prueba esterilizados.
Reducción de Nitrato	Agar nitrato. Ácido sulfamínico al 0.8% disuelto en ácido acético glacial(5N) aplicado la identificación de nitritos. Solución B preparado a partir de α-naftilamina al 0.5% en ácido acético glacial (5N) añadido después de la incubación.
Citrato de Simmons	Medio agar citrato de Simmons en polvo. Mecheros. Asas. Gradillas. Pizeta. Pipetas de 1.0 ml. esterilizadas.
Licuefacción de Gelatina	Agar gelatina disuelta (128 g en un litro de agua estéril, calentada mediante agitación constante a 50 °C y autoclavada a 121 °C por un periodo de 15 minutos.
Hidrolisis de Almidón	Agar de almidón, peptona, extracto de extracto de carne, cloruro de sodio y agar nutritivo. Mecheros. Gradillas. Asas de inoculación. Placas de Petri. Pipetas volumétricas de 1.0 mL. Pinzas estériles.
Movilidad (SIM) Indol	Medio agar semisólido SIM, mecheros, asas, gradillas pizeta, pipetas de 1.0 mL. Estériles, pipetas Pasteur estériles.

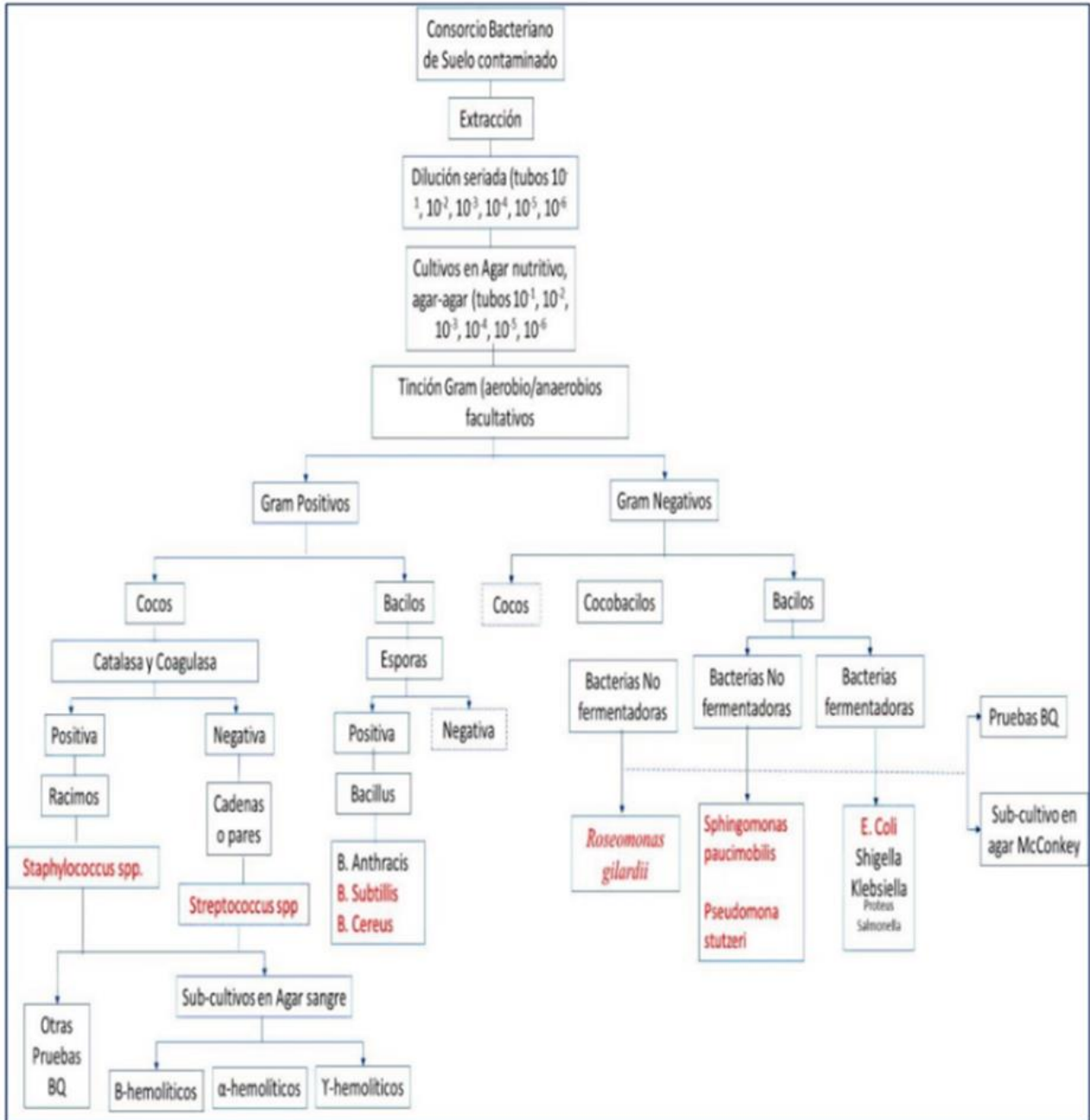
Fuente: Elaboración Propia

Procedimiento de muestreo aplicado en el trabajo de Investigación

En la Figura 28, se muestra el procedimiento aplicado, incluyendo a las pruebas bioquímicas y cultivos selectivos y diferenciales usando agar sangre y agar Mac Conkey. Las muestras fueron colectadas en una sola ocasión, a partir de un muestreo compuesto en diferentes zonas donde se evidencio la contaminación por lixiviados. Luego se procedió a homogenizar la muestra compuesta para su envío al laboratorio. Las muestras fueron colectadas a una profundidad de 10 cm ya que el objetivo de la investigación fue determinar la presencia de microorganismo aerobios, mayores profundidades no cumplen con esta condición.

Figura 28

Procedimiento final aplicado para identificar un consorcio bacteriano a partir de un suelo impactado por el lixiviado del relleno sanitario del Distrito de Jesús en Cajamarca.



Fuente: Elaboración Propia

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis físico químico del suelo impactado por el lixiviado del relleno sanitario

Cajamarca.

La elevada conductividad eléctrica del suelo (482.13 uS/cm) puede haber favorecido un cambio en la estructura de la comunidad microbiana a favor de los microorganismos tolerantes a la salinidad. En efecto, los valores del potencial redox (-40.83 mV) y el PH (7.41), son indicadores de la presencia de una comunidad bacteriana aerobia o facultativa capaz de tolerar estas condiciones extremas, caracterizadas por la baja disponibilidad de varios elementos nutritivos para el crecimiento y desarrollo de las poblaciones microbianas en su conjunto, de manera que, cada tipo de microorganismo se adaptó a condiciones específicas. Respecto a la capacidad de intercambio catiónico, este valor puede ser normalmente hallado en suelos de tipo arcilloso (< 30%) (Casanova y Benavides, 2009), como es el caso en la presente investigación, cuyo contenido de arcilla (7.45%), explica el valor negativo del potencial redox y su tendencia a sufrir anegamientos por la periódica deposición de lixiviados procedentes del relleno sanitario y por ende dificultades para el drenaje de los líquidos incluido el agua, estos encharcamientos limitarían la disponibilidad e intercambio de aire y particularmente oxígeno en el suelo, haciendo menos practica la respiración microbiana. Con un potencial redox de -40.83 mV, se provoca un ambiente reductor de convivencia entre microorganismos aerobios y facultativos favoreciendo más a las bacterias autóctonas que a los hongos en estos regímenes redox fluctuantes (Tabla 9).

Tabla 9

Propiedades fisicoquímicas del suelo impactado por el lixiviado del relleno sanitario Cajamarca.

	pH	Conductividad Eléctrica (dS/m)	Potencial redox(mV)	M.O. (%)	H (%)	CIC (meq/100g)
	7.71	480	-42	3.82	5	21.14
	7.12	483.2	-40	3.5	5.13	20
	7.4	483.2	-40.5	3.65	5.5	20.6
Promedio	7.41	482.13	-40.83	3.66	2.21	20.58
Desv est.	0.295	1.848	1.041	0.16	0.26	0.57

Fuente: Elaboración Propia

El elevado contenido de materia orgánica (3.66%), con regularidad se lo encuentra asociado a la arcilla (Casanova y Benavides, 2009), formando el complejo de cambio del suelo y estableciendo una reserva de nutrientes, tanto para las plantas como para los microorganismos, propiedad que no es plenamente aprovechada por estos organismos debido a las limitaciones impuestas por los factores antes descritos. El suelo presenta un pH ligeramente alcalino con pH que fluctúan entre 7.12 a 7.71.

4.2. Resultados de los análisis bioquímicos

Los aislamientos efectuados correspondieron a la muestra de suelo proveniente de las áreas adyacentes al relleno sanitario del distrito de Jesús de Cajamarca. En ella se logró identificar ocho cepas bacterianas *Sta MÉTODOS ylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Roseomonas gilardii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*. Estas se agrupan en 2 filos, 3 clases, 6 órdenes y 7 familias (Tabla 31).

Luego de las 48 horas de incubación a 37°C del extracto diluido y aplicado mediante la siembra por agotamiento en agar nutritivo y agar-agar, se obtuvo cultivos a los cuales se les aplicó la prueba de tinción de Gram.

Tabla 10

Resultados de Tinción Gram

Código colonia	Detalle morfológico	Tinción Gram
BRS1	Colonias grandes ligeramente amarillas, brillantes y lisas. Cocos Gram positivo, no esporulado, grupos irregulares similares a racimos de uvas	Cocos Gram positivos.
BRS2	Colonias de formas redondas, lisas, borde irregular consistencia cremosa, grandes, planas, algo secas.	Bacilo Gram positivo con endoesporas.
BRS3	Colonias pequeñas, cremas, opacas y lisas formando parejas o cadenas cortas.	Cocos Gram positivo.
BRS4	Las colonias crecieron como colonias uniformes rosadas, móvil, formadora de esporas.	Bacilo Gram positivos con endoesporas.
BRS5	Colonias con aspecto mucoso, en agar nutritivo, no esporulado, colonias de color amarillo en agar nutritivo.	Cocobacilo Gram negativo.
BRS6	Colonias lisas de forma algo convexas y abultada, en agar nutritivo; colonias de tono amarillo en agar nutritivo de tipo circular e irregular formando grupos en forma de rosas.	Bacilo Gram negativo no esporulado.
BRS7	Colonias amarillas, de forma algo rugosa en los bordes de filos lisos con un centro como si fuera un botón algo convexas con forma de disco que irradian desde el centro	Bacilo Gram negativo no esporulado.
BRS8	Colonias grandes de forma circular, brillante y lisas. Bacilos no esporulados color rosado opacas de formas circulares y algo convexas con filos suaves.	Bacilo Gram negativo.

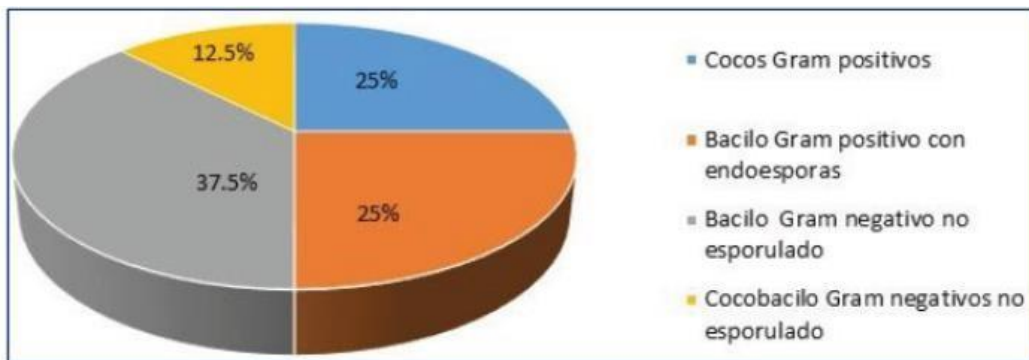
Nota: antes de conocer a los organismos analizados se les asignaron códigos (BRS1... BRS8) lo que permitió un mejor manejo de las cepas previo a su identificación.

En la Tabla 10, se muestra los resultados de la morfología de las colonias observadas y cultivadas en agar nutritivo, agar-agar y tinción Gram.

De acuerdo a la Figura 29, el 50 % de las cepas correspondieron a grupos cocos Gram positivos y bacilos Gram positivos esporulados, mientras que el grupo con más representación correspondió a bacilos Gram negativos no esporulados con 37.5 %.

Figura 29

Porcentajes de grupos bacterianos hallados en el extracto de suelo lixiviado.



Fuente: Elaboración Propia

De la figura 29 podemos observar que el mayor grupo de organismos colectados son bacilos gram negativos no esporulados. Esto se debe a que son unos de los grupos que más predominan en el suelo (Lloyd. 2000).

4.2.1. Medios selectivos y diferenciales

La Tabla 11, muestra los resultados obtenidos en los cultivos de las colonias realizados en los cultivos de sangre y Mac Conkey.

Tabla 11*Características de las colonias sembradas en medios sólidos*

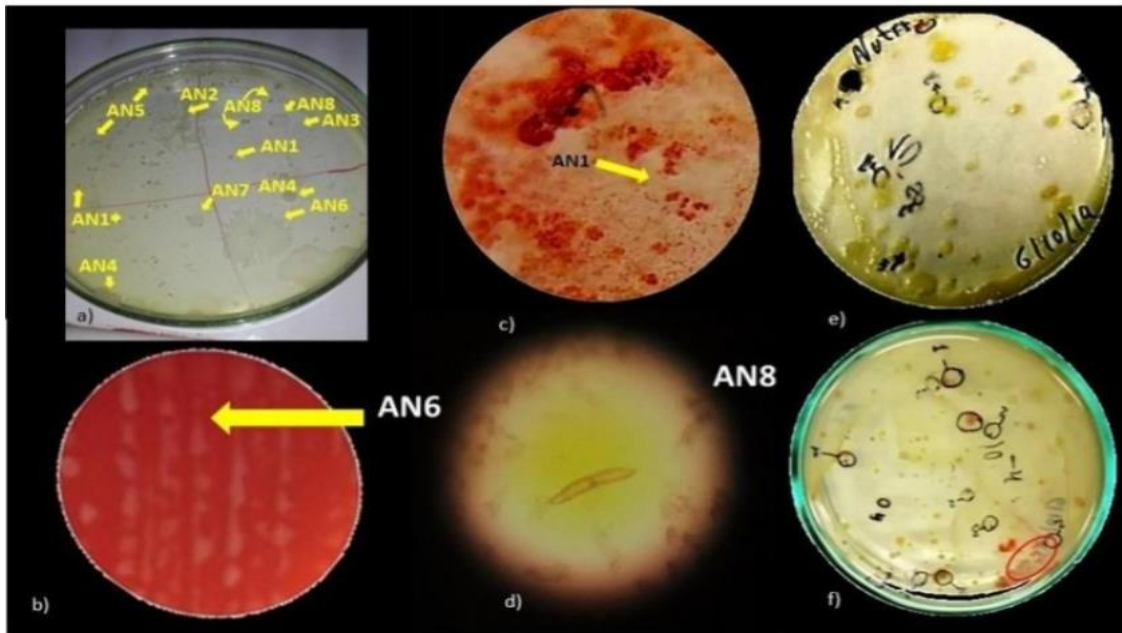
Medio de cultivo	Código	Detalle morfológico
Agar sangre	BRS 1	Buen crecimiento, con rasgos β Hemolítica. Colonias de consistencia cremosa y tono amarillento, filos lisos, algo curvo.
Agar sangre	BRS 3	Colonia opaca y blanca gamma hemolítica. Colonias grandes beta hemolíticas con aspecto de bastón
Agar sangre	BRS 2	uniformes, de aspecto blanquecino liso, mucoide,
Agar sangre	BRS 4	Colonias grandes, beta hemolítica, tono vidrioso formando cadenas.
Agar sangre	BRS 6	Colonias irregulares, acuosas y móviles, no hemolítica.
Agar sangre	BRS 5	Colonias redondas de tono rosado y muy mucosas, no hemolítica. Colonias pequeñas de tono amarillento, protuberantes,
Agar sangre	BRS 7	algo secas y ondeadas corrugadas, sin hemólisis se adherían a la superficie.
Agar sangre	BRS 8	Colonias circulares, tamaño de mediano a grande de color blanco, superficie brillante, densidad opaca y elevación convexa.
Agar MacConkey	BRS 7	Colonias elevadas, rizadas, arrugadas con bordes regulares, sin fermentación.
Agar MacConkey	BRS 8	Colonias rosado-rojizas.
Agar MacConkey	BRS 6	Negativo.
Agar MacConkey	BRS 5	Negativo.

Fuente: Elaboración Propia

La observación en microscopio 100x (Figura 30), ha permitido caracterizar a los microorganismos en sus diferentes formas a las 48 horas de incubación en agar sangre y evaluar la presencia de bacterias hemolíticas en el medio Mac Conkey para diferenciar entre Gram negativos, bacilos y entéricos fermentadores de lactosa.

Figura 30

Medios de cultivo a) agar-agar (medio general), b) agar sangre c) tinción Gram en medio agar-agar, d) agar Mac Conkey, e y f) agar nutritivo (medio general), para la identificación de bacterias de suelo impactado con lixiviado de relleno sanitario.



Fuente: Elaboración Propia

4.2.2. Pruebas Bioquímicas

La Tabla 12, muestra una lista de las diferentes pruebas bioquímicas realizadas en la presente investigación.

Tabla 12*Principales pruebas bioquímicas aplicadas*

Prueba Bioquímica	Símbolo
Tinción Gram	TG
Catalasa	CAT
Oxidasa	Oxidasa
Coagulasa	COAG
Voges Proskauer (α naftol)	VP
Rojo de metilo	RM
LIA: Descarboxilación de lisina (fondo)	LIA-DESC
LIA: Desaminación de lisina (superficie)	LIA-DESA
Producción de H ₂ S	H ₂ S
TSI (Agar con azúcar triple y hierro)	TSI
Superficie/Profundidad	
Producción de gas	PG
Ureasa	UR
Reducción de Nitrato	RED NIT
Citrato de Simmons	CIT
Licuefacción de Gelatina	L. GEL
Hidrólisis de Almidón	H. ALM
Movilidad	MOV
Indol	IND

Fuente: Elaboración Propia

A continuación, se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas para la identificación del consorcio bacteriano extraído del suelo impactado por los lixiviados del relleno sanitario del distrito de Jesús de Cajamarca, los cuales fueron sembrados en los distintos medios, por espacio de 48 horas a 37 °C.

4.2.2.1. Identificación de BRS1

Tabla 13

Identificación de la cepa BRS1

Símbolo	TG	Bacteria
BRS1	Cocos Gram positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.2. Características Bioquímica de *Staphylococcus aureus*

Tabla 14

Resultados de prueba bioquímica de Staphylococcus aureus

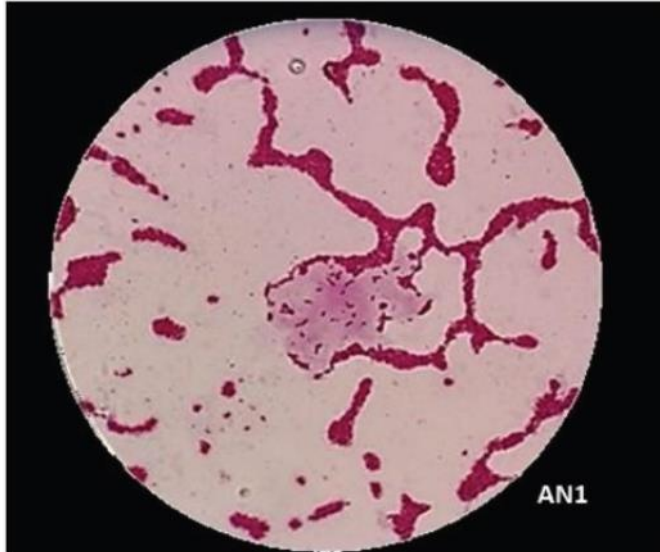
CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H ₂ S	TSI
+	-	+	+	-	-	-	-	+(A/A)
PG	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND	
-	-	+	-	+	-	-	-	

Fuente: Elaboración Propia

De acuerdo a Schleifer y Bell (2015), *Staphylococcus aureus* se compone de células esféricas no formadores de esporas, con diámetros de 0.5 a 1.5 μm . En esta investigación se observó la formación de grupos dispuestos en formas de racimos muy irregulares, no móviles (Figura 31). Estos microorganismos resultaron catalasa y coagulasa positivos (β hemolíticos). En la prueba de TSI se observó el cambio de coloración de rojo a amarillo explicado por la fermentación de los carbohidratos (glucosa, sacarosa, lactosa), lo cual produjo ácidos. Además, no se observaron gases en la prueba, con resultado positivo a la prueba de VP, siendo concordante con la literatura (Hu, Wessels, van Alen, Jetten y Kartal, 2019; Schleifer y Bell, 2015).

Figura 31

Coloración gram de Staphylococcus aureus



Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.3. Características Bioquímicas de Bacillus subtilis

Tabla 15

Identificación de la cepa BRS2

Código	TG	Bacteria
BRS2	Bacilo Gram positivo con endoesporas	<i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 16

Resultados de prueba bioquímica de Bacillus subtilis

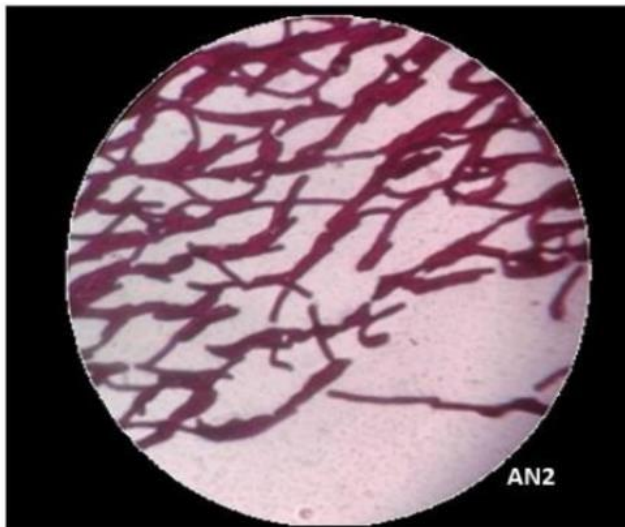
CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H ₂ S	TSI
+	-	-	+	-	-	-	-	+(K/A)
	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND	
PG								
+	-	+	+	+	+	+	-	

Fuente: Elaboración Propia

De acuerdo a los resultados esta especie presentó colonias irregulares con una apariencia de una cultura mixta. Resultó catalasa, citrato y reductor de nitrato positivo, con capacidad para licuar la gelatina e hidrolizar el almidón; sin embargo, fue oxidasa, indol y ureasa negativa (Logan y Vos, 2015) pero, no metabolizó la lisina. Los resultados de la prueba de TSI señalaron un microorganismo fermentador (TSI), con baja generación de gas y, aunque fue negativo al rojo de metilo, resultó positivo a la prueba de Voges Proskauer, lo que evidenció la capacidad de la bacteria para desarrollar una fermentación formica y su conversión a butilenglicol, acetoina y ácidos orgánicos (Osman, 2008). La Figura 32 muestra los resultados microbiológicos observados en microscopio 100x.

Figura 32

Coloración gram Buscillus subtilis



Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.4. Características Bioquímicas de *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*)

Tabla 17

Identificación de la cepa BRS3

Símbolo	TG	Bacterias
BRS3	<i>Cocos Gram positivo</i>	<i>Enterococcus faecalis o Streptococcus faecalis</i>

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 18

Resultados de prueba bioquímica de Enterococcus faecalis

CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H ₂ S	TSI
+	-	-	+	-	-	-	-	+(A/A)

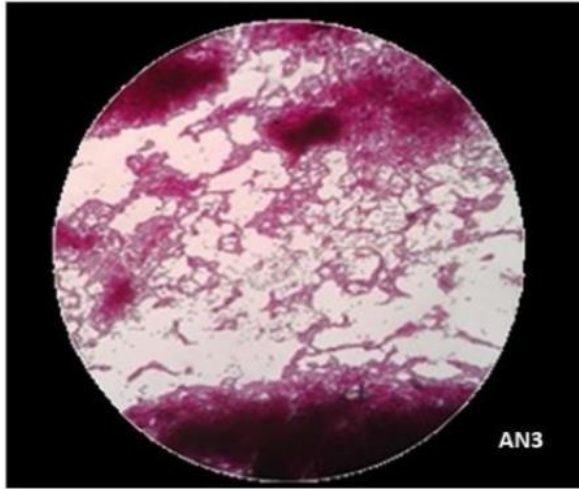
PG	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND
+	-	+	+	+	+	+	-

Fuente: Elaboración Propia

Esta especie es una bacteria anaerobia facultativa, no móvil, pero catalasa, oxidasa, coagulasa e indol negativa, fermentadora de una amplia gama de sustratos e hidratos de carbono como demuestra las pruebas positivas de TSI (A/A) y de Voges Proskauer, mientras que resultó negativa a las pruebas de licuación de gelatina e hidrólisis de almidón. Por lo general esta bacteria es aislada desde materiales clínicos, antropogénicas, veterinarios, alimentos y muestras ambientales (Vec y Devriese, 1903). La Figura 33, muestra la TG.

Figura 33

Coloración gram Enterococcus faecalis (Streptococcus faecalis).



Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.5. Características Bioquímicas de *Bacillus cereus*

Tabla 19

Identificación de la cepa BRS4

Símbolo	TG	Bacteria
BRS4	<i>Bacilo Gram positivos con endoesporas</i>	<i>Bacillus cereus</i>

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 20

Resultados de prueba bioquímica de Bacillus cereus

CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H ₂ S	TSI
+	-	-	+	-	-	-	-	-(K/K)
PG	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND	
-	-	+	+	+	+	+	-	

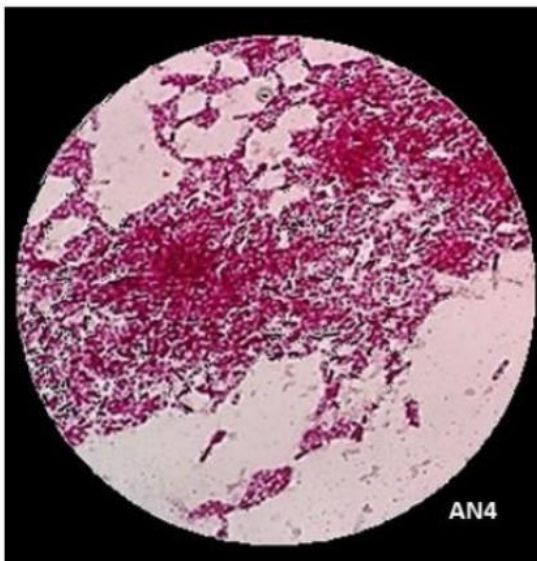
Fuente: Elaboración Propia

Estos bacilos Gram positivos anaerobios facultativos formaron colonias elipsoidales de color cera brillante y móviles, la especie mide entre 1.0 - 1.2 μm por 3.0 - 5.0 μm . Los cultivos

presentaron esporas de forma cilíndrica en un extremo del bacilo. La colonia resultó catalasa positiva y oxidasa negativa, con licuación de gelatina e hidrolización de almidón, además fue citrato y Voges-Proskauer positivo y reductora de nitrato; sin embargo, a diferencia del *B. subtilis* no generó gas al fermentar la glucosa con una reacción de tipo (K/K), con la prueba de TSI. Las colonias observadas fueron algo más grandes que la del *B. subtilis* que tuvo de forma irregular (Figura 34).

Figura 34

Coloración gram Bacillus cereus.



Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.6. Características Bioquímica de Roseomonas gilardii

Tabla 21

Identificación de la cepa BRS5

Símbolo	TG	Bacteria
BRS5	<i>Cocobacilo Gram negativo</i>	<i>Roseomonas gilardii</i>

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 22*Resultados de prueba bioquímica de Roseomonas gilardii*

CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H ₂ S	TSI
+	+	-	+	-	-	-	-	-(K/K)
PG	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND	
-	+	-	+	-	-	-	-	

Fuente: Elaboración Propia

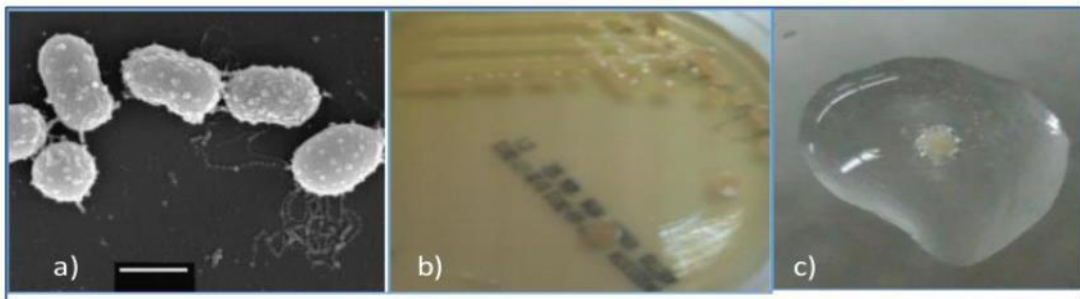
Los resultados mostraron bacterias Gram negativas, en forma de cocobacilos dispuestos en pares y cadenas cortas, algo profundas, de color rosado brillante y mucoso. Crecieron también en agar sangre y en agar Mac Conkey (color rosado), en incubaciones de 37°C durante 48 horas. Los resultados de las pruebas bioquímicas demostraron bacterias catalasa, ureasa y oxidasa positivas, pero indol, Voges Proskauer, LIA y TSI negativos, sin hidrólisis de almidón ni licuefacción de gelatina, descrito en la literatura (Weyant y Whitney, 2015).

La especie *Roseomonas gilardii* es un bacilo Gramnegativo de la clase alphaproteobacteria y del orden Rhizobiales (Nehaul, Davis-Yadley, Narayanan y Sinnott, 2015), esta especie como bacilo Gramnegativo, no fermentativo, generalmente desarrolla un pigmento rosa (varillas rosadas). Son cocoides, que aparecen como pares o cadenas cortas y en esta investigación resultó negativo su cultivo en agar Mac Conkey. Esta especie tiene un crecimiento mucoide de sus colonias en un tiempo de incubación de 48 h (Rudolph, Gunzer, Trauth, Bunk, Bigge, y Schrottner, 2019), aunque la bacteria es considerada como una cepa ambiental, recientemente se ha reportado que forma parte de la flora de la piel humana (Romano-Bertrand, Bourdier Aujoulat, Michon, Masnou, Parer, et al., 2016) o gastrointestinal (Nolan y Waites, 2005). Por tanto, es un patógeno humano, susceptible a los aminoglucósidos. Se encuentra principalmente en el suministro de agua doméstica y en el ambiente (Seethapathy, Hix y Silver, 2016: Schoch, Minniganti, Nair y Cunha,

1999), aunque también algunos investigadores expresan que aún no ha sido identificado ningún reservorio natural (Nolan y Waites, 2005). La Figura 35 muestra algunas características de la bacteria registrada en la literatura coincidentes en esta investigación.

Figura 35

Roseomonas sp: a) microfotografía de un cultivo de bacteriano *Roseomonas mucosa* efectuada por Han, Pham, Tarrand, Rolston, Helsel y Leven (2003), especie muy similar a la identificada, b) Aislamiento de *Roseomonas gilardii* efectuada por Sahar (2013).

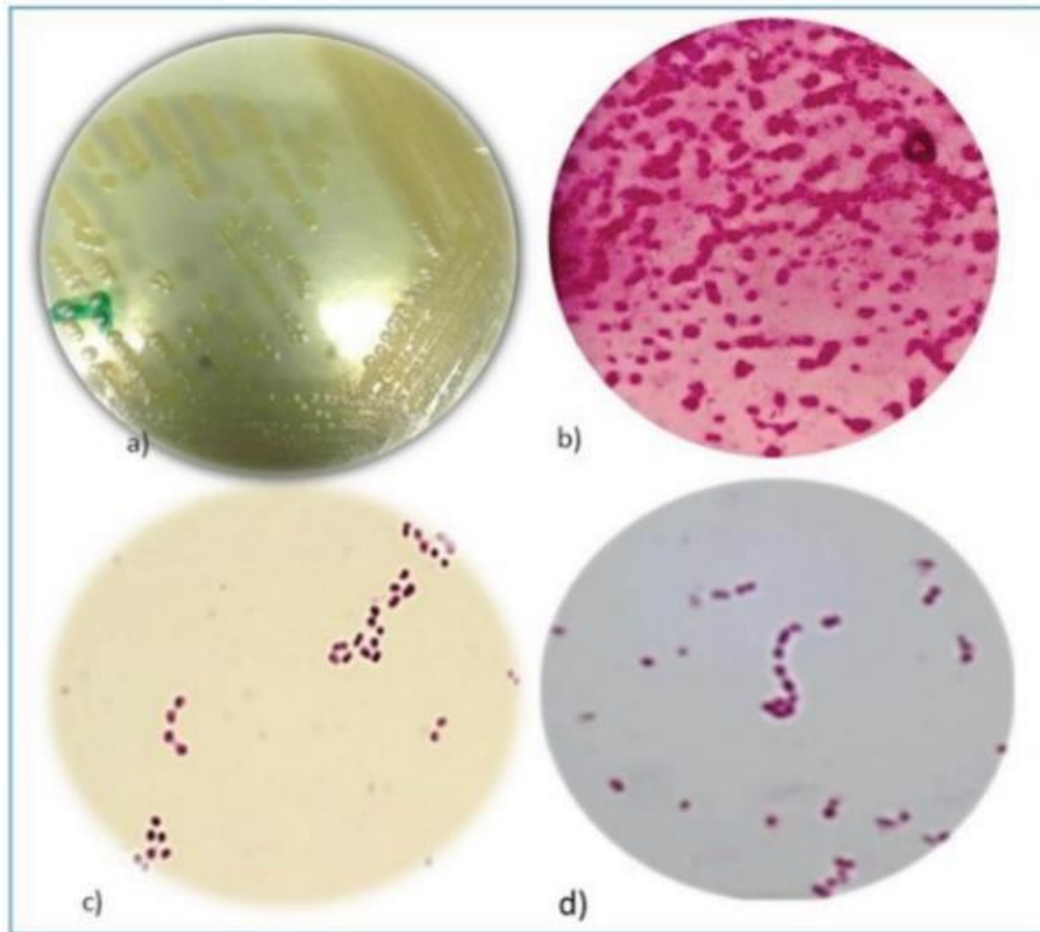


Fuente: Elaboración Propia

La Figura 36, muestra los resultados de la tinción de Gram que demostró cocobacilos regordetes en pares y cadenas cortas (Nolan y Waites, 2005). Taxonómicamente es muy similar a la *Roseomonas mucosa* (Han, Pham, Tarrand, Rolston, Helsel y Levett, 2003).

Figura 36

a) Aislamiento de la especie *Roseomonas gilardii* en agar nutritivo esta investigación b)
Tinción Gram negativo observada en microscopio 100x efectuada en la investigación c)
Tinción Gram negativo de *Roseomonas mucosa* efectuada por Kimura, Ha.



Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.7. Características Bioquímica de *Sphingomonas paucimobilis*

Tabla 23

Identificación de la cepa BRS6

Símbolo	TG	Bacteria
BRS6	<i>Bacilo Gram negativo no esporulado</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 24*Resultados de prueba bioquímica de Sphingomonas paucimobilis*

CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H ₂ S	TSI
+	-	-	-	-	-	-	-	-(K/K)
PG	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND	
-	-	-	+	+	+	-	-	

Fuente: Elaboración Propia

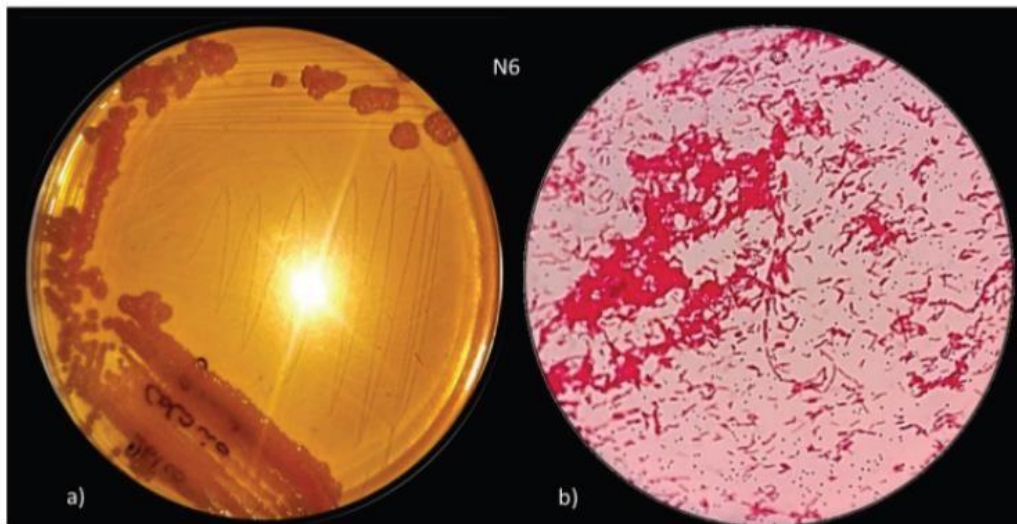
En la presente investigación, este microorganismo creció en agar-agar, pero no en agar McConkey, tal como lo informó Nandy, Dudeja, Kumar y Tiwari (2013). Los aislamientos produjeron colonias de pigmento amarillo. Visto al microscopio 100x, las colonias fueron de tipo circular y algo convexo, estas crecieron en temperaturas 37°C, no móviles en el periodo de 48 horas. Las pruebas bioquímicas mostraron que no hubo fermentaciones de la glucosa. De acuerdo a la Tabla 25, los aspectos más importantes fueron su reacción positiva a la prueba de oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, pero negativa en la formación de H₂S, TSI, LIA y Voges Proskauer, así como a la reacción de la ureasa, gelatina, reducción de nitrato e indol, descrito de manera similar por Martínez y Ovalle (2013) y Nandy, Dudeja, Kumar y Tiwari (2013). En el caso del TSI mostró reacción roja / rojo sin gas en TSI agar inclinado.

La especie *Sphingomonas paucimobilis* es un bacilo Gramnegativo con un tamaño de 0.4 x 1,4 µm, que se ha identificado en casos de pacientes hospitalarios como un agente patógeno oportunista y se ha encontrado en el ambiente en cuerpos de agua y suelo (McNeil, Archer, Giavasis y Harvey, 2013). Además, se ha informado de su presencia en la rizósfera en las arenas de desierto y en vertederos, pueden tomar además tonalidades naranjas y son aerobios (Feng, De Franceschi, Kahraman, Soste, Melnik, Boersema et al., 2014).

La especie *Shingomonas paucimobilis*, anteriormente pertenecía al género *Pseudomonas*, pero Yabuuchi, Yano, Oyaizu, Hashimoto, Ezaki y Yamamoto (1990), señalaron la separación del grupo fluorescente pseudomona ya que esta bacteria se diferencia de otras Gram negativas porque posee glucoesfingolípidos que componen las células eucariotas, pero carece de lipopolisacárido. Lo extraño es que los lipopolisacáridos representan un componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Entonces, esta especie al poseer solo el monosacárido de tipo tetrasacárido no contenía la molécula de tipo lipopolisacárido (Kawasaki, Moriguchi, Sekiya, Nakai, Ono, Kume y Kawahara, 1994). La Figura 37, muestra los resultados macro y microscópicos obtenidos.

Figura 37

a) Aislamiento de la especie *Sphingomonas paucimobilis* en agar nutritivo y b) Tinción Gram positivo.



Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.8. Características Bioquímica de *Pseudomonas stutzeri*

Tabla 25

Identificación de la cepa BRS7

Símbolo	TG	Bacteria
BRS7	<i>Bacilo Gram negativo no esporulado</i>	<i>Pseudomona stutzeri</i>

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 26

Resultados de prueba bioquímica de Pseudomonas stutzeri

CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H ₂ S	TSI
+	+	-	-	-	-	-	-	-(K/K)

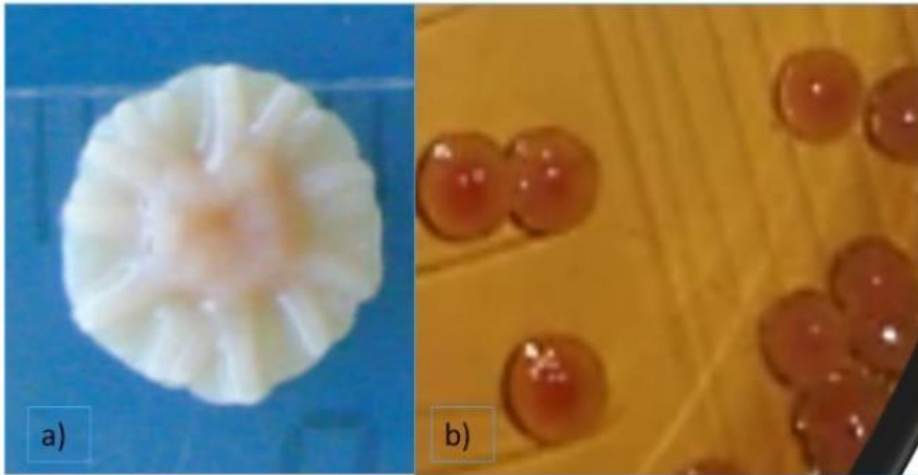
PG	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND
-	-	+	+	-	+	+	-

Fuente: Elaboración Propia

Las colonias mostraron un relieve con perfiles en forma de varillas Gram negativas rectas o ligeramente curvadas y arrugadas (Figura 38), catalasa y oxidasa positivas, su reacción con el almidón y desnitrificación fue muy vigorosa. Se observó su motilidad debido a sus flagelos polares, además fue oxidasa y catalasa positiva y su cultivo en agar Mac Conkey fue positivo, sus colonias pueden ser casi incoloras, pero es común la pigmentación de colonias blancas, blanquecinas, crema y amarillas.

Figura 38

Especie Pseudomonas stutzeri: a) microfotografía tomada por Lalucat, Bennasar, Bosch, Garcia- Valdes y Palleroni (2006) y b) microfotografía 100x de la especie identificada en esta investigación.



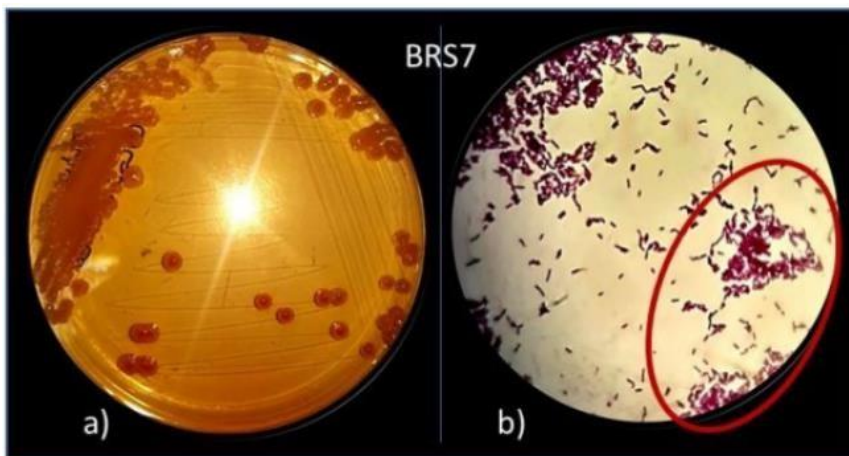
Fuente: Elaboración Propia

Esta especie es nutricionalmente versátil. Emplea algunos compuestos de carbono que rara vez utilizan otras pseudomonas (almidón, maltosa y etilen glicol). Es una especie que se distribuye ampliamente en el ambiente y ocupa diversos nichos ecológicos y ha sido aislada como un patógeno oportunista de los seres humanos (Lalucat, Bennasar, Bosch, Garcia- Valdes y Palleroni, 2006). Se ha identificado la utilidad de esta bacteria con altas capacidades de degradación para compuestos químicos nocivos y por lo tanto útil para la biorremediación (Palanivel, Sivakumar, Al-Ansari y Víctor, 2020), además se ha demostrado que *P. stutzeri* A1501 puede promover el crecimiento del maíz (Ke, Feng, Wang, Lu, Zhang, Chen y Lin, 2019).

Es una bacteria que puede transformarse naturalmente por ADN cromosómico homólogo: no requieren tratamiento químico para hacerlo y se ha transformado una variedad de mutaciones cromosómicas, pertenecen a hábitats acuáticos y ecosistemas terrestres (Lalucat, Bennasar, Bosch, García-Valdes y Palleroni, 2006). Esta especie resultó fermentadora, catalasa y oxidasa positiva, también positiva con la hidrólisis de almidón, citrato, pero negativa con el TSI y Voges Proskauer. La Figura 39, muestra los resultados microscopios y de cultivo.

Figura 39

a) Cultivo de la especie *Pseudomonas stutzeri* en agar nutritivo y b) tinción Gram.



Fuente: Elaboración Propia

La complejidad de los tres microorganismos antes descritos y su caracterización bioquímica fue confirmada a través de una extensa revisión bibliográfica (Tabla 27).

Tabla 27

Referencias de literatura sobre la caracterización bioquímica de Pseudomonas stutzeri, Roseomonas gilardii y Shingomonas paucimobilis.

Nº	Análisis	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Roseomonas gilardii</i>	<i>Shingomonas paucimobilis</i>
1	Producción de H ₂ S	(-) Lapage <i>et al.</i> (1968)	(-) Rihs <i>et al.</i> (1993), Gallego <i>et al.</i> (2006)	(-) Nandy <i>et al.</i> (2013)
2	Fermentación/glucosa	(-) Quinteros <i>et al.</i> (2005)	(-) Toro <i>et al.</i> (2000), Rihs <i>et al.</i> (1993), Toro <i>et al.</i> (2000)	(-) Ryan y Adley 2011
3	Ureasa	(-) Lapage <i>et al.</i> (1968)	(+) Fanella <i>et al.</i> (2009), Rihs <i>et al.</i> (1993)	(-) Nandy <i>et al.</i> (2013)
4	Citrato	(+) Nohit <i>et al.</i> (2008), Nohit <i>et al.</i> (2008),	(+) Toro <i>et al.</i> (2000), Rihs <i>et al.</i> (1993)	(-) Nandy <i>et al.</i> (2013)
5	Lisina descarboxilasa	(-) Winn <i>et al.</i> (2008), Rossello-Mora <i>et al.</i> (1994)	(-) Rihs <i>et al.</i> (1993)	(-) Berger (2018)
6	Oxidasa	(+) Quinteros <i>et al.</i> (2005)	(+) Molina) Fanella <i>et al.</i> (2009)	(+) Nandy <i>et al.</i> (2013)
7	Catalasa	(+) Quinteros <i>et al.</i> (2005)	(+) Toro <i>et al.</i> (2000), Rihs <i>et al.</i> (1993), Gallego <i>et al.</i> (2006)	(+) Nandy <i>et al.</i> (2013)
8	LIA (lisina, hierro agar)	(-) (-)	(-) Rihs <i>et al.</i> (1993)	(-) (Yen, Siew, Ching 2013)

Continuación Tabla 27

9	TSI (triple azúcar hierro)	(-)	Winn <i>et al.</i> (2008) Lapage <i>et al.</i> (1968)	(-)	Rihs <i>et al.</i> (1993)	(-)	Nandy <i>et al.</i> (2013)
10	Voges Proskauer, rojo de metilo	(-)	Nohit <i>et al.</i> (2008)	(-)	Gallego <i>et al.</i> (2006)	(-)	Berger (2018) (Yen, Siew, Ching 2013)

Fuente: Elaboración Propia

4.2.2.9. Características Bioquímicas de Escherichia coli

Tabla 28

Identificación de la cepa BRS8

Símbolo	TG	Bacteria
BRS8	<i>Bacilo Gram negativo</i>	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 29

Resultados de prueba bioquímica de Escherichia coli

CAT	OXI	COAG	VP	RM	LIA-DESC	LIA-DESA	H2S	TSI
+	-	-	-	+	+	-	-	+(A/A)-
PG	UR	RED NIT	CIT	L.GEL	H.ALM	MOV	IND	
+	-	+	-	-	-	+	+	

Fuente: Elaboración Propia

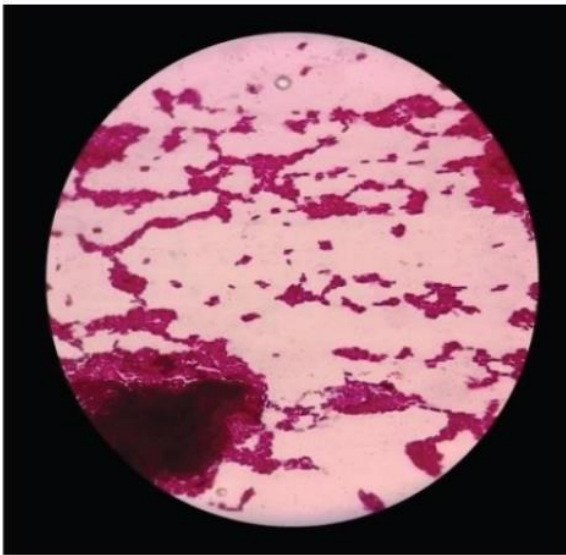
Las escherichias son barras rectas, cilíndricas, Gram negativas con extremos redondeados de 1.1- 1.5 µm de diámetro y 2.0 - 6.0 µm de longitud, se distribuyen solas o en parejas y forman grupos algo desordenados, móviles debido a sus flagelos peritricos, catalasa positivos, pero

oxidasa negativos. Las escherichias producen ácidos fuertes y generalmente gases de la fermentación. Mostraron reacción positiva en el rojo de metilo, negativo en la prueba Voges

– Proskauer y, aunque el citrato de Simmons no pudo ser utilizado por E. coli, la lisina fue adecuadamente descarboxilada (Figura 40).

Figura 40

Coloración gram Escherichia coli.



Fuente: Elaboración Propia

4.2.3. Confirmación de especies mediante el VITEK 2 Compact

La Tabla 30 muestra el resultado de la prueba colorimétrica del Vitek 2 Compact.

Tabla 30

Confirmación colorimétrica mediante Vitek 2 Compact de Roseomonas gilardii, Pseudomonas stutzeri y Sphingomonas paucimobilis.

Código	Análisis	Abreviatura	Cantidad/ pocillo	Roseomonas gilardii	Pseudomonas stutzeri	Sphingomonas paucimobilis
1	Ala-Fe-Pro-Arilamidasa	APPA	0.0384 mg	+	-	+
2	Adonitol	ADO	0.1875 mg	-	-	-
3	L-Pirrolidonil-Arilamidasa	Pyra	0.018 mg	+	-	+
4	L-Arabitol	IARL	0.2 mg	-	-	-
5	D-Celobiasa	Dcel	0.3 mg	-	-	-
6	Beta-Galactosiasa	BGAL	0.036 mg	-	-	-
7	Producción de H ₂ S	H2S	0.0024 mg	-	-	-
8	Beta-N. Acetil-Glucosaminidasa	BNAG	0.0408 mg	-	-	+
9	Glutamil Arilamidasa PNA	AGLTp	0.0324 mg	-	-	-
10	D-Glucosa	Dglu	0.3 mg	-	+	+
11	Gamma-Glutamil-Trans.ferasa	GGT	0.0228 mg	-	-	-
12	Fermentación/Glucosa	OFF	0.45 mg	-	-	-
13	Beta-Glucosidasa	BGLU	0.036 mg	-	-	+
14	D-Maltosa	Dmal	0.3 mg	-	-	+
15	D-Manitol	Dman	0.11875 mg	-	-	-
16	D-Manosa	Dmne	0.3 mg	-	-	-
17	Beta-Xilodasa	BXYL	0.0324 mg	-	-	-
18	BETA-Alanina Arilamidasa	Balap	0.0174 mg	-	-	-
19	L-Propalina-Arilamidasa	ProA	0.0234 mg	+	+	-
20	Lipasa	LIP	0.0192 mg	-	-	-
21	Palatinosa	Pple	0.3 mg	-	-	-
22	Tirosina Arilamidasa	Tyra	0.0276 mg	-	+	-

Continuación de la Tabla 30

23	Ureasa	URE	0.15 mg	+	-	-
24	D-Sorbitol	Dsor	0.1875 mg	-	-	-
25	Sacarosa	SAC	0.3 mg	-	-	+
26	D-Tagatosa	Dtag	0.3 mg	-	-	-
27	D-Trealosa	Dtre	0.3 mg	-	-	+
28	Citrato	CIT	0.054 mg	-	-	-
29	Malanato	MNT	0.15 mg	-	-	-

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 31 se muestra los resultados de la prueba Vitek Compact 2 donde se muestran los resultados de la prueba colorimétrica de confirmación de reacciones bioquímicas por las tres cepas analizadas. Los resultados positivos afirman la presencia de la reacción. El programa en automático arroja el grupo de microorganismos al que pertenece la cepa analizada. Los resultados de la prueba confirman los datos obtenidos de las pruebas bioquímicas en los ítems anteriores.

La Tabla 31 muestra la relación final de las cepas identificadas y aisladas a partir del suelo adyacente impactado por los lixiviados del relleno sanitario en Cajamarca.

Tabla 31

Clasificación taxonómica de las cepas aerobias y anaerobias facultativas aisladas mediante pruebas fenotípicas de microorganismos del suelo impacto por lixiviados del relleno sanitario de Cajamarca.

Gram Positivos	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Staphylococcus aureus</i>	Firmicutes	Bacilo	Bacillales	Staphylococcaeae	Staphylococcus
<i>Streptococcus faecalis</i>	Firmicutes	Bacilo	Lactobacillales	Enterococcaeae	Enterococcus
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	Bacilo	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	Bacilo	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
Gram Negativos	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaeae	Sphingomonas
<i>Roseomonas gilardii</i>	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonales	Pseudomonadaeae	Pseudomonas
<i>Escherichia coli</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia

Nota: La clasificación taxonómica actualizada se tomó de la página especializada <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>. Las tres bacterias sombreadas no son nativas del suelo.

De los resultados obtenidos podemos indicar que se identificaron un total de ocho especies bacterianas. Los siguientes grupos son considerados organismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Roseomonas gilardii* (Winn, 2008). Estos géneros provienen de los residuos que se recolectan en el relleno sanitario y tienen importancia médica ya que son causantes de diversas patologías. Aunque el *Bacillus cereus* es un organismo de amplia distribución en diversos medios este puede ser causante de intoxicaciones alimentarias y causar diarreas u otro tipo de enfermedades si son ingeridas como lo explica (Perez 2012), sin embargo, se puede indicar que este género ha sido utilizado en la protección de organismos como lombrices de tierra que han sido expuestas a suelos contaminando con insecticidas permitiendo su supervivencia como lo indica (Mathiyazhagan et al. 2020) en su estudio. En el estudio de (Muñoz,

2019) se ha identificado que el *Bacillus cereus* es resistente a los metales pesados por lo que tiene un gran potencial de uso de estos contaminantes en procesos de biorremediación. El *Bacillus subtilis* tiene una relevancia significativa en los procesos de control y regulación de poblaciones bacterianas en los suelos. Según el trabajo realizado por (Villareal, 2018) indica que son un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. Entonces su presencia en los suelos analizados no es una casualidad este organismo podría estar controlando la presencia de algunos organismos presentes. Por esta razón existe una necesidad de realizar más estudios sobre el tipo de interacción que desarrollan estos organismos en el suelo. Las bacterias del género *Sphingomonas paucimobilis* aunque puede causar enfermedades asociadas al sistema inmunológico (Martínez, 2013) tiene una gran importancia ambiental ya que se ha demostrado su eficiencia en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados como los indica (Raghad, 2019). En su estudio describe que la asociación de este grupo de bacterias puede sintetizar metales como Pb y Cd. Las bacterias *Pseudomonas stutzeri* es una bacteria muy importante en los procesos de nitrificación y desnitrificación del suelo como lo expresa (Jibin, 2011) en su investigación. El autor estudia las concentraciones de nitrógeno y las variaciones presentes en suelos en presencia de este grupo de microorganismos.

Las bacterias nativas de los suelos analizados están constituidas por los géneros *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Roseomonas gilardii*, *Pseudomonas stutzeri*; el resto de microorganismos identificados no son autoctonos al provenir de orígenes antropogénicos. Los mecanismos de interacción entre estos grupos no están bien definidos por lo que se deben analizar en futuras investigaciones.

4.3. Contrastación de hipótesis

Se ha confirmado la hipótesis de investigación general. De acuerdo a los resultados analíticos obtenidos al investigar las propiedades fisicoquímicas se ha logrado una caracterización inicial del suelo que ha permitido conocer las condiciones del hábitat bacteriano. El suelo posee una textura arcillosa (7.45%), esto indica una facilidad de compactación asociado a una alta capacidad de retención de la humedad (H: 5%) y de nutrientes. su capacidad de intercambio catiónico reportado 20.58 meq/100L) y su conductividad eléctrica, reflejan un normal contenido salino, además posee un buen contenido de MO (3.66%), apto para intereses agrícolas. Sin embargo, estas características también reflejan una capacidad del suelo a retener con facilidad componentes del lixiviado que escurre en el territorio y una capacidad de acumulación de agentes contaminantes en su material.

En principio, el cultivo inicial se ha elaborado en agares nutritivos, donde se aislaron todo tipo de cepas bacterianas, pero la aplicación de la prueba de tinción de Gram ha permitido separar las cepas en Gram positivas y negativas, lo cual ha permitido saber el tipo de pared celular que poseen. Posteriormente, el cultivo en agar sangre y agar MacConkey como medios selectivos y diferenciales ha permitido establecer una relación de bacterias por su morfología de colonias y si estas fueron hemolíticas o no y el tipo de hemolisis, que finalmente, ha podido identificarse mediante las típicas pruebas bioquímica sumada al análisis microscópico ha servido para identificar 8 cepas como resultado final, contrastado con la abundante literatura científica existente respecto a las cepas en investigación. El análisis colorimétrico permitió finalmente confirmar aislamiento de 03 cepas de hábitat ambiental de especial atención en aplicaciones de remediación ambiental tales como *Roseomonas gilardii*, *Pseudomonas stutzeri* y *Sphingomonas paucimobilis*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Se han identificado ocho cepas bacterianas en función de sus propiedades fenotípicas, basadas en las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos, así como en resultados de las pruebas bioquímicas correspondientes a dos filos: *Firmicutes* y *Proteobacteria*; tres clases: Bacilo, *Alphaproteobacteria* *Gammaproteobacterias*, seis ordenes: *Lactobacillales*, *Bacillales*, *Sphingomonadales* *Rhodospirillales*, *Pseudomonales*, *Enterobacteriales*; siete familias: *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacillaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Acetobacteraceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*.

2. El 25 % de las cepas correspondieron a grupos cocos Gram positivos y 25 % fueron bacilos Gram positivos esporulados, mientras que el grupo con más representación correspondió a bacilos Gram negativos no esporulado con 37.5 % y con menor proporción coco bacilos gram positivos no esporulados con 12.5 %.

3. Las ocho cepas identificadas fueron: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Roseomonas gilardii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*. Las bacterias nativas de los suelos analizados están constituidas por los géneros *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Roseomonas gilardii*, *Pseudomonas stutzeri*; el resto de microorganismos identificados no son autóctonos al provenir de orígenes antropogénicos. Los mecanismos de interacción entre estos grupos no están bien definidos por lo que se deben analizar en futuras investigaciones.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcaráz, L. E., Satorres, S. E., Mattana, C. M., Centorbi, H. J., Aliandro, O. E. Echenique, D. R. (2017). Material Didáctico para estudiantes. Guía de trabajos prácticos. Bacteriología y Virología. Recuperado de http://www±qbf.unsl.edu.ar/documentos/mde/Bioquimica_ClinicaJ/Bioqca, C. I.pdf.
- Al-Yaqout. A. & Hamoda, M. (Eds.). (2003), Evaluation of landfill leachate in arid climate a case studv. Environrment International. 29(5), 593-600. DOI: 10.1016/s0160- 4120(03)00018-7.
- Aslanzadeh, J. (Eds.). (2006). Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. 84.116. DOI: 10.1007 / 0-387- 32892-0_6.
- Balakhnina. T. y Borkowska. A. (Eds.). (2013). Efectos del silicio sobre la Resistencia de las plantas al estrés ambiental: Revisión. International Agrophvsics. 27 (2). 225-232. DOI: 10.2478 / vl0247-012-0089-4.
- Baltas, Fl. Sirin, M. Gokbayrak, E., &Ozcelik, A. E. (Eds.). (2019). A case studyon pollution and a human health risk assessment of heavy metais in agricultural soils around Sinop province, Turkey. Chemosphre. 1 25() 15. DOI: 10.101 61j. chemosphere.2.19.125015
- Benavides, R., y Hermida. S. (2008). Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guazca (Cundinamarca). Bogotá. (Trabajo de grado). Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- Berger, S. (2018). Gideon guide to medically important bacteria. ¿Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=gjpLDwAAQBAJ&p=PA 1 726&lpg=PA 1726>

&dq=Sphingomonas+paucimobilis+Voges+Proskauer&source=bl&ots=7jacc0Ryg & sig=ACfU3U32Rb5gZpcoiEY6FSlxauP6 1 vwQmw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiH 2imTk5brnAhXtzVvKHfp 1 DTMQ6AEwBnoECAoQAQ#v=onepage&q=Sphingomonas%20paucimobilis%20Voges%20Proskauer&f=false.

Bermúdez, D. (2016). Eficiencia de consorcios bacteriano —microalga para la disminución de la concentración de materia orgánica en aguas residuales de la ESPAM MFL. (Tesis previa la obtención del título de Ingeniero en medio ambiente). Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Feliz López. Calceta. Ecuador.

Buergmann. 1-1. (sf) Microbial diversity unseen variety. (Eds). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/238775969_Microbial_diversity__unseen_variety

Busse, H. (2011). Polyamines. *Taxonomy of Prokaryotes*, 239—259. DOI: 10.1016/b978-0-12-387730-7.0001-5.

Cañon-Cortazar, R., Avellaneda-Torres L., Torres-Rojas E. (2012). Microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno en suelo bajo tres sistemas de uso: cultivo de papa, ganadería y páramo en el Parque Los Nevados. Colombia. *Acta agronómica*, 61 (4).

Casanova, P. Benavides. C. (Eds.). (2009). Cartografía de las pérdidas potenciales de n-urea por volatilización en suelos de Chile central. *Revista de la ciencia de/suelo y nutrición vegetal*. 9(1). 14-25. DOI: 10.4067/S0718-27912009000100002.

Castillo M. (2012). Identificación de Bacilos Gram Negativo no fermentadores para aplicación en celdas de combustible microbianas y en biorremediación. (Tesis para obtener el grado de maestría en Ciencias en Energías renovables). Centro de investigación en Materiales Avanzados, S. C. Posgrado. Monterrey, México.

- Celik, O., Aslim, B, & Beyatli. y, (2008). Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain Gil in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *Journal of Environmental Microbiology*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/24211911_Enhanced_crude_oil_biodegradation_and_rhamnolipid_production_by_Pseudomonas_stutzeri_strain_Gil_in_the_presence_of_Tween-80_and_Triton_X-100
- Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*. 2014;61(1):28-40.
- Chen, F., Li, X., Zhu, Q. Ma. .1. Hou. H. & Zhang. S. (Eds.). (2019). bioremediation of petroleum-contaminated soil enhanced by aged refuse. *Chemosphere*, 222, 98105. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2.19.01.122
- Colca. R. (2017). Eficiencia en el cultivo de microorganismos eficaces para reducir hidrocarburos totales de petróleo contenidos en fuentes de grifo. Huarochirí. 2017 (Tesis para obtener el título de Ingeniería Ambiental). Universidad César Vallejo. Lima Este, Perú.
- Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). (2012). Plan Nacional Estratégico de Ciencia Tecnología e Innovación para la competitividad y el desarrollo humano. PNCTI 2006-2021. Recuperado de https://portal.concytec.gob.pe/imagenes/stories/imagenes2012/portal/areas-institucion/pyp/plan_nac_ctei/pian_nac_ctei2006_2021.pdf.
- Christensen, T. Kjeldsen, P., Jørgensen, P., Christensen, J., Baun, A. & otros. (Eds.). (2001). A. of landfill leachate plumes. *Applied Geochemistry*, 16 (7- 8), 659—718. DOI: 10.1016/S0883-2927(00)00082-2.

- Covadonga, V., De Silóniz, M., y Serrano, S. (2010). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. Recuperado de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/arricleíview/8191834>.
- Cui, J., Wang, W., Peng, Y., Zhou, F., He, D., Wang, & otros. (Eds.). (2019). Effects of simulated Cd deposition on soil Cd availability, microbial response. And crop Cd uptake in the passivation-remediation process of Cd-contaminated purple soil. *Science of the Total Environmen*. DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.05.292
- Dainico S, Collins T, Marx J, C Feller G, Gerday C (Eds) (2006) Microorganismos psicrófilicos: desafíos para la vida. *Informes EMBO*. 7 (4), 385—389. DOI: 10.1038/sj.embor.7400662.
- Dhaliwal, S., Naresh, R., Mandal, A. Singh, R. & Dhaliwal, M. (Eds.). (2019). Dynamics and transformations of micronutrients in agricultural soils as influenced by organic matter build-up: a review. *Environ. Monit. and Assess.* 12, 10(X)07. DOI: 10.1016/j.indic.2019.100007.
- Dixit, H., Lowry, M., Mohsin, U., Moond, M., Kumar, S., Chokriwal, A. & otros. (2018). Screening and Identification of Diesel Oil Degrading Bacterial Isolates from Petroleum Contaminated soil of Barnier. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 6 (1):34-40. ISSN: 2348-7658.
- Echevarría, R - (2011). Estudios de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) como alternativa de aplicación a suelos con limitantes abióticas (Tesina presentada para obtener el grado académico de licenciado en química). Universidad Nacional de la Pampa.
- Ehling-Schulz, M., Knutsson, R., & Scherer, S. (2010). *Bacillus cereus*. Genomes of foodborne and waterborne pathogens, 147-164.

- El Khodrani, N. Omrania.S. Zouahri, A. Douaik, A. Iaaich, I-1. Yahyaoui, A. y otros. (Eds.). (2019). Spatial Distribution and Mapping of Heavy Metals in Agricultural Soils of the S. fafaa region (Gharb, Morocco). *Materials Today: Proceeding*, 13, 832-840. DOI: 10.1016/j.matpr.2019.04.046.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2015). Method 9045dsoil and Waste pH. Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/9045d.pdf>.
- Espinosa. M. (2010). Caracterización de los lixiviados del vertedero de residuos sólidos urbanos “Calle 100”, ciudad de la Habana, CUBA. *Revista Cubana Química*. 12 (1), 27-35.
- Falkowski. P., Fenchel, T. y Delong, E. (Eds.). (2008). Los motores microbianos que impulsan los ciclos biogeoquímicos de la Tierra. *Science*. 320 (5879), 1034-1039. DOI: 10.1126 / science.1153213
- Fanella. S., Schantz D. Karlowsky, J., & Rubinstein, E. (Eds.). (2009). Case Report Septic arthritis due to *Roseomonas giardii* in an immunocompetent adolescent. *Journal of Medical Microbiology*. 58, 1514-1516. DOI: 10.1099/jmm.0.011106-0.
- Farifia. N., Carpinelli, L., Samudio, M. Guillén. R. Laspina. F., Sanabria R., y otros. (Eds.). (2013). *Staphylococcus coagulasa-negativa* clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista chilena de infectología*. 30 (5) Santiago. DOI: 10.4067/S0716-1012(2013)000500003.
- Feng, Y., De Franceschi, G., Kahraman, A., Soste, M., Melnik, A., Boersema, P. & otros. (Eds.). (2014). Global analysis of protein structural changes in complex proteomes. *Nature Biotechnology*. 32, 1036-1044. DOI: 10.1038/nbt.2999
- Fernández, O. García. D. Saéz, N., & Valdezate. R. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recuperado de

- <https://www.seimc.org/contenidos!documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimicntomicrobiologia37.pdf>.
- Gallego. B. (2017). Caracterización microbiológica del lixiviado producido por la planta de composta de Bordo Poniente (Tesis para a obtener el grado de Maestría en Ciencias en Estudios Ambientales y de la Sustentabilidad). Instituto Politécnico Nacional. México
- Gallego, V. Sánchez-Porro, C., García, M. T., Ventosa, A. (Eds.). (2006). *Roseomonas aquatica* sp. Nov. isolated from drinking water. *International Journal of Svsiernaric i.md Evolurionar Microhiologv*. 56 (Pt 10):2291 -5. DOI: 10. 1099/ijvs.0.64379-0.
- Gerba. C. (2005). Biological Mechanisins. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sc iences/soil - microorganism>.
- Gessner. M., Swan. C. Dang. C., McKie, B., Bardgett, R. Wall. y otros. (2010). Diversity meets decomposition. Recuperado de https://www.researchgate.net/publicationl41622258_Diversity_Meets_Decompositi on
- Gmochowska, W., Pietranik, A., Tyszka, R., Euler, y., MihaIjevi, M., Dlugosz, M., & otros. (Eds.). (2019). Sources of pollution and distribution of Pb, Cd and Hg in Wroclaw soils: Insight from chemical and Pb isotope composition. *Geochemistry*. DOI: 10.101 6/j. chemer.2019.07.002
- Gobierno Regional de Cajamarca (GRC). (2011). Zonificación ecológica y económica base para el ordenamiento territorial del Departamento de Cajamarca. Recuperado de <https://siar.regioncajamarca.gob.peldocumentos/zonificacion-ecologica- economicabase-ordenamiento-territorial>.
- González, D. (2007). Diversidad de las especies desnitrificantes del género *Halomonas* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada. España.

Google earth. (S.f). El globo terráqueo más completo. Recuperado
<https://www.google.com/intl/es/earth/>

Han, X., Pham. A., Tarrand, J., Roiston, K., Helsel, L., Levett, P. (Eds.). (2003). Bacteriologic characterization of 36 strains of *Roseomonas* species and proposal of *Roseomonas mucosa* sp nov and *Roseomonas gilardii* subsp rosea subsp nov. American ournal of clinical patology. 120 (2):256-64. DOI: 10.1309/731 V-VGVC- KK35- 1 Y4J

Holdridge L R(1967) Life zone ecolQgy Recuperado de
<http://reddcr.go.cr/sites/default/files/centro-de-documentacion/holdridge-1966-lifezone.ecology.pdf>.

Holst, O., & Molinaro, A. (Eds.). (2010). Core region and lipid A components of lipopolysaccharides. *Microbial Glycobiology*. 2955. DOI: 10.1016/b978-0-12-374546-0.0003-1.

Hong. S., Gan, P. & Chen, A. (Eds.). (2019). Environmental controls en soil pH in planted forest and its response to nitrogen deposition. *Environmental Research*. 172, 159— 165. DOI: 10.1016/j.envres.2019.02.020

Hu, Z., Wessels, H. van Alen, Tjetten M. & Kartal B. (Eds.). (2019). Nitricoxide-dependent anaerobic ammonium oxidation. *Nature Communications*, 10. 1244. DOI: 10.1038/s41467-019-09268-w.

Husson.O. (Eds.). (2013). Redox potential (Eh) and pilas drivers of soil/plant/microorganism systems: a trans disciplinary ayer view pointing te inteative oprtunities for agronomy *Plant Soil* 362 389-417 DOI: 10.1007/s110401214297

- Instituto Nacional de Informática (INEI). (S.f). 1. Población con acceso sostenible a fuentes mejoradas de abastecimiento de agua según ámbito geográfico 2005 2015. Recuperado de <https://www.inei.gov.pe> > Menu Recursivo> Est LibI 416> c5. 1.1.xlsx
- International Union of Soil Science (IUSS). (SS). El futuro de la ciencia del suelo. Recuperado de <https://www.iuss.org> > media futura_ciencia_suelo_1.
- Isobe, K. & Ohte, N. (Eds.). (2014). Ecological perspectives oil microbes involved in Ncycling. *Microbes ond environments*, 29 (1), 4- 16. DOI: 10. 1264fjsme2.mel3 159
- Ike, Y., Hashimoto, H., & Clewell, D. B. (1984). Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. *Infection and Immunity*, 45(2), 528-530.
- Jamovi. (2019). l'hc jamovi Project (versión 1.0) (Computer Sotfware). Recuperado de <https://www.janioviorg>.
- Jibin Zhang, Pengxia Wu, Bo Hao, Ziniu Yu, 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 21, Pages 9866-9869, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.118>.
- Kaczorek, E. Smulek, W. Zgola-Grzekowiak, A. Bielicka. -Daszkiewicz, K., & Olszanowski, A. (Eds.). (2015). Effect of Glucopton 215 co ccli surface properties of *Pseudoimmas stutzeri* and diesel oil biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradorion*, 104, 129 135. DOI: 10J016/j.ibiod.20 15.05 028.
- Kawasaki, S., Moriguchi, R., Sekiya, K., Nakai, T., Ono, E., Kume, K., Kawahara, K. (Eds.). (1994). The ccli envelope structure of he lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of bacteriology*, 176 (2). 284-290. DOI: 10.1 128/jb.176.2.284-290.1994

- Ke, X., Feng, S., Wang, J., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., Lin, M. (Eds.). (2019). Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A 1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere. *Systems and Applied Microbiology*, 42(2), 248-260. DOI: 10.1016/j.syapm.2018.10.010.
- Kim, H. Yim, B. Bae, C., & Lee, Y. (Eds.). (2017). Acute toxicity and antioxidant responses in the water flea *Daphnia magna* to xenobiotics (cadmium, lead, mercury, bisphenol A, and 4-nonylphenol). *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 9(1), 41-49 DOI: 10.1007/s13530-017-0302-8
- Kimura, K., Hagiva, H., Nishi, I., Yoshida, H., & Tornono, K. (Eds.). (2018). *Roseomonas mucosa* bacteremia in a neutropenic child: A case report and literature review. *IDCases*, 14, e00469. DOI: 10.1016/j.idcr.2018.e00469.
- Kirchman, D. L. (2018). Processes in Microbial Ecology. Recuperado de [https://www.worldcat.org/title/processes.in-microbialecolgyloc/c/1043555622/viewport](https://www.worldcat.org/title/processes-in-microbialecolgyloc/c/1043555622/viewport).
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8), 724-725.
- Koneman, E. (2001). *Diagnostico microbiológico: texto y atlas color*. Recuperado de <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/3803/Koneman-Diagnostico-microbiologico.html>.
- Lalucat, J., Bennisar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. (Eds.). (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510-547. DOI:10.1128/mmbr.00047-05.
- Lalucat, J., Bennisar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 510-547.
- Lapage, S., Hill, L., Reeve, J. (Eds.). (1968). *P. stutzeri* in pathological material.

Journal of Medical Microbiology, 1(2)1 95-202. DOI: 10.1099/00222615-1-2-195

Lewis, L., Stock, F., Williams, D., Weir, S., & Gill, V. J. (1997). Infections with *Roseomonas gilardii* and review of characteristics used for biochemical identification and molecular typing. *American journal of clinical pathology*, 108(2), 210-216.

León, H., Cruz, C., Dávila, R., Velasco, F., Chapa, J. (2015). Impacto del lixiviado generado en el relleno sanitario municipal de Linares (Nuevo León) sobre la calidad del agua superficial y subterránea. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 32(3). [En línea]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1026-87742015000300514&lng=cn&tlng=en. Consultado: 25enero 2020 y que se anexa al presente estudio.

Lipson, D. (Eds.). (2007). Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 59 (2), 418-427. DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00240.x

Liu, S., Pu, S., Deng, D., Huang, H., Yan, C., Ma, H., & Razavi, B. (Eds.). (2020). Comparable effects of manure and its biochar on reducing soil Cr bioavailability and narrowing the rhizosphere extent of enzyme activities. *Environmental International*. 134, 105277. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105277

Lloyd, J., & Macaskie, L. (Ed.) (2000). *Bioremediation of Radionuclide-Containing Wastewaters*. Recuperado de <https://www.asmscience.org/content/book!10.112X/9781555818098.chap13>.

Lustosa, M., López, J., Santos, F., Padilha, E., Hernández-Macedo, M., Cabrera-Padilla, R. (Eds.). (2011). Degradación de hidrocarburos de petróleo por bacterias aisladas de manglares. *Revista Peruana de Biología*. 25 (4). Nota científica. DOI:10.1

- Mac Faddin, J. (2000). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica Buenos Aires Argentina Editorial Medica Panamericana
- Martínez, M. A., & Ovalle, A. (2013). *Sphingomonas paucimobilis*. Revista chilena de infectología, 30(1), 49-50.
- Mathiyazhagan Narayanan, Jimmandiyur Mathappan Murugan, Gajendiran Kandasamy, Sabariswaran Kandasamy, Omaima Nasif, Manikandan Rajendran & Arivalagan Pugazhendhi (2020) The biotransformation potential of *Bacillus cereus* on β -cypermethrin to protect the earthworm (*Perionyx excavatus*) on insecticide -contaminated soil, Archives of Agronomy and Soil Science, DOI: 10.1080/03650340.2020.1864339
- McNeil B., Archer. D. Giavasis I., y Harvey. L (2013). Microbial production of foods ingredients. enzymes and nutraceuticals. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/296531624,,MicrobialProduction,,oLFood_Ingr edients_Enzymes,,and_Ntitraceuticals/link/596e40610f7e9bd5f75f6790/download
- Méndez. R., Cachon, E., Sauri, M. y Castillo, E. (2002). Influencia del material de cubierta en la composición de los lixiviados de un relleno sanitario. Ingeniería. 6 (2), 7-12. En línea Disponible en <http://www.redalyc.org/html/4674t76020> [Consultado 25 enero 2020] y que se anexa al presente estudio.
- Mendo. M. (2014). Medios de Cultivo en Microbiología. Las Gardenias de Pro-Los Olivos, Lima, Perú. Ebisa.
- Miliennium Ecosystem Assessment (MEA). (SO. Ecosystems and Their Services. Recuperado de <https://www.millenniumassessment.org/documents/document300.aspx.pdf>.

Ministerio del Ambiente (MINAM) (2017a). Aprueban Reglamento del Decreto Legislativo N° 1278. Decreto Legislativo que upnieba la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos. Decreto Supremo N° 014-2017-MINAM. 2017. Recuperado de http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2018/06/ds_014-2017-minam-RRSS.pdf.

Ministerio del Ambiente (MINAM). (2017b). Decreto Supremo NC 011-2017-MINAM Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo. Recuperado de <https://sinia.minam.gob.pe/normas/aprueban-estandares-calidad-arnbiental-eca-suelo-o>

Ministerio del Ambiente (MINAM). (2014). Guía para el muestreo de suelos. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2018/07/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELO.pdf>.

Ministerio del Ambiente (MINAM). (2009). D.S. No 012-2009-MINAM Aprueba la Política Nacional del Ambiente (23.05.09). Recuperado de http://wwwxnam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds_012-2009-minam.pdf.

Ministerio del Ambiente (MINAM). (s.f.a). Ley General Del Ambiente - Ley N° 28611. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/06/ley-general-del-ambiente.pdf>.

Ministerio del Ambiente (MINAM). (s.f.b) Ley de Creación del MINAM. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/08/Creaci%C3%83n-MINAM-D.Legislativo.1013.pdf>

Ministerio de Economía y Finanzas (MEF). (2003). Ley Orgánica de Municipalidades LEY N°27972.Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/ogpcontent/uploads/2013/08/Creaci%C3%B3n-MINAM-D.Legislativo.1013.pdf>.

- Ministerio de la Mujer y Poblaciones Vulnerables (MIMP). (2003). Ley Orgánica de Gobiernos Regionales LEY N 27867. Recuperado de https://www.mimp.gob.pe/ogd/pdf/2014-ley-organica-de-gobiernos-regionales_27867.pdf.
- Ministerio de Salud (MINSA). (2009). Opinión técnica favorable del proyecto de infraestructura de tratamiento relleno sanitario de Cajamarca presentado por la Municipalidad Provincial de Cajamarca. Recuperado de <http://www.digesa.minsagob.pe/Expedientes/DepositoOTF/2355-2009pdf>.
- Molina, A. (S.f). Bacteriemia/pseudobacteriemia por una especie de roseomonas. Caso 568V. Servicio de Microbiología Hospital Universitario de Getafe Getafe. Madrid. Recuperado de <http://www.wider.es/casosclinicos/index.php/2013/04/?print=pdf-search>.
- Mollinedo, P. y Gonzáles. V. (2014). Bacterias Gram Negativas. Revista de Actualización Clínica Investiga, 49,2609-2613. ISSN 2304-3768.
- Muñoz-Silva L., P. Olivera-Gonzales, M. SantillánTorres & C. Tamariz-Angeles. 2019. Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa Jangas (Perú). Revista peruana de biología 26(1): 109 - 118 (febrero 2019). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15914>
- Murray, P., Barón, E, Jorgensen, J. Pfaller, M., Tenover, R. (2003). Manual of Clinical Microbiology. Recuperado de <https://jcpnU.coniuintenijclinpath!571i11.2IiiiI. pdf>
- Nájera H. Castañón J., Figueroa J. y Rojas-Valencia M. (2009). Caracterización y tratamiento físicoquímico de lixiviados maduros producidos en el sitio de disposición final de Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. México. II Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos. Barranquilla, Colombia.

- Nandy, S., Dudeja, M. Kumar, D. Tiwari, R. (Eds.). (2013). Community acquired Bacteremia by *Sphingomonas paucimobilis*: two rare cases reports. *Journal of clinical microbiology research*. 7 (12), 2947-2949. DOI: 10.7860 / JCDR / 2013 / 6459.3802.
- Narváez-Fh5rez. S. Gómez. M., y Martínez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aislados a partir de sedimentos del caribe colombiano. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-97612008000100004&script=sci_abstract&tlng=es
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
- Navarro, F. & Torretta, V. (Eds.). (2019). Review Waste microbiología Mismanagement in Developing Countries: A Review of Global Issues. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 1060 DOI: 10.3390/ijerph16061060.
- Nehaul. R., Davis-Yadley. A. Narayanan, S., & Sinnot, J. (Eds.). (2015). Genus *Roseomonas*: the Pink Bacterium-a Case Report. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37 (16), 133- 134. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2015.07.007.
- New South Wales (NSW). (S.f). Soil survey standard test method electrical conductivity. Recuperado de <https://www.environment.nsw.gov.au/resources/soils/testmethods/ec.pdf>.
- Nicola. L., & Bonthuis, E. (Eds.). (2019). The effect of temperature and moisture on lag phase length of bacterial growth in soil after substrate addition. *Soil Biology and Biochemistry*. DOI: 107563. DOI: 10.1016/j.soilbio. 2019.107563.
- Nohit, A. Vassu. T., Trasca, T. Csutak. O. Pelinescu, D., Ghindea. & otros. (2008). Preliminary analysis on biodegrading strains of *Pseudomonas siurzeri*. *Roumanian Biotechnological Letters*. 13 (1). 3595-3604.

- Nolan, J. Waites. K. (Eds.) (2005). Nosocomial ventriculitis due to *Roseomonas gilardii* complicating subarachnoid haemorrhage. *The Journal of infection*. 50. 244-251. DOI: 10.1016/j.jinf.2004.03.011
- Núñez M C Zaror T L & Río R (1975) Fiebre entérica por *Pseudomonas* *Siutzeri* *Revista Chilena de Pediatría*. 46 (1). En línea}. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcpiv46n1/art12.pdf>. Consultado: 25 enero 2020 y que se anexa al presente estudio.
- Núñez, A. (2015). Biodiversidad, materia orgánica y estructura del suelo: ciencia, técnica e ingeniería. (Tesis Doctoral). Universidad de Burgos, España.
- Ochoa C. y Montoya R. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista de la Facultad de ciencias Económicas*. 18 (2), 55-74.
- Oh, Y., Jimvung K., Gye, C., Sun, N. (2016). A Case of *Roseomonas* Infection in Korea. *Lab Med Online*. 6(1), 5053. DOI: 10.3343/lmo.2016.6.150. En línea}. Disponible en: <https://synapse.koreamed.org/Synapse/Data/PDFData01/92LM0/lmo-650.pdf>. Consultado: 25 enero 2020] y que se anexa al presente estudio.
- Osman. N. (2008). Antagonismo in vitro de cepas nativas y de colección (ATCC) de *Bacillus subtilis* frente a *Erwinia carotovora* y *Rhizoctonia solani* (Tesis de grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de licenciado en ciencias biológicas). Universidad Austral de Chile, Los Ríos. Chile.
- Otero P. (2017). Carl Woese y los dominios de la vida. *Revista Boletín Biológica*. 37 (11). En línea. Disponible en: [http://www.revistaboletinbiologica.com.ar/pdfs/N37/historia\(37\).pdf](http://www.revistaboletinbiologica.com.ar/pdfs/N37/historia(37).pdf). Consultado: 25 enero 2020 y que se anexa al presente estudio.

- Palanivel, T. M., Sivakumar, N., Al-Ansari, A., & Victor, R. (Eds.). (2020). Bioremediation of copper by active cells of *Pseudomonas stutzeri* LA3 isolated from an abandoned copper mine soil. *Journal of Environmental Management*. 253. 109706. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.10.9706.
- Presidencia del Consejo de ministros (PCM). (S.f). Constitución Política del Perú. Recuperado de <http://www.pcm.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/Constitucion-Pol%C3%ADtica-del-Peru-1993.pdf>.
- Pereira, P., Bogunovic, I. Muñoz-Rojas, M. & Brevik, E. (Eds.). (2018). Soil ecosystem services, sustainability, valuation and management. *Current Opinion in Environmental Science & Technology*, 5, 7-13. DOI:10.1016/j.cosh.2017.12.003.
- Pérez, P. (2012). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. Revisión. *Revista Cubana de Salud Pública*, 38 (1). ISSN 0864-3466.
- Pincus, D. H. (S.f), Microbial identification using the Bioréieux VITEK® 2 System BioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA. Recuperado de https://store.pda.org/tabletcontents/ermm_v2_ch01.pdf
- Poorsoleiman, M. Hosseini, S. Etrinan, A., Abiahi, H., & Koolivand, A. (Eds.). (2019). Effect of two-step bioaugmentation of an indigenous bacterial strain isolated from oily waste sludge on petroleum hydrocarbons biodegradation: Scaling-up from a liquid mineral medium to a two-stage composting process. *Environmental Technology & Innovation*, 100558. DOI: 10.1016/j.eti.2019.10.0558

- Puerta-García, A. & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*. 10 (51):3426-31. [En línea. Disponible en: [hnp://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias.Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias.Medicine2010.pdf). [Consultado: 25 enero 2020] y que se anexa al presente estudio.
- Q GIS. (s.f). Descarga libre. Recuperado de <https://www.qgis.org/es/site/forusers/download.html>.
- Quinteros, M. Famiglietti, A., Lirnansky, A. Casellas. J. M. Vay. C., Pastera. E. y otros. (2005). Consenso sobre criterio de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad en los BNNF. Recuperado de https://aam.org.arisrclimg_up130072014.3.pdf.
- Raghad, Jaafar. (2019). THE POTENTIAL ROLE OF SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS IN BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH HYDROCARBON AND HEAVY METAL. *Malaysian Journal of Science*. 38. 48-58. 10.22452/mjs.vol38no3.5.
- R. Core Team (2018). R. A Language and environment for statistical computing (Computer software). Recuperado de <https://cran.r-project.org/>.
- Rihs, J. Brenner. D. Weaver. R. Steigerwalt, A., Hollis, D., Yu, V. (1993). Roseomonas, a new genus associated with bacteremia and other human infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(12), 3275-3283. En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266400/pdf/jcm00024-0211.pdf>. [Consultado: 25 enero 2020] y que se anexa al presente estudio.
- Romano-Bertrand. S., Bourdier A. Aujoulat. F., Michon. A., Masnou, A., Parer S., & otros. (2016). Skin microbiota is the main reservoir of Roseomonas mucosa. an emerging opportunistic pathogen so far assumed to be environmental. *Clinical Microbiology and Infection*. 22 (737). e737.e7.

- Rudolph, W. Gunzer, F., Trauth, Kl., Bunk, E., Bigge, R., y Schröttner. P. (Eds.). (2019). Comparison of Vitek 2, Maldi-Tof MS. 16S rRNA gene sequencing. and whole- genome sequencing for identification of *Roseomonas mucosa*. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103576. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103576.
- Ruiz-Marín, A., Zavala-Luna, J. C., Canedo-López, Y., & Cordova-Quiroz, A. V. (2013). Aislamiento de bacterias tropicales en suelo de mangle contaminado por hidrocarburos: biorremediación por atenuación natural y bioaumentación. *Revista mexicana de ingeniería química*. 12 (3). ISSN 1665-2738.
- Ryan. M. Adlev. C. (Eds.). (2010). *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection*, 75 (3), 153-157. DOI:10.1016 /j. jhin.2010.03.007.
- Sahar. A. (2013). A Case of bacteremia due to *Roseomonas gilardii* in a senile nigerian patient with many underlying medical illness. *European Journal of Research in Medical Sciences*. 1 (1). Disponible en: <https://www.idpublications.org/wpcontent/uploads/2013/08/a-case-of-bacteremia- due-to-roseomonas-gilardii-in-a-senile-nigerian-patient-with-many-underlying-medical-illness.pdf>. Consultado: 25 enero 2020 y que se anexa al presente estudio.
- Salazar, Y. y Sánchez, É. (2011). Evaluación de consorcios microbianos conformados a partir de aislamientos bacterianos con capacidad de degradadora de Letranitrato de pentaeritritol (PETN) y trinitrotolueno (TNT) (Proyecto de grado para optar el título de ingeniero Ambiental y Sanitario). Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.

- Salton M. R. & Kwang-Shin K. (1996). Structure. En S. Baron. (Ed). Medical Microbiology. Texas. Unites States. Galveston (TX).
- Sancha. A. (2013). Caracterización físico-química y microbiológica de un proceso de tratamiento de lixiviados de vertedero (Proyecto de investigación para obtener el grado de Máster en Biotecnología Alimentaria). Universidad Oviedo. Oviedo, España.
- Schleifer, K., & Beil, J. (Eds.). (2015). Staphylococcus. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 001:10.1002/9781118960608. gbm(X) 569.
- Schoch. P. Minniganti, V. Nair, R. y Cunha, B. (Eds.). (1999). Primary roseomonas gilardii bacteremia in a patient with inflammatory breast cancer. Clinical Microbiolagy Newsieuer, 21(23). 1 88 190. DOI: 10.101 6/sO 196-4399(00)90002-3.
- Seethapathy H., Hix i., Silver J. 2016). Roseomonas gilardii infection in a patient undergoing CAPO: Rochester general hospital. Rochester. Recuperado de [https://www.ajkd.org/article/S0272-6386\(16\)005357/pdf](https://www.ajkd.org/article/S0272-6386(16)005357/pdf).
- Senamhi. (2020). Pronóstico del tiempo para Cajamarca. IEn línea 1. Disponible en: <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cajamarca&ppronostico-detalle>.
- Smith, R., Tanouchi, Y., & You, L. (Ms.). (2013). Synthetic Microbial Consortia and their Applications. Svnrhesis Biology. 243-258. DOI: 10.101 6/b978-0- 12-394430-6.00013-3
- Steward K. (S.fj. Gram Positive vs Gram Negative. Recuperado de <https://www.technologynetworks.com/immunologyfarticles/gram-positive-vs-gramnegative -323007>.
- Svec, P. & Devriese, L. (Ed). Genus I. Enieroooccus (ex Thiercelin and Jouhaud (1903) New York. USA. Editorial Springer.

- Takami, H. (Ms.). (2019). Molecular Tools in Microbial Diversity. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 117—136. IX)1: 10.1016/b978-0-12-814849-5.00008-3
- Thind, B. (2020). *Phytopathogenic bacteria and plant diseases*. Boca Raton FL. Taylor y Franelas Group.
- Ting Ch Hegaz) M., Chung Dar L (Ms) (2010) L Lysine Catabolism Is controlled by L- Arginine and ArgR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of bacteriology*, 192 (22), 5874--5880. DOI:10.1128/JB.00673-10.
- Toro C., Enríquez A., Moreno V., Alvarez P, Buhigas I., y Baquero M. (2000). Isolation of *Roseomonas gilardii* in a patient with AIDS. *Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 18 (5), 250-251. En línea. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-aislamiento-roseomonas-gilardii-un-paciente-10715>. [Consultado: 25 enero 2020] y que se anexa
- Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (FCN.UNP). (2019). *Metabolismo bacteriano, identificación y taxonomía*. Recuperado de <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microgenerallwp-content/uploads/2017/02/07-Metabolismo-Identificacion-y-taxonom%C3%ADa.pdf>.
- Vásquez, Ch. (2017). *Efecto de los microorganismos eficaces en la calidad fisicoquímica y microbiológica de los lixiviados del relleno sanitario municipal de Cajamarca* (Tesis de postgrado para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca. Perú.

- Vergara T (2017) Caracterización de las unidades geomorfológicas en el distrito de Jesús, Cajamarca (Tesis de pregrado para obtener el título profesional de Ingeniero Geólogo). Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.
- Villarreal-Delgado, María Fernanda, Villa-Rodríguez, Eber Daniel, Cira-Chávez, Luis Alberto, Estrada-Alvarado, María Isabel, Parra-Cota, Fannie Isela, & Santos-Villalobos, Sergio de los. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Vinothini, C., Sijdhakar, S. & Ravikuma, R. (2015, Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*. *International journal of current microbiology and Applied Sciences*. 4 (1), 318-319. ISSN: 2319-7706.
- Wang, K., Liu, Y., Song, Z., Wang, D., & Qiu, W. (Eds.). (2019). Chelator complexes enhanced *Aeromonas hydrophila* L. phytoremediation efficiency of Cd-contaminated soils. *Chemosphere*, 237, 124480. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124480.
- Weyant, R. y Whitney, A. (Eds.). (2015). *Roseomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-9. DOI:10.1002/9781118960608.gbm000888.
- Winn, W., Allen S., Janda, W. Koneman, E., Tenover, G., Schreckenberger P., y otros. (Ed.). (2008). *Koneman Diagnóstico microbiológico Texto atlas en color*. Editorial Médica Panamericana.
- Wu, D. Chen O. Zhang, X., Yang, K., & Xie, B. (Eds.), (2016). Change in microbial community in landfill refuse contaminated with antibiotics facilitates denitrification more than the increase in ARG over long-term. *Scientific Reports*, 7.41230. DOI:10.1038/srep41230

- Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Iwashimoto, Y., Ezaki, T. y Yamamoto, H. (Eds.). (1990). Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. And comb. Nov. *Sphingomonas paucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas vanosokuvae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and Two Genospecies of the Genus *Sphingomonas*. *Microbiology and Immunology*. 34(2). 99-119. DOI:10.1111/j.1348-0421.1990.tb00996.x.
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, Ch. & Qin, W. (Eds.). (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*. 3.316-323. DOI: 10.1016/j.iswcr.2015.11.003.
- Yaya, Ch. (2017). Biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo por bacterias nativas sometidas a distintas condiciones de cultivo aplicados en aguas residuales, Callao - 2017 (Tesis de pregrado para obtener el título de Ingeniera Ambiental). Universidad Cesar Vallejo. Lima Norte Perú.
- Yen, T. Siew, Y. & Ching, E (Eds.). (2013). Five clinical cases of *Necropsobacter rosorum* bacteremia. *Journal Clinical Microbiology*, 51 (4). 1337-1340. DOI: 10.1128/JCM.03116-12.
- Zúñiga, F, Huertas, J. Guerrero, G. Sarasty, J. Dórner, I. y Urbano, O. (Eds.). (2018). Propiedades morfológicas de los suelos asociadas a los ecosistemas de Páramo. Nariño, Sur de Colombia. *Terra Latinoamericana*, 36. 183-196. DOI: <https://doi-org/10.28940/terra-v36i2.3>.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Panel Fotográfico

Fotografía 1.

Suelo impactado por lixiviado del relleno sanitario Cajamarca.



Fotografía 2

Realizando toma de muestra de suelos.



Fotografía 3

Recopilando toma de muestra de suelo



Fotografía 4

Obteniendo la toma de muestra de suelo.



Fotografía 5

Muestra de suelo.



Fotografía 6

Pesado de suelo.



7.2. Ficha Registro de campo

DATOS DE CAMPO DE LAS MUESTRAS DE SUELO – MUESTREO DE SUELO							
PROCEDENCIA: Caserío Palturo						ANÁLISIS REQUERIDO	OBSERVACIONES
FECHA: 12 MAYO 2020							
HORA DE INICIO: 80:00 AM			HORA DE FIN: 13:00 pm				
MUESTREO REALIZADO POR: Ingeniero Ambiental Osias CuevaGUEVARA							
ÍTEM	ESTACIÓN	IDENTIFICACIÓN	FECHA	HORA	CANTIDAD DE SUELO		
1	07°10'06.35" S. 78°29'4270" W	Arcilloso	12 mayo 2020	09:00 am	Medio kilo	Análisis bioquímico	Suelo color amarillónaranja
2	07°10'06.36" S. 78°29'4273" W	Arcilloso	12 mayo 2020	09:30 am	Medio kilo	Análisis bioquímico	Suelo color amarillónaranja
3	07°10'06.38" S. 78°29'4274" W	Arcilloso	12 mayo 2020	10:00 am	Medio kilo	Análisis bioquímico	Suelo color amarillónaranja
4	07°10'06.33" S. 78°29'4272" W	Arcilloso	12 mayo 2020	10:30 am	Medio kilo	Análisis bioquímico	Suelo color amarillónaranja
5	07°10'06.38" S. 78°29'4271" W	Arcilloso	12 mayo 2020	11:00 am	Medio kilo	Análisis bioquímico	Suelo color amarillónaranja
6	07°10'06.39" S. 78°29'4277" W	Arcilloso	12 mayo 2020	11:30 am	Medio kilo	Análisis bioquímico	Suelo color amarillónaranja
7	07°10'06.37" S. 78°29'4276" W	Arcilloso	12 mayo 2020	12:00 am	Medio kilo	Análisis bioquímico	Suelo color amarillónaranja