



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

“CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PSICRÓFILAS DE LOS GLACIARES TROPICALES EN EL VOLCÁN CHIMBORAZO”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: EDWIN JAVIER SILVA CHICAIZA

DIRECTORA: ING. RAFAELA PACURUCU REYES

Riobamba – Ecuador

2020

©2020, Edwin Javier Silva Chicaiza

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.

Yo, Edwin Javier Silva Chicaiza, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 23 de diciembre de 2020

Edwin Javier Silva Chicaiza

060374984-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Proyecto de Investigación, “**CHARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PSICRÓFILAS DE LOS GLACIARES TROPICALES EN EL VOLCÁN CHIMBORAZO**”, realizado por el señor: **EDWIN JAVIER SILVA CHICAIZA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Dolores Díaz Heredia

2020-12-23

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

YOLANDA
DOLORES
DÍAZ HEREDIA
Firmado digitalmente por YOLANDA DOLORES DÍAZ HEREDIA
Fecha: 2021.01.18 08:57:38 -05'00'

Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes

2020-12-23

DIRECTORA DEL TRABAJO

ANA
RAFAELA
PACURUCU
REYES
Firmado digitalmente por ANA RAFAELA PACURUCU REYES
Fecha: 2021.01.15 11:31:35 -05'00'

DE TITULACION

Dra. Nancy Cecilia Veloz Mayorga

2020-12-23

MIEMBRO DE TRIBUNAL

NANCY
CECILIA
VELOZ
MAYORGA
Firmado digitalmente por NANCY CECILIA VELOZ MAYORGA
Fecha: 2021.01.17 16:21:17 -05'00'

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación quiero dedicarlo a mi madre Olga quien desde pequeño me supo acompañar y guiar con buenos valores, a mis abuelos Octavio y Teresa quienes fueron mis segundos padres y me han sabido dar certeros consejos.

Edwin

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a mi madre Olga por ser mi principal apoyo durante toda mi vida y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación.

A mi maestra y directora de tesis la Ing. Rafaela Pacurucu por darme el apoyo y la ayuda necesaria durante la carrera y en mi trabajo de titulación.

A la Ing. Verónica Moreno por su gran ayuda y consejos en las horas de laboratorio.

Al BQF. Marcelo Ortiz y a la Dra. Jacqueline Guevara por su valiosa colaboración en el desarrollo de mi tesis.

A mis amigos de cordada Leandro, Josué, Jhon, Gabriel y a mi tío Marcelo sin su apoyo hubiera sido imposible el muestreo.

A mis amigos Dayaneth, Carolina, Natalia, Romario, Alexis, Edgar, Richard, Oscar y Gio y por su apoyo incondicional.

Edwin

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO	
1. MARCO TEORICO REFERENCIAL	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Microorganismos Extremófilos	4
1.3. Microorganismos Psicrófilos	5
1.3.1. <i>Microorganismos psicrótrofos</i>	5
1.3.2. <i>Adaptaciones moleculares en psicrófilos</i>	5
1.4. Bioprospección de Psicrófilos	7
1.4.1. <i>Bioprospección</i>	7
1.4.2. <i>Bioprospección de bacterias extremófilas</i>	7
1.4.3. <i>Bioprospección de bacterias psicrófilas</i>	7
1.5. Aplicaciones de los psicrófilos	7
1.6. Ambientes fríos	8
1.6.1. <i>Criósfera</i>	8
1.7. Reserva de Producción de Fauna Chimborazo.	9
1.7.1. <i>Volcán Chimborazo</i>	10

1.8.	Caracterización fenotípica	10
1.8.1.	<i>Características macroscópicas de las colonias</i>	10
1.8.2.	<i>Características microscópicas</i>	12
1.8.3.	<i>Pruebas fisiológicas</i>	12
1.8.4.	<i>Pruebas de sensibilidad a antibióticos</i>	15

CAPÍTULO

2.	MARCO METODOLÓGICO	17
2.1.	Tipo de Investigación	18
2.2.	Diseño de la Investigación	18
2.3.	Unidad de análisis	19
2.4.	Localización del Estudio	19
2.4.1.	<i>Georreferenciación del sitio de muestro</i>	19
2.5.	Parte Experimental	20
2.5.1.	<i>FASE I: Análisis físico-químico del agua</i>	20
2.5.2.	<i>FASE II: Análisis de la diversidad bacteriana</i>	20
2.5.3.	<i>FASE III: Aislamiento de cepas bacterianas</i>	25
2.5.4.	<i>FASE IV: Pruebas Fisiológicas</i>	25
2.5.5.	<i>FASE V: Sensibilidad a Antibióticos</i>	29

CAPÍTULO

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1.	Análisis físico-químico del agua de los glaciares en el Volcán Chimborazo	31

3.2.	Biodiversidad bacteriana	32
3.3.	Caracterización Macroscópica	36
3.4.	Caracterización Microscópica	38
3.5.	Pruebas Fisiológicas	39
3.5.1.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	39
3.5.2.	<i>Pruebas enzimáticas</i>	41
3.6.	Sensibilidad a Antibióticos	41
	CONCLUSIONES	43
	RECOMENDACIONES	44
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clasificación de los microorganismos en función de la temperatura de crecimiento.....	4
Tabla 2-1:	Enzimas de microorganismos psicrófilos y sus aplicaciones.....	6
Tabla 3-1:	Principales bacterias y enzimas aplicados a la industria.....	8
Tabla 4-1:	Características de las colonias.....	11
Tabla 1-2:	Codificación de cajas Petri.....	18
Tabla 2-2:	Georreferenciación de puntos de muestreo.....	19
Tabla 3-2:	Composición del medio de cultivo Agar R2A.....	21
Tabla 4-2:	Composición del medio de cultivo Agar Nutritivo.....	21
Tabla 5-2:	Codificación de cajas Petri para agar R2A el mes de septiembre.....	22
Tabla 6-2:	Identificación de cajas Petri para agar Nutritivo el mes de septiembre.....	23
Tabla 7-2:	Identificación de cajas Petri para agar R2A el mes de febrero.....	23
Tabla 8-2:	Identificación de cajas Petri para agar Nutritivo el mes de febrero.....	24
Tabla 9-2:	Composición del medio de cultivo SIM.....	26
Tabla 10-2:	Composición del medio de cultivo Agar TSI.....	27
Tabla 11-2:	Composición del medio de cultivo Agar Citrato Simmons.....	27
Tabla 12-2:	Composición del medio de cultivo Müller Hinton.....	29
Tabla 1-3:	Resultado de análisis in-situ.....	30
Tabla 2-3:	Resultado de análisis ex-situ.....	30
Tabla 3-3:	Resultados de la caracterización macroscópica.....	36

Tabla 4-3:	Resultados de la caracterización microscópica.....	38
Tabla 5-3:	Resultados de las pruebas fisiológicas.....	40
Tabla 6-3:	Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Morfología de colonias bacterianas.....	11
Figura 2-1:	Morfologías de las células.....	12
Figura 3-1:	Identificación de bacterias.....	14
Figura 1-2:	Metodología empleada.....	17
Figura 1-2:	Ubicación Volcán Chimborazo.....	19

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Número total de colonias obtenidas.....	32
Gráfico 2-3:	Cantidad de colonias obtenidas por medio de cultivo.....	33
Gráfico 3-3:	Cantidad de colonias por fecha de muestreo.....	34
Gráfico 4-3:	Cantidad de colonias por temperatura.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Autorización de investigación por el Ministerio de Ambiente

ANEXO B: Sitios de muestreo

ANEXO C: Evidencias Fotográficas del trabajo de laboratorio

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar cepas bacterianas psicrófilas de los glaciares tropicales en el volcán Chimborazo. Se realizaron dos muestreos, uno en verano (septiembre) y otro en invierno (febrero), que consistieron en la recolección de muestras de hielo glaciar en tres puntos distintos del volcán. In-situ se midieron la temperatura, el pH y la conductividad eléctrica, mientras que de forma ex-situ se analizó el pH, la conductividad eléctrica, color, turbiedad, dureza, alcalinidad y concentración de hierro. Las muestras se inocularon por quintuplicado tanto en agar R2A como en agar nutritivo mediante la técnica de siembra en superficie, y se incubaron a 4°, 10° y 20°C. Se aislaron 34 cepas bacterianas distintas en función de su morfología; para su identificación se analizaron las características macro y microscópicas, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas comunes, pruebas enzimáticas para determinar la actividad amilolítica, proteolítica y lipolítica, y pruebas de sensibilidad a antibióticos. El 73.53% de las bacterias aisladas fueron Gram negativas mientras que el 26.47% fueron Gram positivas, evidenciándose una baja resistencia a antibióticos; además, de acuerdo a los resultados de las pruebas fisiológicas se podrían sugerir los siguientes géneros: *Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *Neisseria sp.*, *Serratia sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.* Los glaciares del volcán Chimborazo cuentan con una amplia diversidad bacteriana psicrófila, la cual se encuentra en constante peligro a causa del incremento de la temperatura del planeta, por lo que se precisan estudios posteriores para la caracterización molecular de las cepas aisladas.

Palabras claves: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <BIOPROSPECCIÓN>, <BACTERIAS>, <PSICRÓFILOS>, < PSICROTROFOS >, <VOLCÁN CHIMBORAZO>, <GLACIARES TROPICALES>



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**



0527-DBRAI-UPT-2021

SUMMARY

The purpose of the current research was to characterize the psychrophilic bacterial strain of Chimborazo volcano tropical glaciers. It was necessary to carry out two samplings, one in summer (September) and the other in winter (February); they consisted on the collection of glacier ice samplings from three different points of the volcano. Some parameters like temperature, pH and electric conductivity were measured on-site, while some other parameters like pH, electric conductivity, color, turbidity, hardness, alkalinity and iron concentration were measured off-site. The samples were inoculated fivefold, both in agar R2A and in nutritive agar trough the surface seeding technique and were incubated at 4°, 10° and 20°C. 34 different bacterial strains were isolated according to their morphology; and for their identification it was necessary to analyze the macro and microscopic characteristics; then some common biochemical tests, enzymatic tests to determine the amylolytic, proteolytic and lipolytic activity and antibiotic sensitivity testing were carried out. 73% of isolated bacteria were Gram negative while 26.47% Gram positive, this evidences a low antibiotic resistance. In addition, according to the results obtained in the physiological tests the following types can be suggested: *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. The glaciers of Chimborazo volcano have a wide psychrophile bacterial diversity which is at permanent risk due to the increase in the temperature of the planet. Thus, it is necessary to carry out further studies for the molecular characterization of isolated strains.

Key words: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <BIOPROSPECTING>, <BACTERIA>, <PSYCHROPHILE>, <PSYCHROTROPHS>, <CHIMBORAZO VOLCANO>, <TROPICAL GLACIERS>.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático en la actualidad, es considerado uno de los principales factores que alteran los diferentes hábitats en el mundo. En Ecuador, la biodiversidad se ha visto en peligro por la destrucción de los ecosistemas a causa del incremento de la temperatura en el planeta.

La ubicación de nuestro país, además de su relieve, ha dado como resultado una gran variedad de ecosistemas y consigo una diversidad biológica inimaginable. Los pisos climáticos presentes en el Ecuador varían desde los cálidos, pasando por templado, frío (páramo) y hasta los más gélidos denominados glaciario o de alta montaña.

En el interior de los glaciares, existe una extensa diversidad microbiana por descubrir, hasta el momento, existe una gran cantidad de estudios que describen detalladamente la microbiota del Ártico y el Antártico, mientras que los estudios en los glaciares tropicales son mínimos, teniendo como resultado que la información sobre la microbiota procedente de los ecosistemas de alta montaña es escasa.

El estudio de microorganismos de hielo glaciario resulta interesante por tratarse de psicrófilos de alta tolerancia a: cambios en su ambientales, poca disponibilidad de nutrientes, elevadas radiaciones solares, altas presiones hidrostáticas, además de ser capaces de producir enzimas extracelulares y por consiguiente son de gran potencial biotecnológico (Rondón, et al. 2016, p.905). Resultando así, la bioprospección como estrategia de progreso para países en vías de desarrollo ricos en biodiversidad (Torres y Velho, 2009, p.96), la que consiste en la búsqueda de organismos o sus productos con la finalidad de valorar la biodiversidad para usarla a favor de la sociedad.

En este contexto, el Volcán Chimborazo cuenta con 22 glaciares, que en las últimas décadas se ha visto reducidos en un 59.8% de su masa (Caceres, 2010, p.54), los glaciares más afectados por el calentamiento global son Reiss, Stubel y Thielmann (Muñoz, 2010).

El incremento en la temperatura del planeta ha provocado el deshielo progresivo de los glaciares tropicales, lo que ha motivado a los investigadores a estudiar estos ecosistemas tan frágiles y a la vez tan importante para la vida y el desarrollo de los países andinos

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Caracterizar cepas bacterianas psicófilas de los glaciares tropicales en el Volcán Chimborazo.

Objetivos Específicos.

- Realizar la caracterización físico-química de las aguas obtenidas de los glaciares en el Volcán Chimborazo.
- Aislar cepas bacterianas de los glaciares en el Volcán Chimborazo.
- Identificar la biodiversidad bacteriana aislada, mediante pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas.
- Evaluar la resistencia de las cepas bacterianas a antibióticos.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

Los microorganismos extremófilos han llamado la atención de los científicos, en concreto las bacterias psicrófilas han atraído a los investigadores desde las primeras expediciones en la Antártida, no solo por las bajas temperaturas en las que viven, sino también por la falta de agua y nutrientes y las altas presiones a las que se encuentran expuestas. (Miteva, 2008, p.32)

Las bacterias psicrófilas varios años atrás eran de interés para un grupo pequeño de investigadores, en la actualidad las bacterias psicrófilas son de gran interés para un gran grupo de investigadores ya que estas bacterias producen proteínas anticongelantes en su membrana, sustancias poliméricas extracelulares a partir de hidratos de carbono, además son de gran importancia en el mundo actual ya que han ayudado al desarrollo biotecnológico como la producción de detergentes activos en frío, la producción de biocombustibles y procesamiento de alimentos a bajas temperaturas, entre muchos otros.

En la actualidad existe un sinnúmero de publicaciones de estudios de bacterias psicrófilas y psicrotolerantes obtenidas a partir de los deshielos en los glaciares polares ya que estos se han visto deteriorados por el calentamiento global, sin embargo, los glaciares tropicales de igual manera han sido afectados por los efectos del cambio climático.

El incremento en la temperatura del planeta ha causado el deshielo progresivo de los glaciares en las zonas tropicales de nuestro planeta, lo que ha motivado a los investigadores a estudiar estos ecosistemas tan frágiles y a la vez tan importante para la vida y el desarrollo de los países andinos.

En América del Sur se ha publicado estudios de la diversidad bacteriana en glaciares, en concreto Ball y otros (2013), Rondón y otros, (2016) estudiaron cepas bacterianas en los Andes Tropicales de Venezuela; en Perú, González-Toril y otros (2015) realizaron estudios de pirosecuenciación en bacterias de glaciares del Parque Nacional Huascarán. En Ecuador se ha reportado estudios de bacterias psicrófilas a elevadas altitudes en la laguna Amarilla del nevado El Altar realizado

por Moreno (2017) y el estudio de la producción de compuestos bioactivos a partir de psicrófilas por Díaz y Estrada (2018).

1.2. Microorganismos Extremófilos

Se considera microorganismos a organismos muy pequeños que no se pueden observar a simple vista, los cuales se los puede observar mediante la ayuda de un microscopio; es un grupo grande y diverso de organismos estructuralmente sencillo, pero realizan todos los procesos vitales que tienen lugar en organismos superiores; se considera microorganismos a los virus, bacterias, protozoos, algunas algas y algunos hongos. (Prescott et al., 2004, p.2)

Los microorganismos conservan una amplia diversidad genética y metabólica en comparación a otros seres vivos (Madigan et al., 2009, p3), por lo que, sumado a su crecimiento rápido y su facilidad de intercambio de genes, les han permitido supervivir en cualquier habiada natural y adaptarse a condiciones variables. (Oliart-Ros et al., 2016, p80)

Los microorganismos “extremófilos” se caracterizan por ser capaces de desarrollarse en condiciones que se podrían considerar como extremas para los seres humanos y seres vivos en general. Un ambiente extremo se puede considerar aquel donde se presenten temperaturas muy elevadas o bajas, alta salinidad, alta alcalinidad o alta acidez. (Ramírez et al., 2006, p.57)

Los extremófilos han sido de gran interés científico, y en particular para la biotecnología, debido a sus características para resistir las condiciones de su entorno. Además, la existencia de microorganismos en ambientes hostiles hace especular la existencia de vida en otros planetas. (Ramírez et al., 2006, p.57)

La temperatura, es un factor que limita el desarrollo de los microorganismos, por tal motivo varios autores clasifican a los microorganismos según la temperatura optima de crecimiento.

Tabla 1-1: Clasificación de los microorganismos en función de la temperatura de crecimiento.

Microorganismos	Descripción
Hipertermófilos	Temperatura óptima mayor de 80 °C y la máxima entre 110 y 113 °C.
Termófilos	Desde 45 °C
Mesófilos	Temperatura óptima cerca de 37 °C. Crecer en torno a 25 a 45 °C.
Psicrófilos	Temperaturas por debajo de 5 °C y con temperaturas Psicrófilos máximas de 20°C.

Fuente: (Ramírez et al., 2006, p.58)

Elaborado por: Silva Edwin, 2020

1.3. Microorganismos Psicrófilos

Los microorganismos psicrófilos tienen la capacidad de crecer activamente en ambientes permanentemente frías e incluso a temperaturas bajo cero. (Rondón, et al. 2016, p.906) Un microorganismo psicrófilo se lo puede definir como aquel que tiene una temperatura de desarrollo óptima en torno de 15 °C, una temperatura de crecimiento máxima por debajo de 20 °C y mínima de 0 °C o más baja. (Madigan et al., 2009, p.176)

Estos microorganismos fueron trasladados desde diferentes ecosistemas, en partículas de polvo por acción del viento, este motivo indica su variedad taxonómica y funcional. Algunas algas y bacterias se desarrollan en la superficie de glaciares, presentando colores característicos. (Yarzabal, 2020, p3) (Madigan et al. 2009, p.176)

Los glaciares, además de contar con una amplia diversidad microbiana, se los considera como archivos de formas de vida antigua. Por tal motivo, muchos microorganismos depositados en las aquellas superficies siguieron siendo viables después de mucho tiempo. Es así que, algunos han evolucionado en el mismo lugar y se han adaptado a las condiciones extremas. (Yarzabal, 2020, p.3)

La resistencia a bajas temperaturas está determinada por la síntesis de proteínas en los ribosomas para crecimiento en frío y soportar el shock térmico. Además, en su membrana la producción de ácidos grasos insaturados con cadena más corta de lo común. (Russell, 1997, p.490)

Según Christner et al. (2008, p.63), Miteva y Brenchley (2005, p.7809) y Rondón, et al. (2016, p.908) en los glaciares la densidad bacteriana presente es baja, de 4.4×10^4 a 1.9×10^5 células/ml en hielo glacial, de 1.2×10^4 células/ml en hielo de acreción y de 4.1×10^5 a 9.6×10^5 células/ml en agua de deshielo subglaciar.

1.3.1. Microorganismos psicrótrofos

También conocidos como psicrófilos facultativos o psicrotolerantes, los psicrótrofos son microorganismos que se caracterizan por poder crecer a 0 °C, aunque su temperatura óptima sea de 20 a 30 °C e incluso hasta 40 °C. (Prescott et al., 2004, p.134) (Madigan et al., 2009, p.176)

1.3.2. Adaptaciones moleculares en psicrófilos

Los psicrófilos cuentan con mecanismos que permiten su supervivencia, dichos mecanismos se han desarrollado durante un largo tiempo gracias a las condiciones “extremas” de su entorno.

Las principales adaptaciones de los psicrófilos han sido la inactividad inducida dependiendo la estación del año, la producción de pigmentos, exopolisacáridos y capas de protección para la radiación UV y la producción de enzimas crioprotectores para prevenir la lisis celular. (Hoover y Pikutab, 2010, p.2)

Una característica particular, es la producción de crioprotectores, son moléculas protectoras de las células psicrófilas, su ventaja radica en reducir el daño causado por cristales de hielo, lo cual pone en peligro la membrana celular. (Yarzabal, 2020, p.3)

Los psicrófilos, igualmente originan enzimas las cuales funcionan de manera óptima en el frío, como es el caso de proteasas con actividad catalítica por debajo de 0 °C (Rossi et al., 2003, p.3689) y que se desnaturalizan o inactivan incluso a temperaturas muy moderadas, las enzimas de psicrófilos se caracterizan por tener más aminoácidos polares y menos aminoácidos hidrofóbicos. (Madigan et al., 2009, p.177).

Entre las enzimas producidas tenemos de enzimas degradadoras de moléculas como almidón, lípidos, caseína, pectina, celulosa, quitina, etc.

Tabla 2-1: Enzimas de microorganismos psicrófilos y sus aplicaciones.

Enzima	Aplicación
Proteasas	Detergentes, alimentos
Amilasas	Detergentes y panadería
Celulasas	Detergentes, alimentos y textiles
Deshidrogenasas	Biosensores
Lipasas	Detergentes, alimentos y cosméticos

Fuente: (Ramírez et al, 2006, p.60)

Elaborado por: Silva Edwin, 2020

Otra particularidad que caracteriza a los psicrófilos, es la composición de su membrana citoplasmática, la cual tiene mayor cantidad de ácidos grasos no saturados en comparación a los mesófilos, que a temperaturas bajas permite que el transporte activo funcione de mejor manera. (Madigan et al., 2009, p.177)

1.4. Bioprospección de Psicrófilos

1.4.1. Bioprospección

Definida como la exploración de organismos vivos en ambientes naturales, la bioprospección busca dar un valor comercial a estos organismos y sus productos. (Torres y Velho, 2009, p.97) Es descrita como una oportunidad para hallar, estudiar, comprender, y aprovechar los organismos vivos como plantas animales y microorganismos; además de comprender el manejo de manera correcta de los recursos y proponer nuevos usos. (Melgarejo et al., 2002, p.6)

1.4.2. Bioprospección de bacterias extremófilas

Los hábitats de las bacterias extremófilas se creía lugares carentes de vida, al momento se conoce que las bacterias extremófilas habitan en glaciares, aguas salinas, sistemas hidrotermales, sitios ácidos o alcalinos y ambientes con alta presión (Oliart et al., 2016, p.83), dichos hábitats proporcionan condiciones adversas, forzando a las células a adquirir ciertas características atractivas para la biotecnología.

1.4.3. Bioprospección de bacterias psicrófilas.

Las bacterias psicrófilas investigadas por sus particulares utilidades, son de gran interés, llevando a investigadores a zonas donde el frío extremo es un factor que complica las actividades de búsqueda de dichos microorganismos.

Según (Russell, 1997, p.13), la existencia de bacterias psicrófilas en ambientes gélidos producen compuestos biológicos de gran utilidad para la biotecnología en bajas temperaturas. Al mismo tiempo, las bacterias psicrófilas se pueden usar como bioherramientas como es el caso de los biofertilizantes.

Los glaciares no polares, tienen un área alrededor de 15.8 millones de km², ellos, los microorganismos sobreviven en canales líquidos entre de las pequeñas masas de hielo y en la delgada película líquida en las superficies. (Santiago et al., 2016, p.1)

1.5. Aplicaciones de los psicrófilos.

Los microorganismos psicrófilos y sus biomoléculas son de gran ayuda para los procesos biotecnológicos, entre los que podemos mencionar están los detergentes para agua fría, aditivos alimentarios y modificadores de sabor, biosensores y para la biorremediación ambiental. (Hoover y Pikutab, 2010, p.3)

Las bacterias psicófilas producen exoenzimas de gran valor para la industria y la biotecnología, por su característica de resistir cambios en la temperatura. La industria se ha visto beneficiada con el uso de dichas bacterias, entre las principales se encuentra la creadora de detergentes, la alimenticia y la farmacéutica. (Oliart et al., 2016, p.84)

Tabla 3-1: Principales bacterias y enzimas aplicados a la industria.

Microorganismos	Enzimas	Aplicación
Pseudoalteromonas sp.	Proteasas	Detergentes, industria de alimentos
Cytophaha sp.	Amilasas	Detergentes y panificación
Vibrio sp.	Deshidrogenasas	Biosensores
	Lipasas	Detergentes, alimentos y cosméticos

Fuente: Ramírez et al, 2006, p.61

Elaborado por: Silva, Edwin, 2019

Otro uso de las bacterias psicófilas es la producción de biofertilizantes, el cual consiste en preparaciones de microorganismos vivos los cuales ayudan a los cultivos en la absorción de elementos esenciales para su crecimiento (Balcazar et al., 2015, p.1), tal es el caso del genero *Pseudomonas spp.* el cual es considerado como promotor de crecimiento de plantas, además de actuar como agente de biocontrol. (Yarzabal et al., 2018, p.2343)

Dadas las características que presentan los psicrófilos Hoover y Pikutab, (2010, p.31) y sus hábitats con condiciones extremas, el interés por la astrobiología ha crecido en los últimos años por la creencia de vida atrapada en planetas criogénicos del sistema solar Margesin y Miteva (2011, p.356), ya que se cree que los psicofísicos se originaron en otra parte del Cosmos y se trasladados a la Tierra por cometas o meteoritos.

1.6. Ambientes fríos

Aproximadamente el 85% de nuestro planeta presenta una temperatura inferior a 5 °C, la mayoría de los ambientes con bajas temperaturas están representados por las profundidades de los mares, las superficies nevadas, las grandes masas polares, los glaciares, permafrost y hielo marino. Otros ambientes fríos son lagos gélidos, subsuelos, desiertos fríos y cuevas. (Margesin y Miteva, 2011, p.346)

1.6.1. Criósfera

La criósfera en nuestro planeta, se considera a toda porción de la tierra donde se encuentra el agua en estado sólido; se puede dividir en criósfera continental, marina y aérea. (Wang et al., 2019, p.124)

La criósfera está constituida en la tierra por glaciares, nieve, hielo marino, hielo lacustre y fluvial, permafrost y hielo de nubes. (Qin et al., 2018, p.256)

1.6.1.1. Glaciar

Se considera glaciar a las formaciones de hielo perdurables, con distintos tamaños y formas, su formación ocurre donde las condiciones climáticas y topográficas ayudan a la acumulación de la nieve durante varios años y progresivamente sufra un proceso de compresión para finalmente transformarse en hielo. (Climate Action Network Latino América, 2014, p.3)

Existen dos tipos de glaciares naturales, los glaciares polares y los glaciares tropicales, la diferencia radica en la ubicación que se encuentra en el planeta tierra, siendo los glaciares polares los que se encuentran en los Polos Norte y Sur, mientras que los glaciares tropicales son los que se encuentran ubicados en las regiones más cálidas del planeta, en latitudes donde las estaciones no existen, por lo que no acumulan hielo y estos son relativamente pequeños. Por esta razón, son especialmente sensibles a los cambios climáticos y son considerados como excelentes indicadores del calentamiento global.

En un glaciar, las masas de hielo se clasifican en tres según su temperatura: frío, politermal y templado. Las masas de hielo frío son aquellas que tienen una temperatura bajo cero, el agua se encuentra presente entre los cristales de hielo en bajas cantidades; las masas de hielo politermal se caracteriza por tener una temperatura cercana a la temperatura de fusión, mientras que la temperatura de las masas de hielo templado se encuentra en el punto de fusión, estas masas de hielo se ubican en latitudes medias y bajas. (Christner et al., 2008, p.53)

1.7. Reserva de Producción de Fauna Chimborazo.

La Reserva de Producción de Fauna Chimborazo se creó mediante el Acuerdo Ministerial No. 437 en octubre de 1987 publicado en el Registro Oficial No. 806 del 9 de noviembre del mismo año. Dicha Reserva se encuentra en las provincias de Chimborazo, Bolívar y Tungurahua, con una extensión total de 58560 hectáreas. La altura va desde los 3800 m.s.n.m. en la parte más baja, hasta 6268 m.s.n.m., a la altura de la cumbre Whymper del nevado Chimborazo; el clima que presenta es frío andino con temperaturas desde los 0 a 10 °C. (Ministerio del Ambiente, 2013)

1.7.1. Volcán Chimborazo

El Chimborazo es el volcán activo más alto de los Andes del Norte en América del Sur con una altura máxima de 6268 m.s.n.m., ubicado en la Cordillera Occidental de Ecuador a 150 km al suroeste de Quito y 28 km al noroeste de la ciudad de Riobamba, es un estratovolcán que se encuentra en el suroeste del arco volcánico ecuatoriano la denominada "Avenida de los Volcanes". (Ministerio del Ambiente, 2013)

En siglos pasados, varios investigadores como Humboldt, Whymper, Meyer, Reiss y Stübel se han fascinado por la majestuosidad del relieve del volcán Chimborazo y, además, de contar con flancos empinados y una gran capa de glaciar. (Samaniego et al., 2012, p.34)

El glaciar del volcán Chimborazo presenta precipitaciones provenientes de dos lados opuestos, al lado oeste siendo alimentado por masas de aire del Océano Pacífico y al lado este alimentado por masas de aire de la cuenca del Amazonas, en general presenta una precipitación media anual que varía de 500 -1000 mm/a, estas variaciones en la precipitación se ve afectada por dos estaciones lluviosas (febrero - mayo y octubre - noviembre) y dos estaciones secas, la primera llamada comúnmente "Verano" (junio - septiembre) mucho más pronunciada que la segunda en el mes de diciembre. (Vuille et al., 2000, p2523) (Clapperton, 1990, p.93)

1.8. Caracterización fenotípica

La identificación de bacterias, en la actualidad se realiza en base a varios métodos. La caracterización fenotípica es un método clásico comúnmente usado, en base a características como la morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. (Sosa López et al., 2011, pp.39-40) (Bou et al., 2011, p.602)

1.8.1. Características macroscópicas de las colonias

Las características visibles de las colonias en la superficie del medio de cultivo, permiten dar una primera identificación a las unidades formadoras de colonias (UFC), ya que cada una cuenta con aspectos característicos propios. (Prescott et al., 2004, p.114)

Las características usadas se describen a continuación en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Características de las colonias.

Característica	Pigmentación	Superficie	Forma	Elevación	Borde	Característica óptica	Consistencia
Clasificación	Color observable	- Lisa - Rugosa	- Puntiforme - Circular - Filamentosa - Irregular - Rizoide - Fusiforme	- Plana - Elevada - Convexa - Pulvinada - Umbonada	- Entero - Ondulado - Lobulado - Erosionado - Filamentoso	- Opaca - Traslúcida - Transparente	- Cremosa - Membranosa

Fuente: Pérez y Mota, 2006, p.23; Prescott et al., 2004, p.114

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

La clasificación de características de borde, forma y elevación se detallan a continuación en la Figura 1-1.

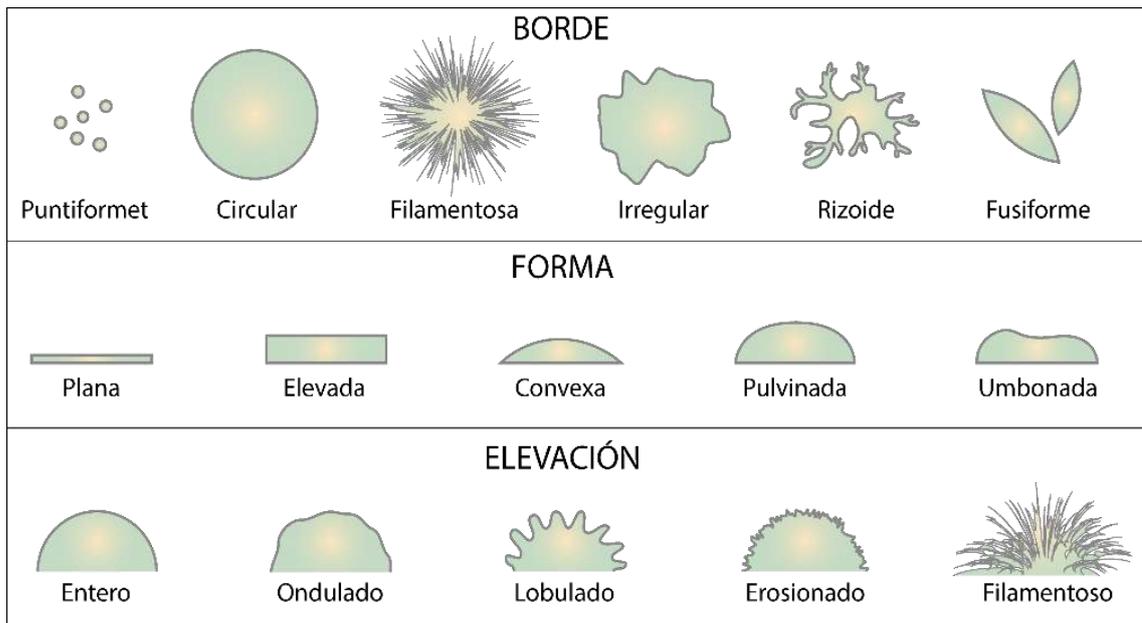


Figura 1-1: Morfología de colonias bacterianas.

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

1.8.2. Características microscópicas

1.8.2.1. Morfología

La morfología de una bacteria se refiere a las formas que toman las células, y mediante la observación en un microscopio se puede definir dicha morfología. (Madigan et al., 2009, p74). Las principales morfologías se representan en la Figura 2-1.

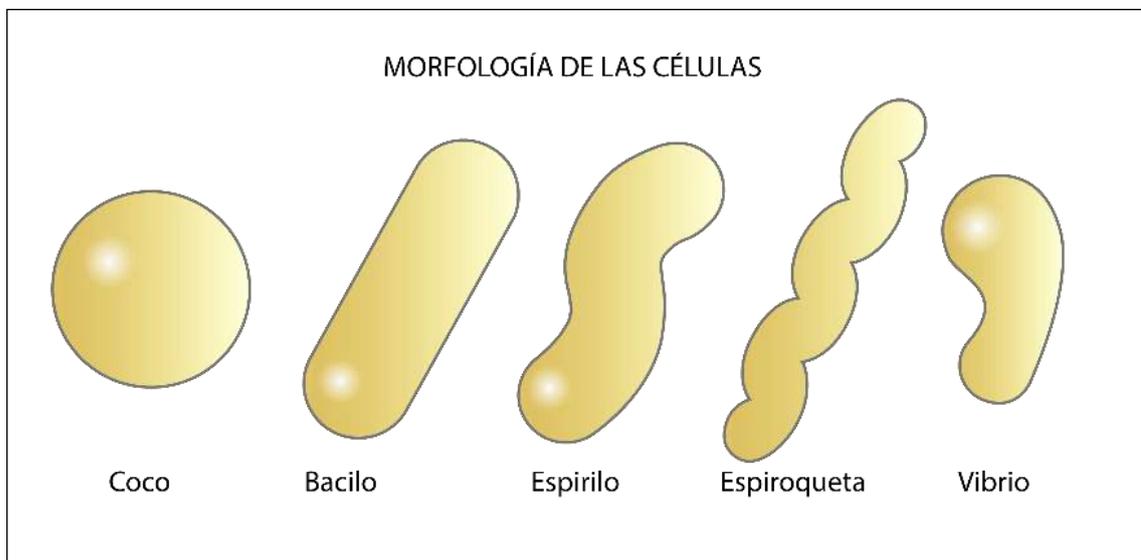


Figura 2-1: Morfologías de las células.

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

1.8.2.1. Tinción diferencial de Gram

La tinción Gram, es una técnica usada para clasificar a las bacterias en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas. La técnica consiste en la tinción de la pared de las células, las bacterias Gram positivas tomaran un color morado, mientras que las bacterias Gram negativas se tornaran rosadas o rojas. (Bonilla et al., 2006, p.38)

1.8.3. Pruebas fisiológicas

La caracterización a partir de la fisiología de una bacteria, es comúnmente usada como ayuda para determinar el género de esta, dentro de las pruebas fisiológicas tenemos las pruebas bioquímicas y las pruebas de producción de enzimas.

1.8.3.1. Pruebas bioquímicas

- Prueba de Oxidasa

La prueba de la oxidasa es usada para determinar la existencia de la enzima oxidasa, esta prueba se usa para diferenciar entre la familia *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*, y entre géneros *Moraxella* (+), *Neisseria* (+) y *Acinetobacter* (-). (MacFaddin, 2003, p.344)

- Prueba de Catalasa

Esta prueba se usa para determinar la presencia de la enzima oxidasa, se usa una disolución de peróxido de hidrogeno al 3%. Esta prueba ayuda a diferenciar *Streptococcus* (-) de *Micrococcus* (+) o *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-). (MacFaddin, 2003, p.73)

- Prueba de Ureasa

Prueba destinada para determinar la enzima ureasa, se la realiza por medio del medio de cultivo agar de urea de Christensen, donde las bacterias usan la urea como única fuente de nitrógeno. Se usa para detectar bacterias del genero *Enterobacter* y *Proteus* las cuales dan positivo ante esta prueba. (MacFaddin, 2003, p.400)

- Prueba de Sulfuro, Indol y Motilidad

El medio de cultivo SIM es utilizado para diferenciar entre bacilos de la familia *Enterobacteriaceae*, de acuerdo a la producción de sulfuro de hidrogeno H₂S, formación de indol y motilidad de las células. (Zimbro et al., 2009, p.482)

- Prueba de fermentación de azúcares

El agar TSI (Triple Sugar Iron Agar) sirve para diferenciar bacilos entéricos gramnegativos por medio de la fermentación de tres azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa) y la producción de sulfuro de hidrogeno. (Zimbro et al., 2009, p.565)

- Prueba de Citrato

La prueba de citrato se utiliza para determinar si una bacteria usa el citrato como única fuente de carbono, se lo realiza por medio del agar citrato Simmons. Es usado para diferenciar géneros en especial de la familia *Enterobacteriaceae*. (MacFaddin, 2003, p 92)

1.8.3.2. Pruebas enzimáticas

Las pruebas enzimáticas tienen como objetivo observar la producción de enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas.

- **Hidrolisis de Almidón**

La prueba de hidrolisis del almidón, consiste en la obtención de la enzima amilasa, la cual divide la molécula de almidón en maltosa y glucosa, estos azúcares son usados por la célula como fuente de carbono y de energía. (Alarcón, 2004, p.35)

- **Hidrolisis de Lípidos**

Las enzimas que hidroliza los lípidos se denominan lipasas, los ácidos grasos resultantes por hidrolisis de lípidos, son usados como fuente de energía para la célula.

- **Degradación de Caseína**

La degradación de la caseína se obtiene por medio de la acción de la enzima caseinasa, al mezclar un medio de cultivo con leche, el medio se torna turbio ya que los aminoácidos se dispersan, cuando la enzima caseinasa actúa sobre el medio este se torna transparente. (Alarcón, 2004, p.36)

1.8.3.3. Identificación de bacterias

La identificación bacteriana se puede realizar de dos formas: una mediante la observación de las características fenotípicas de un organismo y otra por la relación entre los ancestros y los organismos vivos, conocida como filogenética.

Una identificación clásica se basa en características fenotípicas de las bacterias, comportamiento en los medios de cultivo morfología, degradación de macromoléculas, propiedades bioquímicas, fisiológicas y nutricionales. (Gobernado y López 2003)

Mediante la Figura 3-1 se puede estimar el género de una bacteria mediante la caracterización fenotípica.

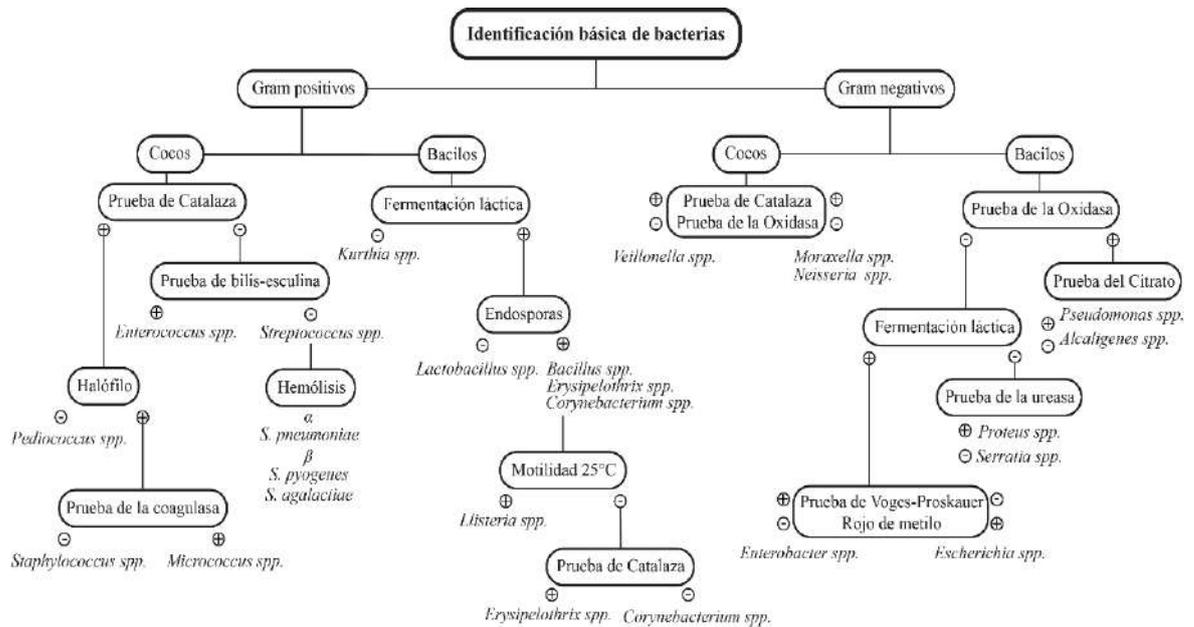


Figura 3-1: Identificación de bacterias

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

1.8.4. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

La prueba de sensibilidad a antibióticos, consiste en observar el comportamiento de una bacteria que se encuentra en presencia de distintos antibióticos. Se considera antibiótico a un conjunto de sustancias, que producen acciones específicas en un microorganismo, cuentan con una toxicidad selectiva en mínimas concentraciones. (Seija y Vignoli, 2006, p.631)

Los antibióticos pueden dividirse en dos grupos, en bacteriostáticos y bactericidas. Los agentes bacteriostáticos impiden el crecimiento y reproducción de las bacterias mientras que los agentes bactericidas no solo impiden el crecimiento sino también producen la muerte celular. (Cavaliere et al., 2005, p.6)

1.8.4.1. Métodos de Acción de Antibióticos

Los agentes antibióticos se pueden clasificar dependiendo su acción en las células bacterianas. Los agentes pueden: interferir con la síntesis de péptidoglicano en la pared celular, inhibir la síntesis proteica, interferir con la síntesis de ADN, o inhibir de rutas metabólicas (Seija y Vignoli, 2006, p.632). Para el presente estudio se decidió contar con los siguientes antibióticos:

La oxitetraciclina es un antibiótico del grupo de las tetraciclinas son agentes bactericidas, cuyo mecanismo es la inhibición de síntesis de proteínas por unión a la subunidad 30S del ribosoma, usados para el control de bacterias Gram positivos y negativos. (Bado et al. 2008)

La penicilina perteneciente al grupo de betalactámicos es un antibiótico bactericida de acción lenta, se caracterizan por poseer un anillo betalactámico el cual inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias, comúnmente usado frente a microorganismos Gram positivos, Gram negativos y espiroquetas. (Seija y Vignoli 2006, p.634)

La cefalexina es un antibiótico bactericida perteneciente al grupo de cefalosporinas de primera generación, de acción inhibitoria similar a las penicilinas, usadas contra infecciones de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. (Rivas et al. 2002)

La gentamicina perteneciente al grupo de los aminoglucósidos es un antibiótico cuyo mecanismo de acción es la inhibición de proteínas mediante la adhesión de aminoazúcares a la subunidad 30 S del ribosoma impidiendo la lectura correcta del material genético. (Seija y Vignoli 2006, p.640-641)

1.8.4.2. Mecanismos de Resistencia

Existe varios mecanismos para que una bacteria llegue a ser resistente a antibióticos, entre los cuales encontramos: producción de enzimas destructoras del antibiótico, desarrollar una pared celular impermeable a los antibióticos, mutaciones que no permiten la unión con el agente antibiótico, flujos a partir de la célula que repele el agente antibiótico y rutas metabólicas alteradas genéticamente para impedir el efecto del antibiótico. (Cavalieri et al., 2005, p.8)

La causa común de resistencia a antibióticos es mediante mutación de material genético, más conocido como transferencia horizontal de genes. Existen tres mecanismos de transferencia: transformación, transducción y conjugación.

El mecanismo de transformación reside en la captación de ADN libre en el ambiente por una bacteria, la transferencia mediante transducción radica en el intercambio genético entre bacterias por medio de un bacteriófago y la transferencia mediante conjugación consisten en la transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante un plásmido. (Rozo y Dussán 2010, p.23-24)

Capítulo II

2. MARCO METODOLÓGICO

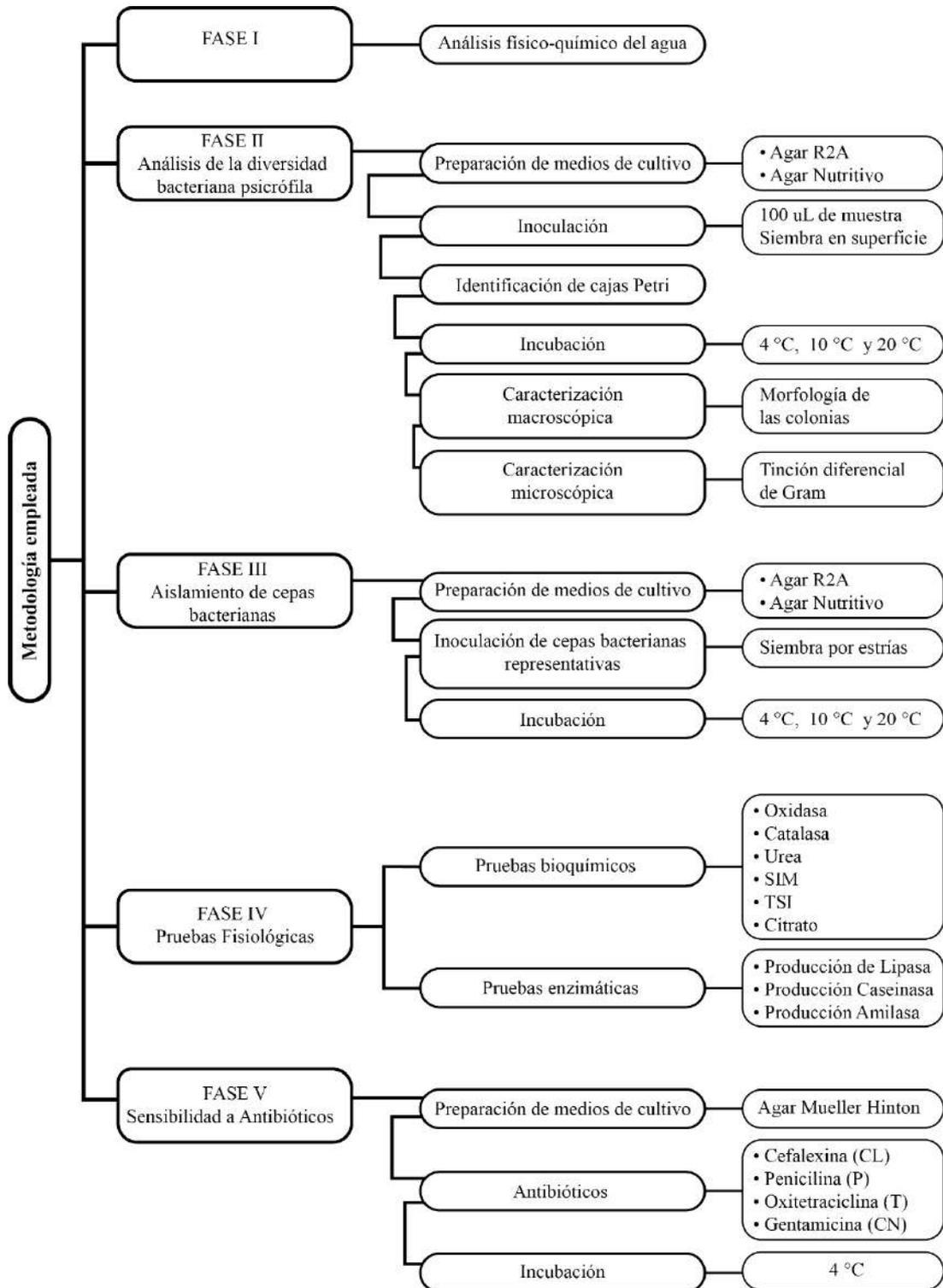


Figura 1-2: Metodología empleada

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

2.1. Tipo de Investigación

El tipo de investigación es exploratorio, por tratarse de un estudio destinado a obtener información y solucionar dificultades del que se tiene poca información, la metodología a usada sirve para validar o rechazar la hipótesis.

2.2. Diseño de la Investigación

Para el presente estudio se utilizará el método de investigación mixto y según la manipulación de variables independientes (temperatura, medio de cultivo) se utilizará un diseño experimental completamente al azar para relacionar los resultados de las muestras de agua de los deshielos de los glaciares los mismos que contarán con cinco repeticiones para punto de muestreo.

Tabla 1-2: Codificación de cajas Petri.

Septiembre							Febrero					
Agar R2A			Agar Nutritivo				Agar R2A			Agar Nutritivo		
Punto T°	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
4 °C	R111S	R211S	R311S	N111S	N211S	N311S	R111F	R211F	R311F	N111F	N211F	N311F
	R112S	R212S	R312S	N112S	N212S	N312S	R112F	R212F	R312F	N112F	N212F	N312F
	R113S	R213S	R313S	N113S	N213S	N313S	R113F	R213F	R313F	N113F	N213F	N313F
	R114S	R214S	R314S	N114S	N214S	N314S	R114F	R214F	R314F	N114F	N214F	N314F
	R115S	R215S	R315S	N115S	N215S	N315S	R115F	R215F	R315F	N115F	N215F	N315F
10 °C	R121S	R221S	R321S	N121S	N221S	N321S	R121F	R221F	R321F	N121F	N221F	N321F
	R122S	R222S	R322S	N122S	N222S	N322S	R122F	R222F	R322F	N122F	N222F	N322F
	R123S	R223S	R323S	N123S	N223S	N323S	R123F	R223F	R323F	N123F	N223F	N323F
	R124S	R224S	R324S	N124S	N224S	N324S	R124F	R224F	R324F	N124F	N224F	N324F
	R125S	R225S	R325S	N125S	N225S	N325S	R125F	R225F	R325F	N125F	N225F	N325F
20 °C	R131S	R231S	R331S	N131S	N231S	N331S	R131F	R231F	R331F	N131F	N231F	N331F
	R132S	R232S	R332S	N132S	N232S	N332S	R132F	R232F	R332F	N132F	N232F	N332F
	R133S	R233S	R333S	N133S	N233S	N333S	R133F	R233F	R333F	N133F	N233F	N333F
	R134S	R234S	R334S	N134S	N234S	N334S	R131F	R231F	R331F	N134F	N234F	N331F
	R135S	R235S	R335S	N135S	N235S	N335S	R132F	R232F	R332F	N135F	N235F	N332F

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

2.3. Unidad de análisis

Muestras de agua en tres puntos diferentes de los glaciares tropicales del volcán Chimborazo, en la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo.

2.4. Localización del Estudio

El muestreo del presente estudio se llevó a cabo de forma in-situ en los glaciares del volcán Chimborazo, ubicado en la Cordillera Andina Occidental del Ecuador, en la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo, en el límite de las provincias de Chimborazo, Bolívar y Tungurahua, a 150 kilómetros al suroeste de Quito y 28 km al noroeste de la ciudad de Riobamba, el estudio continuó de manera ex-situ en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en la Panamericana Sur km 1 ½.

2.4.1. Georreferenciación del sitio de muestro

Tabla 2-2: Georreferenciación de puntos de muestro.

Punto de muestro	Coordenadas UTM
P1	0741616 , 9837474
P2	0740953, 9837379
P3	0740892, 9837621

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020



Figura 1-2: Ubicación Volcán Chimborazo

Fuente: Google Earth, 2020

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

2.5. Parte Experimental

2.5.1. FASE I: Análisis físico-químico del agua.

Se recolectó muestras de hielo glaciario en tres puntos distintos del volcán Chimborazo denominados como P1, P2 y P3, en dos épocas durante el año, seca (septiembre) y lluviosa (febrero).

Se recolectó 1000 ml de muestra en una botella color ámbar para su preservación ante la luz, se enjuagó tres veces la botella con la muestra (NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2176:2013, p.5), posteriormente se llenó con la muestra por completo procurando no dejar aire para evitar cambios en su composición, posteriormente se transportaron a <4 °C al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo el mismo día de su recolección.

2.5.2. FASE II: Análisis de la diversidad bacteriana.

En la base del glaciario se descartó 5 cm de la superficie, para extracción de la muestra se utilizó un tornillo de hielo de 17 cm de largo previamente esterilizado por llama directa (Rondón et al. 2016, p.906), para la recolección de muestras se utilizó frascos de polipropileno de 100 ml estériles, el frasco se enjuagó tres veces con la muestra para evitar contaminación al interior y se transportaron a <4 °C (NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2176:2013, p.5) al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo el mismo día de su recolección.

2.5.2.1. Análisis microbiológico del agua

Para obtener la mayor cantidad de biodiversidad bacteriana se optó por usar dos medios de cultivo distintos, un medio de cultivo con abundantes nutrientes “Agar Nutritivo” y un medio de cultivo con nutrientes limitados “Agar R2A”.

2.5.2.2. Preparación de medios de cultivo

- Agar R2A

Se disolvió 18.2 g del medio de cultivo agar R2A en polvo Difco™ en 1 L de agua destilada, se procedió a calentar y agitar frecuente hasta llegar a hervir durante 1 minuto para obtener la

completa dilución del polvo. Finalmente se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tabla 3-2: Composición del medio de cultivo Agar R2A.

Compuesto	Concentración g/L
Extracto de levadura	0.5
Proteosa Peptona No. 3	0.5
Ácidos Casamino	0.5
Dextrosa	0.5
Almidón soluble	0.5
Piruvato de sodio	0.3
Fosfato dipotásico	0.3
Sulfato de magnesio	0.05
Agar	15.0

Fuente: Zimbardo et al. 2009, p.461

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

- Agar Nutritivo

Se disolvió 23 g del medio de cultivo agar nutritivo en polvo Difco™ en 1 L de agua destilada, se procedió a calentar y agitar frecuente hasta llegar a hervir durante 1 minuto para obtener la completa dilución del polvo. Finalmente se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tabla 4-2: Composición del medio de cultivo Agar Nutritivo.

Compuesto	Concentración g/L
Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Agar	15.0

Fuente: (Zimbardo et al. 2009, p.398)

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

2.5.2.3. Inoculación

Las muestras obtenidas fueron inoculadas en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias. Con ayuda de una micropipeta, se sembró 100 uL de agua de glaciador de cada punto de

muestreo (Ciesielski, et al. 2014, p.596), en las cajas que contenían los medios de cultivo Agar R2A (Ball et al. 2014, p.933) (Bowman, 2001, p.593) y Agar Nutritivo (Silva et al. 2018, p.1508), con un asa de Drigalsky, previamente esterilizada, se extendió la muestra uniformemente por toda la superficie del agar. Este procedimiento se realizó por quintuplicado.

2.5.2.4. Codificación

El nombre usado para la identificación de cada caja Petri se lo realizó mediante un código alfanumérico, el mismo que contiene dos letras y tres números; la primera letra indica el medio de cultivo a utilizarse (P: Plate Count Agar o N: Nutrient Agar), el segundo dígito indica el punto de muestreo, el tercer dígito indica la temperatura de incubación a la que será sometida la caja (1: 4 °C, 2: 10 °C y 3: 20 °C), el cuarto dígito indica el número de réplica realizada en la siembra y la última letra indica la época de muestreo (S: Septiembre o F: Febrero).

Tabla 5-2: Codificación de cajas Petri para agar R2A el mes de septiembre.

Punto Temperatura	Punto 1	Punto 2	Punto 3
4 °C	R111S	R211S	R311S
	R112S	R212S	R312S
	R113S	R213S	R313S
	R114S	R214S	R314S
	R115S	R215S	R315S
10 °C	R121S	R221S	R321S
	R122S	R222S	R322S
	R123S	R223S	R323S
	R124S	R224S	R324S
	R125S	R225S	R325S
20 °C	R131S	R231S	R331S
	R132S	R232S	R332S
	R133S	R233S	R333S
	R134S	R234S	R334S
	R135S	R235S	R335S

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

Tabla 6-2: Identificación de cajas Petri para agar Nutritivo el mes de septiembre.

Punto Temperatura	Punto 1	Punto 2	Punto 3
4 °C	N111S	N211S	N311S
	N112S	N212S	N312S
	N113S	N213S	N313S
	N114S	N214S	N314S
	N115S	N215S	N315S
10 °C	N121S	N221S	N321S
	N122S	N222S	N322S
	N123S	N223S	N323S
	N124S	N224S	N324S
	N125S	N225S	N325S
20 °C	N131S	N231S	N331S
	N132S	N232S	N332S
	N133S	N233S	N333S
	N134S	N234S	N334S
	N135S	N235S	N335S

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

Tabla 7.2: Identificación de cajas Petri para agar R2A el mes de febrero.

Punto Temperatura	Punto 1	Punto 2	Punto 3
4 °C	R111F	R211F	R311F
	R112F	R212F	R312F
	R113F	R213F	R313F
	R114F	R214F	R314F
	R115F	R215F	R315F
10 °C	R121F	R221F	R321F
	R122F	R222F	R322F
	R123F	R223F	R323F
	R124F	R224F	R324F
	R125F	R225F	R325F
20 °C	R131F	R231F	R331F
	R132F	R232F	R332F
	R133F	R233F	R333F
	R131F	R231F	R331F
	R132F	R232F	R332F

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

Tabla 8-2: Identificación de cajas Petri para agar Nutritivo el mes de febrero.

Punto Temperatura	Punto 1	Punto 2	Punto 3
4 °C	N111F	N211F	N311F
	N112F	N212F	N312F
	N113F	N213F	N313F
	N114F	N214F	N314F
	N115F	N215F	N315F
10 °C	N121F	N221F	N321F
	N122F	N222F	N322F
	N123F	N223F	N323F
	N124F	N224F	N324F
	N125F	N225F	N325F
20 °C	N131F	N231F	N331F
	N132F	N232F	N332F
	N133F	N233F	N333F
	N134F	N234F	N331F
	N135F	N235F	N332F

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

2.5.2.5. Incubación

Las cajas inoculadas fueron incubadas a diferentes temperaturas cada una, a 4 °C (Ciesielski et al., 2014, p.596), 10 °C y 20 °C (Rondón, et al. 2016, p.906) durante un periodo de hasta 15 días donde se observó la presencia de colonias.

2.5.2.6. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica consistió en la observación de la morfología de cada colonia, teniendo en cuenta las siguientes características: color, superficie, forma, elevación, borde, características ópticas y consistencia.

2.5.2.7. Caracterización microscópica

Para la caracterización macroscópica, con ayuda de un asa microbiológica se realizó la fijación de las colonias en un portaobjetos, posteriormente se procedió a realizar una tinción diferencial de Gram.

2.5.3. FASE III: Aislamiento de cepas bacterianas

Con un conteo previo y realizada la caracterización morfológica, se procedió a aislar las colonias más representativas de cada tratamiento, teniendo en cuenta los siguientes criterios: color, superficie, forma, elevación, borde, características ópticas y consistencia.

2.5.3.1. Preparación de medios de cultivo

Para el aislamiento de cepas bacterianas más representativas, se utilizó los medios de cultivo Agar R2A y Agar Nutritivo.

2.5.3.2. Purificación

Para la obtención de cultivos puros de cada cepa representativa se aplicó la técnica de siembra por estrías. (Bonilla et al., 2006, p34)

2.5.3.3. Incubación

Cada una de las cajas inoculadas fueron incubadas a 4, 10 y 20 °C respectivamente, durante 15 días, al término de este período se observaron las colonias aisladas.

2.5.4. FASE IV: Pruebas Fisiológicas

Se realizó un total de nueve pruebas fisiológicas: pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Las pruebas bioquímicas ejecutadas fueron: ureasa, SIM (sulfuro, indol y movilidad), TSI (fermentación de glucosa sacarosa y lactosa), citrato, oxidasa y catalasa como pruebas rápidas; mientras que las pruebas enzimáticas fueron: hidrolisis de lípidos, proteínas y carbohidratos. (Fernández et al., 2010, p.4)

2.5.4.1. Pruebas bioquímicos

- Oxidasa

La colonia a identificar fue puesta en contacto con tiras que contenían papel con reactivo para detección de oxidasa marca Merck. Si la coloración del papel se tornaba azul el resultado era considerado positivo. (Al-Dhabaan, 2019, p1248)

- Catalasa

Con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una muestra de la colonia en una placa portaobjetos, posteriormente se colocó una disolución de peróxido de hidrogeno al 3% si se generaba efervescencia enérgica y constante por al menos 10 segundos, el resultado era considerado positivo. (Al-Dhabaan, 2019, p1249)

2.5.4.1.1. Preparación de medios de cultivo

- Agar Base Urea Christensen

Se disolvió 21 g del medio de cultivo agar base Urea Christensen en polvo MERCK en 1 L de agua destilada, adicionalmente en otro matraz se colocó 50 ml de una solución de urea al 40%, se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos, en condiciones asépticas se mezcló la solución de urea y el medio agar base de urea.

- Medio de Cultivo SIM

Se disolvió 30 g del medio de cultivo SIM en polvo Difco™ en 1 L de agua destilada, se procedió a calentar y agitar frecuente hasta llegar a hervir durante 1 minuto para obtener la completa dilución del polvo. Finalmente se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tabla 9-2: Composición del medio de cultivo SIM.

Compuesto	Concentración g/L
Digerido Pancreático de Caseína	20.0
Digerido Péptico de Tejido Animal	6.1
Sulfato ferroso amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5

Fuente: (Zimbro et al. 2009, p.482)

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

- Agar TSI

Se disolvió 65 g del medio de cultivo agar TSI en polvo Difco™ en 1 L de agua destilada, se procedió a calentar y agitar frecuente hasta llegar a hervir durante 1 minuto para obtener la completa dilución del polvo, se dispuso en tubos de ensayo, se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos y finalmente se dejó enfriar en una posición inclinada.

Tabla 10-2: Composición del medio de cultivo Agar TSI.

Compuesto	Concentración g/L
Extracto de carne de res	3.0
Extracto de levadura	3.0
Digerido Pancreático de Caseína	15.0
Proteosa Peptona No. 3	5.0
Dextrosa	1.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Sulfato de hierro	0.2
Cloruro de sodio	5.0
Tiosulfato de sodio	0.3
Agar	12.0
Rojo fenol	0.024

Fuente: (Zimbro et al. 2009, p.482)

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

- Agar Citrato Simmons

Se disolvió 24.2 g del medio de cultivo agar Citrato Simmons en polvo Difco™ en 1 L de agua destilada, se procedió a calentar y agitar frecuente hasta llegar a hervir durante 1 minuto para obtener la completa dilución del polvo, se dispuso en tubos de ensayo, se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos y finalmente se dejó enfriar en una posición inclinada.

Tabla 11-2: Composición del medio de cultivo Agar Citrato Simmons.

Compuesto	Concentración g/L
Fosfato monoamónico	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Agar	15.0
Azul de bromotimol	0.08

Fuente: (Zimbro et al. 2009, p.482)

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

2.5.4.1.2. Inoculación

Se procedió a inocular cada tubo con medio de cultivo SIM con ayuda de un asa microbiológica recta en forma de aguja, se realizó una punción recta hasta el final del tubo; para los medios de

cultivos restantes, se realizó una estría en la superficie con un asa microbiológica normal con el fin de observar crecimiento en la superficie.

2.5.4.1.3. Incubación

Los tubos de ensayo destinados para las pruebas bioquímicas, con los medios de cultivo SIM, agar TSI y agar Citrato de Simmons y agar Urea Christensen se incubaron a 20 °C durante un periodo de 7 días hasta observar cambio en los distintos medios.

2.5.4.2. Pruebas enzimáticas

2.5.4.2.1. Preparación de medios de cultivo

- Agar Aceite de Oliva

Se disolvió 18.2 g del medio de cultivo agar R2A en polvo Difco™ anteriormente descrito en 1 L de agua destilada, se suplemento con 10 ml de aceite de oliva, 20 gotas de tween 80 y 50 gotas de vitamina A, se procedió mezclar bien y homogenizar. Finalmente se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- Agar Leche Descremada

Se disolvió 18.2 g del medio de cultivo agar R2A en polvo Difco™ anteriormente descrito en 1 L de agua destilada, adicionalmente en otro matraz se colocó 100 ml de leche descremada, se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos, en condiciones asépticas de mezclo la leche descremada y el medio R2A.

- Agar Almidón

Se disolvió 18.2 g del medio de cultivo agar R2A en polvo Difco™ anteriormente descrito en 1 L de agua destilada, se suplemento con 10 ml de goma de almidón al 1%, se procedió mezclar bien y homogenizar. Finalmente se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2.5.4.2.2. Inoculación

La inoculación se realizó por duplicado en cajas dipetri. En la superficie del agar solidificado se realizó una estría de gran tamaño en los dos segmentos de la caja.

2.5.4.2.3. Incubación

Las cajas Petri con los medios agar leche descremada, agar almidón y agar aceite de oliva, se incubaron a 20 °C, durante un periodo de 7 días hasta observar crecimiento en la superficie.

2.5.4.2.4. Identificación bacteria

Los resultados obtenidos de las pruebas fisiológicas se usaron para determinar los posibles géneros de los 34 aislamientos más representativos mediante la Figura 3-1.

2.5.5. FASE V: Sensibilidad a Antibióticos

Para determinar la resistencia o sensibilidad a antibióticos se probaron los antibióticos: Cefalexina (CL), Penicilina (P), Oxitetraciclina (T) y Gentamicina (CN).

2.5.5.1. Preparación de medios de cultivo

Se disolvió 38 g del medio de cultivo agar Mueller Hinton en polvo Difco™ en 1 L de agua destilada, se procedió a calentar y agitar frecuente hasta llegar a hervir durante 1 minuto para obtener la completa dilución del polvo. Finalmente se trasladó a esterilizar a la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tabla 12-2: Composición del medio de cultivo Mueller Hinton.

Compuesto	Concentración g/L
Extracto de carne en polvo	2.0
Digerido ácido de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0

Fuente: (Zimbardo et al. 2009, p.372)

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

2.5.5.2. Inoculación

Se suspendieron las colonias en 10 ml de solución salina al 0.9 %, con ayuda de un agitador vórtex se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland. Con un hisopo empapado de la solución previamente descrita, se procedió a inocular la caja Petri, se empezó por la parte superior cubriendo toda la placa de forma horizontal, se rotó la caja 60° aproximadamente,

se cubrió por segunda vez, este proceso se lo realizó nuevamente rotando la caja por tercera vez, para finalizar la inoculación, con el hisopo se pasó por todo el borde del medio de cultivo. (Cavalieri et al. 2005, p.42)

Una vez inoculada la caja en su totalidad, se procedió a colocar los cuatro discos que contenían antibióticos, se colocó un disco en la mitad de cada cuadrante.

2.5.5.3. Incubación

Las cajas Petri destinadas para las pruebas de antibiogramas, con el medio agar Müller Hinton se incubaron a 20 °C, durante un periodo de 7 días hasta observar crecimiento y halos alrededor de los discos con antibióticos.

Capítulo III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis físico-químico del agua de los glaciares en el Volcán Chimborazo.

Los resultados de los análisis físico-químico de las muestras de agua de los glaciares del volcán Chimborazo se detalla en las siguientes tablas. La Tabla 1-3 describe los resultados de los parámetros obtenidos de forma in-situ, seguida por la Tabla 2-3 que describe los resultados obtenidos en un laboratorio externo.

Tabla 1-3: Resultado de análisis in-situ.

Determinaciones	Unidades	Resultados
Temperatura	°C	1
pH	-	8.9
Conductividad	μSiems/cm	38.9

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

Tabla 2-3: Resultado de análisis ex-situ.

Determinaciones	Unidades	Resultados
pH	-	8.92
Conductividad	μSiems/cm	48.6
Color	Und Pt/Co	131
Turbiedad	NTU	74
Dureza	mg/L	40
Alcalinidad	mg/L	30
Hierro	mg/L	0.3

Fuente: SAQUIMIC Laboratorio.

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

La temperatura media registrada de las muestras en la base del glaciar del volcán Chimborazo durante la mañana es de 1 °C, según Christner et al. (2008, p.53), la temperatura de un glaciar politermal se encuentran cerca del punto de fusión, considerando que los valores de la temperatura medida in situ oscilan entre 0.8 °C y 1.2 °C, estaríamos ante la presencia de dicho glaciar.

Los resultados de pH obtenidos tanto en la muestra in-situ como la muestra analizada en el laboratorio presentan valores similares de 8.9 y 8.92 respectivamente; estos datos denotan un pH ligeramente alcalino lo cual podría deberse a la gran cantidad de potasio presente en los flancos de volcán Chimborazo descrito por Samaniego et al. (2012, p.44), además de la influencia de las cenizas del volcán Tungurahua señaladas por Ginot et al. (2010, p.563) trabajo que hace referencia al aporte de grandes cantidades de iones como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .

Además de las grandes cantidades de iones, Ginot et al. (2010, p.563) en su trabajo nos indica también la presencia de iones como SO_4^{2-} y HCO_2^- los cuales serían los causantes de la conductividad descritas en la Tabla 1-3 y 2-3 debido a la elución como producto del derretimiento de las capas superficiales de hielo.

Los resultados obtenidos en los parámetros de Color y Turbiedad se deben a las sustancias disueltas descritas anteriormente y partículas diferentes a hierro, las cuales dan a la muestra un color rojizo típico de todas las muestras.

3.2. Biodiversidad bacteriana

La inoculación de las muestras del agua de glaciación, realizadas por quintuplicado, otorgó una cantidad total de 1695 colonias.

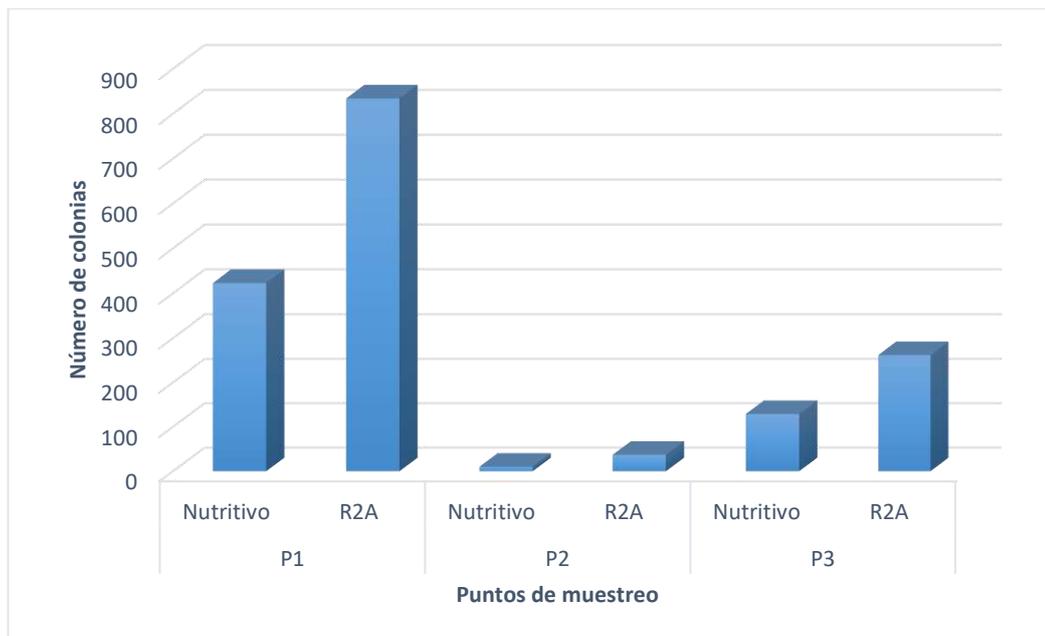


Gráfico 1-3: Número total de colonias obtenidas.

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

El Grafico 1-3 nos indica el número total de colonias dependiendo el medio de cultivo y el punto de muestreo. La mayor cantidad de colonias se determinó en el P1, correspondiente al 74.16% con un total de 1257 colonias, seguido por el P3 con un 23.07% con un total de 391 colonias, finalmente el P2 con un 2.77% que corresponde a 47 colonias.

El P1 se caracteriza por ser el punto más alto del muestreo, con una altura aproximada de 5600 m.s.n.m., es el punto menos frecuentado en los ascensos a la cumbre del volcán, por lo que se podría afirmar que es el punto con menos influencia antropogénica además Clapperton (1990, p.93) indica que el lado sur-este del glaciar es alimentado por masas de aire de la cuenca del Amazonas, lo cual podría justificar la presencia de microbiota alóctona, ya que Smith et al. (2011, p.249) afirma que el viento es el transporte más común de bacterias.

El segundo punto con mayor altitud es el P3, seguido del P2, que se encuentran ubicados sobre la laguna “Cóndor Cocha”, existiendo una distancia entre los dos puntos de 500 m; debido a su cercanía se podría justificar la coincidencia de la baja de biodiversidad encontrada.

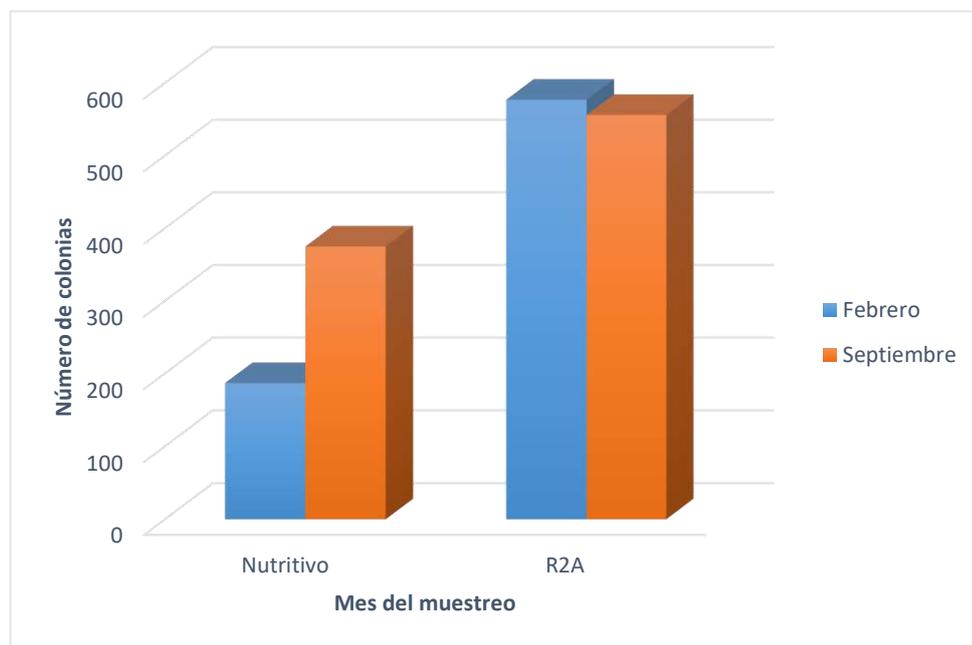


Gráfico 2-3: Cantidad de colonias obtenidas por medio de cultivo.

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

El Gráfico 2-3 representa la cantidad de colonias obtenías por cada medio de cultivo utilizado en las dos épocas de muestreo. Según este gráfico en el medio de cultivo Agar Nutritivo se dio el

crecimiento de 562 UFCs que corresponde al 33.16% del total de las colonias obtenidas, mientras que el medio de cultivo Agar R2A se dio el crecimiento de 1133 UFCs que corresponde al 66.84% restante.

El Agar Nutritivo es un medio de cultivo usado para conteo de distintos microorganismos heterótrofos que se caracteriza por contener alta cantidad de nutrientes y un pH ligeramente ácido, mientras que el medio de cultivo Agar R2A es un medio frecuentemente usado para conteo de bacterias heterótrofas con rasgos oligotróficos, teniendo como característica importante el ser un medio con bajo contenido de nutrientes y un pH ligeramente alcalino, por tal motivo Bowman (2001) Ball et al. (2013) y Rondón, et al. (2016) lo emplean en sus estudios de aislamiento de bacterias procedentes de glaciares.

Teniendo en cuenta las características de los medios de cultivo, se puede corroborar la afirmación de Prescott et al., (2004, p.129) que indica que las bacterias en ambientes hipertónicos sufren un proceso denominado plasmólisis, el que consiste en el daño de la membrana plasmática, la deshidratación de la célula y como consecuencia la inactivación de su metabolismo.

Las cepas bacterianas obtenidas en las dos fechas de muestreo demuestran mayor adaptación en el medio de cultivo Agar R2A, y se obtuvo un aislamiento microbiano mayoritario en dicho agar (Gráfico 2-3).

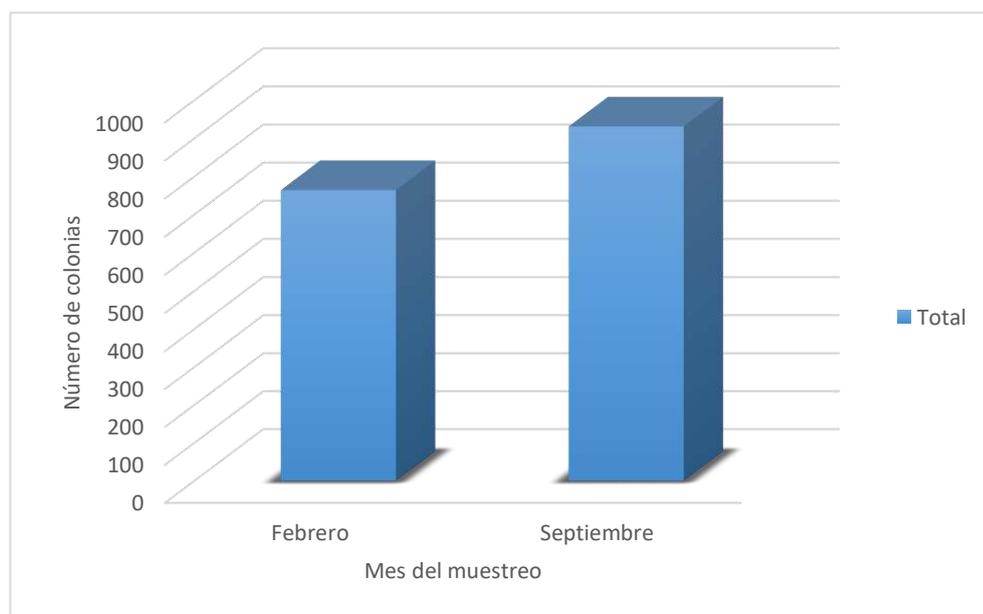


Gráfico 3-3: Cantidad de colonias por fecha de muestreo.

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

El número de colonias obtenidas en el mes de septiembre es de 931 (54.93%), mientras que las colonias obtenidas en el mes de febrero fueron 764 (45.07%) del total de las colonias obtenidas (Gráfico 3-3); según Vuille et al. (2000, p.2523) el mes de septiembre pertenece a la temporada seca (verano).

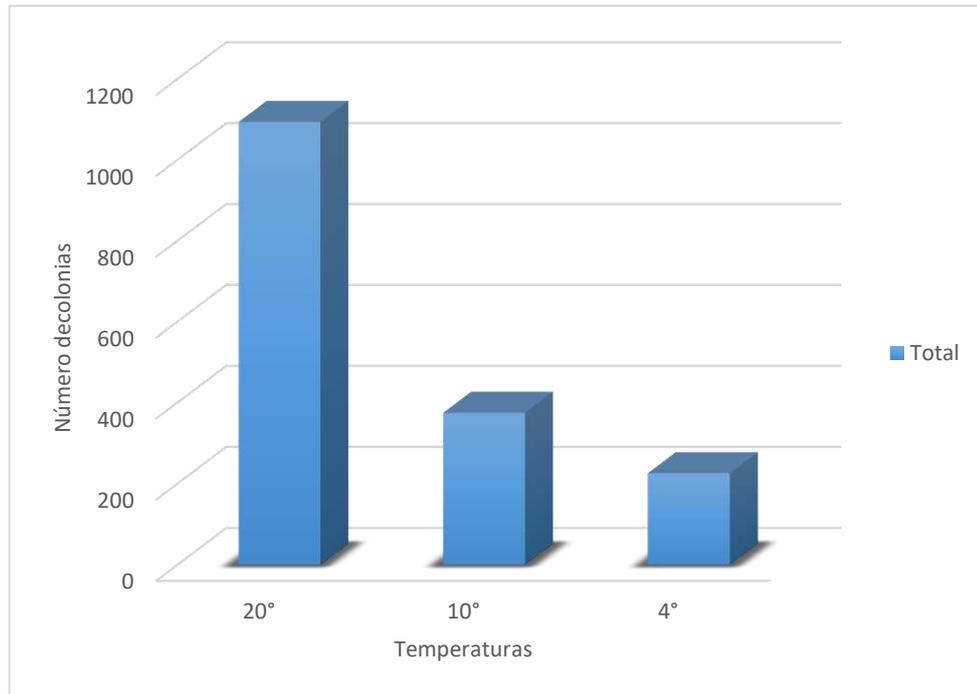


Gráfico 4-3: Cantidad de colonias por temperatura.

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

El Gráfico 4-3 indica el número de colonias obtenidas dependiendo de la temperatura de incubación, la mayor cantidad de colonias obtenidas se obtuvo a 20 °C con un total de 1094 (64.543%), seguida de la temperatura de 10 °C con un total de 375 colonias (22.124%), finalmente la menor temperatura correspondiente a 4 °C se obtuvo un total de 226 colonias (13.333%). En el Gráfico 4-3 nos indica que a mayor temperatura el número de colonias presentes es mayor, ya que el 64.543% de las colonias se obtuvieron a 20 °C, de acuerdo con Ramírez et al., (2006, p.58) serían psicrótrofos o psicrófilos facultativos, mientras que 35.457% son psicrófilos estrictos. La importancia del uso de varias temperaturas radica en los cambios producidos en los glaciares por el incremento de la temperatura en el planeta.

3.3. Caracterización Macroscópica

Tabla 3-3: Resultados de la caracterización macroscópica.

Código	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS						
	Pigmentación	Superficie	Forma	Elevación	Borde	Características ópticas	Consistencia
1R2	Blanca	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
1R4	Amarilla clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
2R5	Rosada clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
2R6	Amarilla oscura	Lisa	Circular	Convexa	Ondulado	Opaca	Cremosa
2R8	Blanca	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
2R9	Crema	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
2R10	Amarilla clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
2R11	Amarilla oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
3R13	Blanca	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
3R16	Rosada oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
3R17	Amarilla clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Traslúcida	Cremosa
3R18	Amarilla oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
3R19	Blanca	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
3R22	Verde	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
3R23	Naranja oscura	Rugosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Opaca	Cremosa
3R24	Blanca	Rugosa	Irregular	Elevada	Entero	Traslúcida	Cremosa
3R25	Amarilla clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
1N4	Amarilla clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Traslúcida	Cremosa
1N3	Naranja oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
2N8	Naranja clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Traslúcida	Cremosa
N231F1	Naranja oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Traslúcida	Cremosa
N231F2	Rosada clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
N335F3	Amarilla oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Traslúcida	Cremosa
N131F4	Crema	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
N331F5	Naranja clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Traslúcida	Cremosa
R125F6	Blanca	Rugosa	Circular	Convexa	Ondulado	Opaca	Cremosa
R325F7	Blanca	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
R234F8	Blanca	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
R135F9	Crema	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
R231F10	Amarilla clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
SR111	Rosada oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
SR211	Rosada clara	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa
SR212	Amarilla oscura	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Traslúcida	Cremosa
SR311	Crema	Lisa	Circular	Convexa	Entero	Opaca	Cremosa

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

Los análisis de los primeros cultivos mostraron la presencia de bacterias con características similares a los resultados obtenidos por Rondón et al. (2016), con una densidad bacteriana de 2.1×10^2 células / ml. Se caracterizó un total de 34 colonias, las más representativas de cada temperatura, habiéndose descartado otras iguales de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas.

Del total de las colonias más representativas el 76.47% presentaron pigmentación, dando a notar colores como: crema, amarillo, naranja, rosado y verde (Tabla 3-3), coincidiendo con los resultados obtenidos por Ball et al. (2013) donde el mayor porcentaje de colonias presentaron pigmentación. La presencia de pigmentos se atribuye a mecanismos de adaptación como es el caso de la exposición a altas concentraciones de radiaciones UV evitando la fotooxidación de las células. La producción de pigmentos se veía disminuida conforme se avanzaba con las diferentes pruebas en el laboratorio.

Una de las características más notables es la superficie de las colonias, 31 aislamientos presentaron superficie lisa (91.18%), mientras que los 3 restantes (8.82%) presentaron superficie rugosa. Según Pérez y Mota (2006), las colonias con una superficie lisa, son características de microorganismos de tipo salvaje aisladas de sus hábitats naturales.

La mayor cantidad de aislamientos con forma circular tiene superficie lisa, con excepción del aislamiento R125F6 (superficie rugosa), correspondiente al 94.12% del total de las colonias aisladas, o que coincide con Loveland et al. (1994); el 5.88% restante de los aislamientos tienen forma irregular. De los 34 aislamientos obtenidos, 2 (5.88%) tienen una formación elevada, mientras que 32 colonias (94.12%) muestran una elevación convexa. (Tabla 3-3)

Los bordes de las colonias presentan un 91.18% de colonias con borde entero y un 8.82% corresponde a borde ondulado. Las características ópticas presentes muestran que el 76.47% son colonias opacas y el 23.53% son colonias translúcidas.

La consistencia de las colonias muestra que el 100% son cremosas, entre las adaptaciones fisiológicas de las bacterias psicrófilas, la más común es la alta producción de polisacáridos a bajas temperaturas para evitar la formación de cristales de hielo. En el presente estudio todos los aislamientos presentaron una apariencia viscosa, sumándose a los resultados obtenidos por Ball et al. (2013) y Rondón et al. (2016).

3.4. Caracterización Microscópica

Tabla 4-3: Resultados de la caracterización microscópica.

Código	CARACTERÍSTICAS		
	Forma	Tinción Gram	Tamaño (µm)
2R6	Cocos	-	<1
2R8	Cocos	-	<1
2R10	Cocos	-	<1
3R16	Cocos	-	<1
3R19	Cocos	-	<1
3R22	Cocos	-	<1
3R25	Cocos	-	<1
R135F9	Cocos	-	<1
3R13	Bacilos	+	<1
3R24	Bacilos	+	<1
1R2	Cocos	+	<1
R325F7	Cocos	+	<1
R234F8	Cocos	+	<1
SR111	Cocos	+	<1
SR211	Cocos	+	<1
SR311	Cocos	+	<1
1N4	Bacilos	-	1.1
2R9	Bacilos	-	1.2
R125F6	Bacilos	-	1.2
SR212	Bacilos	-	1.3
3R18	Cocos	+	1.3
2R11	Bacilos	-	1.5
N231F2	Bacilos	-	1.8
N331F5	Bacilos	-	1.8
1R4	Bacilos	-	2
2R5	Bacilos	-	2
1N3	Bacilos	-	3
N131F4	Bacilos	-	3
2N8	Cocos	-	3
N231F1	Bacilos	-	3.5
R231F10	Cocos	-	3.5
3R23	Cocos	-	4.5
3R17	Cocos	-	5.3
N335F3	Bacilos	-	8

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

Posterior a la tinción diferencial de Gram, los aislamientos observados a través de un microscopio presentaron células esféricas y en forma de barra, se obtuvo resultados de bacterias Gram positivas y Gram negativas, la cuales poseían diferentes tamaños.

La Tabla 4-3 muestra los resultados de las formas obtenidas, del total de 34 muestras observadas, 15 de ellas (44.12%) presentaron formas alargadas, característica principal de “Bacilos”; las 19 muestras restantes (55.88%) presentaron una forma circular es decir “Coco”. Mediante la tinción diferencial de Gram, se pudo establecer que el 73.53% de las cepas aisladas son Gram negativas mientras que el 26.47% Gram positivas; resultados que coinciden con los obtenidos por Ball et al. (2013), donde se encontraron mayor cantidad de bacterias Gram negativas en glaciares tropicales de gran altitud en Venezuela.

El análisis mediante una cámara acoplada al microscopio, permitió determinar el tamaño medio de las células en cada aislamiento de manera digital, el 47.06% de las cepas analizadas presentaron un tamaño menor a 1 μm , el 29.41% de las bacterias presentaron una longitud entre 1.1 a 2 μm , el 17.65% se encontraron entre 2.1 a 5 μm , finalmente el 5.88% entre 5.1 a 10 μm .

El 44.12% de las células presentaron un tamaño muy pequeño, menor a 1 μm , tamaño difícil de determinar mediante la cámara, coincide con Ball et al. (2013) y Rondón et al. (2016) que reportan en sus resultados que existe presencia dominante de células “enanas” con formas de varillas y cocos.

3.5. Pruebas Fisiológicas

3.5.1. Pruebas bioquímicas

Los resultados de las pruebas inmediatas, realizadas por duplicado, para oxidasa y catalasa, arrojaron que el 100% de los aislamientos son negativos para la producción de oxidasa, además, que el 100% de los aislamientos son positivos para la producción de catalasa.

Los cultivos realizados en el agar base urea Christensen evidenciaron que el 29.41% de los aislamientos manifestaron un viraje de coloración en el medio de cultivo, dando como positivo para la producción de la enzima ureasa, mientras que el 70.59% dio como negativo. En la prueba de citrato, se observó que el 23.53% de aislamientos cambiaron el medio de color de verde a azul, demostrando ser positivo, mientras que el 76.47% restante es negativo (Tabla 5-3).

Tabla 5-3: Resultados de las pruebas fisiológicas.

Código	PRUEBAS BIOQUÍMICAS										ENZIMÁTICAS		
	Oxidasa	Catalasa	Ureasa	Citrato S	SIM			TSI			Lipasa	Caseinasa	Amilasa
					H ₂ S	Indol	Motilidad	Glucosa	Lactosa	H ₂ S			
1R2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1R4	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
2R5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2R6	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
2R8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2R9	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2R10	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
2R11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3R13	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
3R16	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3R17	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
3R18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3R19	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
3R22	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3R23	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
3R24	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
3R25	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
1N4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
1N3	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
2N8	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
N231F1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
N231F2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
N335F3	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
N131F4	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
N331F5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
R125F6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
R325F7	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
R234F8	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
R135F9	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
R231F10	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
SR111	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
SR211	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
SR212	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
SR311	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

Los resultados de las pruebas múltiples, en el medio de cultivo SIM, se evidencio nula producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) e Indol; mientras que para la motilidad el 29.41% resulto ser

positivo. En el agar TSI se comprobó nuevamente la nula producción de sulfuro de hidrógeno, no obstante, la fermentación de azúcares (glucosa y lactosa) fue positiva para un 44.12%.

3.5.2. Pruebas enzimáticas

En las pruebas de exoenzimas degradadoras de macromoléculas, el 71.76% de los aislamientos es positivo para la producción de lipasas, el 44.12% positiva para la producción de la enzima caseinasa y 100% de los aislamientos resultaron ser negativos para la producción de amilasa (Tabla 5-3). Revalidando lo indicado por Margesin y Miteva (2011) referente a la producción de grandes cantidades de sustancias extracelulares usadas para la iteración bioquímica, formación de biopelículas y protección de la célula contra condiciones ambientales extremas.

Las enzimas producidas por bacterias psicrófilas se caracterizan por tener actividad catalítica mayor en comparación con sus homólogas mesófilas o termófilas, en consecuencia, dichas bacterias proporcionan beneficios económicos para la industria a bajas temperaturas (Cavicchioli et al. 2011).

Mediante los resultados de la caracterización macro y microscópica, se puede establecer que los aislamientos obtenidos se encuentran dentro de los géneros *Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia sp.*, *Micrococcus sp.*, *Neisseria sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, siendo este último el género más frecuente encontrado por Ball et al. (2013) y Rondón et al. (2016).

3.6. Sensibilidad a Antibióticos

Para el presente estudio se optó por el uso de cuatro antibióticos comúnmente usados en medicina clínica, dos de ellos (Oxitetraciclina y Gentamicina) con similar mecanismo de acción de inhibición en la pared celular, mientras que los dos restantes (Penicilina y Cefalexina) tienen un mecanismo de acción de inhibición de la lectura correcta del material genético.

Las pruebas de sensibilidad a los diferentes antibióticos reflejan que para el disco de Oxitetraciclina, 3 aislamientos son resistentes (8.82%) y los 31 aislamientos restantes son sensibles (91.18%); para el disco de Penicilina, 4 aislamientos son resistentes (11.76%) y 30 aislamientos son sensibles (88.24%); para Cefalexina, 6 cepas son resistentes (17.65%) y 28 cepas son sensibles (82.35%); finalmente para Gentamicina, 3 aislamientos son resistentes (8.82%) y los 31 aislamientos son sensibles (91.18%) (Tabla 6-3).

Los resultados reflejan que la mayor cantidad de aislamientos son sensibles a los antibióticos usados y se nota un bajo porcentaje de resistencia a los diferentes antibióticos. Los aislamientos 3R22 y R234F8 resultaron ser bacterias resistentes a todos antibióticos. Si bien los mecanismos

de resistencia a antibióticos son potenciados por las condiciones extremas en su hábitat, existe evidencia que una de las principales causas de resistencia a antibióticos es la contaminación antropogénica, como asegura Segawa et al. (2013), donde se estudió varios glaciares en el mundo y se encontró bacterias carentes de genes de resistencia antibióticos.

Tabla 6-3: Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos.

Código	ANTIBIÓTICOS			
	Oxitetraciclina	Penicilina	Cefalexina	Gentamicina
1R2	S	S	S	S
1R4	S	S	S	S
2R5	S	S	S	S
2R6	S	S	S	S
2R8	S	S	S	S
2R9	S	S	S	S
2R10	S	S	S	S
2R11	S	S	R	S
3R13	S	S	R	S
3R16	S	S	S	S
3R17	S	S	S	S
3R18	S	S	S	S
3R19	S	S	R	S
3R22	R	R	R	R
3R23	S	S	S	S
3R24	S	S	S	S
3R25	S	S	S	S
1N4	S	R	R	S
1N3	S	S	S	S
2N8	S	S	S	S
N231F1	S	S	S	S
N231F2	S	S	S	S
N335F3	S	S	S	S
N131F4	S	S	S	S
N331F5	R	S	S	R
R125F6	S	S	S	S
R325F7	S	R	S	S
R234F8	R	R	R	R
R135F9	S	S	S	S
R231F10	S	S	S	S
SR111	S	S	S	S
SR211	S	S	S	S
SR212	S	S	S	S
SR311	S	S	S	S

Elaborado por: Silva, Edwin, 2020

CONCLUSIONES

- Las características físico-químicas de las aguas de los glaciares del volcán Chimborazo presentaron una temperatura media de 1 °C, pH 8.9, conductividad eléctrica 48.6 μ Siems/cm, color 131 Und Pt/Co, turbiedad 74 NTU, dureza 40 mg/L y alcalinidad 30 mg/L; concluyendo que dichas aguas contienen grandes cantidades de iones disueltos, lo que permitiría el desarrollo de microorganismos oligotróficos.
- Las muestras obtenidas a partir de los glaciares del volcán Chimborazo permitieron aislar 34 cepas bacterianas distintas, de las cuales 20 cepas fueron aisladas el mes de septiembre y 14 cepas el mes de febrero, en donde se observó la mayor tasa de aislamiento en agar R2A (26 aislamientos), mientras que el agar nutritivo evidenció una menor cantidad de colonias (8 aislamientos). En cuanto a los puntos de muestro, la mayor tasa de aislamientos se obtuvo a partir de la muestra del “Punto 1” (74.16%), seguida del “Punto 3” (23.07%) y finalmente del “Punto 2” (2.77%). La temperatura de incubación fue un factor importante para el aislamiento bacteriano; se evidenció el mayor número de colonias en 20 °C con un 64.543%, seguido de la temperatura de 10 °C con 22.124%, finalmente por la temperatura de 4 °C con un 13.333%; en las pruebas fisiológicas todos los aislamientos se lograron adaptar a la temperatura de 20°C, demostrando así la presencia de bacterias psicrótrofos.
- Se realizó la caracterización tanto macroscópica como microscópica de los 34 aislamientos obtenidos, de los cuales el 76.47% de los aislamientos presentaron pigmentación; del total de cepas aisladas, el 73.53% son Gram negativas mientras que el 26.47% Gram positivas; además se realizó pruebas fisiológicas con el fin de obtener los géneros posibles, los cuales fueron: *Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *Neisseria sp.*, *Serratia sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.*
- El estudio detectó únicamente 2 colonias aisladas resistentes a todos los discos de antibióticos (3R22 y R234F8), lo que corresponde al 5.88%, lo que evidencia que la mayor parte de las bacterias aisladas son sensibles a ellos; demostrando así que en ambientes naturales de alta montaña existe mínima resistencia a antibióticos.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de bioprospección a partir de glaciares tropicales, por ser un hábitat poco estudiado y frágil que está amenazado a causa del incremento en la temperatura del planeta y además por contener una extensa diversidad microbiana.
- Se recomienda la secuenciación del material genético, con el fin de identificar el género y especie de cada aislamiento.

BIBLIOGRAFÍA

ALARCÓN, L.R., 2004. *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición*. S.l.: UACJ. ISBN 978-968-7845-28-9.

AL-DHABAAN, F.A., 2019. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, no. 6, pp. 1247-1252. ISSN 1319-562X. DOI 10.1016/j.sjbs.2018.05.029.

BADO, I., et al., 2008. PRINCIPALES GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS. *Temas de bacteriología y virología médica*. Cuarta Edición. Montevideo: Oficina del libro FEFMUR, pp. 23.

BALCAZAR, W., et al., 2015. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*, vol. 177, pp. 1-7. ISSN 0944-5013. DOI 10.1016/j.micres.2015.05.001.

BALL, M.M., et al., 2013. Bacteria recovered from a high-altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes. *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 30, no. 3, pp. 11. ISSN 1573-0972. DOI 10.1007/s11274-013-1511-1.

BONILLA, M., et al., 2006. *MANUAL DE PRACTICAS DE MICROBIOLOGÍA BÁSICA*. Cuajimalpa: s.n. ISBN ISBN: 978-607-28-0975-8.

BOU, G., et al., 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 29, no. 8, pp. 601-608. ISSN 0213-005X. DOI 10.1016/j.eimc.2011.03.012.

BOWMAN, J.P., 2001. Methods for psychrophilic bacteria. *Methods in Microbiology* [en línea]. S.l.: Academic Press, Marine Microbiology, pp. 591-614. [Consulta: 27 febrero 2020]. ISBN 0-12-521530 4. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951701300648>.

CACERES, B., 2010. *Actualizacion del inventario de tres casquetes glaciares del Ecuador*. 2010. S.l.: s.n.

CAVALIERI, S.J., et al., 2005. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana* [en línea]. Washington: Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington. ISBN 1-55581-347-X. Disponible en:

<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>.

CAVICCHIOLI, R., et al., 2011. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial biotechnology*, vol. 4, no. 4, pp. 449-460. ISSN 1751-7915. DOI 10.1111/j.1751-7915.2011.00258.x.

CHRISTNER, B.C., et al., 2008. Bacteria in Subglacial Environments. En: R. MARGESIN, F. SCHINNER, J.-C. MARX y C. GERDAY (eds.), *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* [en línea]. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 51-71. [Consulta: 20 marzo 2020]. ISBN 978-3-540-74335-4. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4_4.

CIESIELSKI, S., et al., 2014. The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. *Current Microbiology*, vol. 69, no. 5, pp. 594-603. ISSN 1432-0991. DOI 10.1007/s00284-014-0629-1.

CLAPPERTON, C.M., 1990. Glacial and volcanic geomorphology of the Chimborazo-Carihuairazo Massif, Ecuadorian Andes. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, vol. 81, no. 2, pp. 91-116. ISSN 1473-7116, 0263-5933. DOI 10.1017/S0263593300005174.

CLIMATE ACTION NETWORK LATINO AMÉRICA, 2014. GLACIARES ANDINOS: La necesidad de una agenda transversal. [en línea]. Lima: Disponible en: <https://www.cambioclimaticochile.cl/download/informe-glaciares-andinos-la-necesidad-de-una-agenda-transversal/>.

DÍAZ, A. y ESTRADA, M., 2018. *Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos* [en línea]. S.l.: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27507/1/BQ%20148.pdf>.

FERNÁNDEZ, A., et al., 2010. *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* [en línea]. S.l.: Seimc. ISBN 978-84-614-7932-0. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

GINOT, P., et al., 2010. Influence of the Tungurahua eruption on the ice core records of Chimborazo, Ecuador. *The Cryosphere*, vol. 4, no. 4, pp. 561-568. ISSN 1994-0416. DOI <https://doi.org/10.5194/tc-4-561-2010>.

GOBERNADO, M. y LÓPEZ, J.L., 2003. Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 21, pp. 54-60. ISSN 0213-005X.

GONZÁLEZ-TORIL, E., et al., 2015. Pyrosequencing-Based Assessment of the Microbial Community Structure of Pastoruri Glacier Area (Huascarán National Park, Perú), a Natural Extreme Acidic Environment. *Microbial Ecology*, vol. 70, no. 4, pp. 936-947. ISSN 1432-184X. DOI 10.1007/s00248-015-0634-3.

HOOVER, R.B. y PIKUTAB, E.V., 2010. Psychrophilic and Psychrotolerant Microbial Extremophiles in Polar Environments. *NASA Technical Reports Server* [en línea], [Consulta: 18 marzo 2020]. Disponible en: <https://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=20100002095>.

LOVELAND, J., et al., 1994. Characterization of psychrotrophic microorganisms producing beta-galactosidase activities. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 1, pp. 12-18. ISSN 0099-2240.

MACFADDIN, J.F., 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. S.l.: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-1572-3.

MADIGAN, M., et al., 2009. *BROCK. BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS*. 12. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN. ISBN 978-84-7829-097-0.

MARGESIN, R. y MITEVA, V., 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, vol. 162, no. 3, pp. 346-361. ISSN 0923-2508. DOI 10.1016/j.resmic.2010.12.004.

MELGAREJO, L.M., et al., 2002. *Plan nacional en bioprospección continental y marina (propuesta técnica)*. Santa Marta: Invemar. ISBN 978-958-97264-0-2.

MINISTERIO DEL AMBIENTE, 2013. Reserva de Producción de Fauna Chimborazo, 26 años de protección. [en línea]. [Consulta: 18 marzo 2020]. Disponible en: <https://www.ambiente.gob.ec/reserva-de-produccion-de-fauna-chimborazo-26-anos-de-proteccion/>.

MITEVA, V., 2008. Bacteria in Snow and Glacier Ice. En: R. MARGESIN, F. SCHINNER, J.-C. MARX y C. GERDAY (eds.), *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* [en línea]. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 31-50. [Consulta: 24 febrero 2020]. ISBN 978-3-540-74335-4. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4_3.

MITEVA, V.I. y BRECHLEY, J.E., 2005. Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120,000-year-old Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 12, pp. 7806-7818. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.71.12.7806-7818.2005.

MORENO, L.V.M., 2017. *Caracterización de cepas bacterianas de la laguna amarilla perteneciente al nevado el altar en la provincia de Chimborazo* [en línea]. S.l.: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/7877/1/236T0302.pdf>.

MUÑOZ, G., 2010. Los glaciares del 'Taita' Chimborazo se deslíen. *El Comercio* [en línea]. 2010. [Consulta: 28 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/actualidad/mundo/glaciares-del-taita-chimborazo-deslien.html>.

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2176:2013, 2013. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo*. S.l.: s.n.

OLIART, R.M., et al., 2016. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, vol. 11, no. 1, pp. 79-90. ISSN 2007-7858.

PÍREZ, M. y MOTA, M., 2006. Morfología y estructura bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica* [en línea]. Segunda. Montevideo: Oficina del libro FEFMUR, Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>.

PRESCOTT, L., HARLEY, J. y KLEIN, D., 2004. *Microbiología*. Quinta. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana. ISBN 84-486-0525-X.

QIN, D., et al., 2018. Cryospheric Science: research framework and disciplinary system. *National Science Review*, vol. 5, no. 2, pp. 255-268. ISSN 2095-5138. DOI 10.1093/nsr/nwx108.

RAMÍREZ, N., SERRANO, J. y SANDOVAL, H., 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 37, no. 3, pp. 56-71. ISSN 1870-0195.

RIVAS, K.B., et al., 2002. Cefalosporinas: De la Primera a la Cuarta Generación. *Revista de la Facultad de Medicina*, vol. 25, no. 2, pp. 142-153. ISSN 0798-0469.

- RONDÓN, J., et al.,** 2016. Diversity of culturable bacteria recovered from Pico Bolívar's glacial and subglacial environments, at 4950 m, in Venezuelan tropical Andes. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 62, no. 11, pp. 904-917. ISSN 1480-3275. DOI 10.1139/cjm-2016-0172.
- ROSSI, M., et al.,** 2003. Extremophiles 2002. *Journal of Bacteriology*, vol. 185, no. 13, pp. 3683-3689. ISSN 0021-9193, 1098-5530. DOI 10.1128/JB.185.13.3683-3689.2003.
- ROZO, C. y DUSSÁN, J.,** 2010. Análisis de transferencia horizontal de genes en ensayos de biorremediación con grasas recalcitrantes. , no. 1, pp. 11.
- RUSSELL, N.J.,** 1997. Psychrophilic bacteria - Molecular adaptations of membrane lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, vol. 118, no. 3, pp. 489-493. ISSN 0300-9629. DOI 10.1016/S0300-9629(97)87354-9.
- SAMANIEGO, P., et al.,** 2012. Eruptive history of Chimborazo volcano (Ecuador): A large, ice-capped and hazardous compound volcano in the Northern Andes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, vol. 221-222, pp. 33-51. ISSN 0377-0273. DOI 10.1016/j.jvolgeores.2012.01.014.
- SANTIAGO, M., et al.,** 2016. Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. *Frontiers in Microbiology* [en línea], vol. 7. [Consulta: 14 marzo 2020]. ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2016.01408. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5016527/>.
- SEGAWA, T., et al.,** 2013. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environmental Microbiology Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 127-134. ISSN 1758-2229. DOI 10.1111/1758-2229.12011.
- SEIJA, V. y VIGNOLI, R.,** 2006. Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología Médica*, vol. 2, pp. 631-633.
- SILVA, T.R.,** 2018. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biology*, vol. 41, no. 7, pp. 20. ISSN 1432-2056. DOI 10.1007/s00300-018-2300-y.
- SMITH, D.J., GRIFFIN, D.W. y JAFFE, D.A.,** 2011. The high life: Transport of microbes in the atmosphere. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, vol. 92, no. 30, pp. 249-250. ISSN 2324-9250. DOI 10.1029/2011EO300001.

SOSA LÓPEZ, A.I., et al., 2011. Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, vol. 15, no. 1, pp. 39-44. ISSN 1562-3009.

TORRES, O.D. y VELHO, L., 2009. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência da Informação*, vol. 38, no. 3, pp. 15. ISSN 0100-1965. DOI 10.1590/S0100-19652009000300007.

VUILLE, M., BRADLEY, R.S. y KEIMIG, F., 2000. Climate Variability in the Andes of Ecuador and Its Relation to Tropical Pacific and Atlantic Sea Surface Temperature Anomalies. *Journal of Climate*, vol. 13, no. 14, pp. 2520-2535. ISSN 0894-8755. DOI 10.1175/1520-0442(2000)013<2520:CVITAO>2.0.CO;2.

WANG, X., LIU, S.-W. y ZHANG, J.-L., 2019. A new look at roles of the cryosphere in sustainable development. *Advances in Climate Change Research*, vol. 10, no. 2, pp. 124-131. ISSN 1674-9278. DOI 10.1016/j.accre.2019.06.005.

YARZÁBAL, L.A., 2020. Perspectives for using glacial and periglacial microorganisms for plant growth promotion at low temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology* [en línea], [Consulta: 20 marzo 2020]. ISSN 1432-0614. DOI 10.1007/s00253-020-10468-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10468-4>.

YARZÁBAL, L.A., et al., 2018. Antarctic *Pseudomonas* spp. promote wheat germination and growth at low temperatures. *Polar Biology*, vol. 41, no. 11, pp. 2343-2354. ISSN 1432-2056. DOI 10.1007/s00300-018-2374-6.

ZIMBRO, M., et al., 2009. *Difco & BBL Manual: manual of microbiological culture media* [en línea]. 2. ed. Sparks, MD: Becton, Dickinson. ISBN 978-0-9727207-1-7. Disponible en: <http://trios.cz/wp-content/uploads/sites/149/2016/08/DIFCO-A-BBL-MANUAL-2.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A: Autorización de investigación por el Ministerio de Ambiente

MINISTERIO DEL AMBIENTE			
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO			
AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA			
Nro. 029-IC-DPACH-MAE-2019			
FLORA:	FAUNA:	VIARIOS: X	

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la normativa legal vigente, autoriza a:

Nombres y Apellidos	C.C.	Nacionalidad
Edwin Javier Silva Chicaiza	0603749847	Ecuatoriana

Para llevar a cabo la investigación: **"Caracterización de cepas bacterianas psicrófilas y psicrótrofas de los glaciares tropicales en el volcán Chimborazo"**.

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de Edwin Javier Silva Chicaiza.
2. Auspicio de institución científica nacional: ESPOCH.
3. Auspicio de institución científica internacional: Ninguna.
4. Institución que financia la investigación: Autofinanciado.
5. Contraparte de la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo: Ing. María Elena Guaña, Administradora de la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo.
6. Vigencia de esta Autorización: 28/08/2019 a 28/05/2020.
7. Fecha de entrega de informe final: 28/05/2020.
8. Valoración Técnica del Proyecto: Mvz. María Dolores Astudillo.
9. Se autoriza la colección de agua de los glaciares del volcán Chimborazo, para posterior siembra directa en los medios de cultivo, según la metodología que consta en el proyecto. Total de 180 cajas Petri.
10. Las muestras serán procesadas y analizadas en los Laboratorios de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.
11. Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin el correspondiente permiso. Competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
12. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA/FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin la correspondiente autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad o cada uno de los Centros de Tenencia y Manejo de Flora/Fauna (Herbarios/ Museos de Historia Natural) que cuente con patente vigente emitida por la Autoridad Ambiental.
13. De los resultados que se desprenda de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente.
14. **Estos especímenes NO podrán ser utilizados en actividades de BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO, sin la correspondiente Autorización del Ministerio del Ambiente, caso contrario se procederá como lo establece el COIP.- Artículo 248.- Delitos contra los recursos del patrimonio genético nacional.**

Obligaciones del investigador:

15. Entregar a la Dirección provincial del Ambiente de Chimborazo, (02) dos copias del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar Formato).
16. Lista taxonómica de las especies debidamente identificadas, objeto de la autorización de colecta con sus respectivas coordenadas. (Solicitar Formato).
17. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colecto el material biológico.
18. Entregar copias de las publicaciones a la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo
19. Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión. (Se respetará los derechos de autoría).

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 15,16, 17, 18, 19, se responsabiliza al investigador: Edwin Javier Silva Chicaiza.

SE AUTORIZA LA COLECCIÓN EN LAS PROVINCIAS, CANTONES Y ÁREAS PROTEGIDAS:
Reserva de Producción de Fauna Chimborazo, Provincia de Chimborazo. Coordenadas de referencia:
Punto 1: X: 741583 Y: 9837542
Punto 2: X: 741997 Y: 9837267
Punto 3: X: 742071 Y: 9836704

1 Dirección: Av. 9 de Octubre y Duchipela, sector Macaí - Babahúa



SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL PROPÓSITO DE:
Aislar, caracterizar, cepas bacterianas psicrófilas y psicrótrofas, de los glaciares tropicales en el volcán Chimborazo.
Identificar la biodiversidad y evaluar la resistencia de las mismas en presencia de antibióticos.

SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN:

Materiales y equipos	
Cajas Petri	Mecheros
Matraz erlenmeyer	Probeta
Balanza	Espátula
Autoclave	Algodón
Papel Aluminio	Medio de cultivo PCA
Medio de cultivo TSA	Asa bacteriológica
Vasos de precipitación	Gasas

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

1. LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERAN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO O LOTES.
2. ESTA AUTORIZACIÓN FACULTA LA COLECCIÓN/ MANIPULACIÓN DE ESPECIMENES VIVOS, MISMOS QUE NO PODRÁN SER UTILIZADOS COMO MATERIAL PARENTAL PARA MANEJO COMERCIAL.
3. ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, EN TAL SENTIDO HABILITA EL MANEJO DE MICROORGANISMOS Y SUELO QUE HAYAN ESTADO EXPRESADOS EN LA PROPUESTA TÉCNICA TANTO EN TAXONES COMO EN NUMERO DE INDIVIDUOS.
4. LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECÍMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.
5. PARA EL INGRESO A AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
6. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUBSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA DE ESTA INVESTIGACION.
7. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAIDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
8. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
9. EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS, TÉCNICOS O DISPOSICIONES ESTABLECIDAS EN EL PRESENTE DOCUMENTO ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DEL MISMO SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA NORMATIVA LEGAL VIGENTE Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
11. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES DEPOSITADOS EN BANEQUADOR CUENTA 0010000785, CON REFERENCIA 856605024 RECIBO DE CAJA 1826.

Ing. Wilmer Tingo.
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO.



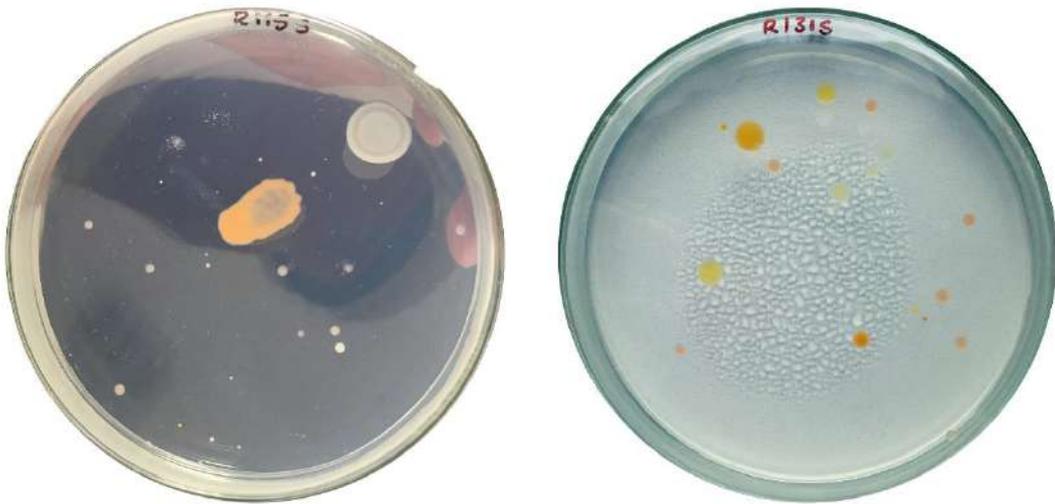
MA: 28/08/2019
MP: 28/08/2019

ANEXO B: Sitios de muestreo

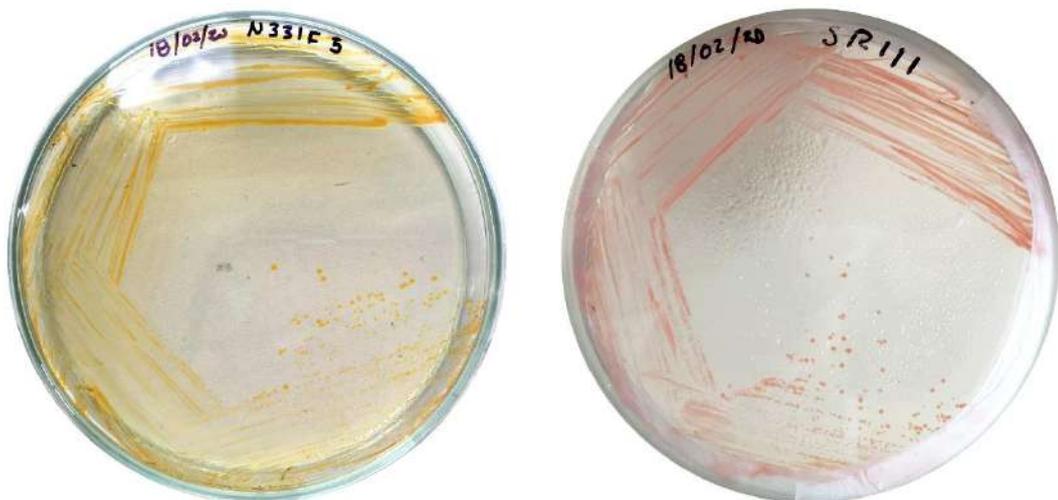


ANEXO C: Evidencias Fotográficas del trabajo de laboratorio.

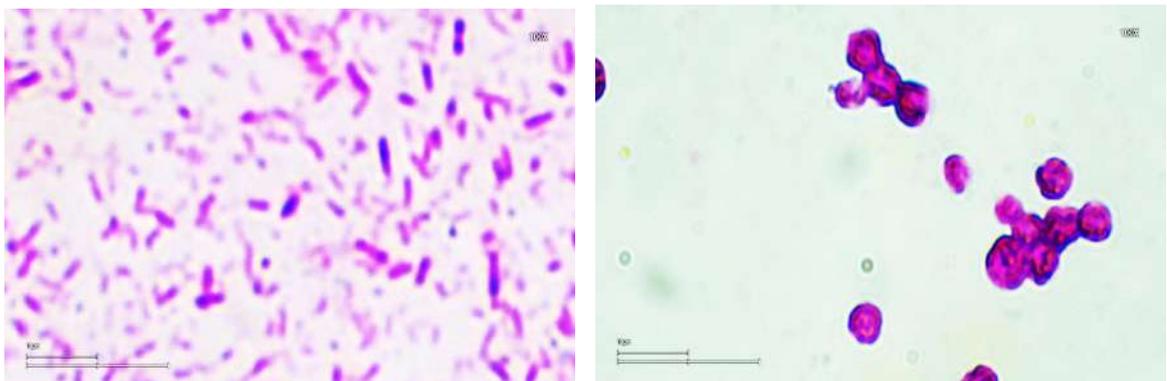
a) Obtención de la biodiversidad bacteriana



b) Aislamiento de mediante siembra por estrías



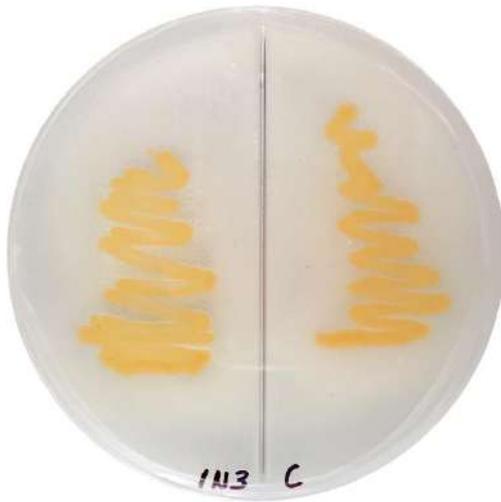
c) Caracterización microscópica



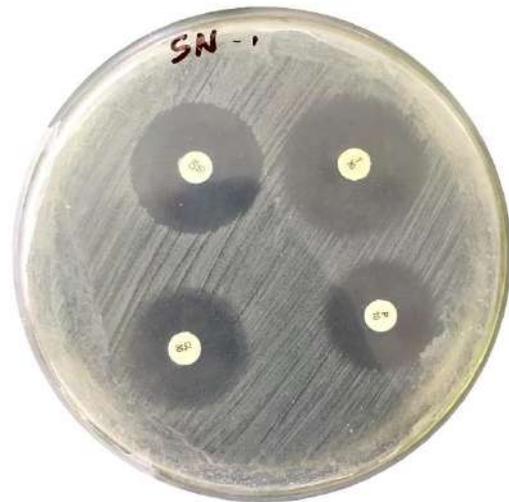
d) Pruebas bioquímicas



e) Pruebas enzimáticas



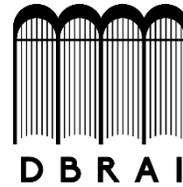
f) Antibiogramas





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL
APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 14 / 01 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Edwin Javier Silva Chicaiza
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniero en Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**



0527 -DBRAI-UPT-2020