

## IDENTIFICACIÓN DE COLIFORMES EN EL CANAL DE AGUAS LLUVIAS DE LA UNIVERSIDAD DISTRITAL, SEDE VIVERO

1. Ingrid Melisa Pérez Rodríguez

**Docente Asesor:** Luz Fabiola Cárdenas Torres

**Semillero de Investigación:** Producción Verde

### RESUMEN

El canal de aguas lluvias ubicado en la Sede Vivero de la Universidad Distrital, transitado diariamente por la comunidad universitaria, tiene como principal problemática el estancamiento de agua, que genera proliferación de vectores y focos de incubación de bacterias, debido a esto el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de bacterias coliformes y estudiar el género que tuvo mayor formación de UFC (Unidad Formadora de Colonias), para ello se realizó una siembra masiva y por medio de los postulados Koch se purificó la bacteria ejecutando siembras por cuadrantes, se realizaron siembras en tubos para determinar características generales como morfología microscópica y motilidad, entre otras;

además, tinciones simples y diferenciales para identificar la morfología microscópica, esporulación y presencia de glicocálix. Las pruebas bioquímicas tuvieron como fin identificar el metabolismo de la bacteria, todo lo anterior para llegar a la familia y el género con ayuda del manual de Bergey's, con un 93% de coincidencia en los resultados obtenidos, el microorganismo identificado fue *Citrobacter freundii* un bacilo gram negativo, móvil, anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, patógeno oportunista, se ha observado en el agua, en el suelo y en menor proporción en tracto digestivo humano, puede causar enfermedad en pacientes inmunocomprometidos y se le ha involucrado en epidemias ocasionales de gastroenteritis, el microorganis-

mo es usado en aplicaciones ambientales para la degradación de contaminantes al suelo, también se ha estudiado la posibilidad de la extracción de enzimas o genes que resultan útiles para potenciar el metabolismo de otras bacterias.

**PALABRAS CLAVES:** Enterobacteriaceae, coliformes, aguas de escorrentía, patogenicidad, gram negativo.

### ABSTRACT

The rainwater channel located in the nursery of the District University, which is transited daily by the university community, where the main problem is the stagnation of water which generates the proliferation of vectors and incubation sites of bacteria, That is why the objective of this study was to determine the presence of coliform bacteria and study the genus that had greater formation of CFU, for this a massive sowing was made and by means of the Koch postulates the bacteria was purified executing sowings by quadrants, sowings in tubes were made to determine general characteristics like macroscopic morphology, motility, among others; simple and differential staining to identi-

fy microscopic morphology, sporulation and presence of glycocalyx biochemical tests that have the purpose of identifying the metabolism of the bacteria, all the above to identify the family and genus of the bacteria with the help of Bergey's manual, with a 93% coincidence in the results obtained, the identified microorganism was *Citrobacter freundii* a gram negative, mobile, facultative anaerobic bacillus belonging to the family of Enterobacteriaceae, immunounistic. pathogenic family, has been identified in the soil, in water and sporadically in the gastrointestinal tract of the human, can cause disease in immunocompromised patients and has been involved in occasional epidemics of stomach flu, the microorganism is used in environmental applications for the degradation of contaminants to the soil, the possibility of extraction of enzymes or genes that are useful to boost the metabolism of other bacteria has been studied.

**KEY WORDS:** Enterobacteriaceae, coliforms, runoff, pathogenicity, gram negative.

## INTRODUCCIÓN

La Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales (FAMARENA), en la Sede Vivero sobre la avenida Circunvalar y la carrera 5 este, en esta reciben clases un aproximado de 4.000 estudiantes en un espacio que ocupa 5 hectáreas aproximadamente, la muestra fue tomada del canal de aguas lluvias que se encuentra ubicado a un costado de la carpintería (anexo 1), la principal problemática de este canal radica en que el agua que lo alimenta es de escorrentía y de un vertimiento puntual, esto ocasiona mayor cantidad de sedimentos y estancamientos debido a los bajos caudales. Todos estos factores anteriormente mencionados hacen que estas aguas sean un potencial foco de incubación de bacterias y larvas de insectos que puedan transmitir enfermedades. Los drenajes deficientes crean numerosos problemas a corto y largo plazo, provocando erosión del terreno, disminución de la calidad del agua y zonas de reproducción de vectores (Raffaele, 1999).

El principal objetivo del estudio, es determinar

si en el canal existe la presencia de coliformes, identificar que bacteria está presente en mayor proporción y si es un microorganismo patógeno.

Según Mendoza, el agua estancada puede estar llena de bacterias y parásitos que pueden causar distintos tipos de infecciones (Eagleton, 2017).

La exposición a aguas residuales contaminadas vía inhalación, ingestión o contacto directo con la piel, puede causar problemas de salud, como cefaleas, náuseas, problemas respiratorios, afectaciones dermatológicas en la piel y depresión del sistema nervioso central (Eagleton, 2017).

El trasfondo de este problema, es el mal manejo de alcantarillado de las aguas lluvias, esto ha hecho que con el crecimiento de las grandes ciudades se propusiera una regulación en los servicios públicos, teniendo como foco la relación de agua residual y lluvia. La solución general se orientó a disponer las aguas lluvias por escorrentía en las calles hasta llegar a colectores para facilitar su

transporte. Esto arrojó resultados ineficientes ya que las tuberías que se disponen para ello no son suficientes para el caudal transportado y es inviable sustituir toda la red de alcantarillado para corregir este error; debido a este problema se presentan inundaciones que representan un foco de enfermedades, daños en la infraestructura y disminuye la calidad de vida de la población afectada (Guerrero, 2018)

## MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los procedimientos se cumplieron las normas de bioseguridad en el laboratorio y se adelantó de la siguiente forma.

**Recuperación de microorganismos:** se toma 1g o 1ml de la muestra a evaluar, y luego se homogeniza con agua peptonada usando el vortex, se deja de 20 a 30 minutos incubando en el baño serológico a 45°C.

**Siembra Masiva:** se inocula en el centro del medio de cultivo con 0,25ml de la muestra y usando el asa tipo Drigalsky, se despliega la muestra por la superficie del medio cultivado, posteriormente se llevan a incubar a 37°C.

**Figura 1.** Crecimiento siembra



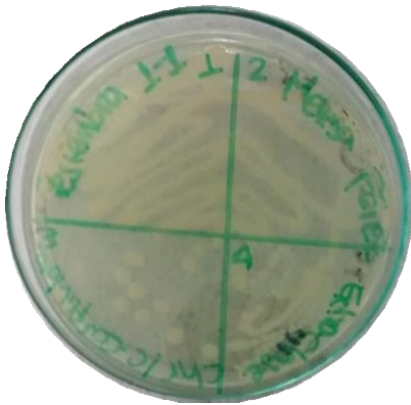
**Fuente:** Autor

Los agares utilizados fueron: LB Luria Bertini (Nutritivo), SS Salmonella Shigella (diferencial/selectivo), CHR Chromocult (Selectivo), BP Baird Parker (diferencial), MYP *Bacillus cereus* (Diferencial), YE extracto de malta (selectivo), para realizar la lectura de los medios sembrados se debe especificar la morfología de las colonias observadas como: elevación, borde, forma y color.

**Aislamiento y purificación:** se debe escoger una UFC y realizar, una resiembra en el medio nutritivo, en la lectura se debe describir el cambio de colores y morfología de las UFC.

**Siembra por Cuadrantes:** se realiza con el asa redonda donde se debe tomar la UFC de interés, en el medio seleccionado se efectúan estrías en el primer cuadrante, se arrastra la muestra y se hacen estrías en los 3 cuadrantes restantes teniendo en cuenta no repasar los sitios donde rozó el asa, considerando que en cada cuadrante se deben hacer estrías más alejadas entre sí, terminando en el cuarto cuadrante con el objetivo de aislar colonias del microorganismo, como se muestra en la figura 2.

**Figura 2.** Crecimiento de siembra por cuadrantes



Fuente: Autor

### Siembra en tubos

- **Superficie Plana:** se realiza con el asa recta por punción sin tocar la base, ni contorno del tubo, debe ser una punción veloz para garantizar su verticalidad.
- **Superficie Inclinada:** se siembra por estría utilizando el asa redonda comenzando por el fondo de la inclinación y se debe ir atrayendo por la superficie hasta dejar un campo de medio centímetro en el borde superior de la inclinación.
- **Medio líquido:** se utiliza el asa redonda, ingresando hasta la mitad del medio el asa y con movimiento rápidos y fuertes golpear el asa con las paredes del tubo para depositar la muestra.

### Técnicas de tinción

- **Tinción simple:** tienen el objetivo de indicar la morfología que presentan las bacterias, para esto se realizaron las tinciones: azul de metileno, cristal violeta y fucsina.
- **Tinción de Gram:** es una tinción compuesta ya que se utilizan colorantes como cristal violeta, lugol, mezcla de alcohol-cetona y fucsina; esto permite identificar si la bacteria es gran

positiva o gran negativa.

- **Tinciones diferenciales**

**Rojo Congo y tinta china:** se utilizan para determinar la presencia de glicocalix en la bacteria, el rojo Congo permite determinar si la bacteria posee capsula o capa delgada.

**Wayson y Verde Malaquita:** permite observar la presencia de esporas en los microorganismos, y en qué posición se encuentran.

**Pruebas Bioquímicas:**

Para las pruebas de citrato y TSI (triple azúcar hierro) se siembra por punción y estrías, usando un tubo de superficie inclinada.

Las pruebas SIM (Sulfuro Indol Movilidad), oxidación-fermentación, rojo de metilo, Vogues-Proskawer, gelatina y nitrato se realiza por punción ya que son medio de superficie plana.

La prueba de urea se sembró por suspensión ya que es un medio líquido.

Adicionalmente, al momento de sembrar la prueba de fermentación se le agrega glicerina para aislar el oxígeno del tubo.

La prueba de oxidasa y catalasa no se incuban, su resultado es inmediato, para la prueba de catalasa se coloca en una lámina portaobjetos una gota de peróxido de hidrógeno y usando el asa redonda se extiende la muestra posteriormente se observa la reacción. Para la prueba oxidasa se utiliza una tira y con un copo de algodón se frota la muestra y esta presenta un viraje de incoloro a azul si la prueba es positiva.

**Lectura de pruebas Bioquímicas**

En las pruebas de citrato, TSI, oxidación-fermentación, urea, catalasa, gelatinasa y oxidasa, se realiza la lectura por medio de virajes de colores, precipitados y cambios en el agar.

En la prueba SIM se aplica de 2 a 3 gotas del reactivo de Kovac para permitir la formación del anillo indólico.



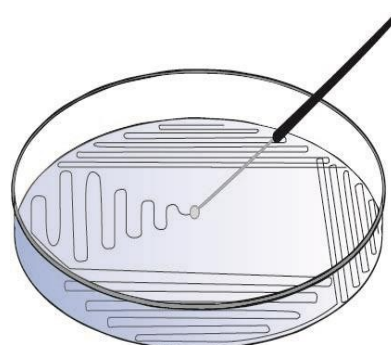
Rojo de metilo: se añaden 5 gotas del indicador rojo de metilo para permitir observar la presencia de ácido, cuando se presenta el viraje la prueba es positiva.

Voges-Proskauer: para su lectura se agrega el reactivo de Barritt compuesto de dos reactivos, donde el reactivo A es catalizador llamado alfa-naftol que actúa como intensificador de color, y el reactivo B es hidróxido de potasio donde se realiza una evaluación ácido-neutro, con cambios de PH según virajes.

Nitrato: se utiliza el reactivo de Nessler que permitirá ver si se redujeron los nitratos a nitritos por medio de un viraje de color amarillo.

**Siembra por rejilla:** se realiza con un asa redonda, se toma muestra y luego en el primer cuarto de la caja de Petri se realizan líneas horizontales paralelas, se arrastra la muestra, y se realizan líneas verticales paralelas, posteriormente se realizan líneas paralelas en la parte inferior de la caja y al finalizar se traza una pequeña estría como se observa en la figura 3.

**Figura 3.** Siembra técnica rejilla



**Fuente:** ilustración hecha utilizando Adobe Ilustrador por el autor

Para la lectura de bioprospección de enzimas se sembraron los agares de caseína, se lee al poner al agar a la luz; en el agar almidón se aplica lugol, y en el de carboximetilcelulosa (CMC) se aplica rojo congo, en estos medios la reacción positiva se observa con la formación de un halo transparente alrededor de la siembra. Para la tributirina se observa el medio bajo luz ultra violeta y la prueba es positiva si se observan burbujas en el medio.

## RESULTADOS

**Siembra masiva:** se escogió el medio de cultivo CHR (chromocult), donde se observó un cambio de color en el agar más amarillen-

to y opaco, los tipos de colonias observados fueron de color salmón rosa claro y algunas colonias oscuras, hubo crecimiento masivo de microorganismos, con un total de 1.168 UFC este conteo se realizó por medio de cuadrantes. Respecto a la guía del agar los posibles microorganismos donde se obtienen colonias de color rosa son: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*.

### **Morfología Microbiana**

Borde: circular entero

Elevación: elevado levemente

Forma: puntiforme

Color: rosa y rojizo

(observación figura 10 anexo 2).

**Aislamiento de microorganismo:** medio de cultivo: LB Luria Bertani (Nutritivo)

Color antes de sembrar: translucido

Color después de la siembra: se observan colonias de color blancuzco, con las siguientes características:

Borde: entero

Elevación: plano

Forma: circular

(Observación en figura 9 anexo 2).

### **Siembra en tubos**

**Líquido:** se observa botón en el fondo donde hay menos concentración de oxígeno, película adherida a las paredes lo que indica presencia de glicocalix, turbidez plantónica que es característica de microorganismos aeróbicos de tipo facultativo como se observa en la figura 11 (anexo 2).

**Inclinado:** crecimiento equinulado, se observan ondulaciones propias de una siembra con crecimiento (figura 12, anexo2).

**Plano:** se observa producción de CO<sub>2</sub>, crecimiento de tipo filiforme en forma de película y que le microorganismo tiene motilidad (figura 13, anexo 2).

### **Tinciones**

**Simples:** se identificó la morfología de las bacterias, siendo estos bacilos, agrupados los observados en las figuras de la 14,15 y 16



(anexo 3).

### Diferenciales:

**Gram:** se observaron bacilos de color rosa fuerte lo cual indica que son gram negativas como se muestra en la figura 17 (anexo 3).

Verde Malaquita y Wayson: no se observa esporulación en las bacterias como se identifica en las figuras 18 y 21 (anexo 3).

**Tinta china y rojo Congo:** se observa la presencia de glicocalix, en rojo Congo se puede identificar que la bacteria tiene capsula ya que el glicocalix sobrepasa el 50% del tamaño de la bacteria como se evidencia en las figuras 19 y 20 (anexo 3).

### Pruebas bioquímicas

El microorganismo presentó resultados positivos para las pruebas de producción de CO<sub>2</sub>, motilidad, oxidación, rojo de metilo y nitrato.

**Citrato:** el microorganismo posee la enzima citrato permeasa y utiliza el piruvato para irse por la vía fermentativa.

**TSI:** acido/acido donde el microorganismo emplea glucosa, lactosa y sacarosa y toma la vía oxidativa por ciclo de Krebs, esto concuerda con la prueba de oxidación de glucosa.

**Rojo de metilo:** el microorganismo es capaz de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, necesita presencia de oxígeno para activar su metabolismo y fermentar glucosa, esto debido a que en la prueba de fermentación con ausencia de oxígeno resulto negativa.

**Nitrato:** el microorganismo posee la enzima nitrato reductasa, lo que indica la capacidad de reducir nitratos a nitritos. Comparando los datos obtenidos con el manual de Bergey's el microorganismo identificado fue *Citrobacter freundii*.

Estos resultados se identifican en las figuras 23,24,25 y 26 (anexo 3). Se logró un cultivo puro con características morfológicas macroscópicas.

De otro lado, según la clasificación realizada

el microorganismo identificado pertenece a:

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Citrobacter*

**Especie:** *Citrobacter freundii*

Esta clasificación según los aportes de Werkman & Gillen (1932) para el manual de Bergey's.

El microorganismo encontrado (*Citrobacter freundii*) usualmente se encuentra en aguas residuales, suelo y en el sistema digestivo de humanos y animales. Lo cual indica que tiene una alta probabilidad de habitar en este canal por lo anteriormente descrito y además de ello, la fauna presente, también se debe tener en cuenta que hay suelo desnudo, en el área de influencia.

## DISCUSIÓN

El lugar de donde se obtiene la muestra se caracteriza por transportar aguas pluviales por arrastre, se observa un vertimiento puntual de aguas presuntamente de tipo residual ya que en un costado funciona dependencias de la universidad como salones de música, gimnasio, espacios de celaduría, vivero, entre otras. El sitio donde se tomó la muestra esta demarcado en color verde en el anexo 1, el área de influencia sobre este vertimiento esta demarcada en color rojo, esto quiere decir que posiblemente, parte de las aguas residuales del herbario, vivero, salones, carpintería y caseta de celadores sean conducidas al canal, además de ello las aguas pluviales que por escorrentía desembocan en dicho canal.

Debido al objetivo de identificar coliformes en la muestra de agua, se selecciona el medio de cultivo CHR (chromocult) ya que es este es un medio selectivo para el desarrollo de dichas bacterias.

En el agar seleccionado CHR, se identifica-

ron las bacterias aisladas del orden XIII enterobacteriales de la familia Enterobacteriaceae, según las características encontradas en la teoría, En el agar CHR los microorganismos que se desarrollan son *Escherichea coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.

El fundamento indica, que los microorganismos se expresan logrando tomar colores, son los primeros los que poseen la enzima B-D-Galactosidasa para escindir el sustrato salmón-GAL y esta reacción produce colonias de color rosa asalmonado, las colonias de dicho color se aislaron en el proceso de laboratorio, las especies que poseen dicha enzima y representan ese

color son *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* (Merck, 2014).

Se realiza una lectura de cada género con el fin de descartar algunos según sus características generales y además de ello se compara las pruebas bioquímicas principales IMVIC, que son Indol, Motilidad, Vogues Proskauer, Rojo de metilo y Citrato, esto gracias a los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

En las cuales se descartan los siguientes géneros (tabla 1), debido a la información suministrada por el manual de Bergey's (Goodfellow,2012).

**Tabla 1.** Identificación de género

IMVIC	Resultados experimentales	Citrobacter	Enterobacter	Klebsiella
INDOL	-	-	-	-
MOTILIDAD	+	+	+	-
VP	-	-	+	+
ROJO METILO	+	+	-	-
CITRATO	+	+	+	-

**Fuente:** Autor

Luego de realizar una comparación entre géneros y observar según el manual de Bergey's las características generales y metabolismo del microorganismo se identificó el género *Citrobacter*.

Según el manual de Bergey's el género *Citrobacter*: son barras rectas, 1.0  $\mu\text{m}$ –6.0  $\mu\text{m}$ , pueden ocurrir solos y en parejas. La definición general de la familia Enterobacteriaceae corresponde a:

- No esporulado.
- Gram negativo.
- Generalmente tienen movilidad por flagelos.
- Facultativamente anaeróbico, tiene un tipo de metabolismo rotatorio y fermentativo.
- Crecen con facilidad en medios ordinarios.
- Las colonias en agar nutritivo son frecuentemente de 2–4 mm de diámetro, lisas, poco convexas, húmedas, translúcidas u opacas a gris con una superficie brillante y todo el borde. Formas mucoides o rugosas que pueden ocurrir ocasionalmente.
- Oxidasa negativa, catalasa positiva y quimioorganotrófico.
- El citrato se puede utilizar como fuente única carbono.
- La D-glucosa se fermenta con la producción de ácido y gas.
- La prueba de rojo de metilo es positiva y la de Voges-Proskauer es negativa.
- Está presente en las heces de humanos y algunos animales, posiblemente son habitantes intestinales comunes. A veces son patógenos y comúnmente son aislados en muestras clínicas. Como patógenos oportunistas también se pueden encontrar en el suelo, la comida.

da, el agua residual y doméstica (Goodfellow, 2012).

Debido a la anterior descripción del género *Citrobacter* se pueden comparar los resultados obtenidos y se encuentra similitud, ya que en las tinciones las morfologías obtenidas son single bacilos, gram negativos, sin esporas; en la siembra en tubos se observa que el microorganismo presenta motilidad, así como en la prueba SIM, además el microorganismo es aerobio facultativo debido al crecimiento del mismo donde hay menos concentración de oxígeno, en las pruebas bioquímicas como en la siembra en tubos se observa la producción de CO<sub>2</sub>, se obtiene que el microorganismo es capaz de oxidar y fermentar glucosa siempre y cuando tenga algún grado de oxígeno en el entorno.

Las enzimas extracelulares que se identifican son caseínasa, amilasa y celulosa, estas se identifican en las figuras 27,28,29 y 30 (anexo 5), se debe medir la velocidad de reacción de estas enzimas para utilizar el microorganismo en procesos biotecnológicos. A pesar de que todas las pruebas fueron positivas, no se obser-

vó gran producción de enzimas extracelulares ya que los halos fueron bastante claros y no cubrieron gran parte del área del medio.

Luego, se determina la especie descartando, según las descripciones de cada especie y debido a esto el microorganismo que se acomoda más al entorno donde se tomó la muestra es la especie *Citrobacter freundii*, como consecuencia a que las demás especies son poco comunes y se han encontrado muy pocas cepas en otros países esta depuración (anexo 6). La bacteria identificada es una bacteria patógena oportunista, lo que indica que la bacteria afectara a las personas que tengan un sistema inmune débil.

El *Citrobacter freundii* es un microorganismo presente comúnmente en la naturaleza se ha podido identificar en la tierra, en el agua y esporádicamente en tracto gastrointestinal del humano, puede causar enfermedad en pacientes inmunocomprometidos y se le ha involucrado en epidemias ocasionales de gastroenteritis (González *et al*, 1982). Considerando la presencia de este microorganismo

en las muestras se puede establecer que se incumpliría con la resolución 2115 de 2007.

Las especificaciones generales sobre el microorganismo, coinciden con el sitio de muestreo ya que esta especie se encuentra usualmente en humanos y animales, incluidos mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. También se encuentra en el suelo, agua, alcantarillado y comida. La muestra fue tomada en el canal de carpintería de la sede vivero, donde la clasificación de estas aguas mixtas entre residuales y pluviales.

La importancia en la identificación de microorganismos, radica en poder conocer toda la biodiversidad microbiana que podemos encontrar en un sitio de interés y disponer de investigaciones sobre los microorganismos para considerarlos como base de resolución de problemáticas ambientales, que se puedan presentar en un entorno, con la aplicación de biotecnología observando la interacción entre el microorganismo y el entorno.

## CONCLUSIONES

- La muestra de agua tomada indica grado de contaminación ya que posee enterobacterias, es decir incumpliría con la resolución 2115 de 2007.
- A partir de la clasificación realizada el microorganismo identificado es *Citrobacter freundii*.
- En la siembra en tubos el microorganismo presenta motilidad, se evidencia que es aerobio facultativo y se identifica la producción de CO<sub>2</sub>, el microorganismo oxida y fermenta glucosa.
- En las pruebas adelantadas no se observó gran producción de enzimas extracelulares.

## AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios, a mi familia que han sido mi motivación, a mi pareja por ser incondicional.

Agradezco de manera cordial a la docente Lena Echeverry por despertar en mí el inte-



rés por el tema y apoyarme en el desarrollo conceptual de la microbiología.

A la tutora del Semillero Producción Verde, Fabiola Cárdenas, por estar siempre dispuesta a escuchar y ser insistente en el camino de la investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eagleton, N. (2017). El agua estancada: Infecciones y otros riesgos. Miami Florida. Baptist Health South Florida. Recuperado de: [baptisthealth.net/baptist-health-news/infections-hazards-standing-water/?cat=research](http://baptisthealth.net/baptist-health-news/infections-hazards-standing-water/?cat=research).
2. González, A., Montes, F., Mayorga, A. & Letelier, M. (1982). Infección por *Citrobacter freundii*. Artículo. *Revista de Enfermedades Infecciosas*, 9. Recuperado desde: <http://www.bvs.hn/RHP/pdf/1982/pdf/Vol9-1-1982-3.pdf>.
3. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, HJ, Trujillo, ME, Suzuki, KI, Ludwig, W. & Whitman, W.B. (2012) *Bergey's Manual® de Bacteriología Sistemática: Volumen Cinco Las Actinobacterias*, Parte A (pp. 171-206). Springer Nueva York.
4. Guerreo, E. (2018). Aguas lluvias el reto de las ciudades de hoy. *Bogotá Colombia*. Rescatado de: Diario La República.
5. Laboratorios Merck (2014). *Agar para coliformes Chromocult®, detección simultánea de bacterias coliformes y E.coli en el agua*. EMD Millipore Corporation, Billerica, EE.UU. Recuperado de: [https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Coliform-Agar,MDA\\_CHEM-110426](https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Coliform-Agar,MDA_CHEM-110426).
6. Raffaele, E. (1999). Mallines: aspectos generales y problemas particulares. *Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica*. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe. ORCYT. Montevideo, Uruguay.



guay.

7. Werkman, C. H., & Gillen, G. F. (1932).  
Bacteria producing trimethylene glycol. *Journal of Bacteriology*. Recuperado desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC533311/pdf/jbacter00834-0050.pdf>.

## ANEXOS

### Anexo 1. Lugar de muestreo.



Convenciones	
	Área de influencia
	Sitio de muestreo

Fuente: Google Earth Modificado por: Melisa Pérez

Figura 5. Vertimiento puntual



Fuente: Autor

Figura 6. Vertimiento Puntual



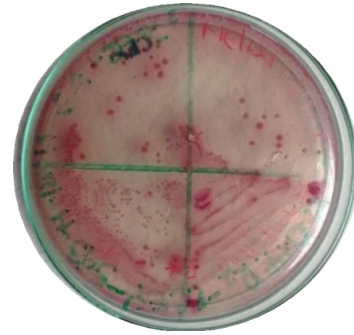
Fuente: Autor

**Figura 7.** Canal Vivero



**Fuente:** Autor

**Figura 10.** Resiembra 3 en medio CHR



**Fuente:** Autor

**Figura 8.** Canal Agua Lluvia



**Fuente:** Autor

**Figura 11.** Medio liquido



**Fuente:** Autor

## Anexo 2. Morfología Microbiana y siembra en tubos

**Figura 9.** Resiembra 1



**Fuente:** Autor

**Figura 12.** Tubo plano



**Fuente:** Autor

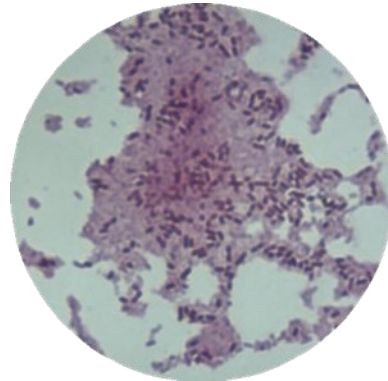


**Figura 13.** Tubo inclinado



**Fuente:** Autor

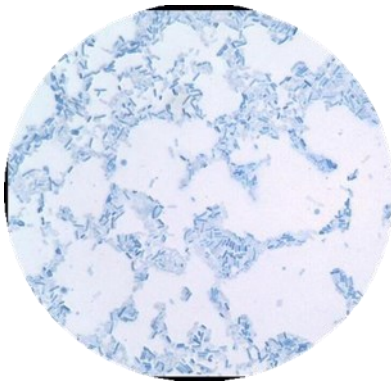
**Figura 16.** Fucsina



**Fuente:** Autor

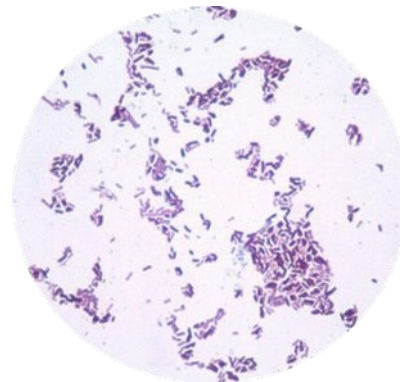
### Anexo 3. Resultados Tinciones

**Figura 14.** Azul de metileno



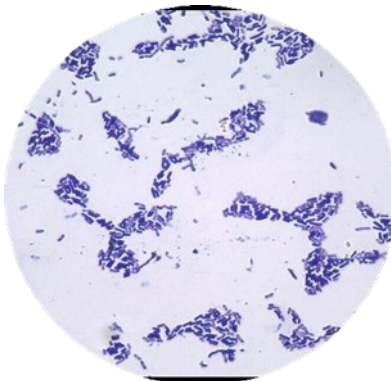
**Fuente:** Autor

**Figura 17.** Tinción de Gram



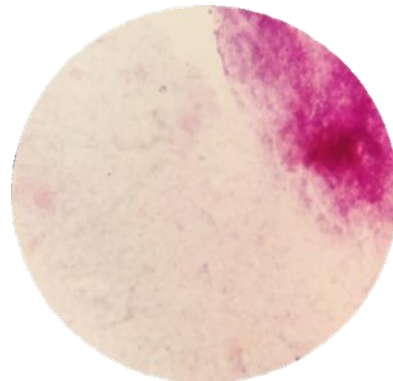
**Fuente:** Autor

**Figura 15.** Cristal Violeta



**Fuente:** Autor

**Figura 18.** Verde Malaquita



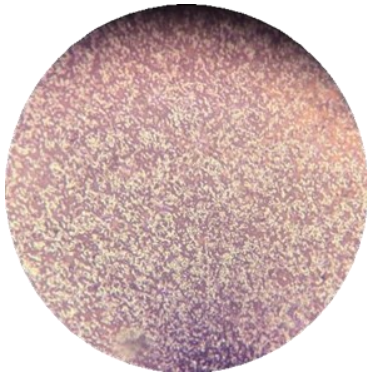
**Fuente:** Autor

**Figura 19.** Tinta china



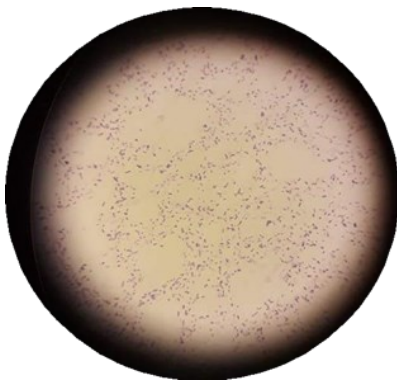
**Fuente:** Autor

**Figura 20.** Rojo Congo



**Fuente:** Autor

**Figura 21.** Wayson



**Fuente:** Autor

## Anexo 4. Pruebas Bioquímicas

**Figura 22.** Tubos de Pruebas Bioquímicas



**Fuente:** Autor

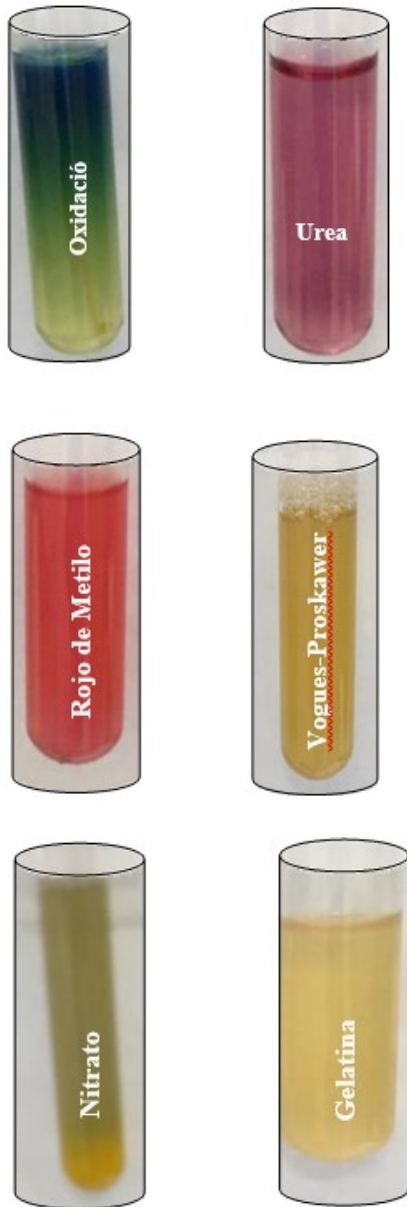
**Figura 23.** Pruebas Bioquímicas



**Fuente:** Autor

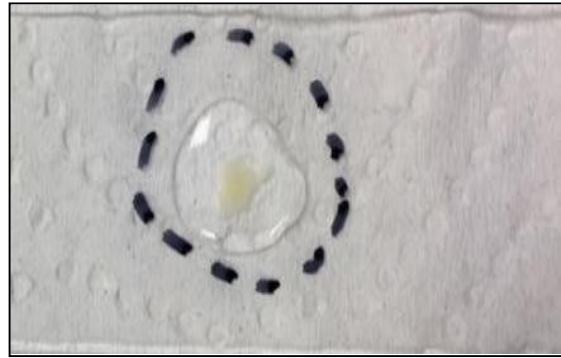


**Figura 24.** Pruebas Bioquímicas



**Fuente:** Autor

**Figura 25.** Catalasa



**Fuente:** Autor

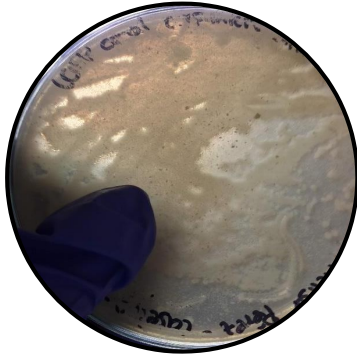
**Figura 26.** Oxidasa



**Fuente:** Autor

## Anexo 5. Bioprospección de Enzimas

**Figura 27.** Caseína



**Fuente:** Autor

**Figura 30.** Carboximetilcelulosa CMC



**Fuente:** Autor

**Figura 28.** Almidón



**Fuente:** Autor

**Figura 29.** Tributirina (Aceite)



**Fuente:** Autor

## Anexo 6. Identificación Bacteriana

Citrobacter												
	Resultados Experimentales	<i>Freundii</i>	<i>Amalonaticus</i>	<i>Braakii</i>	<i>Farmeri</i>	<i>Gillenbergii</i>	<i>Koseri</i>	<i>Murliniae</i>	<i>Rodentium</i>	<i>Sedlakii</i>	<i>Werkmanii</i>	<i>Youngae</i>
Citrato	+	d	+	dC	dC	dC	+	+	-	+	-	d
TSI-H2S	-	dB	dD	d	-	d	-	d	-	-	+	d
CO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sulfuro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	dB	+	d	+	-	+	+	-	+	-	d
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Oxidación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskaw	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% de Coincidencia		93,33 %	80,00%	93,33 %	80,00 %	93,33 %	80,00 %	80,00%	60,00%	80,00 %	73,33 %	86,67 %
d	Resultados Cambiantes											
dB	Los informes anteriores (por ejemplo, Ewing, 1986a), sobre muchas cepas tenían indol, - (2,1%); y H <sub>2</sub> S + (93,1%)											
dc	Además, en algunas pruebas pueden ocurrir reacciones positivas tardías que pueden cambiar - por d y d por +											
dD	anteriores informes (por ejemplo, Young et al., 1971) tenían H <sub>2</sub> S - ; malonato -											

Fuente: Autor