



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS: COBALTO, MERCURIO Y PLOMO EN MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAGUNA DE OZOGOCHÉ EN LA PARROQUIA ACHUPALLAS DEL CANTÓN ALAUSÍ”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: JHOJANA ELIZABETH LEMA NOVILLO

DIRECTOR: GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ PhD.

Riobamba-Ecuador

2019

© 2019, Jhojana Elizabeth Lema Novillo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES PESADOS: COBALTO, MERCURIO Y PLOMO EN MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAGUNA DE OZOGOCHÉ EN LA PARROQUIA ACHUPALLAS DEL CANTÓN ALAUSÍ.”**, de responsabilidad de la señorita Jhojana Elizabeth Lema Novillo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Gerardo Emilio Medina Ramírez PhD.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACION**

Verónica Lucía Caballero Serrano PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Jhojana Elizabeth Lema Novillo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, y que he consultado las referencias bibliográficas que conforman este documento.

Siendo autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos del presente trabajo de titulación.



Jhojana Elizabeth Lema Novillo

060421884-2

DEDICATORIA

Llena de regocijo y amor dedico mi trabajo de titulación al ser más importante en mi vida mi pequeño hijo. A mis padres y hermanos quienes han sido incondicionales en todo momento de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios y a La Virgen de Fátima por regalarme sabiduría en mi vida y bendecirme en cada momento.

A mis Padres; Anita y Marcelo, por todo el apoyo y sacrificio que hicieron para llegar a alcanzar una de mis metas más deseadas; por su paciencia y amor infinito, A mis hermanos; Gabriela y Renán, nada de esto sería posible sin ustedes.

A mi querido hijo Iker Fernando, por ser mi mayor fuente de inspiración y superación.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por haber abierto sus puertas para mi preparación profesional y como no agradecer por todos los conocimientos impartidos por mis profesores Dr. Gerardo Medina y a la Dra. Verónica Caballero, por su paciencia y tiempo dedicado en este proceso de investigación.

A la BQF. Yolanda Buenaño, técnica docente quien me abrió las puertas de su laboratorio de Bioquímicos y Bacteriológicos y me brindo la confianza y toda su experiencia para la realización de mi trabajo de titulación.

A todos mis amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio me brindaron una amistad sincera e hicieron mi estadía en la Universidad una de mis mejores experiencias, llevo conmigo gratos recuerdos.

A todos los que confiaron en mí para lograr este hermoso sueño, Gracias.

Con amor Jhojana.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN..... xii

ABSTRACT..... xiii

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1.	Antecedentes de la investigación.....	4
1.2.	Bioprospección	5
1.3.	Zona de estudio.....	6
1.4.	Microorganismos extremófilos.....	8
1.5.	Métodos de identificación microbiana.....	10
1.5.1.1.	<i>Tinción Gram</i>	11
1.5.1.2.	<i>Caracterización macroscópica</i>	12
1.5.2.1.	<i>Prueba Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM)</i>	13
1.5.2.2.	<i>Prueba Agar Hierro Triple azúcar (TSI)</i>	13
1.5.2.3.	<i>Prueba Ureasa</i>	14
1.5.2.4.	<i>Prueba Manitol</i>	14
1.5.2.5.	<i>Prueba Citrato</i>	14
1.5.2.6.	<i>Prueba Oxidasa</i>	14
1.5.2.7.	<i>Prueba Catalasa</i>	15
1.5.2.8.	<i>Prueba MacConkey</i>	15
1.5.2.9.	<i>Prueba Trypteína Soya Agar (TSA)</i>	15
1.6.	Metales Pesados.....	16
1.6.1.1.	<i>Cobalto (Co)</i>	17
1.6.1.2.	<i>Mercurio (Hg)</i>	18
1.6.1.3.	<i>Plomo (Pb)</i>	19
1.7.	Interacciones metal-microorganismo.....	20

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	22
2.1.	Tipo de investigación.....	22
2.2.	Enfoque de la investigación.....	22
2.3.	Diseño de la investigación	22
2.4.	Unidad de análisis.....	22

2.5.	Etapas de la investigación.....	23
2.5.1.1.	Área de toma de muestra	23
2.5.1.2.	Procedimiento del muestreo.....	24
2.5.2.1.	Medios de cultivo	25
2.5.2.2.	Siembra	26
2.5.2.3.	Selección de las colonias bacterianas	27
2.5.2.4.	Aislamiento por agotamiento.....	27
2.6.	Caracterización.....	28
2.6.2.1.	Procedimiento Tinción Gram:	29
2.6.2.2.	Evaluación de la tolerancia a metales pesados (Co, Hg y Pb).....	29
2.6.3.1.	Reactivación de los clones	30
2.6.3.2.	Prueba Catalasa	31
2.6.3.3.	Prueba Oxidasa	31
2.6.3.4.	Prueba Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM).....	31
2.6.3.5.	Prueba Ureasa.....	31
2.6.3.6.	Prueba Manitol.....	32
2.6.3.7.	Prueba Citrato	32
2.6.3.8.	Prueba MacConkey.....	32
2.6.3.9.	Prueba Agar Hierro Triple Azúcar (TSI).....	32
2.6.3.10.	Prueba Agar Trypticosa de Soya (TSA).....	32
2.6.4.1.	Procedimiento por Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas:	33

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1.	Caracterización físico-química del agua de la Laguna de Ozogoche	35
3.2.	Aislamiento de las colonias bacterianas	35
3.2.3.1.	Caracterización microscópica de clones aislados.....	39
3.3.	Caracterización macroscópica de clones aislados.	41
3.3.5.1.	Pruebas de tolerancia Cobalto	47
3.3.5.2.	Pruebas de tolerancia Mercurio.....	49
3.3.5.3.	Pruebas de tolerancia Plomo.....	53
3.4.	Pruebas de Sensibilidad Antibiótica	59
	CONCLUSIONES.....	60
	RECOMENDACIONES.....	62

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Productos obtenidos de bacterias psicrófilas y sus aplicaciones.	10
Tabla 2-1: Caracterización microscópica.....	11
Tabla 3-1: Reactivos utilizados en la coloración de Gram y su función.	12
Tabla 4-1: Caracterización macroscópica.	12
Tabla 5-1: Metales tóxicos de interés.	16
Tabla 1-2: Composición por litro de medio Plate Count Agar (PCA) en agua purificada.	25
Tabla 2-2: Concentraciones evaluadas en cada ensayo de tolerancia a metales pesados:	30
Tabla 1-3: Características físico-químicas del agua de la Laguna de Ozogche	35
Tabla 2-3: Estimación del número de UFC/mL de las muestras.	36
Tabla 3-3: Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización a 35° C.....	37
Tabla 4-3: Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización a 9° C.....	37
Tabla 5-3: Clones obtenidos en los cuatro repiques realizados a 35° C.	38
Tabla 6-3: Clones obtenidos en los cuatro repiques realizados a 9° C.	38
Tabla 7-3: Resultados de la Tinción Gram de los clones seleccionados de los medios PCA+; PCA- y AGL a 35° C.	39
Tabla 8-3: Resultados de la tinción Gram de los clones seleccionados de los medios PCA+; PCA- y AGL a 9° C.	40
Tabla 9-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Cobalto a 35° C.....	47
Tabla 10-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Cobalto a 9° C.....	48
Tabla 11-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Mercurio a 35° C.....	50
Tabla 12-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Mercurio a 9° C.....	51
Tabla 13-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Plomo a 35° C.....	53
Tabla 14-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Plomo a 9° C.....	54
Tabla 15-3: Caracterización bioquímica de los clones aislados.....	57
Tabla 16-3: Resultados de la identificación bioquímica de clones finales.	58
Tabla 17-3: Resultados de antibiogramas.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Ubicación de la Laguna de Ozogoche (Cubillín).....	7
Figura 2-1: Clasificación microorganismos extremófilos.....	8
Figura 1-2: Ubicación de los puntos de muestreo en la Laguna de Cubillín	24
Figura 2-2: Identificación de puntos de muestreo.....	24

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos 35° C.	40
Gráfico 2-3: Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos 9° C.	41
Gráfico 3-3: Forma de los clones cultivados a 35° C.	42
Gráfico 4-3: Forma de los clones cultivados a 9° C.	42
Gráfico 5-3: Tipo de Borde de los clones cultivados a 35° C.	43
Gráfico 6-3: Tipo de Borde de los clones cultivados 9° C.	44
Gráfico 7-3: Tipo de Elevación de los clones cultivados a 35° C.	44
Gráfico 8-3: Tipo de Elevación de los clones cultivados a 9° C.	45
Gráfico 9-3: Tipo de Color de los clones cultivados a 35° C.	46
Gráfico 10-3: Tipo de Color de los clones cultivados a 9° C.	46
Gráfico 11-3: Perfil de tolerancia al cobalto de los clones desarrollados a 35° C y 9° C.	49
Gráfico 12-3: Perfil de tolerancia al Mercurio de los clones desarrollados a 35° C y 9° C.	53
Gráfico 13-3: Perfil de tolerancia al Plomo de los clones desarrollados a 35° C y 9° C.	56

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar microorganismos de la Laguna de Ozogoché para evaluar la tolerancia a metales pesados: cobalto, mercurio y plomo. Se procesaron seis muestras tomadas aleatoriamente en diferentes puntos de la laguna, las cuales se inocularon por la técnica de siembra en superficie en tres tipos de medios diferentes: Medio sin presión selectiva preparado con agua destilada estéril (PCA-), medio preparado con agua de la laguna (AGL) y medio con presión selectiva (PCA+) suplementado con Nitrato de Plomo 25 ug/mL, se incubaron a 9 y 35°C. Se procedió al aislamiento de microorganismos representativos y se determinó el número de bacterias capaces de crecer a las dos temperaturas evaluadas, de estas se seleccionaron 187 clones se realizaron cuatro repicas, para su adaptación y estabilización, la última repica se sembró por agotamiento y se tomaron un total de 69 clones bacterianos, sobre ellos se realizó la Tinción de Gram; se evidenció el predominio de Bacilos Gram negativos a 9°C (75%) y a 35°C el 54,1%. En el caso de Bacilos Gram positivos se obtuvo a 35°C un 32,4%, mientras que a 9°C se encontró un 3%. Estos clones fueron sometidos a pruebas de tolerancia a los metales Co, Hg y Pb en concentraciones crecientes (50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500 y 4000 ug/ml), dando como resultado varios niveles de tolerancia para los clones aislados; 2 clones mostraron tolerancia hasta 750 ug/ml de cobalto, 5 hasta 250 ug/ml de mercurio y 6 hasta 4000 ug/ml de plomo. Se realizaron pruebas bioquímicas sobre los 13 clones que presentaron mayor tolerancia identificándose los géneros *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus spp* y *Pseudomona spp*. Se concluyó que a partir del agua de la laguna de Ozogoché, fueron aisladas bacterias psicrotolerantes y resistentes a metales pesados.

Palabras claves: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGIA>, <MICROORGANISMOS>, <METALES PESADOS>, <PSICROTROTOLERANTES>, <BIOPROSPECCIÓN>, <LAGUNA DE OZOGOCHÉ>, ALAUSI (CANTÓN)



ABSTRACT

The objective of this research was to isolate microorganisms from the “Laguna de Ozogoché” to assess tolerance to heavy metals: cobalt, mercury, and lead. Six samples taken randomly at different points of the lagoon were processed, which were inoculated by the technique of seeding on surface in three different media types: Medium without selective pressure prepared with sterile distilled water (PCA-), medium prepared with water from the lagoon (AGL) and medium with selective pressure (PCA +) supplemented with Lead Nitrate 25 ug / mL, were incubated at 9 °C and 35°C. Isolation of representative microorganisms was carried out and the number of bacteria capable of growing at the two temperatures evaluated was determined. Of these, 187 clones were selected, four rings were made, for their adaptation and stabilization. The last ring was sown by exhaustion and taken a total of 69 bacterial clones, on them, the Gram stain was performed; the predominance of Gram-negative bacilli was observed at 9°C (75%) and at 35°C it was 54.1%. In the case of Gram-positive bacilli, 32.4% was obtained at 35 ° C, while at 9 ° C, 3% was found. These clones were subjected to tolerance tests for metals Co, Hg and Pb in increasing concentrations (50, 100, 250, 500,750, 1000.2500 and 4000 ug/ml), resulting in several tolerance levels for the isolated clones; 2 clones showed tolerance up to 750 ug/ml cobalt, 5 up to 250 ug/ml mercury and 6 up to 4000 ug/ml of lead. Biochemical tests were performed on the 13 clones that showed the highest tolerance, identifying the genera Clostridium, Corynebacterium, Klebsiella, Micrococcus spp and Pseudomonas spp. It was concluded that psychrotolerant bacteria resistant to heavy metals were isolated from the water of the Ozogoché lagoon.

KEYWORDS: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <MICROORGANISMS>,<HEAVY METALS>, <PSICROTROTOLERANTES>, <BIOPROSPECCIÓN>, <LAGUNA DE OZOGOCHÉ> ,ALAUSI (CANTÓN)



INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

En la actualidad el desarrollo de las industrias y el crecimiento poblacional han causado graves problemas ambientales, provocando importantes modificaciones que ocasionan el desequilibrio de ecosistemas llegando hasta los sitios más recónditos del planeta, incluso hasta aquellos lugares que considerábamos inhóspitos.

Se ha evidenciado que la mayoría de los cuerpos de agua dulce: lagunas, lagos, ríos se ven afectados debido a diferentes actividades antropogénicas como; turismo, pastoreo, animales domésticos, agricultura. La problemática de los metales pesados como plomo, mercurio, cobalto, arsénico entre otros metales presentes en el agua residual utilizada para riego, radica principalmente en que pueden ser acumulados en los suelos agrícolas de la zona en estudio. Y resultan peligrosos por su carácter no biodegradable, la toxicidad que ejercen sobre los diferentes cultivos y su biodisponibilidad. Dichos metales pesados son incorporados a los sistemas lóticos, las cuales son algunas de las causas que alteran al estado natural de los recursos hídricos, causando serios problemas en la composición original de especies, cambiando y degradando las redes tróficas lo cual ha provocado un riesgo potencial en la naturaleza y en la sociedad (Bordehore, 2001, p. 1).

Ecuador tiene una gran variedad de lagunas de alta montaña de las cuales existen muy pocos estudios microbiológicos y biotecnológicos que permitan conocer el desarrollo tecnológico de procesos impulsados por el uso de microorganismos. La Laguna de Ozogoché puede ser considerada como un repositorio natural de material genético y biológico con características propias de eras geológicas pasadas, representando un recurso muy importante con aplicación en la biotecnología industrial (Moreno, 2017, p. 14).

Justificación de la Investigación

Estudios en ambientes considerados extremos permiten la búsqueda e identificación de microorganismos poco frecuentes. Este estudio pretende evaluar la tolerancia a los metales pesados: Mercurio (Hg), Plomo (Pb) y Cobalto (Co) en bacterias aisladas del agua superficial de La Laguna de Ozogoché (Cubillín) situada en la Parroquia Achupallas del cantón Alausí de la provincia de Chimborazo, la cual posee una temperatura por debajo de los 15°C siendo éste un ambiente óptimo para el desarrollo de microorganismos psicrófilos que presentan adaptaciones propias al lugar (Ministerio del ambiente, 2015, p. 1).

Los tratamientos en ambientes contaminados con metales pesados donde se hace uso de microorganismos han surgido como una alternativa viable y de bajo costo para el tratamiento de ambientes naturales contaminados. La presencia de metales pesados ejerce una presión selectiva en los microorganismos expuestos a éstos, motivándolos a que se adapten a dicha condición ambiental y solo aquellos que contrarresten los efectos tóxicos de los metales sean capaces de sobrevivir y desarrollar sistemas de supervivencia a estas condiciones.

El presente proyecto de investigación se encuentran dentro de la Constitución de la República del Ecuador vigente a partir del año 2008, presenta una visión acerca de los derechos del agua y la naturaleza impulsando a su conservación y el uso sustentable de los recursos hídricos; en su acuerdo 863 de la Secretaría Nacional del Agua (SENAGUA) hace referencia a varias políticas relacionadas con la calidad y mitigación de los efectos de la contaminación en los cuerpos de agua. Además la Ley Orgánica de recursos hídricos, usos y aprovechamiento del agua aprobada en el año 2014 fortalece la participación ciudadana en el ámbito gestión del agua (Secretaría Nacional Del Agua, 2014, p. 1).

Cabe recalcar que esta investigación está directamente relacionado con el perfil profesional de la carrera perteneciendo a la línea de investigación: Protección ambiental y a la sub línea: Biotecnología, debido a que esta investigación tiene multitud de aplicaciones en la búsqueda de organismos productores de nuevos compuestos, y también como descontaminadores de agua y suelos. Es un trabajo sustentable y sostenible ya que a través del desarrollo investigativo obtendremos grandes beneficios para la sociedad y el ambiente.

La presente investigación se justifica desde la perspectiva metodológica, ya que se pretende emplear métodos, técnicas de investigación acreditadas, con el objetivo de obtener información fidedigna, y verídica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la tolerancia a metales pesados en microorganismos aislados de la Laguna de Ozogoche; de la parroquia Achupallas del Cantón Alausí.

Objetivos Específicos

- Determinar las características físico-químicas del agua de la Laguna de Ozogoche (temperatura, pH).
- Aislar bacterias resistentes a metales pesados a partir de las muestras obtenidas del agua de la Laguna de Ozogoche.
- Evaluar el nivel de tolerancia y/o resistencia que presentan las cepas aisladas a diferentes concentraciones de metales pesados: Cobre (Co), Mercurio (Hg), Plomo (Pb).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Se dice que alrededor del 85% del planeta Tierra posee ambientes fríos aquellos que poseen una temperatura de 15°C o menos, los cuales presentan una gran variedad de hongos, bacterias, algas y levaduras que han colonizado los ambientes antes mencionados y en la actualidad se los denomina como microorganismos extremófilos. Presentan adaptaciones a nivel fisiológico y molecular como modificación de la membrana, síntesis de proteínas, síntesis de exopolisacáridos, resistencia a metales pesados y pesticidas además de la síntesis de enzimas que trabajan a bajas temperaturas (Fullana, 2014, p. 21).

Se han realizado algunas investigaciones alrededor del mundo dirigidas al aislamiento de microorganismos resistentes a metales pesados:

En una investigación dirigida al aislamiento de bacterias resistentes a cobalto y níquel, del yacimiento laterítico de Moa, se obtuvieron 11 cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* particularmente de los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacte*.. Dichas cepas fueron sometidas a varias concentraciones de metal (10 a 200 mmol/L) de níquel (Ni) y cobalto (Co) obteniendo una resistencia de hasta (200 mmol/L) a cobalto en el caso de *Escherichia coli* (Gómez *et al.*, 2002, pp. 27-28).

En estudios de ambientes extremos realizados en la Laguna Amarilla del Nevado el Altar; se procesaron cinco muestras del agua recogidas en diferentes puntos durante una temporada seca y una lluviosa, mismas que fueron incubaron a temperaturas de 4°C, 10°C, 20°C y 37°C para determinar la temperatura óptima de crecimiento y aislamiento de las cepas, las cuales presentaron características psicrótróficas y psicrófilas. Además se determinaron la capacidad que presentan los microorganismos para tolerar concentraciones crecientes de metales pesados y antibióticos. (Moreno, 2017, pp. 10).

En estudios sobre la resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares que posee una temperatura de 15°C; se identificaron 23 cepas resistentes a cadmio

(Cd), cromo (Cr), plomo (Pb) y antibióticos, donde los géneros; *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria* fueron los más abundantes y estos fueron sometidos a diferentes concentraciones diferentes de Pb, Cr y Cd (0.5 mM, 1.0 mM y 1.5 mM), logrando similar resistencia en todos los casos frente a los metales en estudio (Martínez *et al.*, 2010, pp. 5-7).

Acevedo & Severiche (2013) encontraron 9 cepas resistentes a di-bromo-mercurio, de las cuales ocho correspondían a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Salmonella sp*, *Acinetobacter sp*) y 1 a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus sp*). Todos estos géneros fueron sometidos a concentraciones crecientes de dibromo-mercurio (10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 45 ppm, 60 ppm, 75 ppm, 90 ppm, 105 ppm, 120 ppm, 135 ppm, 150 ppm y 180 ppm) formando biopelículas en todas las concentraciones.

1.2. Bioprospección

La bioprospección es una actividad interdisciplinaria encaminada a la exploración sistemática y sostenible de la biodiversidad, que tiene la finalidad de identificar y obtener fuentes de componentes naturales y microorganismos que tengan potencial para ser aprovechados en la biotecnología a nivel ambiental e industrial (Paipilla, 2014, p. 15).

Otros autores mencionan que la Bioprospección es la exploración sistemática y sostenible de la biodiversidad para identificar y conseguir nuevas fuentes de compuestos (químicos, genes, proteínas, microorganismos entre otros) con alto potencial comercial (Departamento Nacional de Planeación, 2008).

Estudio bioprospectivo en Ambientes Extremos

Consiste en el estudio de ambientes naturales poco explorados que presentan condiciones extremas, teniendo como objetivo principal el hallazgo de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y sustancias con uso potencial para beneficio del ser humano, que presenta un valor comercial a nivel biotecnológico, con aplicación industrial y ambiental (Cimera, 2013, p. 1)

Ecología Microbiana

La Ecología Microbiana, constituye la fusión entre la Ecología y la Microbiología, y estudia el papel que juegan los microorganismos en la biósfera. Esta disciplina, surgida con fuerza a partir

de la segunda mitad del siglo XX, nos muestra hoy en día como la gran diversidad de los seres existentes en los ecosistemas dan cuenta de la gran cantidad de actividades que están presentes en el ambiente. Su papel fundamental para mantener la salud de los ecosistemas y la necesidad de integrar a los microorganismos como un componente esencial en los estudios ecológicos para la comprensión del funcionamiento de la biósfera (Guerrero Sánchez *et al.*, 2005, pp. 1-2).

1.2.1. Ambientes extremos

Se consideran ambientes extremos aquellos que poseen condiciones físico-químicas inhabitables como altas o bajas temperaturas, acidez elevada, altas concentraciones de sal, altas presiones. A pesar de estas condiciones encontramos microorganismos que son capaces de crecer y desarrollarse sin problema alguno en este tipo de ambientes utilizando mecanismos de adaptación a estos parámetros atípicos (Gómez, 2016, p. 2).

Los hábitats donde viven los extremófilos incluyen manantiales calientes y ácidos de zonas volcánicas, sistemas hidrotermales submarinos, sistemas de aberturas termales abisales, mares y tierras polares fríos, glaciares alpinos, lagos salinos y alcalinos y zonas de alta montaña que principalmente poseen temperaturas alrededor de -20°C a 15°C (Oliart-Ros *et al.*, 2016, pp. 82-83), (Moreno, 2017, p. 19).

Por su parte el clima de alta montaña en el Ecuador se ubica sobre los 3200 msnm. La temperatura media anual es inferior a 12°C y depende de la altitud. La precipitación anual esta entre 800 y 2000 mm. (Hofstede *et al.*, 1998, p. 19).

En los lugares de alta montaña se observa cuerpos de agua dulce donde habitan microorganismos con adaptaciones propias al entorno y están relacionados con la síntesis de productos naturales inusuales (Moreno, 2017, pp. 19-20).

1.3. Zona de estudio

La presente investigación se desarrolló en la laguna de Cubillín, que se encuentra ubicado dentro del sistema lacustre Ozogoché, situado en la Parroquia Achupallas, Cantón Alausí, Provincia de Chimborazo. Está formado por un grupo de 45 lagunas o lagos dentro del Parque Nacional Sangay, situado a 20 km al sur de Guamote y 36 km al este de Palmira, presenta una altitud de 3400 a 4010 msnm y cuenta con una temperatura durante el día de aproximadamente 20°C pudiendo alcanzar en la noche temperaturas por debajo de 10°C . (Ministerio del Ambiente, 2004).

Originalmente el nombre Ozogoché se deriva del jibaro que significa “*ushu*”: glotón deseoso de comer carne y “*juchi*”: estar solo. Su procedencia se desprende de una leyenda indígena la cual dice que las aves conocidas como cuviví, cada año se arrojan voluntariamente a las aguas heladas para morir y así rendir un tributo suicida a estas aguas sagradas (GoRaymi, 2018).

El complejo lacustre Ozogoché está compuesto por las lagunas de Cubillín, Magtayán, Yanacocha, Laguna Grande, Tinguicocha, Patoguambuna, Boazo y Verdecochoa, entre otras lagunas; la mayoría de ellas ubicadas sobre los 3.800 metros de altitud.

La laguna de Cubillín, presenta una extensión: 7 km² de superficie con una altitud 3.800 msnm, además, esta laguna posee un alto grado de endemismo de especies de flora y fauna. Entre los animales del sector destacan osos de anteojos, gaviotas, cóndor andinos, pumas, venados, patos, ciervos, curianguines y ovejas, Su formación vegetal es un bosque sub-húmedo montano bajo, bosque húmedo montano y estepa espinosa montano bajo (Radio Mundia Ecuador, 2017), (Ministerio del Ambiente, 2004).

1.3.1. Ubicación de la Laguna de Ozogoché (Cubillín)



Figura 1-1: Ubicación de la Laguna de Ozogoché (Cubillín)
Fuente: Google Maps, 2019.

1.4. Microorganismos extremófilos.

Los microorganismos extremófilos tienen como hábitat natural ambientes con condiciones extremas lo cual hace difícil la supervivencia de otros organismos vivos. Se clasifican en base a la condición química o física extrema del ambiente donde habitan (Oliart-Ros *et al.*, 2016, p. 83).

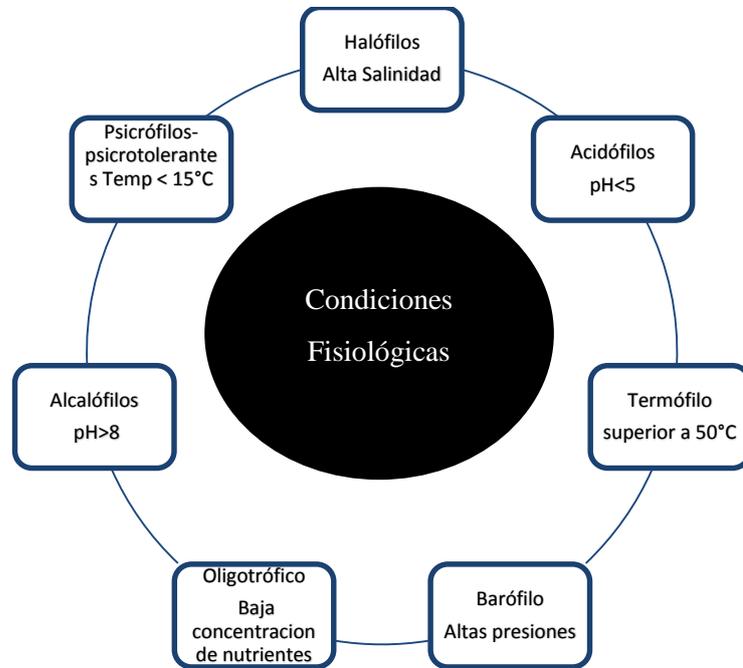


Figura 2-1: Clasificación microorganismos extremófilos

Fuente: Mata, 2006 citado por (Garzón, 2015, p. 19)

1.4.1. Microorganismos psicrófilos

Estos microorganismos se encuentran en ambientes fríos que son actualmente más comunes y extensos que los ambientes calientes, son microorganismos que poseen valores de temperaturas óptimas de crecimiento por debajo de 20 ° C (Castillo Rodríguez *et al.*, 2005, p. 381)

Los psicrófilos mejor estudiados son algas que crecen bajo el hielo como *Chlamydomonas nivalis*, las cuales presentan una coloración verde o rojo según se encuentre en estado vegetativo o esporulado respectivamente, también se pueden encontrar bacterias Gram Positivas de los géneros; *Bacillus*, *Clostridium* y *Micrococcus*. Entre las bacterias Gram Negativas destacan los géneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Vibrio* (Castillo Rodríguez *et al.*, 2005, p. 382), (Instituto Valenciano de Microbiología, 2018, p. 1)

1.4.2. *Microorganismos Psicrotolerantes.*

Los microorganismos capaces de crecer a temperaturas alrededor de 0° C que tiene temperaturas optimas de crecimiento entre 20-40° C se denominan psicrotolerantes (Castillo Rodríguez *et al.*, 2005, p. 381).

Estos tienen una distribución muy amplia en comparación con los psicrófilos, pudiéndose encontrar en suelos y aguas de climas templados, carne, leche o vegetales en refrigeración (4° C). Cabe señalar que los psicrotolerantes son capaces de crecer a 0° C, pero su crecimiento es lento y deben pasar un tiempo prudente para poder ser observados en los medios de cultivo (Madigan *et al.*, 2004, p. 154).

1.4.3. *Adaptaciones moleculares a la psicrofilia*

Los ambientes en los que se desarrollan los microorganismos psicrófilos obligan a que estos se adapten de manera diferente al resto de microorganismos. A continuación se presentan algunas de las características que los hacen diferentes del resto:

- *Producción de Enzimas:* poseen enzimas que funcionan óptimamente en el frío, gracias a que posee en su estructura secundaria una mayor proporción de hélices alfa y en menor cantidad láminas beta. Poseen mayor cantidad de aminoácidos polares en comparación con enzimas de organismos mesófilos, lo cual les permite mayor flexibilidad para catalizar reacciones metabólicas en la célula (Madigan *et al.*, 2004, p. 154).
- *Aumento de la fluidez de la membrana plasmática:* la composición de la membrana plasmática en los microorganismos psicrófilos, a diferencia de los mesófilos, posee ácidos grasos no saturados de cadena corta los cuales facilitan la fluidez y el transporte activo a baja temperatura (Madigan *et al.*, 2004, p. 155).
- *Formación de pigmentos:* se producen pigmentos en la pared celular lo cual otorga a los microorganismos protegerse de la radiación UV para evitar la lisis del DNA, si esta se rompiera altera al ácido nucleico de la célula. En estos microorganismos, cuando se observa la pigmentación se asocia a un mecanismo de protección contra la fotooxidación, la presencia de éstos otorga a las bacterias coloraciones variadas como naranja, rojo y amarillos (Moreno, 2017, p. 25).

1.4.4. Importancia biotecnológica de las bacterias psicrófilas

Los microorganismos psicrófilos son muy importantes dentro del ámbito de la Biotecnología; sobre todo por la producción de moléculas biológicas (enzimas) con capacidad de funcionar en ambientes de bajas temperaturas (Tabla 1-1)

Tabla 1-1: Productos obtenidos de bacterias psicrófilas y sus aplicaciones.

Producto	Importancia	Aplicación
Producción de exopolisacáridos	Los exopolisacáridos producidos por psicrófilos poseen la capacidad de adsorber compuestos tóxicos como por ejemplo el dióxido de carbono. Son compuestos biodegradables, producidos de manera sostenible.	-Biorremediación
Producción de enzimas	Con la aplicación de enzimas frías, se puede modificar compuestos volátiles y orgánicos. Estas enzimas producidas por bacterias psicrófilas presentan velocidades de reacción altas, minimizan reacciones que pueden ocurrir a temperaturas elevadas además de un alto nivel de estereoespecificidad.	-Tecnología Enzimática -Catalizadores
Proteasa	Las proteasas también se las conoce como peptidasas, son enzimas que rompen enlaces peptídicos de proteínas e intervienen en reacciones metabólicas. Los géneros de bacterias empleadas para la producción industrial son Bacillus.	-De gran interés industrial (clarificación de la cerveza, ablandadores de carne, fermentadores de soya, producción de hidrolizados proteicos)
Lipasas	Las lipasas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en microorganismos, plantas y animales, catalizan la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos	- Biocatalizador -Obtención de compuestos ópticamente puros - Bioconversión de principios activos.

Fuente: (Freitas et al., 2011), (Alvarenga et al., 2015), (Martínez et al., 2010), (González et al., 2007).

Realizado por: Lema Jhojana, 2019

1.5. Métodos de identificación microbiana

Los métodos de identificación microbiana son técnicas y procedimientos utilizados para identificar y caracterizar microorganismos de muestras ambientales, clínicas y alimentarias. Inicialmente la muestra obtenida es inoculada en medios de cultivo enriquecidos con

requerimientos específicos que proporcionan las condiciones de vida adecuadas a la población bacteriana en estudio (Hernández, 2003, pp. 15-16).

1.5.1. Caracterización microscópica

El estudio microscópico permite analizar características propias de cada microorganismo, mismas que hacen referencia al tamaño de las bacterias (0,5 a 10 micrómetros). Para ello es necesario el uso de microscopio y poder observar el tamaño, la forma y agrupación que presentan las células en observación (Tabla 2-1) (Garzón, 2015, p. 9), (Rodríguez, 2018, p. 1).

Tabla 2-1: Caracterización microscópica.

Característica	Detalle	Clasificación
Morfología de las células	Cocos	- Coco - Diplococo - Estafilococo - Estreptococo -Sarcina -Tétrada
	Bacilos	- Bacilo - Diplobacilo - Cocobacilo - Estreptobacilo -Empalizada
	Vibrios	
	Espirilos	

Fuente: (Rodríguez, 2018, p. 1)

Realizado por: Lema Jhojana. 2019

1.5.1.1. Tinción Gram

Es definida como una tinción diferencial, que clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: Gram-positivas, de color violeta azulado, y Gram-negativas, de color granate o rojo-rosado (López Hontangas *et al.*, 2007, p. 30).

La tinción Gram se basa en características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales (López Jácome *et al.*, 2014, p. 14).

Tabla 3-2: Reactivos utilizados en la coloración de Gram y su función.

Reactivos	Acción en las paredes de las bacterias
<ul style="list-style-type: none"> • Cristal violeta, 	Posee afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana
<ul style="list-style-type: none"> • Lugol 	Sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana.
<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol-acetona 	Deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos.
<ul style="list-style-type: none"> • Safranina 	Funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo.

Fuente: (López Jácome *et al.*, 2014, p. 14) Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología, México.

Realizado por: lema Jhojana., 2019

1.5.1.2. Caracterización macroscópica

Las bacterias se multiplican rápidamente formando colonias visibles las cuales se pueden observar sin la necesidad de aparatos especiales cuando se las siembran en medios de cultivo. Estas colonias pueden ser caracterizadas utilizando parámetros como: tamaño, forma, consistencia, elevación, borde y coloración que presentan las colonias (Rodríguez, 2018, p. 1), (Moreno, 2017, pp. 27-28).

Tabla 4-3: Caracterización macroscópica.

Característica	Detalle	Clasificación
Morfología de la colonia	Forma	- Puntiforme - Circular - Fusiforme - Irregular - Rizoide
	Borde	-Entero -Ondulado -Lobulado -Filamentoso
	Superficie	- Lisa/Rugosa -Mate/Brillante -Seca/Creмосa -Invasiva/Superficial
	Elevación	-Plana -Convexa -Elevada -Umbiculada
	Consistencia	-Creмосa -Membranosa -Viscosa
	Apariencia	-Opacidad: transparente, opaca, translúcida. -Pigmentación

Fuente: (Garzón, 2015, p. 9) Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo, Colombia.

Realizado por: Lema Jhojana., 2019

1.5.2. Identificación bioquímica

Las pruebas bioquímicas permiten la diferenciación presuntiva rápida entre grupos de microorganismos o entre especies bacterianas; además, permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación (López Hontangas *et al.*, 2007, pp. 28-29).

Algunas pruebas bioquímicas son muy rápidas, la lectura se puede hacer en segundos o pocas horas debido a que evalúan la presencia de una enzima preformada. En otros casos requieren de una incubación previa de entre 18 y 48 horas, entre las enzimas más comunes se encuentran aquellas utilizadas para detectar componentes metabólicos o determinar la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia (Fernández Olmos *et al.*, 2010, p. 3).

1.5.2.1. Prueba Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM)

Esta prueba se utiliza en la identificación de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*, es un medio semisólido y diferencial el cual permite identificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno (H₂S)(Soria Melguizo, 2009b, pp. 1-4), (Brizuela, 2015a, pp. 1-2).

Para saber si se ha producido Indol se añaden tres o cuatro gotas de reactivo de Kovac. La reacción es positiva cuando se observa un color rojo en la superficie del medio, por otra parte si la coloración es amarilla estamos frente a una reacción negativa (Soria Melguizo, 2009b, p. 1).

Las bacterias generan turbidez o un crecimiento difuso fuera de la línea de siembra lo cual determina si presentan o no movilidad (Moreno, 2017, pp. 28-29).

1.5.2.2. Prueba Agar Hierro Triple azúcar (TSI)

Esta prueba se emplea para la identificación del género *Enterobacteriaceae*, en especial *Salmonella* y a toda aquella bacteria fermentadora de azúcares ya que contiene tres carbohidratos glucosa, lactosa y sacarosa (BD Diagnostic Systems Europe, 2003, pp. 1-4), (Brizuela, 2015b, pp. 1-2).

Cuando existe fermentación de ácidos orgánicos el medio se torna rojo indicando alcalinización y si se torna amarillo producción de ácido. También permite la identificación de producción de

sulfuro de hidrógeno (H₂S) por lo que se observa un color negro (Moreno, 2017, p. 29), (BD Diagnostic Systems Europe, 2003, pp. 1-4).

1.5.2.3. Prueba Ureasa

Es una prueba de cribado para *Cryptococcus*, *Proteus*, *Klebsiella* y *Yersinia enterocolitica*; determina la capacidad de las bacterias de hidrolizar urea teniendo como resultado anhídrido carbónico (CO₂) y amoníaco (NH₃). Es positiva cuando se observa el cambio de coloración en el medio de naranja-amarillo a rosa fuerte o fucsia (López Hontangas *et al.*, 2007, p. 37), (Cercenado *et al.*, 2004, p. 4).

1.5.2.4. Prueba Manitol

Esta prueba se utiliza para el aislamiento selectivo de estafilococos y para la detección de *Staphylococcus aureus*.

Este agar presenta peptonas y extractos de carne bovina con una alta concentración salina, gracias a esto se produce la inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos.

Los estafilococos positivos a la coagulasa producen colonias de color amarillo y para los estafilococos negativos producen colonias de color rojo o púrpura (BD Diagnostic Systems Europe, 2013, pp. 1-3).

1.5.2.5. Prueba Citrato

Esta prueba permite determinar la capacidad que poseen las bacterias de usar el citrato como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno. Cuando se desdobra el citrato se producen oxalacetato y piruvato, cuando este se encuentra en medio alcalino a su vez genera carbonatos y bicarbonatos alcalinos, entonces el medio de color verde se torna a color azul (Laboratorios Britania S.A., 2019a, pp. 1-2).

1.5.2.6. Prueba Oxidasa

Esta prueba permite determinar la presencia de enzimas oxidasas, las cuales forman parte del sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo produciéndose peróxido de hidrógeno y agua. El sistema citocromo-oxidasa está presente en bacterias aerobias,

especialmente en bacterias anaerobias facultativas; las bacterias anaerobias estrictas carecen de este sistema (Cercenado *et al.*, 2004, p. 6).

1.5.2.7. Prueba Catalasa

En la mayoría de microorganismos citocromos está presente una enzima conocida como catalasa; aquellas bacterias que sintetizan dicha enzima hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso. Esta prueba sirve para determinar géneros como *Micrococacceae* (positiva si existe burbujeo) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa si no existe burbujeo) (Cercenado *et al.*, 2004, p. 6).

1.5.2.8. Prueba MacConkey

Este medio permite la diferenciación de bacterias de fácil desarrollo del género Enterobacteriaceae provenientes de muestras aguas, alimentos y clínicos, además de *Shigella* y *Salmonella*.

Los nutrientes que componen a este medio de cultivo son: la lactosa que es el hidrato de carbono no fermentable y sales biliares que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y peptonas que aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo de bacilos Gram negativos. Cuando se produce la fermentación de la lactosa las colonias bacterianas tornan de color rosado-rojizo, mientras al no existir fermentación de lactosa las colonias son incoloras (color del medio) (Pandey *et al.*, 2013, p. 77).

1.5.2.9. Prueba Trypteína Soya Agar (TSA)

Es un medio de cultivo que permite el desarrollo de gran variedad de microorganismos. Está compuesto por peptona y triptona que aportan nutrientes como: aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimídicas, minerales, cantidad de hidratos de carbono naturales y cloruro de sodio que mantiene el balance osmótico del agar (Laboratorios Britania S.A., 2019b, pp. 1-2).

Permite el crecimiento de algunos microorganismos como *Estreptococos*, *Pneumococos*, *Brucella*, *Corinebacterias*, *Erysipelothrix*, *Pasteurella* y *Candida*.

1.6. Metales Pesados

Los metales pesados son aquellos que poseen una densidad igual o superior a 5 gr/cm³. Son componentes naturales de la corteza terrestre, y entre ellos podemos encontrar a Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, y Ni. Estos metales se encuentran en forma elemental, con un número atómico superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos) (García y Donoso, 2004).

Los metales pesados tienen un papel importante en los organismos al ser parte fundamental de sus funciones bioquímicas y fisiológicas, pero también pueden actuar como potentes tóxicos (Tabla 5-1) cuando se encuentran en elevadas concentraciones tanto para los seres humanos como para los ecosistemas. La mayoría de los metales de fuentes naturales suelen provenir de la corteza terrestre, sin embargo, otros procesos de origen antropogénico, como las actividades industriales, agrícolas, mineras y ganaderas, son considerados fuentes de metales pesados (Ferré Huguet *et al.*, 2007, p. 51).

Tabla 5-1: Metales tóxicos de interés.

Muy tóxicos y fácilmente disponibles	Contaminantes prioritarios según la EPA	Metales y no metales que aparecen en concentración superior a la normal por causas antrópicas
As Pd Zn Tl Co Ag Sn Pb Bi Cd Se Te Ni Pt Cu Hg Sb	Sb Pb Cr Hg As Hg Cu Tl Be Ni Zn Cd Se	Ag Pb As Sb Cu Sn Hg Zn Ni

Fuente: Swoanez Calvo, M. 1999b citado por (Hernández, 2012, p. 42)

Realizado por: Lema Jhojana., 2019

1.6.1. Toxicidad de Metales Pesados (Co, Hg, Pb)

Los elementos metálicos, debido a que están presentes en los ecosistemas acuáticos a muy baja concentración, son denominados elementos traza. Algunos son nutrientes esenciales para las plantas y los animales, como: Mn (Manganeso), Mo (Molibdeno), Cu (Cobre), Co (Cobalto), Zn (Zinc), Sc (Escandio) y V (Vanadio). Por su parte elementos como el Ni (Níquel), Sn (Estaño) y Cr (Cromo) son esenciales únicamente para los animales, pero cuando estos elementos están presentes en sistemas ambientales a concentraciones superiores a ciertos niveles, debido a desequilibrios naturales o por introducción antropogénica, pueden ser tóxicos para los seres vivos. La toxicidad de los metales pesados depende de su movilidad en el medio, que a su vez, depende de su especiación química, persistencia y tendencia de acumulación o bioacumulación (Domènech y Peral, 2006, pp. 134-150).

1.6.1.1. Cobalto (Co)

El cobalto es un elemento natural que se encuentra en las rocas, el suelo, el agua, plantas y animales. Posee la capacidad de ser un buen conductor del calor y electricidad. Fue reconocido como elemento básico por el químico mineralógico Georg Brandt en 1735 (Gil Alvarez, 2016), (ATSDR, 2004, pp. 1-3).

El cobalto se usa para producir aleaciones usadas en la manufactura de motores de aviones, imanes, herramientas para triturar y cortar en articulaciones artificiales. Los compuestos de cobalto se usan también para colorear vidrio, cerámicas y pinturas así como secador de esmaltes y pinturas para porcelana (ATSDR, 2004, p. 2).

Efectos del cobalto en la salud

El cobalto tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales para la salud de seres humanos:

- El cobalto es beneficioso porque forma parte de la vitamina B12 y es usado para tratar la anemia en mujeres embarazadas, debido a que estimula la producción de glóbulos rojos. (Lenntech BV, 2019)
- La exposición a niveles altos de cobalto puede producir efectos en los pulmones y el corazón y problemas dérmicos.
- En animales expuestos a niveles altos de cobalto también se han observado efectos en el hígado y los pulmones, daña las células en su cuerpo y en algunos casos provoca esterilidad.
- Aunque es poco probable el síndrome de radiación aguda por cobalto, cuando se da puede incluir náusea, vómitos, diarrea, hemorragia, coma y aun la muerte (ATSDR, 2004, pp. 6-8).

Efectos del cobalto en el ambiente

El cobalto puede ingresar al ambiente tanto desde fuentes naturales como a través de actividades humanas. Puede dirigirse al aire y al agua y depositarse en el suelo. Además, puede acumularse en aguas superficiales en agua de escorrentía producida por lluvia que cae sobre suelo o rocas que contienen cobalto.

El cobalto liberado al agua o al suelo se adhiere a partículas, los compuestos de cobalto que se disuelven fácilmente en agua son más dañinos que los que no se disuelven fácilmente en ésta. El cobalto no puede ser destruido en el ambiente, solamente puede cambiar de forma; adherirse o separarse de partículas (ATSDR, 2004, pp. 3-4).

1.6.1.2. Mercurio (Hg)

El mercurio se encuentra naturalmente en el ambiente y en varias formas. Estas formas se pueden clasificar en tres tipos:

- *Mercurio metálico*: o mercurio elemental, es un metal brillante de color blanco-plateado en forma líquida a temperatura ambiente usado en termómetros y en algunos interruptores eléctricos
- *Mercurio inorgánico*: Los compuestos de mercurio inorgánico se producen cuando el mercurio se combina con elementos tales como el cloro, azufre u oxígeno. Estos compuestos de mercurio se llaman sales de mercurio. Ej.: Sulfuro de mercurio (llamado también cinabrio), que es de color rojo y se vuelve negro por exposición a la luz.
- *Mercurio orgánico*: Cuando el mercurio se combina con carbono, los compuestos que se forman se llaman compuestos de mercurio orgánico u organomercuriales. Ej. Metilmercurio

Las formas naturales más comunes de mercurio que se encuentran en el ambiente son el mercurio metálico, sulfuro de mercurio, cloruro mercúrico y metilmercurio. Algunos microorganismos como bacterias y hongos transforman el mercurio del ambiente de una forma a otra (ATSDR, 2012, pp. 1-3).

El mercurio es usado en la fabricación de joyería, pesticidas y bombillas eléctricas incandescentes. También los compuestos de mercurio son añadidos a las pinturas y pigmentos como conservantes, en el área de investigación se usa en los procesos de electrodeposición de plata, oro, bronce y estaño; también en el curtido y tratamiento de pieles (Hernández, 2012, p. 54), (Gunnar, 2013, p. 28).

Efectos del mercurio en la salud

La exposición al mercurio incluso a pequeñas cantidades causa problemas graves en la salud:

- El mercurio es peligroso para el desarrollo de las primeras etapas de vida del feto, causando problemas en el sistema nervioso e inmunitario, el aparato digestivo, la piel, los pulmones, riñones y ojos (Organización Mundial de la Salud, 2017).
- En los mamíferos interfiere con la formación de espermatozoides causando problemas en la reproducción.
- Afecta neurológica y reproductivamente a las aves.
- En peces, causa disminución en el sentido del olfato, daña las branquias, provoca ceguera, y modifica la habilidad para la absorción de nutrientes en los intestinos.
- En las plantas el mercurio reduce el crecimiento (Twardowska *et al.*, 2006).

Efectos del mercurio en el ambiente

Aproximadamente el 80% del mercurio elemental es liberado al aire por actividades humanas como el uso de combustibles fósiles, minería, fundiciones y de la incineración de desechos sólidos. Cerca del 15% del total se libera al suelo, proveniente de abonos, fungicidas y desechos sólidos municipales es un 5% adicional es liberado al agua ambiental desde aguas residuales de industrias (ATSDR, 2012, pp. 1-6).

1.6.1.3. Plomo (Pb)

El plomo es un metal gris-azulado que aparece naturalmente en pequeñas cantidades en la corteza terrestre. Se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente debido a actividades como la minería, manufactura industrial y de combustibles fósiles (ATSDR, 2016, pp. 1-2).

Se dice que aproximadamente que un 40 % del Plomo obtenido de la explotación minera se usa de forma metálica, un 25% es utilizado en aleaciones y un 35 % en compuestos químicos (Gunnar, 2013, p. 39).

El plomo tiene muchos usos diferentes, está presente en la fabricación de baterías, municiones, productos metálicos y dispositivos para evitar irradiación con rayos X.

Debido a inquietudes sobre salud pública, la cantidad de plomo en pinturas, cerámicas y en materiales para calafatear y soldar se ha reducido considerablemente en los últimos años. El uso del plomo como aditivo para gasolina se prohibió en el año 1996 en Estados Unidos (ATSDR, 2016, pp. 1-2).

Efectos del plomo en la salud

Entre algunos de los efectos del plomo en la salud tenemos:

- El plomo afecta principalmente al sistema nervioso alterando la memoria y la concentración.
- Problemas reproductivos y complicaciones durante el embarazo.
- Presión sanguínea alta.
- Problemas digestivos en algunos casos provocando anemia
- Dolores musculares y articulares (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, 2017).

Efectos del plomo en el ambiente

- El plomo no se degrada, sin embargo, compuestos derivados del plomo son transformados por la luz solar, el aire y el agua. Estos al ser liberados en el aire, son transportados largas distancias antes de adherirse a partículas en el suelo.
- El movimiento del plomo desde el suelo a aguas subterráneas dependerá del tipo de compuesto de plomo y de las características del suelo.
- La mayor parte del plomo en suelos del interior de zonas urbanas se origina de casas viejas pintadas con pinturas a base de plomo (ATSDR, 2016, pp. 1-2).

1.7. Interacciones metal-microorganismo

Existe una inmensa diversidad microbiana que presenta cierto interés como captadores de metales en sitios contaminados; entre ellos tenemos microorganismos tolerantes los cuales son muy importantes debido a que presentan mecanismos de detoxificación codificados genéticamente inducidos por la presencia del metal (Vullo, 2003, p. 1).

La tolerancia de los metales por parte de las bacterias es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos:

- Neutralizan su toxicidad, por efecto de componentes celulares que capturan los iones metálicos.

- Enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas.
- Transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular (Marrero Coto *et al.*, 2010, p. 69).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación

Este tipo de investigación se clasifica como Experimental- Descriptiva, ya que representa un estudio del que se posee poca información, es un tema poco explorado en el Ecuador. La finalidad es encontrar nueva información y determinar el grado de tolerancia de los microorganismos a diversas concentraciones de metales pesados.

2.2. Enfoque de la investigación

Esta investigación presenta un enfoque mixto debido a que recolecta, analiza y vincula tanto datos cuantitativo como cualitativos (Ruiz Medina, 2011, pp. 158-159) ya que se emplearon diversas concentraciones de metales pesados Cobalto (Co,) Mercurio (Hg,) Plomo (Pb) observando hasta que concentración la bacteria es capaz de crecer y desarrollarse sin problema alguno y se determinó el número de colonias existentes en cada ensayo realizado

2.3. Diseño de la investigación

Es un diseño Experimental debido a que el factor de crecimiento microbiano está determinado por la temperatura, se desarrollaron bacterias psicrotolerantes, y por otra parte se maneja la variable independiente con el fin de determinar el efecto de la variación de las concentraciones de metales pesados a las cuales fueron sometidas las bacterias.

2.4. Unidad de análisis

Agua superficial de la Laguna de Cubillín ubicada dentro del sistema lacustre Ozogoche en la Parroquia Achupallas, Cantón Alausí, Provincia de Chimborazo.

2.5. Etapas de la investigación

2.5.1. Recolección de la muestra

Para la toma de muestras se utilizó envases de polietileno de 100 mL, bolsas plásticas de polietileno estériles con sello hermético, un cooler para el transporte y conservación de las muestras (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1998, pp.4-6).

2.5.1.1. Área de toma de muestra

Para la recolección de las muestras de análisis se reconoció el sistema lacustre Ozogoche de las cuales destaca la Laguna de Cubillín, ubicada entre las coordenadas 02° 15' 04" de latitud Sur y 78° 36' 00" de longitud Oeste. Esta última posee 7 Km² de superficie y está ubicada a una altitud de 3800 msnm, presentando una temperatura promedio en el día de 20° C, y en la noche puede llegar a 10° C o menos (Ministerio del Ambiente, 2004), (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2014).

Las muestras seleccionadas para la investigación fueron obtenidas de la superficie de agua de la Laguna Cubillín.

Muestra 1: Tomada de una zona Norte poco transitada por turistas donde el acceso es limitado.

Muestra 2: Tomada de una zona intermedia de la laguna, donde existen rocas cercanas a la zona de muestreo.

Muestra 3: Tomada de una vertiente que descendía por las montañas y desembocaba en la laguna.

Muestra 4: Tomada de una zona donde se muestra presencia de corriente en la orilla de la laguna y donde el nivel del agua es muy bajo.

Muestra 5: Tomada de una zona donde no presentaba corriente ni oleaje.

Muestra 6: Tomada en la entrada directa de la laguna, donde se observa presencia de oleaje. Esta es una zona con fácil acceso.

Únicamente se tomó del lado izquierdo de la laguna debido a que el otro extremo de está, su acceso es difícil. (Figura 1-2)

La ubicación e identificación de los puntos de muestreo se observan a continuación:

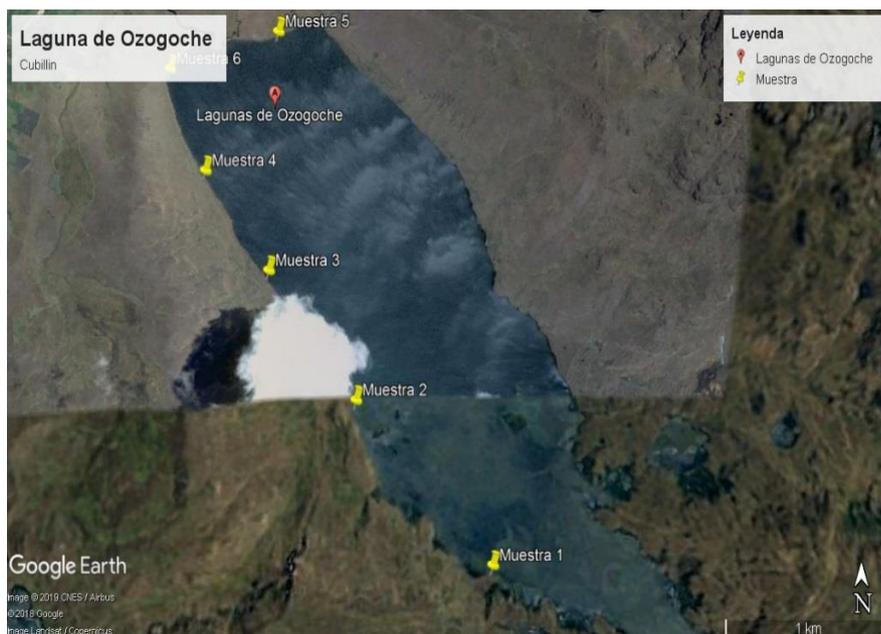


Figura 1-2: Ubicación de los puntos de muestreo en la Laguna de Cubillín
Fuente: Google Maps, 2019.

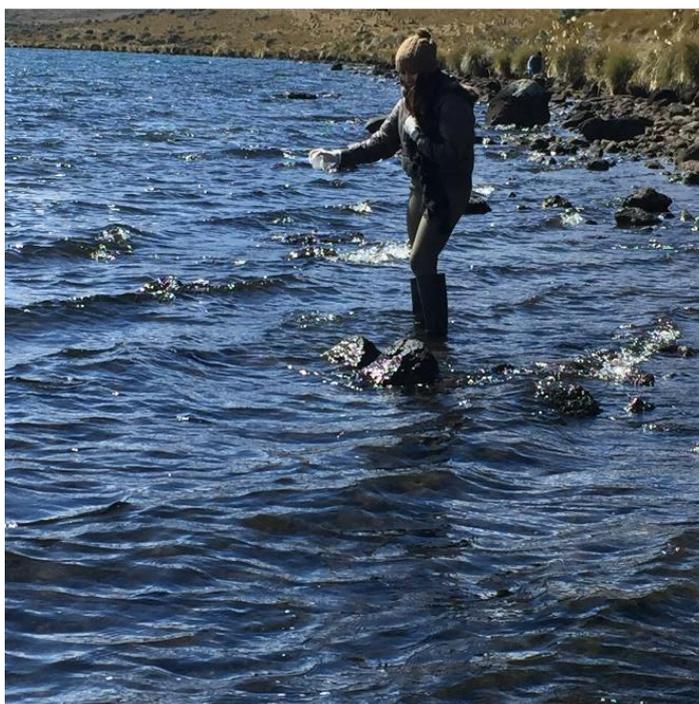


Figura 2-2: Identificación de puntos de muestreo
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

2.5.1.2. Procedimiento del muestreo

- Se realizó un reconocimiento del sistema lacustre Ozogоче, específicamente la laguna de Cubillín, para determinar los puntos de recolección de muestra.
- Se seleccionaron seis puntos de muestreo en la laguna Cubillín.

- Se utilizaron 6 recipientes de plástico de boca ancha, con tapa hermética, etiquetados y enumerados cada uno de ellos.
- Se colocó el equipo de protección personal.
- Los recipientes fueron enjuagados tres veces con el agua de la laguna y se llenaron con el agua superficial de la laguna aproximadamente las tres cuartas partes, posteriormente se sellaron herméticamente.
- En cada uno de los puntos se midieron la temperatura y el pH, haciendo uso de un termómetro y tiras de papel pH .
- Las muestras fueron trasladadas en un cooler a 4° C hasta llegar al laboratorio de Bioquímicos y Bacteriológicos ubicado en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para su respectivo análisis microbiológico (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2011).

2.5.2. Aislamiento

Para el aislamiento y selección de colonias bacterianas a partir de las muestras tomadas del agua de la Laguna de Ozogoché se utilizaron diferentes medios de cultivo basados en agar PCA (Plate Count Agar).

2.5.2.1. Medios de cultivo

Como base se preparó el medio de cultivo PCA que es un medio muy utilizado para el aislamiento de bacterias aeróbicas de aguas, aguas residuales y alimentos. Triptona y el Extracto de Levadura suministran las fuentes de nitrógeno y de vitaminas que requieren los microorganismos, por su parte la glucosa actúa como fuente de energía (Soria Melguizo, 2009a, pp. 1-3).

Tabla 1-2: Composición por litro de medio Plate Count Agar (PCA) en agua purificada

Componente	Cantidad en (g/L)
Hidrolizado pancreático de caseína (Triptona)	5,00
Extracto de levadura	2,5
Glucosa	1,00
Agar-Agar	12,00
pH	7,0+/- 0,2

Fuente: (Soria Melguizo, 2009a, p. 1)

Realizado por: Lema Jhojana., 2019

Además del medio PCA, se prepararon tres medios más cada uno con la composición detallada a continuación:

- Medio PCA sin presión selectiva

Simbología: “PCA-”

Este medio se preparó según las indicaciones del fabricante: 23,5 gramos de medio fueron disueltas en 1 litro de agua destilada, posteriormente esta mezcla fue esterilizada durante 15 min a 121° C, y se distribuyó en placas Petri.

- *Medio PCA con presión selectiva 1*

Simbología: “PCA+”

Se realizó el mismo procedimiento para preparar el medio PCA- descrito anteriormente y luego este fue suplementado con una solución de Nitrato de Plomo (25 µg/mL) como agente de presión selectiva.

- *Medio PCA con presión selectiva 2*

Simbología: “AGL”

Para la preparación de este medio se siguieron indicaciones del fabricante pero en lugar de hacerlo con agua esterilizada se preparó con agua propia de la laguna, que fue previamente filtrada y esterilizada para evitar que partículas pequeñas se incorporaron al medio.

2.5.2.2. *Siembra*

Se procedió a realizar la siembra siguiendo los parámetros descritos a continuación:

- Las seis muestras recolectadas fueron inoculadas por triplicado, en tres diferentes volúmenes de (25, 75 y 150 µL) en los medios PCA+ medio con presión selectiva, PCA- medio sin presión selectiva y AGL medio preparado con agua de la laguna; para esta siembra se inoculó únicamente un volumen de 75 µL.
- Con la ayuda de una espátula de Drigalski, se extendió y distribuyó en cada una de las placas, los diferentes volúmenes adicionados.
- Posteriormente se incubó a dos temperaturas 9° C y 35° C hasta observar crecimiento microbiano.
- Finalmente se efectuó un conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en cada placa Petri.

2.5.2.3. Selección de las colonias bacterianas

- Se procedió a la selección de uno o varios representantes de las colonias obtenidas en cada uno de los medios (PCA+, PCA- y AGL).
- Los clones seleccionados fueron repicados en nuevas placas cada una con la misma presión selectiva, luego se incubaron a las temperaturas de 9° C y 35° C.
- Se realizaron cuatro repiques hasta lograr la estabilización de cada clon, para las dos temperaturas mencionadas.

2.5.2.4. Aislamiento por agotamiento

Una vez obtenidos clones estables, se realizó un reaislamiento por la técnica de aislamiento por agotamiento.

Procedimiento:

- Se usó un asa de siembra la misma que fue flameada en el mechero, antes y después de su uso.
- Con el asa bacteriológica flameada y enfriada, se procedió a la siembra de clones en placas con cada uno de los medios (PCA+, PCA- y AGL).
- La placa se dividió en cuatro para un mejor uso y optimización de recursos en cada cuadrante se sembró la bacteria por agotamiento en superficie; se fue girando la caja y rayando a manera de zigzag, con el propósito de diluir el inóculo. Para finalmente obtener bacterias aisladas.(Alarcón y Olivas, 2001, pp. 14-18)
- Posteriormente se volvió a quemar el asa y con un marcador indeleble se procedió a etiquetar para un fácil reconocimiento de los clones.
- Se incubo a temperaturas de 9 °C y 35 °C respectivamente, hasta observar crecimiento de clones aislados para cada una de las temperaturas.

2.5.3. *Evaluación de las características de crecimiento de los clones aislados en las condiciones de temperatura y presión selectiva opuestas a las toleradas para su aislamiento*

Luego de haber pasado el tiempo necesario de incubación, se procedió a tomar una colonia aislada de la siembra de cada clon, con un palillo estéril y se sembró en los medios PCA+, PCA- y AGL.

- Aquellos clones que provenían de PCA- tanto de temperatura (9° C y 35° C) se sembraron en PCA+ y AGL para observar el comportamiento de los clones en los medios de cultivo con presión selectiva y al medio preparado con agua de la laguna.
- La misma situación fue repetida con los clones provenientes de AGL (9° C y 35° C), los cuales fueron sembrados en PCA+ y PCA- para comprobar su crecimiento y desarrollo en los distintos medios de cultivos y diferencias de temperaturas a las que fueron sometidas.
- Para los dos casos antes seleccionados los clones que provenían de temperatura de 9° C fueron sembrados e incubados a temperatura de 35° C y el mismo caso para clones provenientes de temperatura de 35° C se los sembró e incubó a 9° C.

2.6. **Caracterización**

Para la caracterización se procedió a realizar un análisis sobre cada uno de los clones adaptados tomando en cuenta las siguientes características:

2.6.1. *Caracterización macroscópica*

La caracterización macroscópica fue realizada sobre los clones aislados por agotamiento, mediante una observación directa de cada una de sus características; borde, forma, elevación, color en los medios desarrollados.

2.6.2. *Caracterización microscópica*

Posteriormente para la identificación microscópica de los clones bacterianos se realizó una tinción Gram, lo cual permitió la identificación y clasificación según su coloración (Gram negativas y

Gram positivas) y según su morfología microscópica en cocos y bacilos (Alarcón y Olivas, 2001, pp. 14-18), (López Hontangas *et al.*, 2007, pp. 28-30).

2.6.2.1. *Procedimiento Tinción Gram:*

- Se realizó un frotis en un portaobjetos de los clones previamente aislados y estabilizados.
- Para la fijación de la muestra se pasó sobre el calor del mechero flameándolo.
- Se aplicó una gota de cristal violeta sobre la muestra fijada durante un minuto, y se lavó con abundante agua destilada.
- Posteriormente se aplicó Lugol por un minuto, y se enjuagó.
- Se añadió una mezcla de alcohol-acetona por 30 segundos, se dejó actuar y luego se enjuagó con agua destilada.
- Se añadió safranina por un minuto se enjuagó y se dejó secar la muestra.
- Se añadió una gota de aceite de inmersión para una mejor visualización.
- Finalmente se observó la preparación con el lente de 100x.

2.6.2.2. *Evaluación de la tolerancia a metales pesados (Co, Hg y Pb)*

Para la evaluación de la tolerancia de los clones seleccionados y estabilizados, estos fueron sembrados en medio PCA adicionado con soluciones de metales pesados (Co, Pb y Hg) a concentraciones crecientes (Tabla 2-1) (Navarrete, 2017, pp. 30-32).

Las sales de metales usadas en los distintos ensayos fueron: Nitrato de Cobalto hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) para Co, Acetato de Mercurio ($\text{Hg}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$) para Hg, y Nitrato de Plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) para Pb. Luego de cada siembra, los cultivos fueron incubados a temperaturas de 9 y 35° C hasta obtener un crecimiento.

Los clones se repicaron a partir del medio en el que fueron reaislados a medios suplementados con Nitrato de Cobalto hexahidratado, Acetato de Mercurio y Nitrato de Plomo con el uso de palillos de madera previamente esterilizados sin volver a tocar con el palillo la colonia original en el siguiente orden: Hg, Co y Pb; añadiendo al final un control para verificar que se realizó la siembra de los clones en todos los medios de cultivo (Navarrete, 2017, pp. 30-32).

Aquellos clones que crecieron en cada uno de los ensayos, fueron repicados a otro medio que presentaba una mayor concentración. El proceso se aplicó varias veces hasta obtener aquellos clones que presentaran mayor nivel de tolerancia a las diferentes concentraciones evaluadas en los ensayos aplicados (Navarrete, 2017, p. 32).

El crecimiento de los cultivos bacterianos se determinó visualmente como positivo “+” (se evidencia crecimiento bacteriano) o negativo “-” (sin crecimiento alguno) en un tiempo establecido.

Tabla 2-2: Concentraciones evaluadas en cada ensayo de tolerancia a metales pesados:

Metal	Concentración (µg/mL)								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
Hg	50	100	250	500	750	1000			
Co	100	250	500	750	1000	2000	2500	100	
Pb	50	100	250	500	750	1000	1500	2500	4000

E: ensayo

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

2.6.3. Identificación Bacteriana

La identificación bioquímica se realizó con aquellas cepas bacterianas que presentaron un óptimo crecimiento para temperatura de 9° C y temperatura 35° C. Para ello se reactivaron las colonias y se las pasó nuevamente a placas para obtener suficiente inóculo para las pruebas bioquímicas establecidas.

2.6.3.1. Reactivación de los clones

- Se preparó 33 mL de Caldo Mueller Hinton siguiendo las instrucciones del fabricante, 21 g para 1000 ml de agua destilada se esterilizó en el autoclave por 15 minutos a 121° C.
- Se repartió esta cantidad en 11 tubos de ensayo, adicionando 3 mL para cada tubo.
- Dentro de la cámara de flujo, se tomó una pequeña cantidad de clon bacteriano con uso de un asa de siembra esterilizada y se sembró en los tubos con Caldo Mueller Hinton.
- Los tubos fueron incubados con agitación constante a 35° C por 24 horas para clones que provenían de temperaturas de 35° C, mientras que para clones provenientes de temperaturas de 9° C se incubó por 48 horas.
- Se preparó Agar Mueller Hinton y se colocó en cajas Petri.
- Se introdujo un hisopo estéril en cada tubo y se procedió a sembrar cada uno de los clones en las placas con medio Mueller Hinton.

- También se realizó un control con la presión selectiva de cada clon para evidenciar que realmente se sembró.
- Finalmente se incubó a 35° C por 24 horas.

2.6.3.2. *Prueba Catalasa*

Se tomó un porta objetos y se agregó una gota de peróxido de hidrogeno al 3%. Con un asa estéril se colocó una colonia en la placa y un burbujeo inmediato indicó un resultado positivo evidenciando la presencia de enzima catalasa.

2.6.3.3. *Prueba Oxidasa*

Se añadió un inóculo bacteriano en tiras impregnadas con reactivo revelador de Kovacs. El color purpura indicó la presencia de citocromo oxidasa, mientras que el color café mostró ausencia del mismo.

2.6.3.4. *Prueba Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM)*

Se preparó el medio SIM según los requerimientos del fabricante y se colocaron 3 mL en tubos de ensayo manera vertical. Luego del enfriamiento se inóculó la bacteria con la ayuda de una aguja bacteriológica sin tocar el fondo del tubo y se retiró en la misma dirección sin mover hacia los lados, la muestra fue incubada. Posteriormente se añadió reactivo de Kovacs y la formación de un anillo rojo en la superficie indica positivo para indol, mientras que la formación de nubosidad indica positivo para movilidad.

2.6.3.5. *Prueba Ureasa*

Se preparó el medio Agar Urea de Cristensen según los requerimientos del fabricante y se colocaron 3ml en tubos de ensayo a manera de pico de flauta. Se realizó el estriado del inóculo sobre la superficie del pico de flauta con la ayuda de un asa bacteriológica, para su incubación a 24 horas. El color amarillo muestra un resultado negativo, mientras que el color rojo fenol es un resultado positivo para ureasa.

2.6.3.6. *Prueba Manitol*

Se preparó Agar Manitol Salado y se añadió 3ml a tubos de ensayo dejando enfriar el medio a manera de pico de flauta. Se realizó el estriado del inóculo sobre la superficie del pico de flauta con la ayuda de un asa bacteriológica, los tubos fueron incubados a 35° C por 24 horas. El color amarillo muestra un resultado positivo, mientras que una coloración purpura o rojo muestra un resultado negativo.

2.6.3.7. *Prueba Citrato*

Se preparó el medio de cultivo Citrato colocándose 3mL en tubos de ensayo para luego ser esterilizados. Se dejó enfriar el agar a manera de pico de flauta y se realizó la inoculación con la técnica de siembra en estría desde el fondo del tubo hasta la parte superior del mismo. Estos fueron incubados por 24 horas. El color verde muestra un resultado negativo, por su parte la coloración azul de las colonias es positivo.

2.6.3.8. *Prueba MacConkey*

Se preparó agar Mac Conkey, fueron colocados 3 ml en tubos de ensayo. Se los dejó enfriar a manera de pico de flauta y se realizó la siembra del inóculo a manera de estría desde el fondo hacia la parte superior de los tubos fueron incubados y después 24 horas se evidencio el cambio de color de las colonias a rosadas rojizas mostrando un resultado positivo para fermentación de lactosa.

2.6.3.9. *Prueba Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)*

Se preparó el Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) según los requerimientos del fabricante y se colocaron 3ml en tubos. Se dejó enfriar el medio a manera de pico de flauta y la siembra se realizó de dos maneras; con la aguja bacteriológica haciendo una punción sin topar el fondo del tubo y en la parte del pico del flauta una siembra por estría hasta el final del tubo.

2.6.3.10. *Prueba Agar Tripticasa de Soya (TSA)*

Se preparó 3ml de Agar Tripticasa de Soya en tubos de ensayo. Se dejó enfriar a manera de pico de flauta y se realizó la siembra del inóculo a manera de estría desde el fondo hacia la parte

superior del tubo. Se incubó y se evidenció el cambio de color de las colonias de color verde para *Pseudomonas*.

2.6.4. Prueba de sensibilidad

Como un adicional se realizó un antibiograma o prueba de sensibilidad el cual evalúa la sensibilidad o resistencia de una bacteria a un determinado grupo de antibióticos (Águila, 2016, pp. 2-5).

Materiales

- Agua destilada
- Asa de siembra
- Tubos estériles
- Hisopos estériles
- Pinza estéril
- Placas Petri
- Rotulador
- Regla

Sustancias y Reactivos

- Medio Plate Count Agar
- Suspensión de Sulfato de Bario (0,5 de la escala de Mac Farland)

Antibióticos

- Gentamicina “CN120”
- Ampicilina “AM10”
- Ceftazidima “CAZ30”
- Eritromicina “EM”

2.6.4.1. Procedimiento por Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas:

- Se seleccionó cada una de las placas donde se desarrollaron los clones estabilizados. Con la ayuda de un asa de siembra se tomó el clon y se los depositó en cada tubo estéril que contenía 2 ml de agua esterilizada.
- Para estandarizar la densidad del inóculo se usó una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar, para comparar la turbidez del inóculo (Sacsquispe y Velásquez, 2002, pp. 13-19).

- Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se debe girar una y otra vez dentro de las paredes del tubo con el hisopo con el fin de quitar el exceso de inóculo (Sacsquispe y Velásquez, 2002, pp. 13-19).
- Se inoculó en las placas por estrías en todas las direcciones para garantizar la distribución completa para posteriormente dejar reposar de 3 a 5 minutos.
- Se colocaron los discos de antibióticos sobre la superficie del agar (Gentamicina “CN120”, Ampicilina “AM10”, Cefazidima “CAZ30” y Eritromicina “EM”) usando una pinza estéril.
- Las cajas fueron selladas, etiquetadas e incubadas en posición invertida a 9° C y 35° C, según los requerimientos de la bacteria en análisis.
- Finalmente, a las 24 horas de haber realizado las pruebas de sensibilidad se realizó la medición del diámetro de los halos de inhibición (Navarrete, 2017, p. 34).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización físico-química del agua de la Laguna de Ozogoche

Los resultados obtenidos para la determinación de temperatura y pH en las 6 muestras de agua tomadas de la Laguna de Ozogoche (Cubillín) se detallan a continuación.

Tabla 1-3: Características físico-químicas del agua de la Laguna de Ozogoche

Numero de Muestra	Parámetro	
	Temperatura (°C)	Potencial hidrógeno (pH)
Muestra 1	11	5
Muestra 2	12	7
Muestra 3	12	6
Muestra 4	13	6
Muestra 5	14	7
Muestra 6	15	7

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

La temperatura registrada en la Laguna de Ozogoche oscila desde los 20° C durante el día hasta los 10° C en la noche, por su parte los valores de pH, con frecuencia se ven afectados por las características del suelo en el que está situado. Estos suelos son de origen volcánico por ende el pH tiende a ser ácido, por la presencia de silicatos. Sin embargo, lagunas naturales que no son afectadas por las actividades antropogénicas presentan valores de pH en un rango de 6.5 a 7.5 (Moreno, 2017, pp. 42-44) (Ministerio del Ambiente, 2004).

En el presente estudio, las muestras tomadas mostraron la temperatura que oscila entre los 11 y 15°C. Este puede deberse al incremento de la temperaturas por efecto de sol, por lo que las primeras muestras (M1) muestran menor temperatura que las últimas (M6). Con respecto al pH se observaron valores en un rango de 5 y 7 valor promedio de 6,3 (Tabla 1-3).

3.2. Aislamiento de las colonias bacterianas

3.2.1. Siembra y estimación del número de UFC/mL de las muestras.

Para la estimación del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se realizó una siembra en superficie sobre agar PCA+ (con presión selectiva 25 µL de nitrato de plomo) y PCA- (sin presión selectiva), preparados según las indicaciones del fabricante en materiales y métodos

(Tabla 1-2.) en volúmenes de 25, 75 y 150 µL mientras que para AGL (preparado con agua de la Laguna) se sembró a volumen de 75 µL incubando a dos temperaturas (9 y 35° C). A 35°C se observó crecimiento a las 24 horas, mientras que en 36 horas se obtuvieron colonias visibles a 9° C. El promedio de colonias bacterianas se detallan en las (Tabla 2-3).

Tabla 2-3: Estimación del número de UFC/mL de las muestras.

MUESTRAS	Volumen	Temperatura 35°C			Temperatura 9°C		
		Medios de Cultivo (UFC/ mL)					
		PCA+	PCA-	AGL	PCA+	PCA-	AGL
Muestra 1	25 µL	960	3200		0	600	
	75 µL	893	893	600	93	893	360
	150 µL	407	1580		583	1113	
	Promedio	753	825	600	338	869	360
Muestra 2	25 µL	800	1000		800	680	
	75 µL	707	907	187	600	800	160
	150 µL	713	1127		447	1773	
	Promedio	740	1011	187	616	1084	160
Muestra 3	25 µL	1080	1080		560	800	
	75 µL	533	533	787	707	800	747
	150 µL	853	1687		620	700	
	Promedio	822	1100	787	629	767	747
Muestra 4	25 µL	160	400		520	600	
	75 µL	307	627	560	360	960	440
	150 µL	620	1113		400	887	
	Promedio	362	712	560	427	816	440
Muestra 5	25 µL	480	260		240	160	
	75 µL	360	360	340	507	440	227
	150 µL	380	527		660	827	
	Promedio	407	382	340	469	476	227
Muestra 6	25 µL	240	320		80	320	
	75 µL	400	613	373	173	160	160
	150 µL	533	667		313	507	
	Promedio	391	533	373	189	329	160

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Después de haber realizado las siembras en cada uno de los medios se observó crecimiento bacteriano en las dos temperaturas evaluadas (35 y 9°C) claramente se observó un mayor número de unidades formadoras de colonias en medio PCA-, seguido del medio PCA+ creció un número considerable de colonias, tanto que en el medio AGL presentó menor número de UFC/mL. Es de hacer notar que con respecto al crecimiento en el medio AGL al comparar el crecimiento con su volumen equivalente en PCA- se observó variabilidad. En el caso de la evaluación de clones desarrollados a 35°C se trabajó con esta temperatura debido a que se quería comprobar si existen microorganismos asociados a animales de sangre caliente, observar si existe la presencia de psicrófilos pero a su vez la presencia de patógenos debido a que en este lugar existen animales los cuales sus eses son depositas en los alrededores de la laguna.

3.2.2. Selección y aislamiento de colonias

Para cada una de las placas sembradas se procedió a la toma y selección de un representante de cada tipo de colonia crecida en estos medios (Tabla 3-3) 100 colonias desarrolladas a temperatura de 35° C. Mientras que (Tabla 4-3) 87 colonias desarrolladas a temperatura de 9° C mismas que fueron repicadas en placas a condiciones PCA+, PCA- y AGL.

Tabla 3-3: Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización a 35° C.

Identificación de las colonias seleccionadas								
Muestra	Medio PCA+			Medio PCA-			Medio AGL	TOTAL
	25 µL	75 µL	150 µL	25 µL	75 µL	150 µL		
M1	---	3	1	---	---	---	4	8
M2	---	2	3	3	2	2	5	17
M3	---	---	2	1	2	3	4	12
M4	1	1	4	3	4	2	2	17
M5	---	5	5	1	2	2	5	20
M6	4	7	4	3	1	1	6	26
Número total de Colonias seleccionadas temperatura 35° C.								100

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Tabla 4-3: Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización a 9° C.

Identificación de las colonias seleccionadas								
Muestra	Medio PCA+			Medio PCA-			Medio AGL	TOTAL
	25 µL	75 µL	150 µL	25 µL	75 µL	150 µL		
M1	---	2	---	---	---	2	---	4
M2	---	3	3	2	2	---	3	13
M3	---	1	4	2	3	3	3	17
M4	2	5	3	1	3	2	4	20
M5	2	---	3	3	1	3	3	15
M6	4	3	3	---	2	2	4	18
Número total de Colonias seleccionadas temperatura 9° C.								87

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

- Se efectuaron al menos 4 repiques sucesivos para lograr la adaptación al medio de cultivo y la estabilización de los clones seleccionados (Tablas en la sección Anexos H, I).
- Se evaluó el crecimiento de cada uno de los clones a 35 y 9°C, el cual mostró que el 37% de clones desarrollados a 35°C se adaptaron sobre los medios en los cuales se venían

desarrollando, mismos que crecieron 13 clones en medio PCA+ con presión selectiva nitrato de plomo 25 µg/mL, 12 clones repicados en medio PCA- sin presión selectiva y finalmente se obtuvieron 12 clones en medio AGL adicionado agua de la laguna (Tabla 5-3).

- Por otra parte para la estabilización de clones que se desarrollaron a 9 °C se realizó con un 39% de clones adaptados y estabilizados, 20 Clones repicados en medio PCA+ con presión selectiva nitrato de plomo 25 µg/mL, Además 8 clones repicados en medio PCA- sin presión selectiva de muestras y finalmente 4 clones para medio preparado con agua de la laguna AGL (Tabla 6-3).
- Se realizó un reislamiento de los clones estabilizados utilizando placas con presión selectiva nitrato de plomo 25 µg/mL, para aquellos que no estaban sometidos a estos requerimientos.

Tabla 5-3: Clones obtenidos en los cuatro repiques realizados a 35° C.

Medios		
PCA+	PCA-	AGL
M175µL clones (2,3,6)	M225µL clon (1)	M175µL clones (11,12)
M1150µL clon (1)	M2150µL clon (2)	M275µL clones (8,9)
M275µL clon (4)	M325µL clon (12)	M375µL clones (1,5)
M2150µL clones (5,7)	M375µL clon (3)	M475µL clones (4,10)
M4150µL clon (11)	M3150µL clon (4)	M575 µL clon (3)
M575µL clon (13)	M475µL clones (5,6,7)	M675µL clones (2,6,7)
M5150µL clon (12)	M4150µL clones (8)	
M6150µL clones (8 ,9, 10)	M575µL Clones (10,11)	
	M675µL clon (9)	
Total:13 clones	Total:12 clones	Total:12 clones

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Tabla 6-3: Clones obtenidos en los cuatro repiques realizados a 9° C.

Medios		
PCA+	PCA-	AGL
M175µL clon (13)	M1150µL clon (4)	M275µL clones (1,3,4)
M3150µL clones (1,2,14)	M3150µL clon (3)	M575µL clon (2)
M425µL clon (4,17,20)	M425µL clon (5)	
M475µL clones (9,10,15)	M475µL clon (2)	
M4150µL clones (3,19)	M575µL clones (1)	
M5150µL clon (18)	M5150µL clones (8,7,6)	
M625µL clones (5,7,8,16)		

M6 ₇₅ μL clones (11,12)		
M6 ₁₅₀ μL clon (6)		
Total:20 clones	Total:8 clones	Total:4 clones

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

3.2.3. Caracterización macroscópica y microscópica

3.2.3.1. Caracterización microscópica de clones aislados

Tinción Gram

La Tinción Gram se la realizó a los clones obtenidos y estabilizados, después de haber procedido con los cuatro repiques correspondientes. En las tablas 7-3 y 8-3 se presenta los resultados de la Tinción Gram realizada a todos los clones aislados a partir de los diferentes medios de cultivo

Tabla 7-3: Resultados de la Tinción Gram de los clones seleccionados de los medios PCA+, PCA- y AGL a 35° C.

Clones aislados								
Medio PCA+			Medio PCA-			Medio AGL		
Número de Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia	Número de Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia	Número de Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia
1	-	Bacilos	1	-	Bacilos	1	+	Bacilos
2	-	Bacilos	2	+	Bacilos	2	+	Bacilos
3	+	Bacilos	3	-	Bacilos	3	+	Bacilos
4	-	Bacilos	4	-	Bacilos	4	+	Bacilos
5	+	Cocos	5	+	Bacilos	5	-	Bacilos
6	-	Bacilos	6	-	Bacilos	6	+	Cocos
7	-	Bacilos	7	+	Bacilos	7	-	Bacilos
8	-	Bacilos	8	-	Bacilos	8	-	Cocos
9	-	Bacilos	9	-	Bacilos	9	+	Cocos
10	-	Bacilos	10	-	Bacilos	10	+	Bacilos
11	-	Cocos	11	-	Bacilos	11	+	Bacilos
12	+	Bacilos	12	-	Bacilos	12	+	Bacilos
13	-	Bacilos						

-“GRAM negativo”, + “GRAM positivo”

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

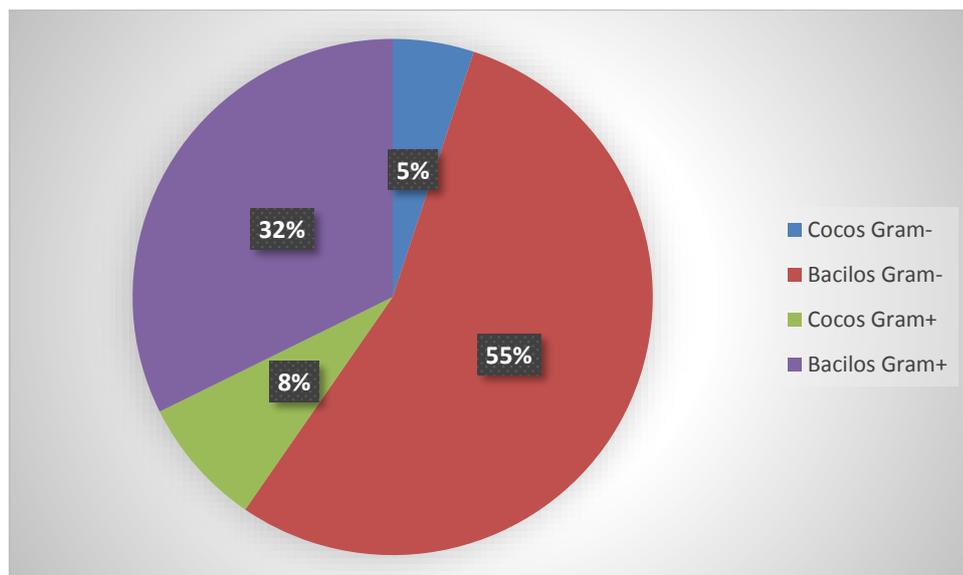


Gráfico 1-3: Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos 35° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Tabla 8-3: Resultados de la tinción Gram de los clones seleccionados de los medios PCA+, PCA- y AGL a 9° C.

Clones aislados								
Medio PCA+			Medio PCA-			Medio AGL		
Número de Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia	Número de Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia	Número de Clon	Tinción Gram	Forma de la Colonia
1	+	Bacilos	1	-	Bacilos	1	-	Bacilos
2	+	Bacilos	2	-	Bacilos	2	-	Bacilos
3	+	Cocos	3	-	Bacilos	3	-	Bacilos
4	-	Bacilos	4	-	Bacilos	4	-	Bacilos
5	+	Bacilos	5	-	Bacilo			
6	-	Bacilos	6	-	Bacilos			
7	-	Bacilos	7	+	Cocos			
8	-	Bacilos	8	-	Bacilos			
9	-	Bacilos						
10	-	Bacilos						
11	+	Cocos						
12	-	Bacilos						
13	-	Bacilos						
14	-	Bacilos						
15	+	Cocos						
16	+	Bacilos						
17	-	Bacilos						
18	-	Bacilos						
19	-	Bacilos						
20	-	Bacilos						

-“GRAM negativo”, + “GRAM positivo”

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

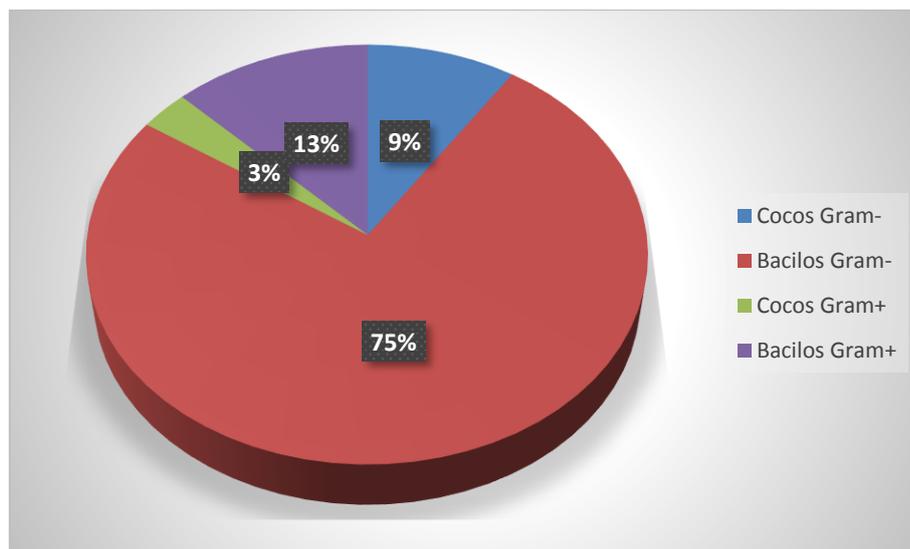


Gráfico 2-3: Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos 9° C.

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

En los gráficos 1-3 y 2-3, se observan los resultados de los clones seleccionados, de los 37 clones desarrollados a 35° C se obtuvo un (54%) Bacilos Gram negativos y (32%) Bacilos Gram positivos, además de (5%) para cocos negativos y (8%) Cocos Gram positivos. Por otra parte los 32 clones desarrollados a 9° C se obtuvo el (75%) fueron Bacilos Gram negativos y (13%) Bacilos Gram positivos, finalmente el (9%) Cocos Gram negativos y apenas un (3%) Cocos Gram positivos en concordancia con bibliografía encontrada se menciona que en ambientes extremos en este caso ambientes fríos como la Laguna de Ozogche y otros como la Antártida, en su mayoría son bacilos Gram negativos y algunos cocos Gram positivos (Hoover y Pikuta, 2010, pp. 2-4).

3.3. Caracterización macroscópica de clones aislados.

La caracterización macroscópica fue realizada con los clones aislados y estabilizados, 37 clones para la temperatura de 35° C, mientras que 32 clones para la temperatura de 9° C tomando en consideración las características morfológicas; forma, borde, elevación y color.

3.3.1. Forma

La forma que presentaron los clones aislados se detallan en el gráfico 3-3 para clones desarrollados en temperatura de 35° C y gráfico 4-3 para los clones de temperatura de 9° C presentando diferencias en su morfología, se obtuvo un mayor porcentaje para clones con morfología circular 40,38% y 56,67% respectivamente, mientras que para la morfología irregular se obtuvo 29,70% y 37,50% finalmente para la forma filamentosa se presentó un porcentaje de

29,92% para clones de temperatura de 35 ° C mientras que el porcentaje fue menor para temperatura de 9° C obteniendo apenas un 5,83%. Además se determinó que la forma que adoptaron los distintos clones depende del medio de cultivo en el que se desarrollan debido a que se sembró clones sin presión selectiva en medio con presión selectiva y viceversa y éstos adoptaron las formas predominantes encontradas en dichos medios.

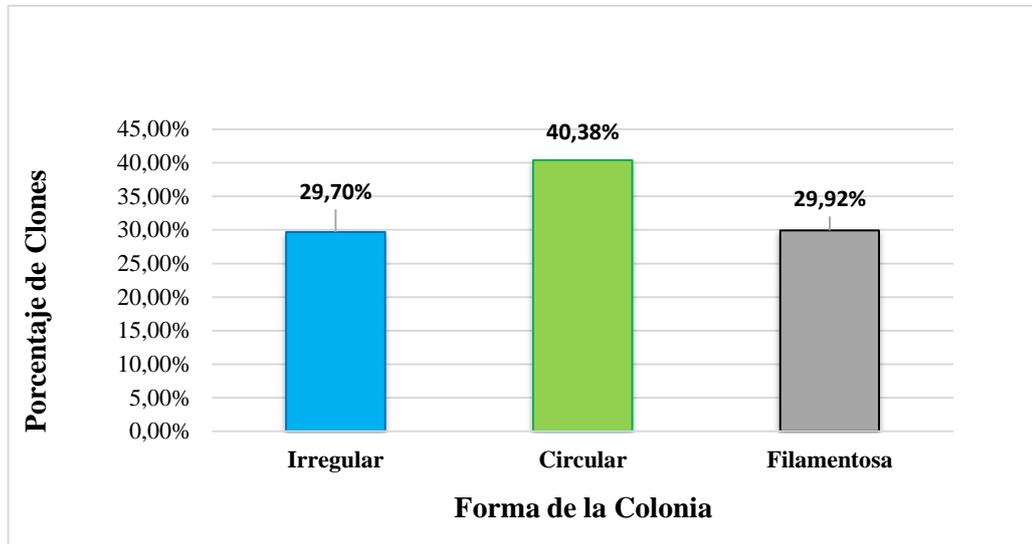


Gráfico 3-3: Forma de los clones cultivados a 35° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

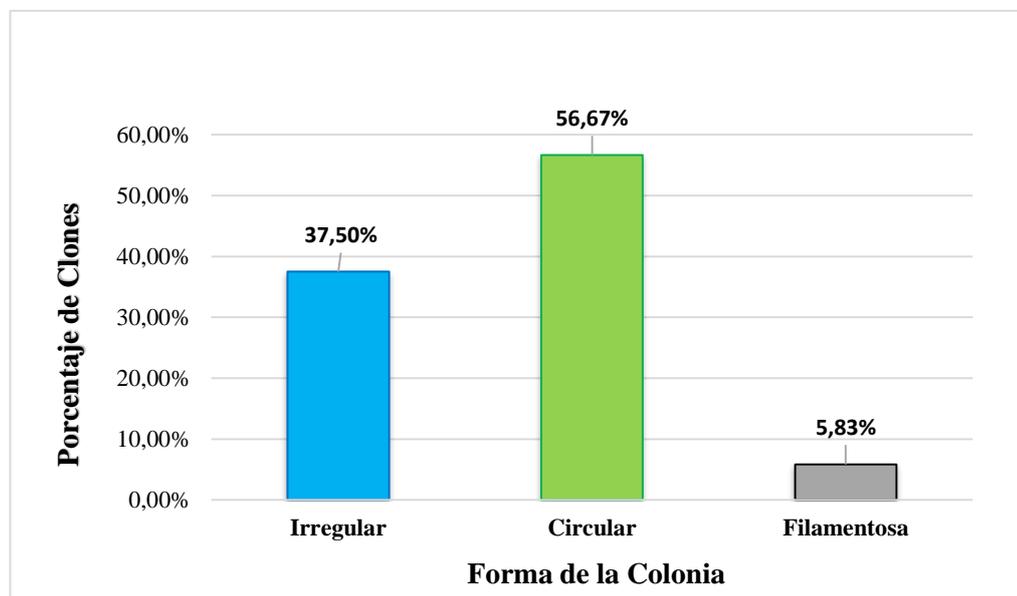


Gráfico 4-3: Forma de los clones cultivados a 9° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

3.3.2. Borde

Con respecto a bordes observados en clones aislados y estabilizados se encontraron tres tipos de bordes los cuales se detallan en el gráfico 5-3 para aquellos clones desarrollados a temperatura de 35° C y gráfico 6-3 para aquellos desarrollados a temperatura de 9° C. presentando el borde entero como predominante en ambos casos con porcentajes de 48,72% y 55% respectivamente, mientras para el borde ondulado el porcentaje fue menor siendo 45,94% para aquellos clones de temperatura de 35° C y un 37,5% para clones de temperatura de 9° C y finalmente se obtuvo solo 5,34% y 7,50% de borde lobulado para cada tipo de temperatura en estudio, estos resultados obtenidos no presentan mayor interferencia de los medios de cultivo en los que se desarrollaron, debido a que en las tres condiciones de los medios de cultivo se observó diferentes tipos de bordes, únicamente presentándose con mayor porcentaje el borde entero.

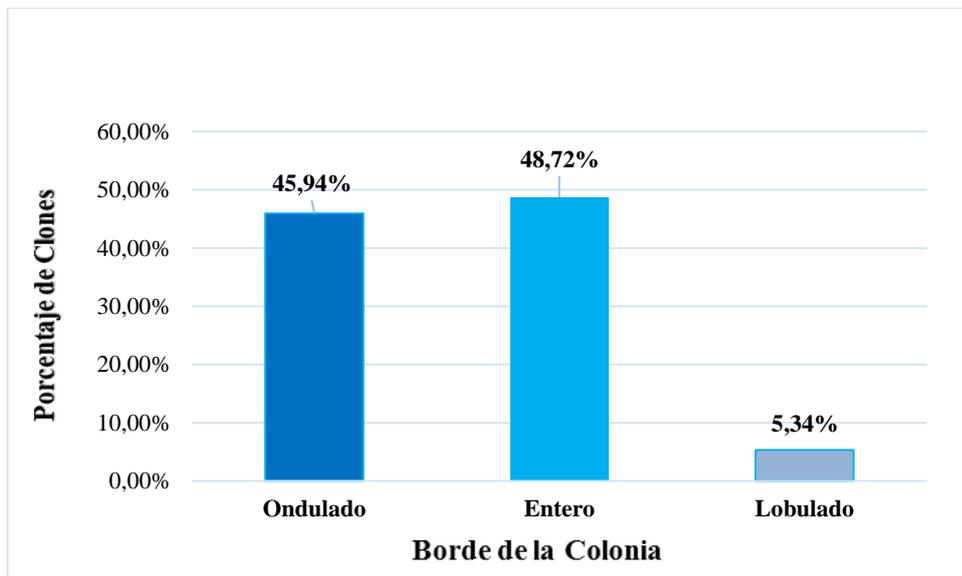


Gráfico 5-3: Tipo de Borde de los clones cultivados a 35° C.

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

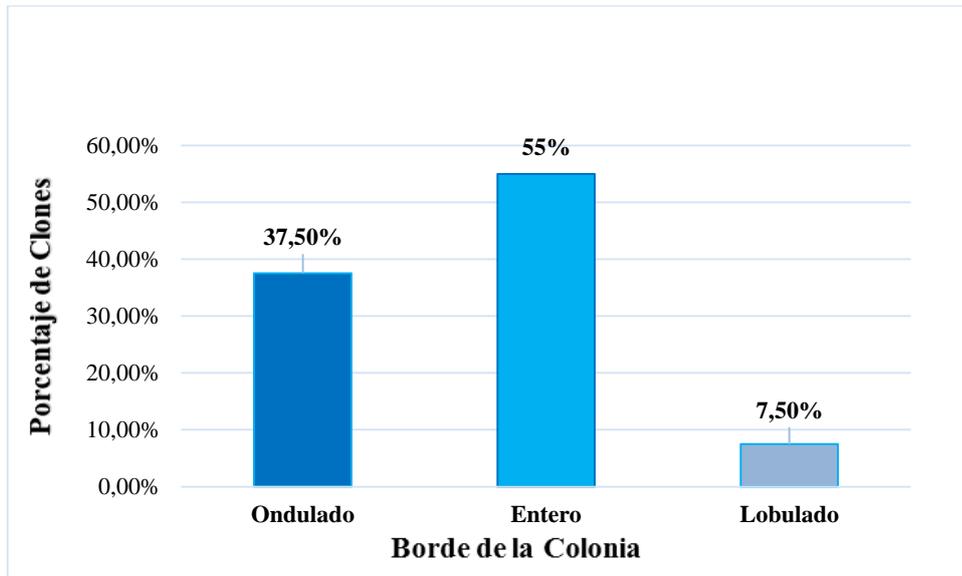


Gráfico 6-3: Tipo de Borde de los clones cultivados 9° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

3.3.3. Elevación

En el caso de la elevación se observó que los clones desarrollados a temperatura de 35° C se mostraron únicamente dos tipos de elevación; plana con 59,83% y elevada 40,17% mientras que para clones desarrollados a 9° C se mostraron tres tipos de elevaciones siendo la elevación convexa la predominante con 35,83% seguida de la elevación plana 34,17% y finalmente elevada con 30%.

Posteriormente se sembraron los clones desarrollados a temperatura de 35° C en medios de temperatura de 9° C y estos adoptaron elevaciones similares y mucho más visibles apareciendo la forma convexa a esta temperatura, los resultados se muestran en los gráficos 7-3 y 8-3.

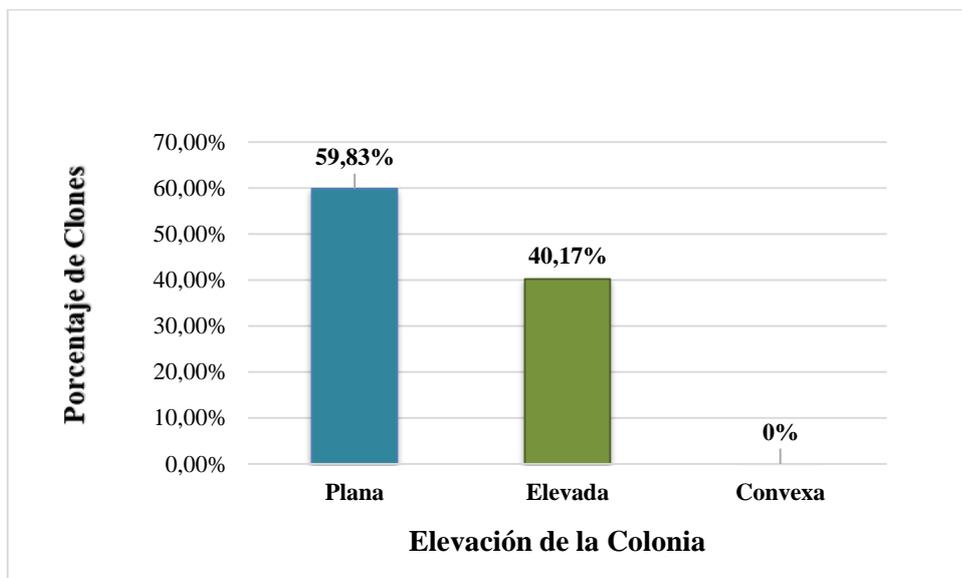


Gráfico 7-3: Tipo de Elevación de los clones cultivados a 35° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

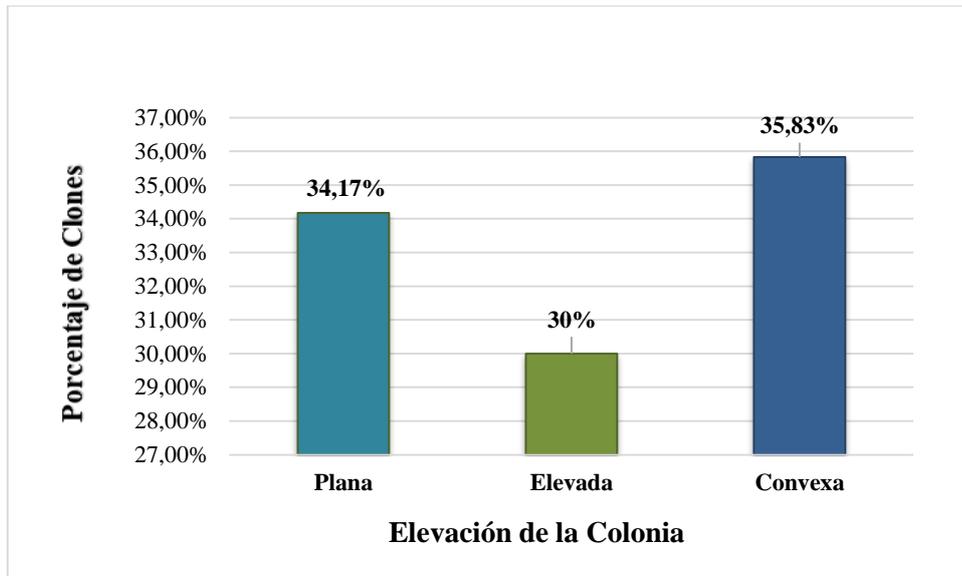


Gráfico 8-3: Tipo de Elevación de los clones cultivados a 9° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

3.3.4. Color

Los resultados obtenidos en base a la observación de la coloración para los clones aislados y estabilizados mostraron para aquellos clones desarrollados a temperatura de 35° C. como predominante el color blanco con 43,59% seguido de color crema y marfil con porcentajes iguales 19,23%, y color gris con un 15,38% y 2,56% para color marrón. Por su parte en aquellos clones desarrollados a temperatura de 9° C se observó cómo color predominante se obtuvo el crema con un 40%, seguido del color blanco con un 29,16%, y pequeños porcentajes de color marrón (16,67%), gris (6,67%), marfil (5,83%) y rosa pálido (1,67%) como se observa en el gráfico 9-3 y 10-3 debido a la influencia de la composición del medio en el cual se desarrollaron y a la variación de temperatura a la cual fueron sometidos.

Además aquellos clones desarrollados en medio PCA sin presión selectiva que mostraron el color blanco como predominante al ser sembrados en medios PCA+ con presión selectiva 25 µg/mL de nitrato de plomo adoptaron una coloración marrón.

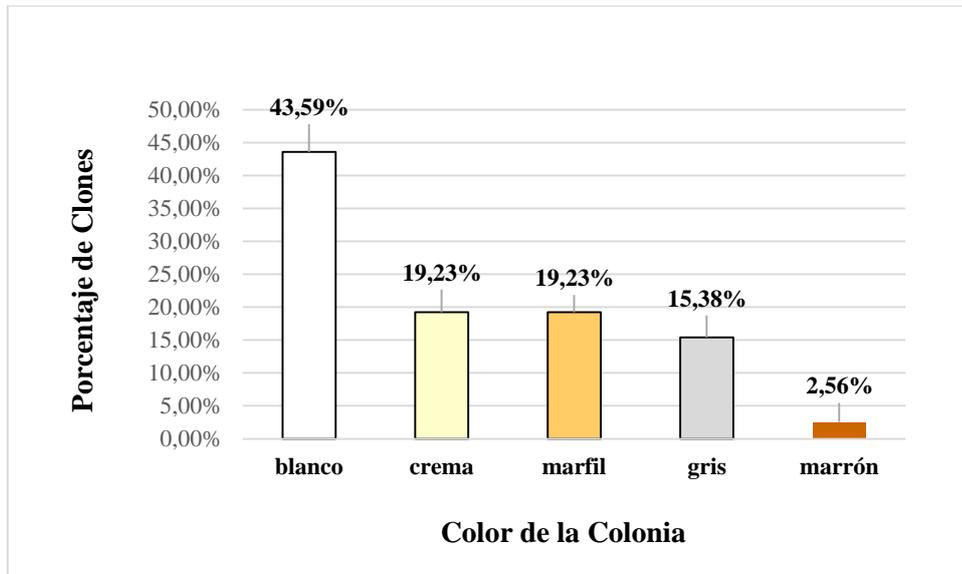


Gráfico 9-3: Tipo de Color de los clones cultivados a 35° C.
Realizado por: Lema Jhohana. 2019.

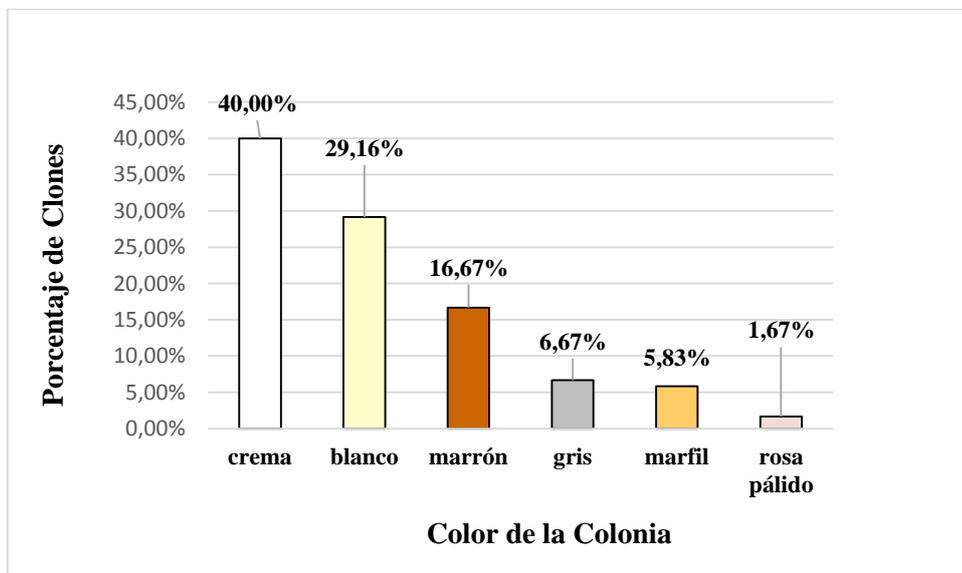


Gráfico 10-3: Tipo de Color de los clones cultivados a 9° C.
Realizado por: Lema Jhohana, 2019.

3.3.5. Evaluación de la tolerancia a metales pesados (Co, Hg y Pb)

La evaluación de la tolerancia a los diferentes metales pesados; cobalto ($\text{Co}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), mercurio ($\text{Hg}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$) y plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) permitió la observación de varios niveles de tolerancia para cada uno de los clones aislados, los mismos que se incubaron a temperatura de 35°C y 9°C por un periodo entre 1 y 15 días.

3.3.5.1. Pruebas de tolerancia Cobalto

Se realizaron diferentes ensayos en medios con concentraciones crecientes de metal para determinar la tolerancia a Cobalto de los clones aislados. Se inició con una concentración de 100-2500 µg/mL observándose un comportamiento variado en cada una de las concentraciones del tóxico (Tabla 9-3) para clones de temperatura de 35° C igual comportamiento se observó para clones de 9° C. (Tabla 10-3).

Los clones en estudio manifestaron un buen crecimiento en las primeras 24 y 48 horas de haber realizado los ensayos para las dos temperaturas en estudio, sin embargo a partir del ensayo E3 se necesitó mucho más tiempo de (120 a 180 horas) para observar el desarrollo de clones.

Los clones desarrollados a temperatura de 35° C llegaron a tolerar hasta una concentración de 2500 µg/mL ensayo E7, pero para clones de temperatura 9° C solamente llegaron a tolerar una concentración de 750 µg/mL ensayo E4, dando como resultado que influye mucho la temperatura a la cual están sometidos los clones para tolerar diferentes niveles concentraciones de metales. Mientras exista un incremento en la concentración de metal menor será el tiempo de desarrollo y adaptación del clon.

Tabla 9-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Cobalto a 35° C.

Clon	Concentración de Cobalto de cada ensayo (µg/mL)													
	E1	C	E2	C	E3	C	E4	C	E5	C	E6	C	E7	C
	100	Pb	250	Pb	500	Pb	750	Pb	1000	Pb	2000	Pb	2500	Pb
1	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+
2	++	++	+	++	+	+	-	-						
3	++	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+	-	-	+
4	+	-	-	-										
5	+	+	-	++	-	-								
6	+	++	+	++	+	++	-	++						
7	+	+	-	+	-	-								
8	+	+	+	+	+	-	-	-						
9	+	+	+	+	+	-	-	-						
10	++	+	+	+	-	-								
11	++	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+	-	+
12	+	+	-	+	-	-								
13	+	+	+	++	-	-								
14	+-	+-	+	+	+-	+	-	-						
15	++	+	-	++	-	-								
16	+	+	+	++	++	++	++	++	+	+	-	+	-	+
Clon	Concentración de Cobalto de cada ensayo (µg/mL)													
	E1	C	E2	C	E3	C	E4	C	E5	C	E6	C	E7	C
	100	Pb	250	Pb	500	Pb	750	Pb	1000	Pb	2000	Pb	2500	Pb
17	++	+	-	+	-	-								
18	+	+	+	++	-	++								
19	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	-	+

20	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+ -	+	-	-
21	++	++	+	++	+	++	++	++	+	+	-	+	-	-
22	++	++	+ -	++	-	++								
23	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	.	+	-	-
24	++	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+ -	+	-	-
25	++	++	+	++	++	++	+	++	+	+	+ -	+	-	-
26	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	++
27	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	+
28	++	++	+ -	++	-	-								
29	+	+	+ -	+	-	-								
30	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+ -	+	-	+
31	++	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+ -	+	-	+ -
32	+	++	+	++	-	++								
33	+	+	+	+	-	++								
34	+	+	+ -	+	-	-								
35	+	+	+ -	++	-	+								
36	+	+	+ -	++	+ -	++	+ -	++	-	++	.	+	-	-
37	+	+	+ -	++	+ -	-	+ -	+	+	++	.	+	-	-

"E": ensayo. "++": Mayor Crecimiento. "+": Crecimiento Medio. "+-": Menor crecimiento. "-": Sin Crecimiento
 Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones. Celda "C Pb": Controles con Plomo.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Tabla 10-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Cobalto a 9° C.

Clon	Concentración de Cobalto de cada ensayo (µg/mL)								
	E1	C	E2	C	E3	C	E4	C	
	100	Pb	250	Pb	500	Pb	750	Pb	
1	+	++	-	++	-	-			
2	+	++	+ -	++	+ -	+	-	-	-
3	+	+	+ -	++	+ -	-	-	-	-
4	+	+	-	++	-	-			
5	+	+	-	++	-	-			
6	+	+	-	++	-	-			
7	+	++	-	++	-	-			
8	+	+	+ -	++	+ -	-	-	-	-
9	++	+	+ -	++	-	-			
10	+	+	+ -	++	-	-			
11	+	+	-	++					
12	+ -	+	+ -	++	-	-			
13	+ -	+	++	++	+	+ -	+		+ -
14	++	+	+ -	++	-	+ -			
15	+	+	+ -	++	-	-			
16	+	+	+ -	++	-	-			
17	+	+	-	++					
18	+	+	-	++					
19	+	+	++	++	+	+ -	-	-	+ -
20	+	++	+	+	+ -	-	-	-	-
21	+	++	-	++					
22	+	+	+ -	++	-	-			
23	++	+	+ -	++	-	-			
24	.	+	-	++					
25	+	+	+ -	++	-	-			
26	+	++	+ -	++	-	-			
27	++	++	-	++					
28	++	++	-	++					
Clon	Concentración de Cobalto de cada ensayo (µg/mL)								
	E1	C	E2	C	E3	C	E4	C	
	100	Pb	250	Pb	500	Pb	750	Pb	
29	++	+	+ -	++	-	-			
30	++	++	+ -	++	-	-			
31	+	+	-	++					
32	+	+	-	++					

"E": ensayo. "++": Mayor Crecimiento. "+": Crecimiento Medio. "+-": Menor crecimiento. "-": Sin Crecimiento
 Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones. Celda "C Pb": Controles con Plomo.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

La evaluación de la tolerancia a concentraciones crecientes de cobalto en los clones aislados (tabla 9-3 y gráfico 11-3) mostró una disminución importante de la tolerancia hasta los 750 $\mu\text{g/ml}$ de cobalto, seguida de importante tolerancia entre 750 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ para obtener el valor máximo de tolerancia en un clon (Co 1) hasta 2500 $\mu\text{g/ml}$.

En el caso de los clones aislados a 9° C el efecto del Co fue mucho más marcado que a 35° C, observándose un marcado declive hasta una tolerancia máxima de 750 $\mu\text{g/ml}$ en el clon (Co 13).

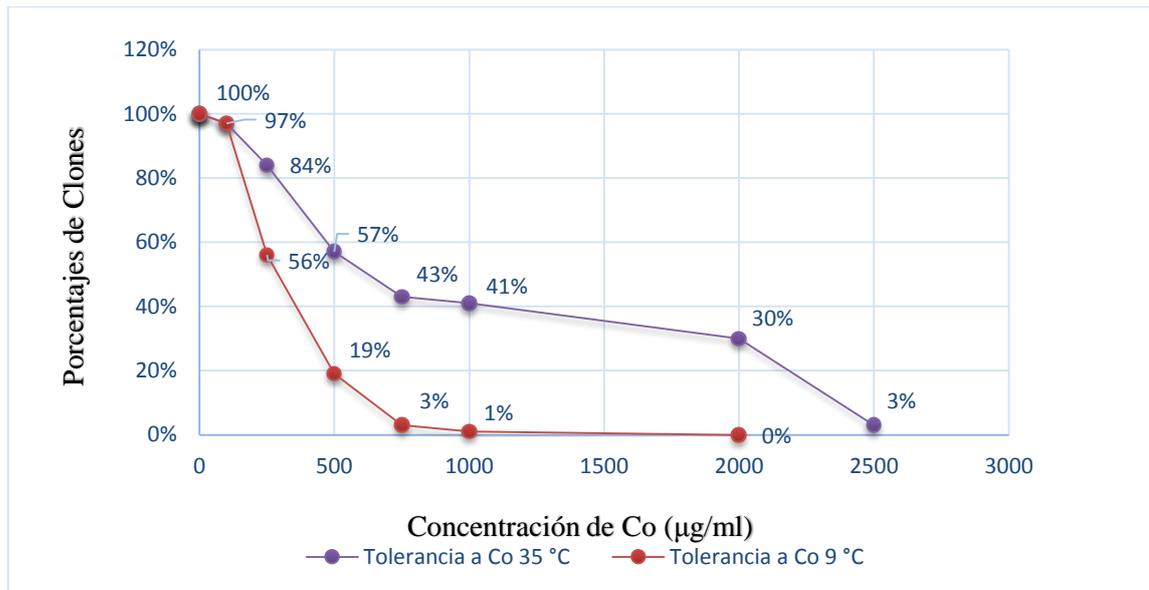


Gráfico 11-3: Perfil de tolerancia al cobalto de los clones desarrollados a 35° C y 9° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Los resultados obtenidos del crecimiento de los clones a 35° C mostraron la mayor tolerancia (2500 $\mu\text{g/ml}$) y mientras que a 9° C se observó la mayor tolerancia a (750 $\mu\text{g/ml}$) (Gráfico 11-3). Estas concentraciones concuerdan con investigaciones similares donde tomaron muestras de agua y lodos del yacimiento laterico de Moa, Holguín y sometieron a clones a concentraciones crecientes de sulfato de cobalto hexahidratado presentando similitud de tolerancia en concentración de 220 $\mu\text{g/ml}$ (Gómez *et al.*, 2002, pp. 29-31)

3.3.5.2. Pruebas de tolerancia Mercurio

La realización de ensayos para determinar la tolerancia a mercurio de los clones aislados se muestran (Tabla 11-3) para clones desarrollados a temperatura de 35° C y (Tabla 12-3) para clones de 9° C donde se muestran los resultados.

Se inició a una concentración del metal de 50 µg/mL en los dos casos de temperatura, se obtuvo resultados entre las primeras 72 horas para el ensayo E1, 120 horas para evidenciar crecimiento y/o desarrollo de los clones en el ensayo E2. Y por último para clones de temperatura de 9° C se realizó un ensayo E3 donde tuvo que pasar alrededor de 180 horas para tener resultados.

Tabla 11-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Mercurio a 35° C.

Clon	Concentración de Mercurio de cada ensayo (µg/mL)			
	E1	C	E2	C
	50	Pb	100	Pb
1	+-	++		-
2	+-	++		-
3	+-	++		-
4	+	-		-
5	+-	+		+-
6	+	++	+	++
7	+	+		.
8	+	+	+	++
9	+-	+		-
10	+	+		-
11	+	+	+	++
12	+-	+		-
CLON	Concentración de Mercurio de cada ensayo (µg/mL)			
	E1	C	E2	C
	50	Pb	100	Pb
13	+	+		++
14	+-	+-		+
15	+	+		+
16	+	+		++
17	+	+		-
18	+-	+		+
19	+	+		-
20	+	++		-
21	++	++		++
22	++	++		++
23	+	+		++
24	+	++		-
25	+	++		-

26	+-	++		++
27	++	++		++
28	++	++		++
29	+	+	+	++
30	+-	+		-
31	+	++		-
32	+-	++		-
33	+	+		++
34	+	+		++
35	+	+		++
36	+	+		++
37	+	+		++

"E": ensayo. "++": Mayor Crecimiento. "+": Crecimiento Medio. "+-": Menor crecimiento. "-": Sin Crecimiento
Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones. Celda "C Pb": Controles con Plomo.

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Tabla 12-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Mercurio a 9° C.

Clon	Concentración de Mercurio de cada ensayo (µg/mL)					
	E1	C	E2	C	E3	C
	50	Pb	100	Pb	250	Pb
1	+	++	-	-		
2	+	++	+-	-		
3	+	+	+-	-		
4	+	+	-	-		
5	+	+	-	-		
6	+-	+	-	-		
7	+	++	-	-		
8	+	+	-	-		
9	+	+	-	+-		
10	+	+	-	-		
11	+	+	-	-		
12	+	+	++	+-	++	++
13	+-	+	-	-		
14	+	+	-	-		
15	+	+	-	-		
16	+	+	-	-		
17	+	+	-	-		
18	+	+	-	-		
19	+	+	+-	-		

20	+	++	+ -	-		
21	+	++	-	-		
22	+	+	+ -	-		
23	+	+	-	-		
24	+	+	-	-		
25	+	+	+ -	-		
26	+	++	-	-		
27	++	++	-	-		
28	+	++	-	-		
29	++	+	+ -	-		
30	+	++	+ -	-		
31	+	+	.	-		
	Concentración de Mercurio de cada ensayo (µg/mL)					
Clon	E1	C	E2	C	E3	C
	50	Pb	100	Pb	250	Pb
32	+	+	-	-		

"E": ensayo. "++": Mayor Crecimiento. "+": Crecimiento Medio. "+-": Menor crecimiento. "-": Sin Crecimiento

Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones. Celda "C Pb": Controles con Plomo.

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

En los ensayos de tolerancia efectuados para mercurio en condiciones de temperatura de 35°C, se evidenció el desarrollo de clones a concentración 50 µg/ml (ensayo E1) con un 89% menos de los clones iniciales, para el ensayo E2 con concentración 100 µg/ml se observó una marcada disminución en la tolerancia de los clones. Es decir se evidenció una tolerancia hasta 11% de los clones (6, 8, 11 y 29) (Tabla 11-3), para finalmente alcanzar una mortalidad total a concentración de 250 µg/ml (Gráfico 12-3).

Por otra parte para los clones desarrollados a temperatura de 9°C, en el ensayo E1 con concentración de (50 µg/ml) se observó un crecimiento del 97% de los clones, en el ensayo E2 con concentración de (100 µg/ml) se evidenció el crecimiento del 28% de los clones, por su parte la máxima tolerancia fue observada por el clon (Hg 12) a 250 µg/ml.

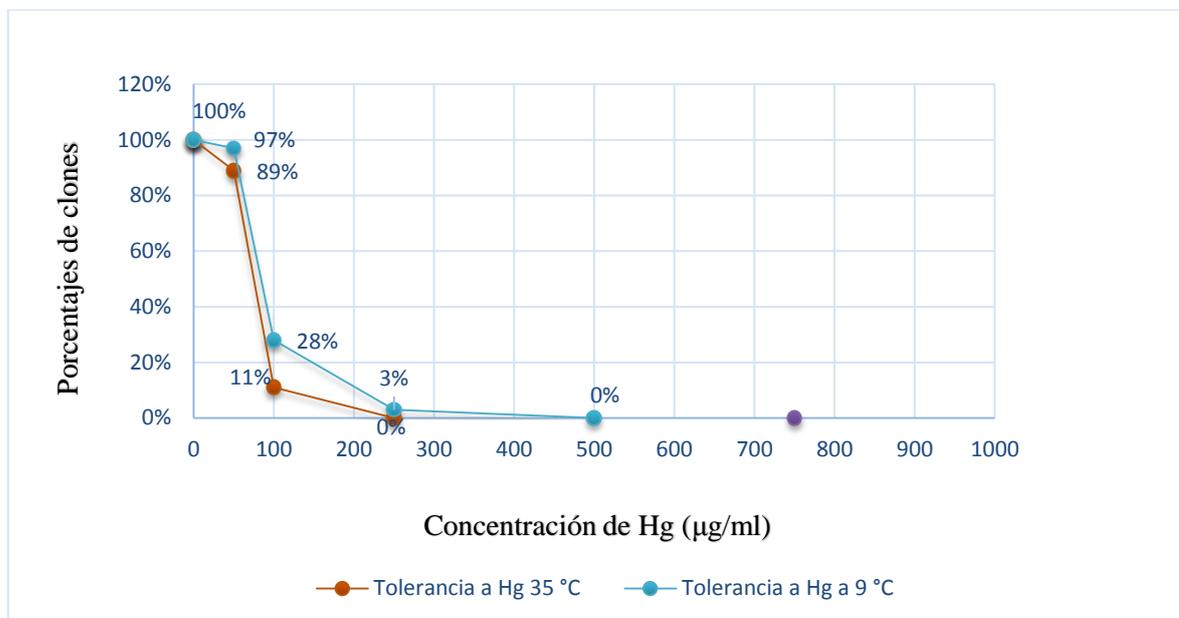


Gráfico 12-3: Perfil de tolerancia al Mercurio de los clones desarrollados a 35° C y 9° C.
Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Para mercurio se observó menor tolerancia con respecto a lo observado a cobalto, (250 µg/ml) dichos resultados son similares a bibliografía encontrada para microorganismos aislados de aguas superficiales de las regiones de Delhi, India indican que bacterias aisladas de estas zonas son resistentes al mercurio en una concentración de 100 mg/L (Rahman y Singh, 2018, pp. 1693-1695).

3.3.5.3. Pruebas de tolerancia Plomo

La evaluación de la tolerancia a plomo se inició con una concentración de 50 µg/mL para las dos temperaturas en estudio. En las primeras 24 a 48 horas se observó un buen crecimiento de los clones hasta el ensayo E5, sin embargo, al ir incrementado las concentraciones de metal el tiempo de desarrollo del clon fue mayor para ensayo E6 y E7.

Los clones desarrollados a temperatura de 35° C llegaron a tolerar hasta una concentración de 4000 µg/mL (ensayo E9), pero para clones de temperatura 9° C se observó una tolerancia de 2500 µg/mL de mercurio (ensayo E8), confirmando así que la temperatura en la que se desarrollaron los clones influyó en la tolerancia a la concentración del metal.

Tabla 13-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Plomo a 35° C.

Clon	Concentración de Plomo de cada ensayo (µg/mL)								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
	50	100	250	500	750	1000	1500	2500	4000
1	+-	++	++	+-	++	+	++	+-	-
2	++	++	+	+-	-		+	+-	-
3	++	+	+	-	-				

4	-	-	-	-	-				
5	+	+	+	+-	-				
6	++	+	++	++	++	+	+	+-	-
7	+	+	-	-	-				
8	+	+	+	++	+	+	+	+-	-
9	+	+	+-	+	+	+	+-	-	-
10	+	-	-	-	-				
11	+	+	++	+	++	+	+	+	+
12	+	+	+-	+-	-				
Clon	Concentración de Plomo de cada ensayo (µg/mL)								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
	50	100	250	500	750	1000	1500	2500	4000
13	+	+	+	+-	-				
14	+-	++	+	++	++	+	++	+-	-
15	+	++	+	++	++	+	+	+-	-
16	+	++	++	++	+	+	+	+	+
17	+	+	+-	+-	-				
18	+	++	+	+	+	+	+	-	
19	+	+	++	+	+	+	+	+-	-
20	++	+	+	+-	+	+	+	+-	-
21	++	+	+	++	+	++	+	+-	-
22	++	+	+	++	+	+	+-	-	
23	+	+	+	+-	++	+	+	+-	-
24	++	+	+	+-	+	+	+	+-	-
25	++	+	++	+	+	+	+	+	-
26	++	++	++	++	++	++	+	+-	-
27	++	++	++	++	++	+	-		
28	++	+	+	-	-				
29	+	+	+	+-	-				
30	+	++	++	++	++	+	+	+-	-
31	++	+	+	-	+				
32	++	+	+	+-	++	++	++	+	-
33	+	+	-	-	-				
34	+	+	++	+	++	+	+	+-	-
35	+	+	++	+	++	+	+-	+-	-
36	+	+	+	+	+	+	+-	+-	-
37	+	+	+	-	-				

E: ensayo. "++": Mayor Crecimiento. "+": Crecimiento Medio. "+-": Menor crecimiento. "-": Sin Crecimiento

Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones.

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Tabla 14-3: Resultados de la evaluación de la tolerancia a Plomo a 9° C.

Clon	Concentración de Plomo de cada ensayo (µg/mL)								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
	50	100	250	500	750	1000	1500	2500	4000
1	++	+	+	++	+	+	+	+	-
2	++	+	+	-	-				
3	+	+-	+-	+-	-				
4	+	+-	+-	-	-				
5	+	+	+-	+-	+-	+-	+-	-	
6	+	+	+-	+-	+-	+-	+-	-	
7	++	+	+	+-	-				

8	+	+	+-	+-	-				
9	+	++	+	+-	+-	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+-	+	+	+	-
11	+	++	+	+	+-	+	+-		
12	+	+	+	+-	+-	+	+	+	-
13	+	+-	+-	-	-				
14	+	++	+	+	+-	+	+-	-	
15	+	+-	+-	+	+-	+	+-	-	
16	+	+	+-	+	+-	+	+-	-	
17	+	+	+-	+-	-				
18	+	+-	+-	+-	+-	+-	-		
19	+		+-	+-	+-	+-	-		
20	++	+-	+-	+-	-				
21	++	+	+-	+	+-	+-			
22	+	+-	+-	+	-				
23	+	+-	+	-	-				
24	+	-	-	-	-				
25	+	+	+-	+	+	+	+	-	
26	++	+	+	+	+	+	+-	-	
27	++	++	+	-	-				
28	++	+	+-	-	-				
Clon C	Concentración de Plomo de cada ensayo (µg/mL)								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
	50	100	250	500	750	1000	1500	2500	4000
29	+	+	+-	+-	-				
30	+	++	+	+	++	+	+-	-	
31	+	+	+-	+	+	+-	+-	-	
32	+	+	+	+-	-				

"E": ensayo. "++": Mayor Crecimiento. "+": Crecimiento Medio. "+-": Menor crecimiento. "-": Sin Crecimiento

Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones.

Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

En el gráfico 13-3 se muestra los resultados de tolerancia al Pb de los clones aislados a 35° C se observa que un 97% menos del porcentaje total (ensayo E2), para ensayos E3 y E4 el porcentaje disminuyó hasta un 78%, seguidos de ensayos E5, E6 y E7 que se evidenciaron un efecto inhibitorio, puesto que se mantenía el mismo número de clones en estas tres concentraciones (700,1000 y 1500 µg/ml), no obstante en la concentración (2000 µg/ml) ensayo E8 se observó la mortalidad del 46% de los clones, para obtener el valor máximo de tolerancia en clones (Pb11 y Pb16) (Tabla 13-3), hasta 4000 µg/ml, el clon (Hg11) también mostró una resistencia doble para mercurio con una concentración de 100 µg/ml.

Por otra parte para los clones desarrollados a 9° C, mostró el mismo crecimiento de clones tanto para ensayos E1 y E2, para el ensayo E3 y E4 se evidencio el desarrollo de los clones en un 94% menos de los clones iniciales, seguido de un efecto negativo relativamente bajo sobre los clones (ensayo E5 a E6), para finalmente alcanzaron una mortalidad total a concentración de 2500 µg/ml (Gráfico 13-3) clones (Pb1,Pb9,Pb10 y Pb12) (Tabla 14-3).Además se mostró una resistencia doble para mercurio se observó en el clon (Hg12) que toleró una concentración de 250 µg/ml.

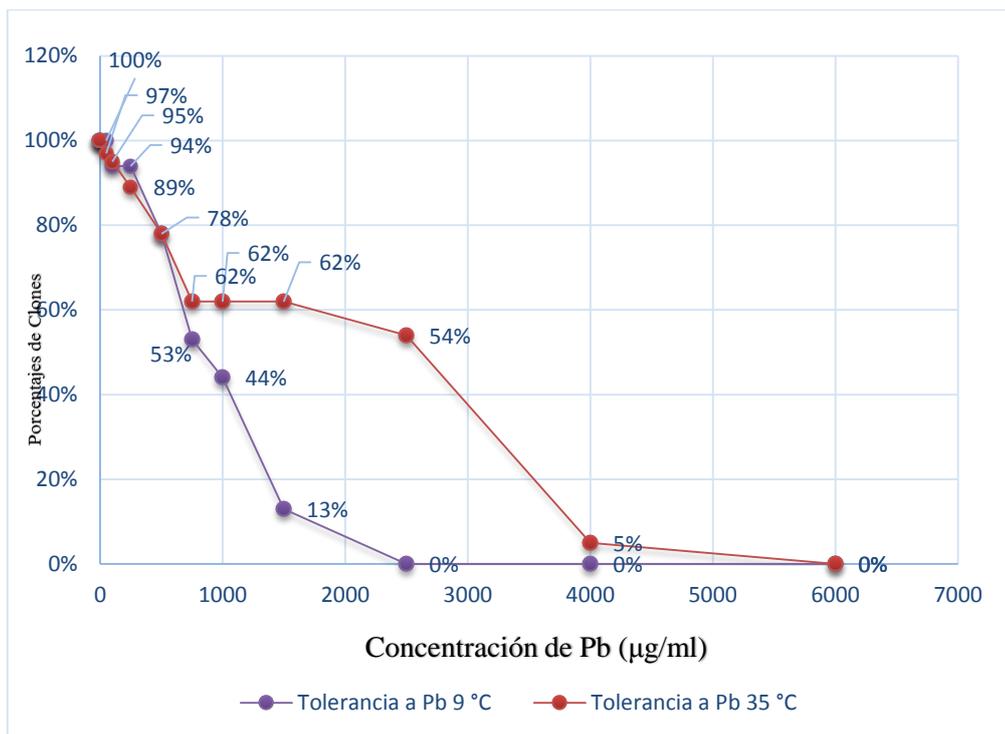


Gráfico 13-3: Perfil de tolerancia al Plomo de los clones desarrollados a 35° C y 9° C. Realizado por: Lema Jhojana, 2019.

Los resultados obtenidos para clones de temperatura de 35°C mostraron una tolerancia de 4000 µg/ml del metal y para clones de temperatura de 9°C fue de 2500 µg/ml, estos datos concuerdan con estudios similares bacterias aisladas de sedimento de laguna San Juan, Ascensión, Chihuahua, probadas a varias concentraciones de plomo de (100 a 1200 µg/ml) dando como resultados final una resistencia de 1200 µg/ml para todas las cepas aisladas, lo que concuerda a una tolerancia menor en nuestros datos obtenidos (Soto Padilla *et al.*, 2016, pp. 163-167).

Además que se observó la producción de una coloración en los clones desarrollados en presencia de plomo, lo que no se observó en clones de Cobalto y Mercurio. A medida que se aumenta la concentración del metal, los clones tomaron un color marrón fuerte y tonalidades de grises, hasta una cierta concentración disminuyó la coloración gradualmente para finalmente quedarse en colores blancos, esto podría deberse a que en muchos casos los clones bacterianos, utilizan algún sustrato del medio de cultivo en el que son inoculadas. Forman y/o excretan algún tipo de sustancia (Peña, 2010), o también podría deberse estas pigmentaciones propias del metal Pb.

Diversos estudios indican procesos adaptativos los cuales se expresan como mecanismos de resistencia hacia el metal al que están expuestos. Los microorganismos inmovilizan o movilizan los metales en el ambiente esto dependerá del metal al cual está expuesto (Pandey *et al.*, 2013, pp. 13-14).

Según estudios realizados, una manera de reducir metales pesados en este caso el plomo, es mediante precipitación extracelular es decir la unión con exopolímeros, lo que inmoviliza y absorbe el metal en la superficie de la célula (Navarrete, 2017, p. 54) esto se puede asociar a que varios clones de la presente investigación pudieron haber desarrollado estos mecanismos para lograr su adaptación al medio.

3.3.6. Identificación Bacteriana por pruebas Bioquímicas

Luego de la evaluación de la tolerancia a metales pesados (Co, Hg y Pb), los clones que resistieron a mayor concentraciones de metales fueron 13 clones (Co1, Co13, Hg6, Hg8, Hg11, Hg29, Hg12, Pb11, Pb16, Pb1, Pb9, Pb10, Pb12.) tanto de temperatura de 35 y 9° C. Se realizaron su identificación de los géneros microbianos aislados, basados en el manual de técnicas en microbiología clínica de M.V. Alvarez, E.Boquet y M.I de Fez (1990).

Tabla 15-3: Caracterización bioquímica de los clones aislados.

CARACTERÍSTICAS		PRUEBAS RÁPIDAS			SIM		TSI			Urea	Manitol	Citrato	MacConkey	TSA
Clon	Forma	Gram	Catalasa	Oxidasa	Movilidad	Indol	Glucosa	Lactosa	H2S					
Co 1	Bacilos	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Hg 6	Cocos	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Hg 8	Cocos	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Hg 11	Cocos	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Hg 29	Bacilos	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Pb 16	Bacilos	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Co 13	Bacilos	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Hg 12	Bacilos	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Pb 1	Bacilos	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Pb 9	Bacilos	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Pb 10	Bacilos	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Realizado por: Lema Jhojana, 2019

De los 13 clones que mostraron mayor tolerancia a cada una de las concentraciones de metales (Co, Hg y Pb) se realizaron pruebas bioquímicas de únicamente a 11 debido a que el clon número 11 y 12 es el mismo que resistió a concentraciones más altas tanto de plomo como mercurio.

Los resultados obtenidos mostraron que el 45 % de los clones escogidos son Gram positivos, mientras que el 55% de los clones son Gram negativos. Esto concuerda con datos encontrados en (Hoover y Pikuta, 2010, pp. 2-4) que menciona que en ambientes considerados extremos habitan microorganismos Gram negativos.

Gracias a las diez pruebas bioquímicas realizadas se lograron identificar géneros microbianos para cada uno de los clones en estudio, el clon (Co1) con un 76,9% de las pruebas coincide con el género *Klebsiella*. Dichos microorganismos son ampliamente distribuidas en la naturaleza, fermenta lactosa, sacarosa, sorbitol, arabinosa y adonitol (Tabla 15-3) (Arizandy *et al.*, 2012)

Para los clones (Hg8, Hg6 y Hg11) con un 50% de las pruebas coincide para el género *Micrococcaceae* especie *Micrococcus spp.* Por lo que son Cocos Gram positivos que se encuentran en el ambiente, aire agua y suelo. La prueba de catalasa dio positivo, evidenciado así la presencia de la enzima catalasa capaz de descomponer H₂O₂ en presencia de agua y oxígeno, además que fermenta glucosa, pero no utiliza el manitol por eso el resultado es negativo (Peraza, 2017, p. 1).

Por su parte los clones (Co13, Hg12, Pb1, Pb9 y Pb10) son bacilos Gram negativos, que presentan resultados favorables para catalasa y oxidasa, especialmente gracias a la realización de la prueba de oxidasa confirma la presencia de psicofilos, cabe recalcar que este grupo de bacterias no fermentan glucosa, se obtuvo un 69,2% de coincidencia con el género de *Pseudomonas* (Alvarez Benito *et al.*, 1990, p. 78).

Para el clon (Hg29) los resultados indicaron que un 69,2% de las pruebas coincide al género *Corynebacterium sp.* El clon (Pb16) es un bacilos Gram positivos, y el 53,8% concuerdan con características del género *Clostridium* (Alvarez Benito *et al.*, 1990, pp. 81-100).

Estos estudios realizados acerca de la microbiota de lagunas de alta montaña que presentan temperaturas muy bajas como la Laguna de Ozogoché existe una escasez de datos e investigaciones por ende no permite tener aproximaciones contundentes de las especies que se han encontrado, pero algunas de las especies identificadas concuerdan con anteriores investigaciones de la laguna amarilla en el altar y en ambientes fríos (Moreno, 2017, p. 56).

Tabla 16-3: Resultados de la identificación bioquímica de clones finales.

Numero de Clones	Géneros encontrados
Co-1	<i>Klebsiella spp.</i>
Hg-6	<i>Micrococcus spp.</i>
Hg-8	<i>Micrococcus spp.</i>
Hg-11	<i>Micrococcus spp.</i>
Hg-29	<i>Corynebacterium spp.</i>
Pb-16	<i>Clostridium. spp.</i>
Co-13	<i>Pseudomona spp.</i>
Hg-12	<i>Pseudomona spp.</i>
Pb-1	<i>Pseudomona spp.</i>
Pb-9	<i>Pseudomona spp.</i>
Pb-10	<i>Pseudomona spp.</i>

Realizado por: Lema Jhojana. 2019.

3.4. Pruebas de Sensibilidad Antibiótica

Los clones bacterianos identificados en las pruebas bioquímicas, se sometieron a pruebas de sensibilidad a los antibióticos (ampicilina “AM”, eritromicina “EM”, ceftazidime “CAZ₃₀” y gentamicina “CN₁₂₀”) para comprobar su sensibilidad y/o resistencia ante estos por medio del método de Kirby Bauer (Bernal y Guzmán, 1984, pp. 1-5)

Para determinar la sensibilidad o resistencia de los clones evaluados se midió el diámetro de inhibición formado en cada uno de los discos de antibióticos alrededor de la bacteria.

Los clones analizados mostraron alta sensibilidad a gentamicina con 81,82% seguido por ampicilina con 45,45%, mientras que para eritromicina y ceftazidime menor sensibilidad.

Tabla 17-3: Resultados de antibiogramas.

Clones		Antibióticos							
		AM [10]		EM [10]		CAZ [10]		CN [10]	
		Diámetro (mm)		Diámetro (mm)		Diámetro (mm)		Diámetro (mm)	
<i>Klebsiella spp.</i>	Co-1	27	S	--	R	--	R	21	S
<i>Micrococcus spp.</i>	Hg-6	23	S	--	R	--	R	24	S
<i>Micrococcus spp.</i>	Hg-8	33	S	15	S	--	R	30	S
<i>Micrococcus spp.</i>	Hg-11	29	S	2	S	--	R	26	S
<i>Corynebacterium spp.</i>	Hg-29	21	S	26	S	23	S	--	R
<i>Clostridium spp.</i>	Pb-16	--	R	--	R	--	R	22	S
<i>Pseudomona spp.</i>	Co-13	--	R	--	R	--	R	30	S
<i>Pseudomona spp.</i>	Hg-12	--	R	--	R	--	R	31	S
<i>Pseudomona spp.</i>	Pb-1	--	R	--	R	--	R	--	R
<i>Pseudomona spp.</i>	Pb-9	--	R	--	R	--	R	25	S
<i>Pseudomona spp.</i>	Pb-10	--	R	--	R	16	S	30	S
Porcentaje Total de Sensibilidad		45,45%		27,27%		18,18%		81,82%	
Porcentaje Total de Resistencia		54,55%		72,72%		81,82%		18,18%	

Ampicilina (AM), Eritromicina (EM), Ceftazidime (CAZ₃₀) y Gentamicina (CN₁₂₀)

“S”: Sensible “R”: Resistente “--”: no presenta halo. “mm”: milímetros.

Realizado por: Lema Jhojana. 2019.

Varios estudios reportan resistencia a metales pesados y antibióticos en microorganismos acuáticos, debido a la presencia de plásmidos los cuales dentro de su genoma tienen genes que le confieren a la cepa la resistencia (Martínez *et al.*, 2010, p. 8).

CONCLUSIONES

- La Laguna de Ozogoché mostró valores de temperatura que oscilan entre 11 y 15°C y un pH promedio de 6,3.
- Las bacterias aisladas de las muestras de agua, al ser cultivadas en medios PCA suplementado con 25 µg/ml de Pb (PCA+), preparado con agua destilada (PCA-) y con agua de la laguna (AGL). Mostró un mayor crecimiento de los clones en el medio PCA-, seguido del medio AGL- y finalmente se observó el menor crecimiento en el medio PCA+, suponemos que esto se debe al efecto tóxico del metal pesado (Pb).
- A partir de las muestras de agua se aislaron en total 187 clones, de los cuales 100 clones provinieron de 35° C y los 87 clones restantes de 9° C. Estos fueron reaislados y estabilizados obteniéndose un total de 37 clones a 35°C; de los cuales 13 clones provinieron del medio PCA+ (con presión selectiva 25 µg/ml de plomo), 12 clones del medio PCA- (medio sin presión selectiva) y 12 clones del medio AGL (agua de la laguna). Mientras que a 9° C se obtuvieron 32 clones; 20 clones del medio PCA+, 8 clones del medio PCA- y 4 clones del medio AGL. Los resultados obtenidos mediante la Tinción de Gram, mostraron el predominio de Bacilos (86% a 35°C y 88% a 9°C). Siendo los más abundantes los bacilos Gram negativos (54% a 35°C y 75% a 9°C). Con respecto a los Cocos se obtuvieron valores similares (13% a 35°C y 12% a 9°C), siendo los más abundantes a 35°C los Gram Positivos con un 8%, mientras que a 9° C los más abundantes fueron los cocos Gram negativos con un 9%.
- La evaluación de tolerancia a concentraciones crecientes de metales pesados (Co, Hg y Pb), mostró que en la temperatura de 35° C, un solo clon (1) pudo tolerar la concentración de 2500 µg/ml de cobalto, cuatro clones (6,8,11,29) mostraron tolerancia hasta 100 µg/ml de mercurio y dos clones (11,16) toleraron concentraciones de hasta 4000 µg/ml de plomo. Con respecto a la temperatura de 9° C, un clon (13) toleró la concentración de 750 µg/ml de cobalto, otro clon (12) toleró hasta 250 µg/ml de mercurio y cuatro clones (1,9,10,12) mostraron crecimiento hasta 2500 µg/ml de plomo. Estos resultados permiten concluir que la tolerancia está relacionada con la temperatura, encontrándose mayor nivel de tolerancia a 35° C, con excepción del Hg ante el cual a la temperatura de 9° C el clon 12 mostró la mayor tolerancia (250 µg/ml de Hg). Este resultado indicaría que estamos en presencia de bacterias, cuyas características metabólicas óptimas de tolerancia están a bajas temperaturas. En el presente estudio se evidenció una doble resistencia a mercurio y plomo en los clones (12,11), el clon 12 toleró 250 µg/ml de mercurio y 2500 µg/ml de Pb a 9° C, mientras que el clon 11 crecido a

35 °C toleró 100 µg/ml de mercurio y 4000 µg/ml de plomo. Es de hacer notar que el clon 12 además es resistente a los antibióticos la ampicilina, eritromicina y ceftazidime.

- La identificación de los clones con mayor tolerancia mostró bacterias de los géneros: *Clostridium spp* (Clon Pb_{35°C} 16), *Corynebacterium spp* (Clon Hg_{35°C} 29), *Klebsiella spp* (Clon Co_{35°C} 1), *Micrococcus spp* (Clones; Hg_{35°C} 11, Hg_{35°C} 8, Hg_{35°C} 6) y *Pseudomona spp* (Clones; Co_{9°C} 13, Hg_{9°C} 12, Pb_{9°C} 10, Pb_{9°C} 9, Pb_{9°C} 1).
- La evaluación de la sensibilidad a antibióticos sobre los clones aislados, mostró mayor sensibilidad a Gentamicina (81,82%), seguida por la Ampicilina (45,45%), la Eritromicina (27,27%) y finalmente Ceftazidime quien mostro el menor porcentaje de sensibilidad (18,18%).

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en esta investigación se recomienda:

- Continuar con la investigación de microorganismos aislados en ambientes extremos, debido a que es un tema nuevo y de gran interés en el Ecuador.

- Realizar evaluaciones de la microbiota de la Laguna en diferentes épocas del año, para comprobar si esta puede ser alterada y variar con el cambio de estaciones.

- Hacer uso de técnicas de Biología Molecular para identificar los clones identificados hasta el nivel de especie, Clones que se encuentran en el laboratorio de Bioquímica y Farmacia en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Por parte de Ministerios y Gad Municipales que exista mayor protección de las áreas consideradas como lugares poco explorados.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO, R. L. Y SEVERICHE, C. A. "Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias , caribe colombiano", *avances Investigación en Ingeniería*, 2013, 10(2), pp. 73-79.

AGENCIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL DE ESTADOS UNIDOS *Plomo*. 2017. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/espanol/plomo> (Accedido: 25 de marzo de 2019).

ÁGUILA, A. *Antibiograma ¿Qué es? Y ¿Cómo interpretarlo?* 206, Panamá. Disponible en: <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2016/11/Antibiograma.pdf> (Accedido: 1 de abril de 2019).

ALARCÓN, L. R. Y OLIVAS, E. *Manual de prácticas de Microbiología Básica y Microbiología de alimentos*.2001, México. Disponible en: <http://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011297.pdf> (Accedido: 29 de marzo de 2019).

ALVARENGA, A. E., et al. "Selección y Caracterización de Cepas Psicrotolerantes Productoras de Actividad α -L-Ramnosidasa", *Revista de Ciencia y Tecnología*. Universidad Nacional de Misiones, 2015, (24), pp. 48-54. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1851-75872015000200008&lng=es&nrm=iso (Accedido: 19 de marzo de 2019).

ALVAREZ BENITO, M. V., BOQUET JIMÉNEZ, E. Y DE FEZ Y CAMINO, M. I. *Manual de técnicas en microbiología clínica*. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas.1990 Disponible en: https://books.google.com.ec/books/about/Manual_de_técnicas_en_microbiología_cl.html?id=XZW8PQAACAAJ (Accedido: 8 de mayo de 2019).

ARIZANDY, M., et al.*Bacteriología Medica Enterobacterias*, 2012. Disponible en: <https://es.slideshare.net/arizandy92/enterobacterias-13318203> (Accedido: 9 de mayo de 2019).

ATSDR, D. A. F. T. S. AND R. *Resumen de Salud Pública Cobalto CAS#: 7440-48-4 División de la Toxicología Agencia para Sustancias Tóxicas*. 2004. Disponible en: www.atsdr.cdc.gov/es (Accedido: 25 de marzo de 2019).

BD DIAGNOSTIC SYSTEMS EUROPE *BD Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)*. 2003. Francia. Disponible en: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254458.pdf> (Accedido: 3 de abril de 2019).

BD DIAGNOSTIC SYSTEMS EUROPE *BD Mannitol Salt Agar*. 2013, Francia. Disponible en: <http://www.bd.com> (Accedido: 3 de abril de 2019).

BERNAL, M. Y GUZMÁN, M. "El antibiograma de discos. tecnica de kirby-bauer", 1984, en Urrego, D. M. G. (ed.) *Biomédica*. Colombia, p. 121.

BORDEHORE, C. *Problemas ambientales, problemas humanos*. 2001. Disponible en: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/2725/8/cap8.pdf> (Accedido: 26 de febrero de 2019).

BRIZUELA, M. *Manual de Instruccion Brizuela-Lab*. Argentina. 2015 a. Disponible en: http://www.brizuela-lab.com.ar/manuales/SIM_medio.pdf (Accedido: 3 de abril de 2019).

BRIZUELA, M. *T.S.I. Agar Triple Sugar Iron*. Argentina. 2015 b Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297d2411990.pdf (Accedido: 3 de abril de 2019).

CASTILLO RODRÍGUEZ, F., et al. *Biotecnología ambiental*. 2005, España: Editorial Tébar.

CERCENADO, E., et al. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España. 2004 Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia17.pdf> (Accedido: 3 de abril de 2019).

CIMERA. *Bioprospecciones en ambientes acuáticos extremos o aislados* 2013, Disponible en: <http://www.cimera.es/en/bioprospecciones-en-ambientes-acuaticos-extremos/> (Accedido: 28 de febrero de 2019).

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN *Documento Conpes 3533. Bases de un plan de acción para la adecuación del sistema de propiedad intelectual a la competitividad y productividad nacional*. 2008, Disponible en: <https://www.cbd.int/doc/measures/abs/post-protocol/msr-abs-co-es.pdf> (Accedido: 28 de febrero de 2019).

DOMÈNECH, X. Y PERAL, J. *Química ambiental de sistemas terrestres*. 2006, Reverté.

FERNÁNDEZ OLMOS, A., et al. *Métodos de Identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. 2010, Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> (Accedido: 21 de marzo de 2019).

FERRÉ HUGUET, N., et al. "Metales pesados y salud: diseño de un software para evaluar los

riesgos de la exposición ambiental a través del agua, suelos y aire" 2007., *Mapfre seguridad*, ISSN 0212-1050, Año n° 27, N° 108, 2007, págs. 50-58, 27(108), Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2508799>.

FREITAS, F., ALVES, V. D. Y REIS, M. A. M. "Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications". *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(8), pp. 388-398. doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.008.

FULLANA, N. Caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura, 2014, <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/5139/1/uy2.-17237.pdf>. (2014) *PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEASA BACTERIANA ACTIVA A BAJA TEMPERATURA*. Facultad de Ciencias, Udelar. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/5139/1/uy24-17237.pdf> (Accedido: 26 de febrero de 2019).

GARCÍA, I. Y DONOSO, C. *Tecnología de suelos. Tema 15. Contaminación por metales*. 2004, Disponible en: <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm> (Accedido: 22 de marzo de 2019).

GARZÓN, V. *Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia*. 2015. Universidad de La Sabana Facultad de Ingeniería, Maestría en diseño y gestión de procesos Chía, Colombia. Disponible en: [https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/22883/Vivian Marcela Garzón Rubiano %20tesis%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/22883/Vivian%20Marcela%20Garz%C3%B3n%20Rubiano%20tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Accedido: 28 de febrero de 2019).

GIL ALVAREZ, I. *Rocas y Minerales*. 2016. Disponible en: <https://www.rocasym minerales.net/cobalto/> (Accedido: 25 de marzo de 2019).

GOBIERNO PROVINCIAL DE MORONA SANTIAGO *Parque Nacional Sangay* 2019, Disponible en: <http://www.moronasantiagoessangay.com/rutas/parque-nacional-sangay> (Accedido: 21 de marzo de 2019).

GÓMEZ, F. *Guía específica de trabajo sobre "Vida en ambientes extremos"* 2016. Disponible en: [http://www.programainvestiga.org/pdf/guias2016-17/Guia introductoria al tema vida en ambientes extremos.pdf](http://www.programainvestiga.org/pdf/guias2016-17/Guia%20introdutoria%20al%20tema%20vida%20en%20ambientes%20extremos.pdf) (Accedido: 28 de febrero de 2019).

GÓMEZ, Y., et al. "Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto", *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2002, Disponible en: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2002-1-027-031.pdf>

(Accedido: 26 de febrero de 2019).

GONZÁLEZ, J., MORENO, V. Y DEL MONTE, A. "Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial", *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2007, 1 enero, pp. 124-140. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15574> (Accedido: 5 de junio de 2019).

GORAYMI *Lagunas de Ozogoché*. 2018, Disponible en: <https://www.goraymi.com/es-ec/alausi/lagunas-de-ozogoché-aaff0jhan> (Accedido: 21 de marzo de 2019).

GUERRERO SÁNCHEZ, M., LÓPEZ ARCHILLA, A. I. Y ANTÓN BOTELLA, J. "Ecología microbiana" 2005. Disponible en: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=124> (Accedido: 28 de febrero de 2019).

GUNNAR, N. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo, Metales: Propiedades Químicas y Toxicidad*. 2013, Disponible en: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tom o2/63.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tom%20o2/63.pdf) (Accedido: 25 de marzo de 2019).

HERNÁNDEZ, A. *Microbiología Industrial*. (2003) Editado por Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). Costa Rica. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false (Accedido: 21 de marzo de 2019).

HERNÁNDEZ, J. *Especiación de metales pesados contaminantes en los suelos y acuífero del río de los remedios*. 2012. Instituto politécnico

HOFSTEDE, R., LIPS, J. Y JONGSMA, W. *Geografía, ecología y forestación de la sierra alta del Ecuador*. 1998, Ediciones Abya-Yala. Quito. Disponible en: https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1445&context=abya_yala (Accedido: 28 de febrero de 2019).

HOOVER, R. Y PIKUTA, E. *Psychrophilic and Psychrotolerant Microbial Extremophiles in Polar Environments, Polar Microbiology*. 2010, doi:10.1201/9781420083880-c5.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA "Anuario Hidrológico Nº 51-2013", *Servicio meteorológico*, p. 329.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA *Protocolo de Muestreo*,

Transporte y Conservación de Muestras de Agua con Fines Múltiples (consumo humano, abrevado animal y riego). 2011, Argentina. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/agua_bebida/107-Protocolo_Aguas_INTA.pdf (Accedido: 28 de marzo de 2019).

INSTITUTO VALENCIANO DE MICROBIOLOGIA *Microorganismos psicrófilos y psicotrofos en alimentos y aguas - Cultivo cualitativo y cuantitativo; Identificación molecular (PCR y secuenciación)*. 2018, Disponible en: <https://www.ivami.com/es/microbiologia-de-alimentos/620-microorganismos-psicrofilos-cultivo> (Accedido: 8 de marzo de 2019).

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Simmons Citrati Agar*. 2019, Argentina . Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a29779bd2be8.pdf (Accedido: 3 de abril de 2019).

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Tripteína Soya Agar*, 2019. Disponible en: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297bfd85301.pdf (Accedido: 16 de abril de 2019).

LENNTECH BV, L. S. B. Y L. D. *Cobalto (Co) Propiedades químicas y efectos sobre la salud y el medio ambiente*. 2019. Disponible en: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/co.htm> (Accedido: 25 de marzo de 2019).

LÓPEZ HONTANGAS, J. L., CASTILLO, F. J. Y SALAVERT, M. "Técnicas de identificación", 2007,p. 15.

LÓPEZ JÁCOME, L. E., ET AL "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". México, 2004, Vol.3, pp. 10-18. Disponible en: www.medigraphic.org.mx (Accedido: 21 de marzo de 2019).

MADIGAN, M. T., et al. *Brock biología de los microorganismos*. 2004. Prentice Hall Hispanoamericana. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=P_nsaCHD1wsC&dq=brock+biologia+de+los+microorganismos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwipsf784Y7hAhVNuVkKHaHrD7MQ6AEILDAB (Accedido: 19 de marzo de 2019).

MARRERO COTO, J., PÉREZ COTO, O. Y DÍAZ VALDIVIA, A. 2010 "Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación", 41(1), pp. 67-78.

MARTÍNEZ, A., et al. "Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares Antibiotic and metals resistance in bacteria isolates from Almendares river",

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 2010, pp. 1-10.

MARTÍNEZ., et al. *Proteasas para alimentación de las aves*. 2010. Disponible en: <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2010/11/5632-proteasas-para-alimentacion-de-las-aves.pdf> (Accedido: 5 de junio de 2019).

MINISTERIO DEL AMBIENTE ECUADOR *Parque Nacional Sangay | Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador*. 2015, Disponible en: <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/parque-nacional-sangay> (accedido: 26 de febrero de 2019).

MINISTERIO DEL AMBIENTE ECUADOR *Parque Nacional Sangay*. 2004. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-sangay/> (Accedido: 21 de marzo de 2019).

MORENO, L. *Caracterización de cepas bacterianas de la Laguna Amarilla perteneciente al Nevado El Altar en la Provincia de Chimborazo*. 2017 Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7877/1/236T0302.pdf?fbclid=IwAR2phpJfEWR-Uv4-RvdqVqx-WgsrHqehH6u8GY-SPJc5PWtMY6jAu25VAGE>.

NAVARRETE, V. *Aislamiento y caracterización de la microbiota nativa de muestras de efluentes de curtiembres*. 2017, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

OLIART-ROS, R. M., et al. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico, *Ciencia UAT*. 2017, Victoria: Universidad Autónoma de Tamaulipas. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079 (Accedido: 28 de febrero de 2019).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD 2017 *El mercurio y la salud*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (Accedido: 25 de marzo de 2019).

PAIPILLA, F. *Aporte a la bioprospección conducente a definir las aplicaciones en la plasticultura de un biopolímero tipo PHAs, proveniente de la biodiversidad colombiana, en el marco de los tratados de libre comercio y acuerdos comerciales suscritos por Colombia*. 2014 Universidad Nacional de Colombia Facultad de Derecho, Ciencias Política y Sociales Maestría en Biociencias y Derecho. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/40053/1/6699687.2014.pdf> (Accedido: 28 de febrero de 2019).

PANDEY, S., BARAI, P. Y TUSHAR, M. *Influence of heavy metals on the activity of*

antioxidant enzymes in the metal resistant strains of Ochrobactrum and Bacillus sp. " *Journal of Environmental biology* 2013.

PEÑA, M. "Características_macroscópicas_de_bacterias 2010.

PERAZA, S. *Informe de la Familia Staphylococcaceae y Micrococcaceae.* 2017, Venezuela. Disponible en: https://www.academia.edu/33799079/Informe_de_la_Familia_Staphylococcaceae_y_Micrococcaceae (Accedido: 9 de mayo de 2019).

RADIO MUNDIAL ECUADOR *Visita a las Lagunas de Ozogoché.* 2017 Disponible en: <https://www.radio-mundial.com/reportajes/5323-visita-a-las-lagunas-de-ozogoché.html> (Accedido: 21 de marzo de 2019).

RAHMAN, Z. Y SINGH, V. P. Assessment of heavy metal contamination and Hg-resistant bacteria in surface water from different regions of Delhi, India", *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2018 Elsevier, 25(8), pp. 1687-1695. doi:10.1016/J.SJBS.2016.09.018.

RODRÍGUEZ, N. *Morfología bacteriana, identificación microscópica y macroscópica.* 2008 Disponible en: <https://www.paradis-sphynx.com/ciencias-naturales/morfologia-bacteriana-microscopica-macroscopica.htm> (Accedido: 21 de marzo de 2019).

RUIZ MEDINA, M. I. *Políticas públicas en salud y su impacto en el seguro popular en Culiacán, Sinaloa, México* ". 2011. Universidad autónoma de Sinaloa .

SACSAQUISPE, R. E. Y VELÁSQUEZ, J. *Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de disco de difusión.* 2002. Lima . Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual_sensibilidad_2.pdf (Accedido: 3 de abril de 2019).

SECRETARIA NACIONAL DEL AGUA. *Acuerdo 2014-863.* Ecuador 2014, Disponible en: www.agua.gob.ec (Accedido: 26 de febrero de 2019).

SORIA MELGUIZO, F. *Ficha Técnica Plate Count Agar.* Madrid. 2009. Disponible en: http://f-soria.es/Inform_soria/Difco_Fichas_tecnicas/PLACAS_DIFCO_Y_CROMOGENICAS_BD/FT_PLATE_COUNT_AGAR.pdf (Accedido: 28 de marzo de 2019).

SORIA MELGUIZO, F. *(Ficha Técnica SIM MEDIUM TUBO.* Madrid. 2009 Disponible en: http://f-soria.es/Inform_soria/Difco_Fichas_tecnicas/TUBOS_DIFCO/FT_SIM_MEDIUM.pdf (Accedido: 3 de abril de 2019).

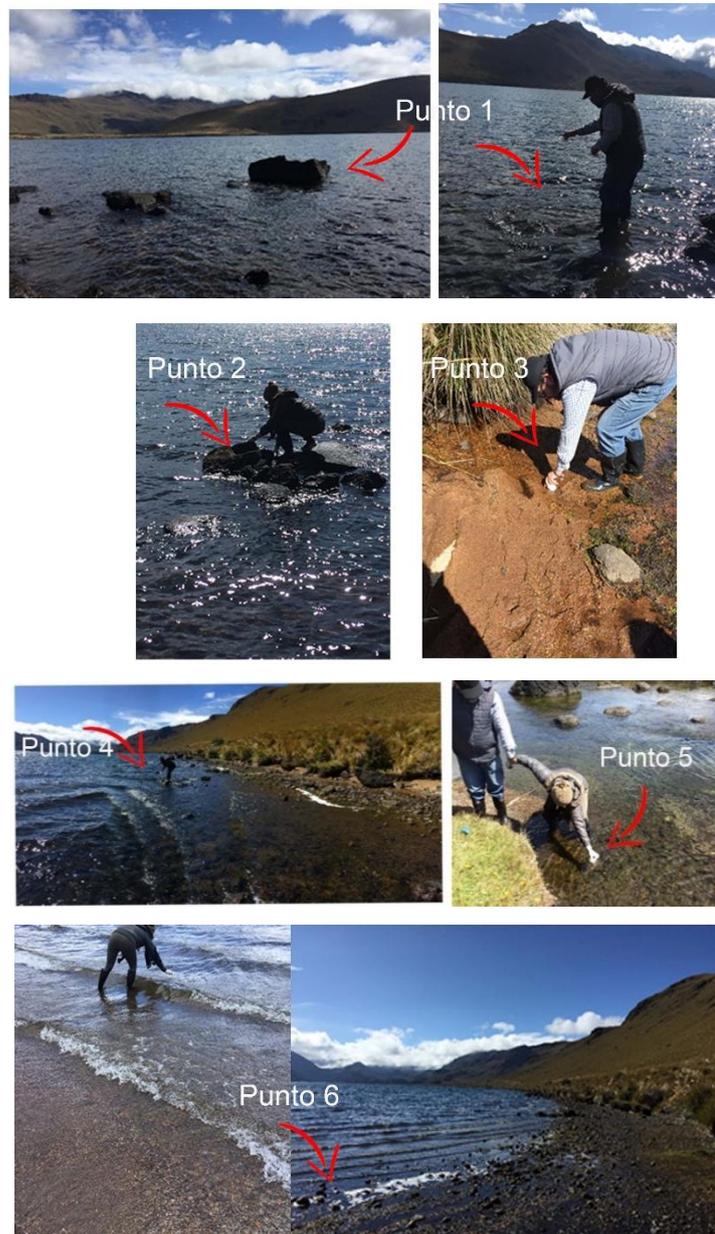
SOTO PADILLA, Y., et al. *Potencial de remoción de plomo mediante bacterias aisladas del sedimento de laguna San Juan, Ascensión, Chihuahua.* 2016, México. Disponible en: http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v10n3/Data/Potencial_de_remocion_de_plomo_mediante_bacterias_aisladas_del_sedimento_de_laguna_San_Juan_Ascension_Chihuahua.pdf (Accedido: 8 de mayo de 2019).

TWARDOWSKA, I., et al. *Viable methods of soil and water pollution monitoring, protection and remediation.* 2006, *Springer*.

VULLO, D. "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente", 2003, noviembre. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm> (Accedido: 25 de marzo de 2019).

ANEXOS

ANEXO A: Recolección y toma de muestras



Fotografía 1: Identificación de los puntos de muestreo en la laguna de Ozogoché.

Anexo B: Siembra de muestras y estimación de UFC/ mL

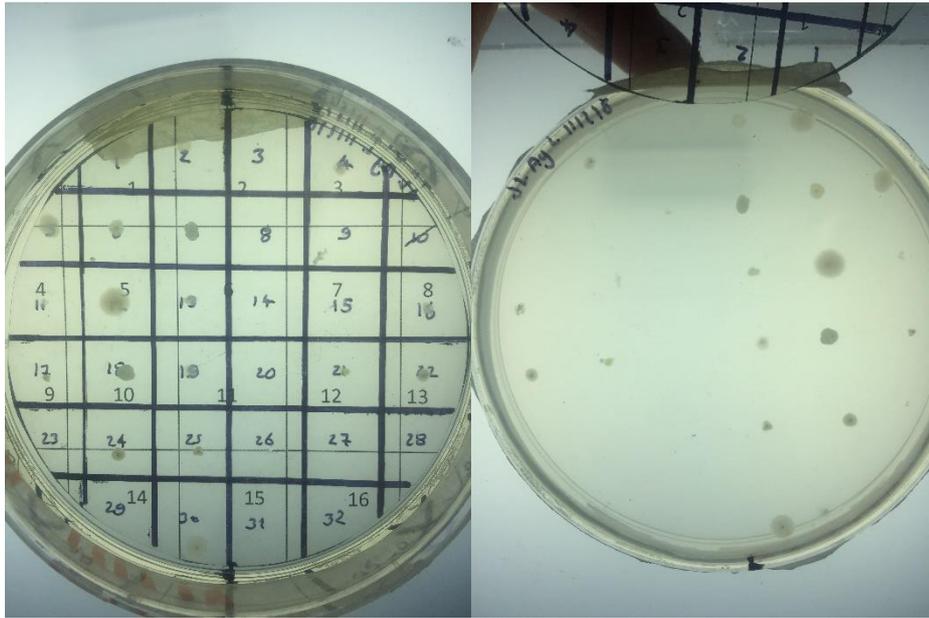


Fotografía 2: Siembra de muestras a diferentes volúmenes

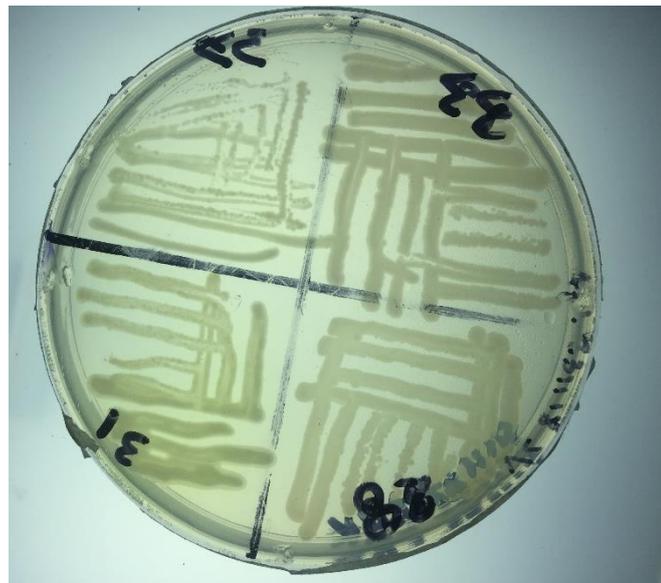


Fotografía 3: Conteo microbiológico de siembras de la muestra

Anexo C: Selección y aislamiento de colonias

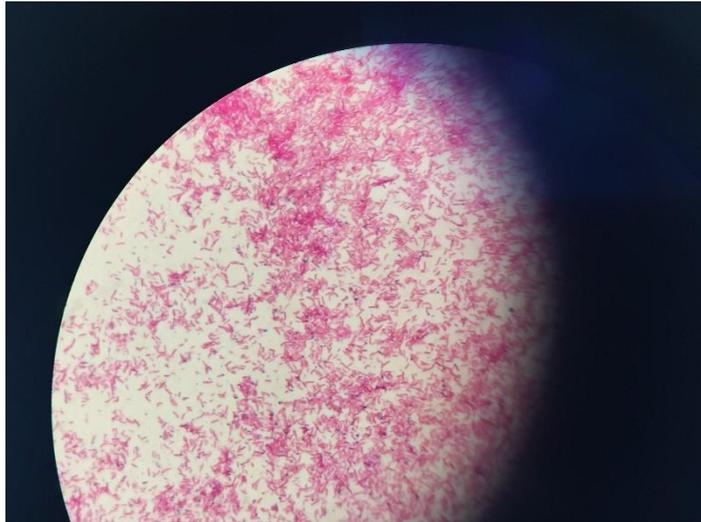


Fotografía 4: Repiques Bacterianos

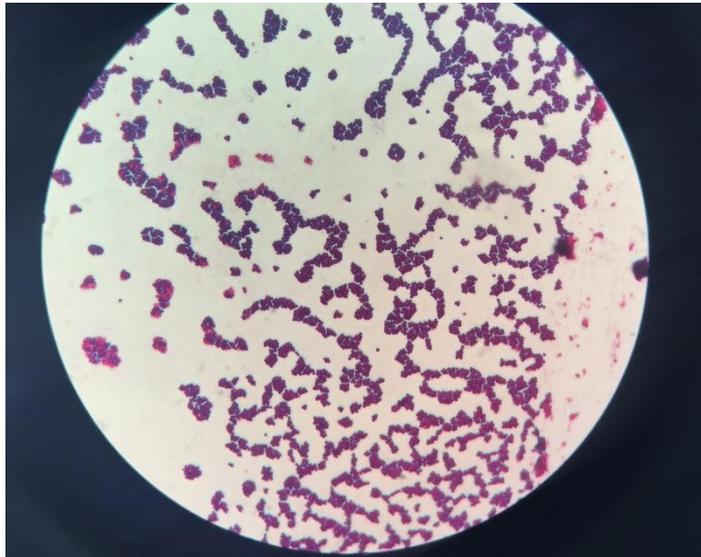


Fotografía 5: Aislamiento por agotamiento

Anexo D: Caracterización microscópica de clones aislados



Fotografía 6: Tinción Gram de clones aislados Gram (-)

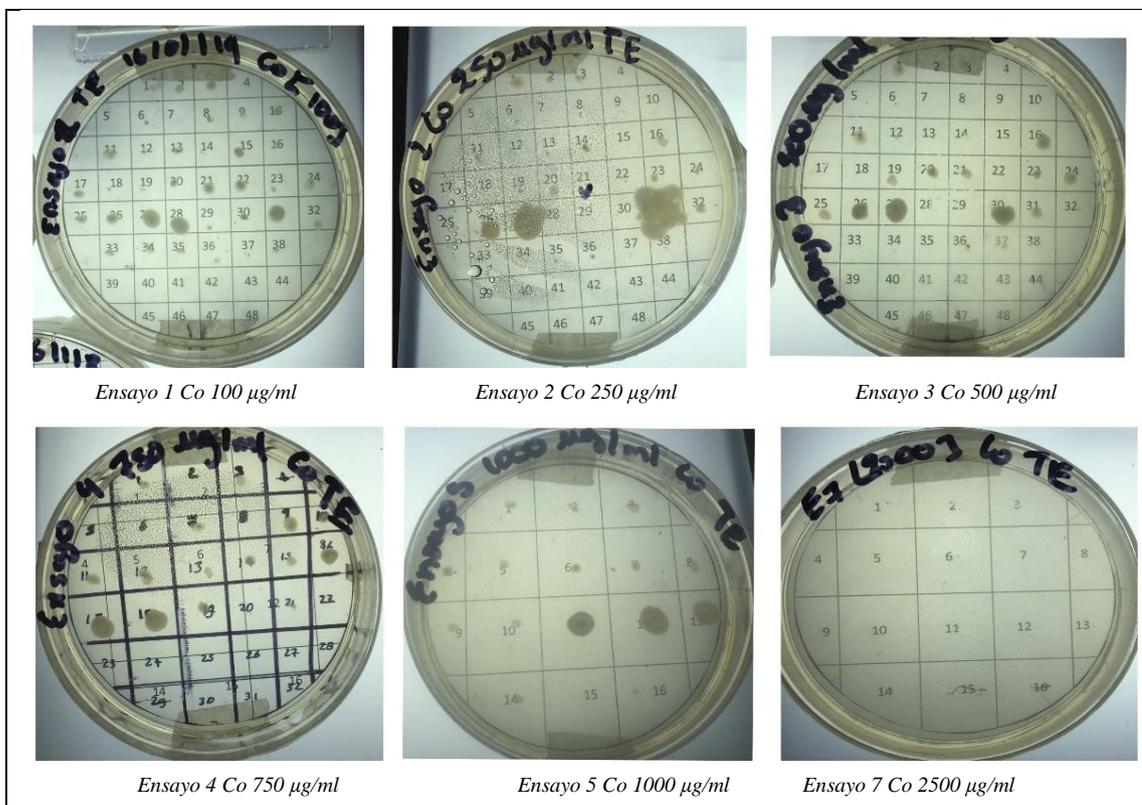


Fotografía 7: Tinción Gram de clones aislados Gram (+)

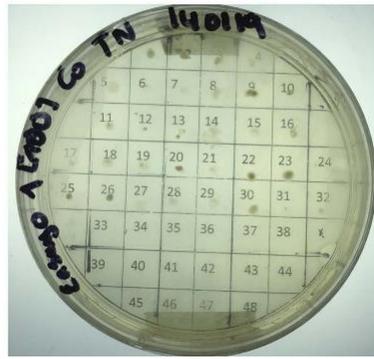
Anexo E: Evaluación de tolerancia a metales pesados (Co, Hg y Pb) de los clones aislados



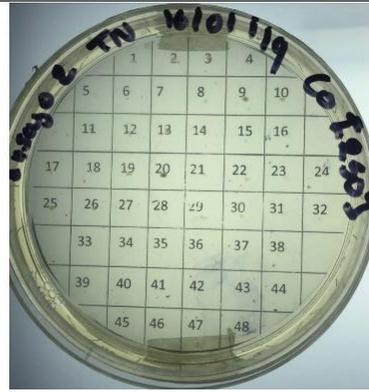
Fotografía 8: Soluciones de sales de Co, Hg y Pb



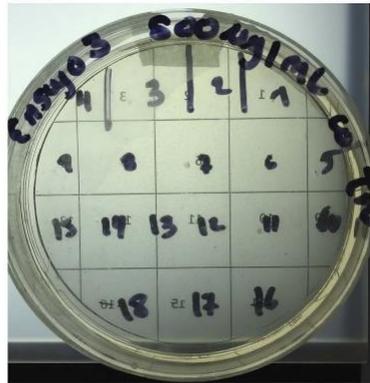
Fotografía 9: Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con Cobalto temperatura 35°C



Ensayo 1 Co 100 µg/ml



Ensayo 2 Co 250 µg/ml

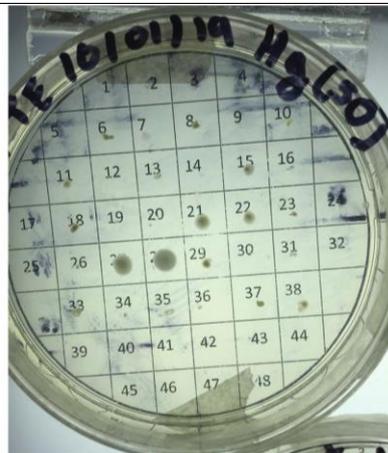


Ensayo 3 Co 500 µg/ml



Ensayo 4 Co 750 µg/ml

Fotografía 10: Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con Cobalto temperatura 9°C

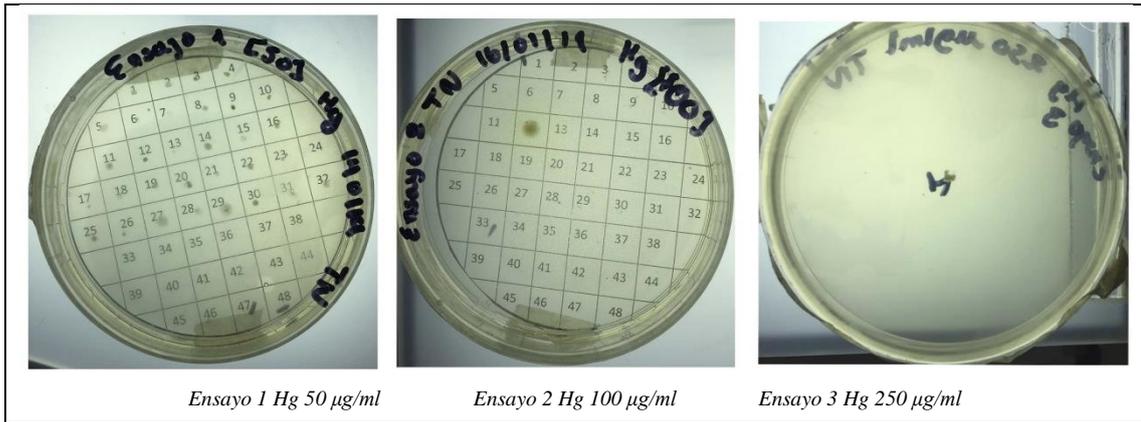


Ensayo 1 Hg 50 µg/ml

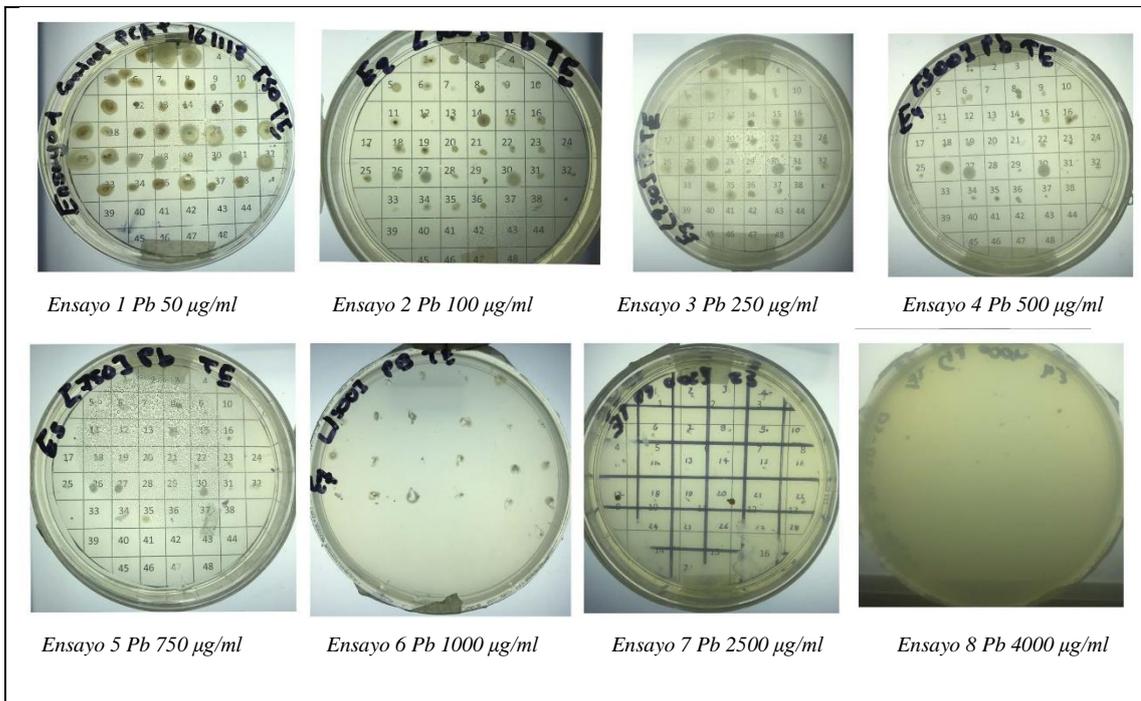


Ensayo 2 Hg 100 µg/ml

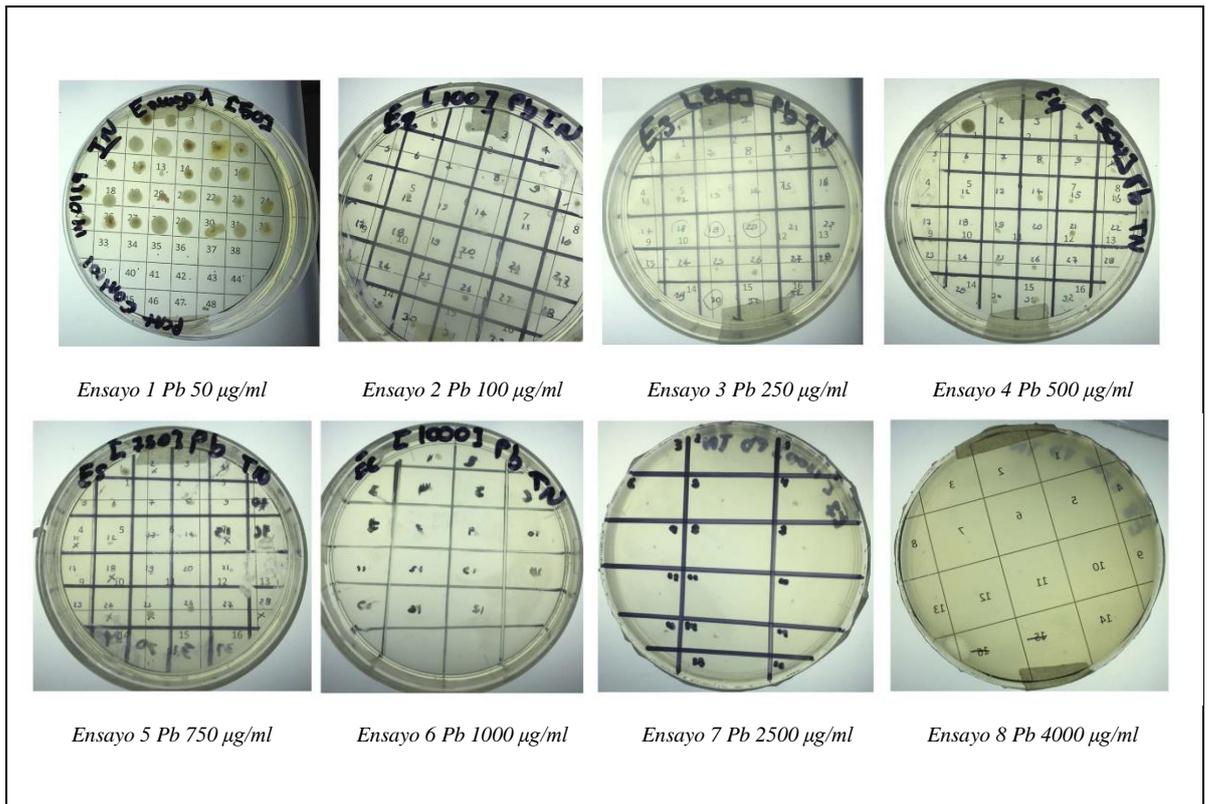
Fotografía 11: Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con Mercurio temperatura 35°C



Fotografía 12: Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con Mercurio temperatura 9°C

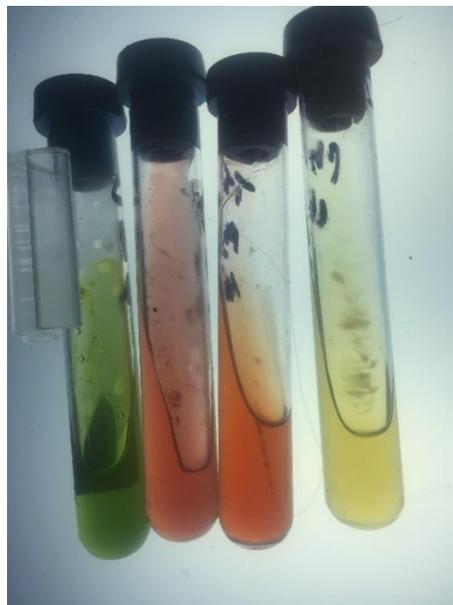


Fotografía 13: Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con Plomo temperatura 35°C



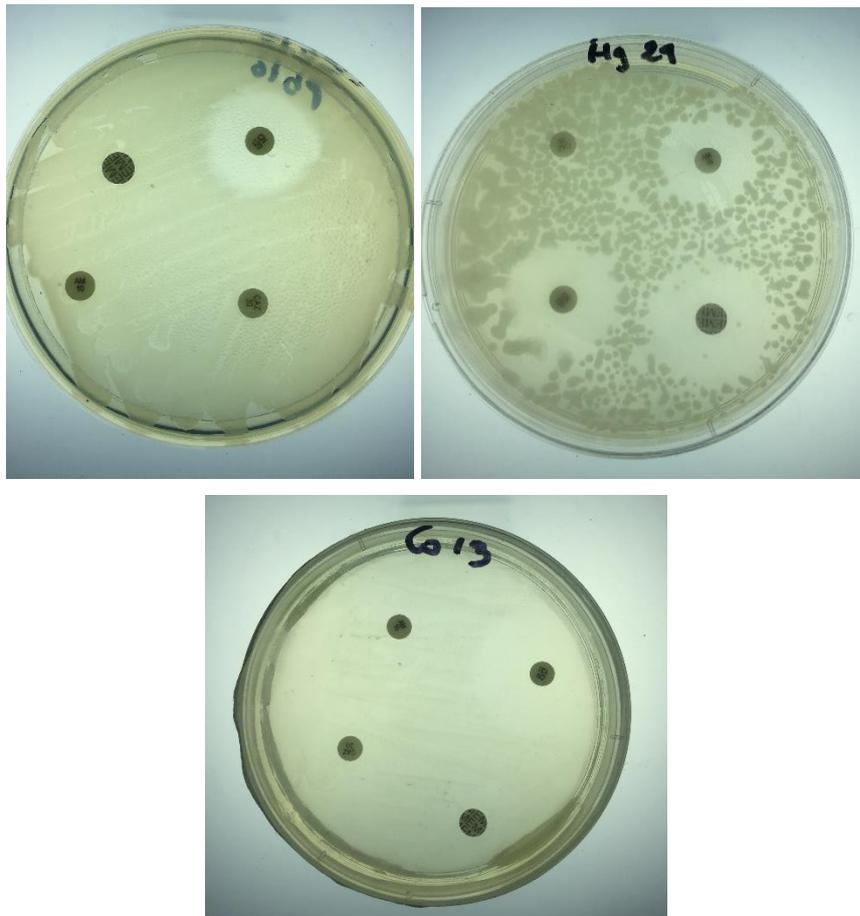
Fotografía 14: Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con Plomo temperatura 9°C

Anexo F: Pruebas Bioquímicas



Fotografía 15: Resultados de las diferentes pruebas bioquímicas realizadas a clones aislados

Anexo G: Antibiograma de los clones resultantes de las pruebas de tolerancia a metales pesados



Fotografía 16: Evaluación de la resistencia o sensibilidad a antibióticos de los clones finales

Anexo H: Comportamiento de los clones en los cuatro repiques realizados a 35°C

Muestras	Primer aislamiento	Segundo Aislamiento	Tercer aislamiento	Cuarto Aislamiento	Aislamiento por agotamiento	Nº de identificación del clon
PCA+						
M1 (75 µL)	+	+	+	+	+	2
	+	+	+	+	+	3
	+	+	+	+	+	6
M1 (150µL)	+	+	+	+	+	1
M2 (75 µL)	+	+	+	+	+	4
	+	+	+	+	--	
M2 (150µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	5
	+	+	+	+	+	7
M3 (150µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
M4 (25 µL)	+	+	+	+	--	
M4 (75 µL)	+	+	+	+	--	
M4 (150µL)	+	+	+	+	+	11
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	--	--	--	--	--	
M5 (75 µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	13
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	--	--	--	--	--	
M5 (150µL)	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
	+	+	+	+	+	12
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
M6 (25µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
Muestras	Primer aislamiento	Segundo Aislamiento	Tercer aislamiento	Cuarto Aislamiento	Aislamiento por agotamiento	Nº de identificación del clon
M6 (25µL)	+	+	+	+	--	

M6 (75µL) Muestras	+	+	+	--	--	
	+	+	+	+	+	9
	+	+	+	+	+	10
	--	--	--	--	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	8
M6 (150µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
PCA-						
M2 (25 µL)	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
M2 (75µL)	+	+	+	+	+	1
	+	+	+	+	--	
M2 (150 µL)	+	--	--	--	--	
	+	+	+	+	+	2
M3 (25µL)	+	+	+	+	+	12
M3 (75µL)	+	+	+	+	+	3
	+	+	+	+	--	
M3 (150µL)	--	--	--	--	--	
	+	+	+	+	+	4
	--	--	--	--	--	
M4 (25µL)	+	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
M4 (75µL)	--	--	--	--	--	
	+	+	+	+	+	5
	+	+	+	+	+	6
	+	+	+	+	+	7
M4 (150µL)	+	+	+	--	--	
	+	+	+	+	+	8
Muestras	Primer aislamiento	Segundo Aislamiento	Tercer aislamiento	Cuarto Aislamiento	Aislamiento por agotamiento	Nº de identificación del clon
M5 (25µL)	+	+	+	+	--	
M5 (75µL)	+	+	+	+	+	10
	+	+	+	+	+	11

M5 (150µL)	--	--	--	--	--	
	+	+	+	+	--	
M6 (25µL)	+	+	+	--	--	
	+	+	+	+	--	
	+	--	--	--	--	
M6 (75µL)	+	+	+	+	+	9
M6 (150µL)	--	--	--	--	--	
AGL						
M1(75µL)	+	+	+	--	--	
	+	+	+	+	+	11
	+	+	+	+	+	12
	+	--	--	--	--	
M2 (75µL)	+	+	+	--	--	
	+	+	+	+	+	8
	+	+	+	+	+	9
	+	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
M3 (75µL)	+	+	+	+	+	1
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
	+	+	+	+	+	5
M4 (75µL)	+	+	+	+	+	10
	+	+	+	+	+	4
M5 (75µL)	--	--	--	--	--	
	+	+	+	+	+	3
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
M6 (75µL)	+	+	+	+	+	6
	+	+	+	+	+	2
	+	+	+	+	+	7
Muestras	Primer aislamiento	Segundo Aislamiento	Tercer aislamiento	Cuarto Aislamiento	Aislamiento por agotamiento	Nº de identificación del clon
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	
M6 (75µL)	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	

+ “Crecimiento”, -- “Sin Crecimiento”
Realizado por: LEMA, Jhojana. 2019.

Anexo I: Comportamiento de los clones en los cuatro repiques realizados a 9°C

Muestras	Primer aislamiento	Segundo Aislamiento	Tercer aislamiento	Cuarto Aislamiento	Aislamiento por agotamiento	Nº de identificación del clon	
PCA-							
M1 (150 µL)	+	+	+	+	+	4	
	+	+	+	+	--		
M2 (25µL)	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
M2 (75µL)	+	+	+	--	--		
	+	+	+	+	--		
M3 (25µL)	+	+	+	--	--		
	+	+	+	+	--		
M3 (75µL)	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
M3 (150µL)	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	+		3
M4 (25µL)	+	+	+	+	+	5	
M4 (75µL)	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	+		2
	+	+	+	+	--		
M4 (150µL)	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
Muestras	--	--	--	--	--		
	Primer aislamiento	Segundo Aislamiento	Tercer aislamiento	Cuarto Aislamiento	Aislamiento por agotamiento	Nº de identificación del clon	
M5 (25µL)	+	+	+	+	--		
	--	--	--	--	--		
M5 (75µL)	+	+	+	+	+	1	
M5 (150µL)	+	+	+	+	+	8	
	+	+	+	+	+	7	
	+	+	+	+	+	6	
M6 (75µL)	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
M6 (150µL)	+	+	+	+	--		
	+	+	+	+	--		
PCA+							

M1 (75µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	13
M2 (75µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
M2 (150µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
M3 (75µL)	--	--	--	--		
M3 (150µL)	+	+	+	+	+	1
	+	+	+	+	+	14
	+	+	+	+	+	2
	+	+	+	+	--	
M4 (25µL)	+	+	+	+	+	20
	+	+	+	+	--	
M4 (75µL)	+	+	+	+	+	15
	+	+	+	+	+	10
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	9
	+	+	+	+	--	
M4 (150µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	3
Muestras M4 (150µL)	Primer aislamiento	Segundo Aislamiento	Tercer aislamiento	Cuarto Aislamiento	Aislamiento por agotamiento	Nº de identificación del clon
	+	+	+	+	+	19
M5 (25µL)	+	+	+	+	+	17
	+	+	+	+	+	4
M5 (150µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	18
	+	+	+	+	--	
M6 (25µL)	+	+	+	+	+	7
	+	+	+	+	+	8
	+	+	+	+	+	16
	+	+	+	+	+	5
M6 (75µL)	+	+	+	+	+	12
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	11
M6 (150µL)	+	--	--	--	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	6

AGL						
M2 (75µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	+	4
	+	+	+	+	+	1
M3 (75µL)	+	+	+	+	+	3
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
M4 (75µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
M5 (75µL)	+	+	+	+	+	2
	+	+	+	+	--	
	+	--	--	--	--	
M6 (75µL)	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	
	+	+	+	+	--	

Realizado por: LEMA, Jhojana. 2019.