

Caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta Ecosangil del municipio de San Gil, Santander

Characterization of amylolytic and cellulolytic microorganisms from the organic waste disposed in the Ecosangil plant in San Gil, Santander

Gómez A., Silvia F.¹, Sarmiento G., Leonardo F.¹ y Delgado C, Diana C.²
Fundación Universitaria de San Gil-Unisangil, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería
Programa Ingeniería Ambiental
San Gil, Colombia

silviaf980@hotmail.com
laofasa19@hotmail.com
dian6885@hotmail.com

Fecha de Recepción: junio 06 de 2014
Fecha de Aceptación: septiembre 17 de 2014

Resumen — El documento presenta la caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos empleando como material de estudio residuos sólidos orgánicos pertenecientes a la planta de tratamiento ECOSANGIL localizada en el municipio de San Gil, Santander. El objetivo principal se basa en la intención de sembrar, separar e identificar microorganismos degradadores de celulosa y almidón a partir de material orgánico. En consecuencia a lo anterior se establecieron una serie de prácticas de laboratorio pendientes a la siembra de microorganismos extraídos de la muestra inicial con el fin específico de obtener organismos que mediante su capacidad enzimática sean capaces de crecer en los medios selectivos utilizados en la investigación.

Palabras clave — Capacidad enzimática, microorganismos celulolíticos, microorganismos amilolíticos, siembra, degradación.

Abstract — The present document offers the characterization of cellulolytic and amylolytic microorganisms using as study material organic solid waste which belong to the plant ECOSANGIL, located in San Gil, Santander. The main objective is based on the intention of sowing, separate and identify degraders of cellulose and starch from organic material. As a consequence, a number of lab practices related to planting microorganisms extracted from the initial sample with the specific purpose of obtaining organisms through its enzymatic capacity able to grow on the selective environments used in the research.

Key words — Enzymatic capacity, cellulolytic microorganisms, microorganisms amylolytic, planting, degradation.

I. INTRODUCCIÓN

En los residuos sólidos orgánicos existe una gran biodiversidad microbiológica prácticamente desconocida, así como su función en la naturaleza, porque en el pasado no se contaba con metodologías apropiadas para el aislamiento, purificación, clasificación, caracterización y preservación de los microorganismos [1]. Debido a esto se aislaron bacterias, hongos y levaduras con capacidad de degradar sustancias presentes en procesos de descomposición de la materia orgánica como celulosa y almidón.

Cabe señalar que el fin primordial del proyecto fue caracterizar e identificar microorganismos que degraden la materia orgánica en un ambiente controlado, lo que permite observar el funcionamiento de dichas especies cuando se encuentran en contacto con el sustrato que les brinda la fuente de carbono que utilizan como alimento.

Con este fin se implementó una práctica de laboratorio referente al área microbiológica que llevará a caracterizar qué tipos de microorganismos (celulolíticos y amilolíticos) se encuentran en las muestras a analizar, mediante una serie de siembras en medios de cultivo como el *agar Carboximetilcelulosa* y en el *agar hidrolisis almidón*, los cuales son específicos para el crecimiento de dichos organismos.

¹ Ingeniero Ambiental, Unisangil.

² Microbióloga Industrial

Realizando la implementación de microorganismos celulolíticos y amilolíticos se pueden presentar las siguientes opciones:

- Alternativas ecológicas.
- Disminución de la contaminación ambiental.
- Bajos costos.

Debido a que estos microorganismos podrían llegar a solucionar parcialmente el problema que enfrenta el mundo por el aumento de los residuos sólidos orgánicos, no solo con la recolección y disposición sino con un proceso más complejo por el cual se pueda lograr la disminución de dichos residuos que llegan a su disposición final, de manera tal que se depositen en forma menos peligrosa al ambiente.

II. LA CELULOSA

Es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa; es pues un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monosacárido); es rígido, insoluble en agua, y contiene desde varios cientos hasta miles de unidades de β -glucosa. La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre; se encuentra en las paredes de las células de las plantas. Químicamente se considera como un polímero natural, formado por un gran número de unidades de glucosa ($C_6H_{10}O_5$), cuyo peso molecular oscila entre varios cientos de miles [2].

A. Estructura de la celulosa

La celulosa se forma por la unión de moléculas de β -glucopiranososa mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico. Por hidrólisis de glucosa. La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n = 200$.

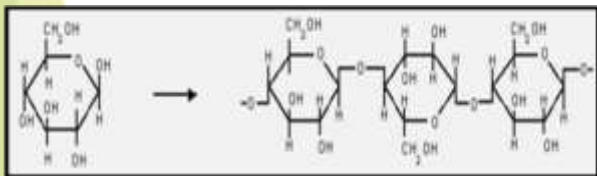


Fig. 1. Estructura de la celulosa [3].

Estructura de la celulosa; a la izquierda, β -glucosa; a la derecha, varias β -glucosa unidas. La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, aspecto que hace que sea insoluble a ésta, originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales [2].

B. Degradación de la celulosa

Es el componente básico de los vegetales y consta de unidades de β -D-glucopiranososa reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos.

La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de VAN DER WAALS [4].

III. ALMIDÓN

Es un polisacárido de reserva alimenticia predominante en las plantas, constituido por amilosa y amilopectina. Proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. Tanto el almidón como los productos de la hidrólisis del almidón constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual; así como la cantidad utilizada en la preparación de productos alimenticios, sin contar el que se encuentra presente en las harinas usadas para hacer pan y otros productos de panadería [5].

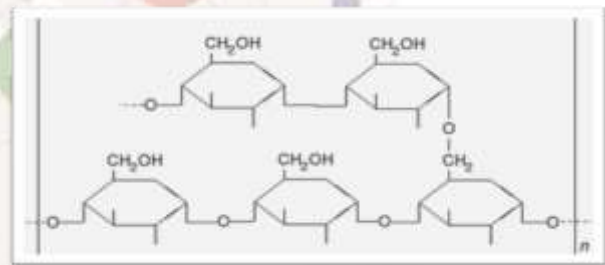


Fig. 2. Estructura del almidón [6].

A. Degradación de almidón

El almidón es el material de reserva que predomina en las plantas y comúnmente se presenta en gránulos con una típica estructura en capas. Está compuesto de dos glucanos: amilosa y amilopectina. La amilosa es soluble en agua caliente y se tiñe de azul con una solución acuosa de yodo. Consiste de una cadena helicoidal no ramificada de unas 200-500 unidades de D-glucosa con enlaces 1,4- β -glicosídicos.

Es también un polímero 1,4- β -D-glucosa que, como el glicógeno, está ramificado por enlaces 1,6- α -glucosídicos aproximadamente cada 25 unidades de glucosa. Los almidones de distinto origen difieren tanto en su ramificación como en el número de unidades por cadena y los residuos de fosfato, iones de calcio y magnesio. Hay tres tipos de descomposición enzimática de los glucanos: fosforólisis, hidrólisis y transglicosilación. La fosforólisis por la α -1,4-glucanofosforilasa sólo ocurre intracelularmente. Por otro lado la transglicosilación es la formación de ciclo dextrinas con 6-8 unidades de glucosa a partir del almidón, por acción de

Bacillus macerans y otros. Y por último el ataque extracelular del almidón es debido a la acción hidrolítica de las amilasas.

La β -amilasa ataca los enlaces 1,4- β -glicosídicos aún en el centro de la cadena, razón por la cual es conocido como endoamilasa, produciendo glucosa, maltosa y oligómeros de 3 a 7 unidades. Está presente en plantas, animales y microorganismos. La viscosidad de la solución de almidón y el color de su reacción con yodo se reducen rápidamente [4].

IV. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y AMIOLÍTICA

A. Prueba cualitativa con rojo congo para actividad celulolítica

Diferentes procedimientos en la identificación y evaluación de microorganismos capaces de utilizar la celulosa han sido descritos, siendo la base de estos la hidrólisis de sustratos celulósicos. Teather y Wood en 1982 observaron que el colorante rojo Congo podía ser usado en los ensayos para evidenciar la hidrólisis de polisacáridos (celulosa) debido a que el colorante forma complejos con moléculas aun no hidrolizadas creados complejos, facilitando la diferenciación de microorganismos celulolíticos y no celulolíticos por las zonas de aclaramiento alrededor de las colonias. Además se podía estimar la eficiencia hidrolítica de cada cepa midiendo la longitud del halo producido por la misma [7].

B. Prueba cualitativa con lugol para actividad amilolítica

El lugol o solución de Lugol es una solución de 1% en equilibrio con KI (2%) en agua destilada que colorea las micelas de almidón de azul intenso casi negro, el cual fue nombrada en honor al físico francés J. G. A. Lugol. El almidón es una mezcla (en diferentes proporciones según las especies) de los polisacáridos amilosa (10-20%) y amilopectina (80-90%). El almidón se colorea de azul en presencia de Lugol, debido a una adsorción del colorante sobre las unidades de glucosa en la amilosa. En cuanto a la hidrolización del almidón por parte de los microorganismos, hace presencia de halos de aclaramiento alrededor de las mismas, lográndose evaluar cualitativamente la acción de las diferentes enzimas [8].

V. METODOLOGÍA DESARROLLADA

El presente estudio se realizó con el fin de caracterizar y aislar microorganismos celulolíticos y amilolíticos presentes en los residuos sólidos orgánicos. Se dividió en tres fases que se describen a continuación:

A. Muestreo

Se tomaron 12 muestras de residuos sólidos orgánicos urbanos dispuestos en la planta de aprovechamiento ECOSANGIL con un peso de 100gr cada una y otra de 500gr

para realizar control negativo, las cuales se empacaron en bolsas de polipropileno con sello hermético debidamente rotuladas con la fecha, número de muestra, pH y temperatura. Estas se depositaron en una cava y posteriormente se trasladaron al laboratorio, donde se almacenaron en una nevera a una temperatura de 4°C, para su respectivo análisis.



Fig. 3. Recolección de muestras en la planta ECOSANGIL, septiembre 25 de 2013.

B. Aislamiento primario

Se pesó 1g de la muestra original y se llevó a 90ml de agua destilada estéril, posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-12} , a partir de las cuales se hicieron siembras en superficie en agar con celulosa como única fuente de carbono (CMC) y en agar nutritivo suplementado con almidón. Las cajas se llevaron a incubación a 37°C por 24 horas; transcurrido este tiempo se observó el crecimiento de colonias y se realizó su respectivo conteo.



Fig. 4. Siembra de diluciones seriadas. Septiembre 30 de 2013, laboratorio de Biología Unisangil.

C. Aislamiento secundario

A partir de los microorganismos obtenidos en el aislamiento primario se realizaron repiques por separado de cada colonia en agar con celulosa como única fuente de carbono y en agar suplementado con almidón. Las cajas se llevaron a incubación a 37°C durante 24 horas, después de las cuales se adicionaron los colorantes reveladores de hidrólisis (rojo congo y lugol al 2%) para confirmar la acción enzimática y la pureza de la cepa.

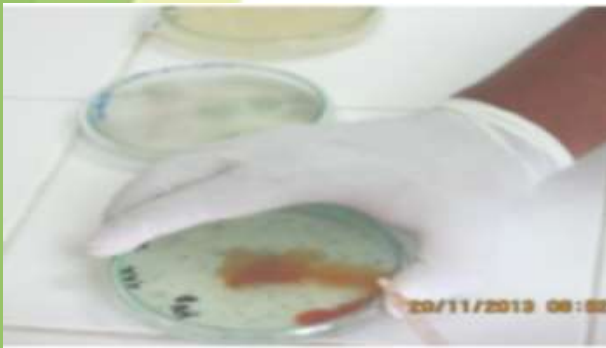


Fig. 5. Aislamiento secundario, noviembre 20 de 2013, laboratorio de Biología Unisangil.

D. RESULTADOS

A. Recolección de la muestra

Se realizaron 3 tomas de muestras en diferentes períodos de tiempo, donde se logró evidenciar un pH neutro y una temperatura interna en promedio de 26°C en todas las muestras.

TABLA 1. RELACIÓN pH Y TEMPERATURA DE MUESTRA DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS

Numero de muestra	Fecha	pH	Temperatura
1	25 de septiembre/2013	7.1	26°C
2	27 de octubre/2013	7.1	26°C

B. Aislamiento primario

Se hicieron siembras en los agares respectivos (almidón – CMC) de las diluciones seriadas de la muestra hasta 10⁻¹², donde se obtuvo crecimiento apto para realizar conteo de colonias; siendo para el agar almidón 8 UFC mientras que para el agar CMC, 3 UFC.

TABLA 2. RELACIÓN DE UFC OBTENIDAS SEGÚN SU FUENTE DE CARBONO Y DILUCIÓN

Dilución	Fuente de carbono	Temperatura °C	pH	UFC
10 ⁻¹²	Almidón	37	7	8
10 ⁻¹²	Celulosa	37	7	3

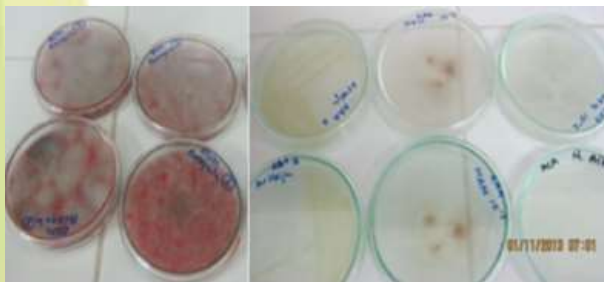


Fig. 6. Aislamiento primario. Noviembre de 2013, lugar: laboratorio de biología Unisangil.

B. Aislamiento secundario

Se obtuvieron colonias puras tanto amilolíticas como celulolíticas, a las cuales se les realizó descripción macroscópica y microscópica, habiendo además asignado código y se adiciona colorantes de revelación respectivos para confirmar la acción enzimática de las mismas midiendo los halos de hidrólisis. Los resultados se presentan en las tablas 3, 4 y 5.






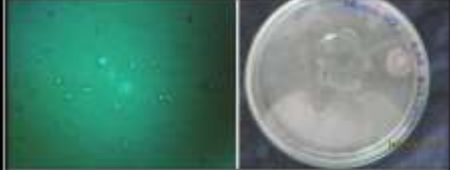


TABLA 3. DESCRIPCIÓN DE COLONIAS OBTENIDAS EN EL AISLAMIENTO SECUNDARIO PARA MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS (MACROSCÓPICAMENTE Y MICROSCÓPICAMENTE Y DIÁMETRO DE HIDRÓLISIS)

Código de Colonia	Fuentes de carbono	Tinción	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tamaño halo de hidrólisis
H1	CMC	azul de lacto fenol	colonia grande, algodonosa café claro expandida	Posiblemente <i>Rhizopus oryzae</i>	2mm
H2	CMC	azul de lacto fenol	colonia grande, algodonosa, blanca expandida	Posiblemente <i>Rhizopus spp</i>	4mm
H3 Actinomiceto	CMC	azul de lacto fenol	colonia mediana, blanca, irregular, dura	Posiblemente <i>Streptomyces</i>	4mm

TABLA 4. ILUSTRACIONES DE LAS COLONIAS OBTENIDAS EN EL AISLAMIENTO SECUNDARIO PARA MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS (MACROSCÓPICAMENTE Y MICROSCÓPICAMENTE Y DIÁMETRO DE HIDRÓLISIS)

Código de Colonia	Ilustración
H1	
H2	
H3 Actinomiceto	

TABLA 5. DESCRIPCIÓN DE COLONIAS OBTENIDAS EN EL AISLAMIENTO SECUNDARIO PARA MICROORGANISMOS AMILOLÍTICOS. (MACROSCÓPICAMENTE Y MICROSCÓPICAMENTE Y DIÁMETRO DE HIDRÓLISIS).

Código de colonia	Fuente de carbono	Tinción	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tamaño halo de hidrolisis	Ilustración
AAA1	ALMIDÓN	gram	colonia mediana, beige, borde regular, elevada, opaca	bacilos cortos gram positivos <i>Bacillus spp</i>	8mm	
AAA2	ALMIDÓN	gram	colonia mediana, beige, borde regular, plana, opaca	bacilos gram positivos <i>Bacillus spp</i>	9mm	
AAA3 (HONGO B)	ALMIDÓN	azul de lacto fenol	hongo blanco, algodonoso, regular	Posiblemente <i>Fusarium spp</i>	1.4mm	
AAA 4	ALMIDÓN	gram	colonia pequeña, beige, irregular elevada	cocos gram positivos en cadena <i>Streptococcus spp</i>	7mm	
AAA5 (HAM)	ALMIDÓN	azul de lacto fenol	hongo blanco con centro marrón, algodonoso expandido	Posiblemente <i>Absidia spp.</i>	10mm	
AAA6 (Levadura)	ALMIDÓN	azul de lacto fenol	colonia grande, irregular, mucoide, blanca, brillante	LEVADURA	10mm	
AAA7 (HV)	ALMIDÓN	azul de lacto fenol	colonia mediana, irregular, verde con borde blanco	<i>Aspergillus spp</i>	3mm	
AAA8 (HN)	ALMIDÓN	azul de lacto fenol	colonia algodonosa grande, irregular, expandida, blanca con puntos negros	Posiblemente <i>Rhizopus spp.</i>	5mm	

C. Descripción macroscópica y microscópica de las colonias amilolíticas

La siguiente figura 7 es la vista macroscópica y microscópica de las colonias amilolíticas halladas en el análisis realizado en las muestras recogidas del material orgánico.

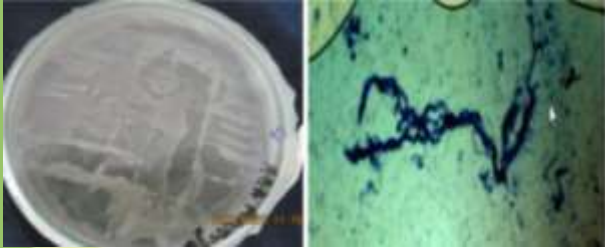


Fig. 7. Vista macroscópica y microscópica de las colonias amilolíticas.

D. Descripción macroscópica y microscópica de las colonias celulolíticas

La siguiente figura 8 es la vista macroscópica y microscópica de las colonias celulolíticas halladas en el análisis realizado en las muestras recogidas del material orgánico.

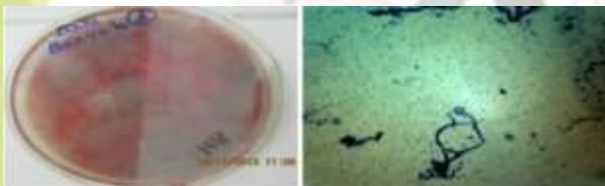


Fig. 8. Vista Macroscópica y microscópica de las colonias celulolíticas.

E. Medición de halos de hidrólisis

Esta parte hace referencia al halo de hidrólisis de los microorganismos analizados en la muestra orgánica.

- *Medición de halos de hidrólisis de microorganismos amilolíticos*

La figura 9 presenta la medición del halo de hidrólisis de microorganismos amilolíticos.

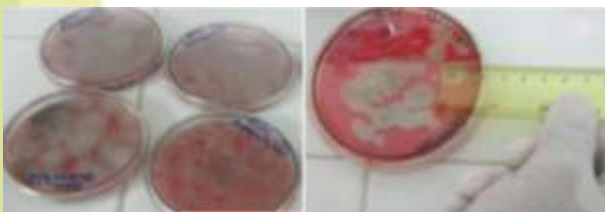


Fig. 9. Visualización de halos de hidrólisis mediante revelado con rojo congo de microorganismos amilolíticos

- *Medición de halos de hidrólisis de microorganismos celulolíticos*

La siguiente figura 10 presenta la medición del halo de hidrólisis de Microorganismos celulolíticos.



Fig. 10. Visualización de halos de hidrólisis, mediante revelado con lugol al 2% de microorganismos celulolíticos.

E. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos se presenta el siguiente análisis.

A. Recolección de la muestra

De acuerdo con la fuente de investigación se tomaron tres muestras de material orgánico fresco en diferentes periodos de tiempo, el cual cabe señalar que el comportamiento de los parámetros químicos a las muestras analizadas permaneció estable. Esto permite concluir que las muestras son homogéneas en el sentido del cultivo y que no hubo ninguna alteración durante el procedimiento que pudiera alterar el análisis realizado del material orgánico.

B. Aislamiento primario

Mediante el cultivo de agar Carboximetilcelulosa y el agar hidrólisis almidón a partir de las muestras de residuos sólidos orgánicos se pudo aislar y purificar un total de ocho UFC en el medio de cultivo agar nutritivo suplementado con almidón y tres UFC en el medio de cultivo agar con celulosa como única fuente de carbono (CMC), las cuales se seleccionaron y se identificaron a través de letras que indicaban el medio de cultivo al que pertenecían: agar hidrólisis almidón (AAA) agar Carboximetilcelulosa (CMC) y si el microorganismo en cuestión a analizar era: Bacteria (b), Hongo (H), o levadura (L).

La dilución seriada más adecuada fue la de 10^{-12} , en la cual fue posible detectar unidades formadoras de colonia y realizar su respectivo conteo. En las otras diluciones mayores las colonias fueron demasiado numerosas e imposibles de identificar con precisión. La tabla 3 muestra el número de unidades formadoras de colonias que crecieron en cada medio utilizado.

En el medio de cultivo agar hidrólisis almidón favoreció el crecimiento de bacterias y levaduras encontrándose tres colonias de bacterias y una levadura en comparación del cultivo agar Carboximetilcelulosa, ya que en este medio no hay proliferación de microorganismos teniendo en cuenta el material utilizado para la investigación.

Con respecto al crecimiento de hongos los medios de cultivos utilizados fueron apropiados. En cada medio de los

agares Carboximetil celulosa e hidrólisis almidón crecieron tres diferentes clases de hongos.

C. Aislamiento secundario

Una vez con las cepas aisladas y puras, se realizó la identificación macroscópica y microscópica con el empleo de microscopio óptico, cuyos datos están en las tablas 3 y 4 respectivamente. Por ende en ella es posible identificar las variedades de microorganismos obtenidos a partir del estudio realizado al material orgánico.

La medición de los halos de hidrólisis se pudo realizar por métodos como la tinción de gram para bacterias y levaduras y el azul de lacto fenol para hongos; mostrando un halo alrededor de cada cepa, lo cual demostró la actividad enzimática de cada medio y permitió, mediante la medición de sus radios, establecer cuáles eran las de mayor actividad enzimática en los distintos medios de cultivos.

Por último, se identificaron presuntivamente los microorganismos por medio de comparaciones de fotos tomadas por equipos de laboratorio y libros que ayudaron en el apoyo de este conocimiento.

F. CONCLUSIONES

Las muestras que se utilizaron en el proyecto eran de material orgánico fresco, y al no haber iniciado ningún tipo de descomposición alta se hallaba a una temperatura ambiente y a un pH neutro, lo que indica que la actividad microbiana se encuentra en la fase de adaptación al medio.

Al realizarse el aislamiento primario de material fresco, el número de microorganismos degradadores de celulosa y almidón fue muy bajo; ya que el proceso de degradación en ese momento es prácticamente nulo. En cuanto la dilución utilizada para lograr el aislamiento de los microorganismos fue de 10^{-12} , debido a que los medios utilizados no contenían agentes inhibidores de la flora acompañante (antibióticos u otros), por lo cual se presentaba crecimiento masivo en diluciones más bajas de otro tipo de especies microbianas.

Al obtener colonias puras y hacer el respectivo revelado con colorantes para evidenciar los halos de hidrólisis se observó que estos iban desde los 1.4 mm hasta los 10 mm, presentando mayor acción enzimática amilolítica; por ende, los halos de mayor tamaño que se observaron en los microorganismos amilolíticos; la levadura y la cepa de *Absidia spp* resultaron ser los microorganismos con mayor potencial de degradación.

El estudio cumplió con los objetivos del proyecto que fueron aislar, separar y caracterizar microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta de tratamiento ECOSANGIL del municipio de San Gil, Santander. Debido a que se obtuvieron

11 cepas puras y aisladas e identificadas presuntivamente con actividad celulolítica tres hongos como *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus ssp*, *Streptomyces* y en la parte de la actividad amilolítica se hallaron dos bacterias *basillus ssp*, y una *Streptococcus ssp*, cuatro hongos *fusarium ssp*, *Absidia ssp*, *Aspergillus ssp* y *Rhizopus ssp*, y una levadura.

El proceso investigativo realizado estimó que los residuos sólidos orgánicos son una fuente inagotable de biomasa, lo cual puede ser empleado en muchas actividades benéficas para la recuperación de suelos y cultivos, e incluso para el mejoramiento ambiental ya que puede evitar la contaminación de fuentes hídricas y el suelo.

Con la medición de halo de hidrólisis se determinó que hay microorganismos con mayor o menor capacidad de degradación de celulosa y almidón, lo cual brinda un beneficio para posibles aplicaciones en un futuro.

Para el manejo seguro de los cultivos microbiológicos es necesaria una valoración adecuada de los riesgos para evitar la contaminación de los mismos.

REFERENCIAS

- [1] L. Cerón y L. Melgarejo. *Enzimas del suelo, indicadores de salud y calidad*, [en línea]. Disponible: <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDFs/V10N1/Art1V10N1.pdf>.
- [2] Ecured (2014), *La celulosa*, [en línea]. Disponible: <http://www.ecured.cu/index.php/Celulosa>.
- [3] Ecured (2014) [en línea]. Disponible: http://www.ecured.cu/index.php/Archivo:Estructura_celulosa.png.
- [4] L. Carrillo (2003), *Actividad microbiana, microbiología agrícola*, Capítulo 3, [en línea]. Disponible: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragriz/micagricap3.pdf>.
- [5] Ecured (2014) [en línea]. Disponible: <http://www.ecured.cu/images/c/c3/Almidones.JPG>.
- [6] Ecured. (2014), *El almidón*, [en línea]. Disponible: <http://www.ecured.cu/index.php/Almid%C3%B3n>.
- [7] C. D. Hendricks J B. and Hugley, 1995. *A New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil. Appl. Environ. Microbiol* 61: 2016-2019.
- [8] E. Rojas, *Determinación enzimática del almidón*, [en línea]. Disponible: <http://es.scribd.com/doc/3596226/DETERMINACION-ENZIMATICA-DEL-ALMIDON>.
- [9] P. Arenas (2009), *Bacterias celulolíticas*, [en línea]. Disponible: http://colombianopablo.blogspot.com/2009/02/pablo-arenas-perez-recursos-forrajeros_18.html.
- [10] A. Bonifaz (2010), et al. *RHIZOPUS SPP*, [en línea]. Disponible: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?i_npopup=true&id=100895.
- [11] Copyright, (2014), *La base científica*, [en línea]. Disponible: <http://labbarrie.educabarrie.org/experimento/inflar-un-globo-con-levadura/>.
- [12] Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA, (2010) "Guía de trabajos prácticos Área de micología", [en línea]. Disponible: <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/migutp.pdf>.
- [13] F.J.; Díaz de castro, M.A. Restrepo, W. Rojas (2007), *Microbiología de las infecciones humanas*. Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín. Colombia.
- [14] G. Dreyfus, *Los microbios al servicio del hombre*, [en línea]. Disponible: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/html/sec_8.html.

- [15] Facultad de ingeniería agroindustrial. *Producción de enzima amilasa microbiana mediante fermentación en sustrato líquido*, [en línea]. Disponible: <http://pt.slideshare.net/ojij/produccion-de-enzima-amilasa-microbiana-m-2>.
- [16] M. Ferrera, J. Segura, M. Ríos, P. Bullón, La placa bacteriana, [en línea]. Disponible: <http://personal.us.es/segurajj/documentos/CV-Art-Sin%20JCR/Periodoncia.1-Placa%20bacteriana%20para%20higienistas.htm>.
- [17] R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami, B. Chauhan (2003). *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*. *Process Biochemistry*. 38:1599-1616.
- [18] M. L. Moreno O. y D. Uribe (2011), *Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa rojo congo*, [en línea]. Disponible: <http://www.redalyc.org/pdf/896/89621344002.pdf>.
- [19] P. Martínez, D. García, P. Silva, G. Vargas y F. Valderrama. (2011), *Manejo de residuos generados directa o indirectamente por el cultivo de cebolla en Aquitania (Boyacá-Colombia)*, [en línea]. Disponible: <http://www.journals.unam.mx/index.php/aidis/article/view/3>.
- [20] P. Martínez y B. Chaparro (2013), *Utilización de microorganismos benéficos para el compostaje de macrófitas invasoras de la laguna colombiana de fúquene*, [en línea]. Disponible: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/aidis/article/view/36967>.

