



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA INGENIERÍA AMBIENTAL**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS  
RESISTENTES A ALTAS TEMPERATURAS DE LAS AGUAS  
TERMALES SAN FRANCISCO – GUAYLLABAMBA UBICADAS  
EN EL CANTÓN CHAMBO, PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

**Trabajo de Titulación**

Tipo: Proyecto de investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA AMBIENTAL**

**AUTORA: TERESA ANDREINA MARTÍNEZ GARCÉS**

**TUTORA: Ing. ANA RAFAELA PACURUCU REYES**

Riobamba – Ecuador

2024


© 2024, Teresa Andreina Martínez Garcés

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, Teresa Andreina Martínez Garcés, 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 autora 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, 30 de abril de 2024



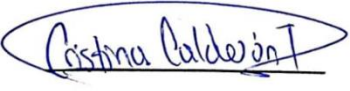
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'T. MARTINEZ GARCÉS', with a horizontal line underneath.

**Teresa Andreina Martínez Garcés**

**0605821834**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto de Investigación, **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A ALTAS TEMPERATURAS DE LAS AGUAS TERMALES SAN FRANCISCO – GUAYLLABAMBA UBICADAS EN EL CANTÓN CHAMBO, PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**, realizado por la señorita: **TERESA ANDREINA MARTÍNEZ GARCÉS**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Raúl Marcelo Benavides Lara <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2024-04-30
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes, MSc. <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		2024-04-30
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia, MSc. <b>ASESORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		2024-04-30

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a mis padres Jorge y Teresa quienes han sido mi apoyo incondicional en cada momento de mi etapa universitaria.

A mis hermanas, Paola y Pamela y hermano, Jonatan que me han brindado su cariño y confianza para seguir cada día adelante.

Andreina

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente a Dios, por darme vida y salud para seguir adelante y seguir cumpliendo con cada meta propuesta.

A mi novio Cristian, que me ha comprendido y valorado en cada momento, que ha puesto su confianza en mí y me ha brindado el apoyo incondicional para culminar con mi carrera universitaria.

Al Ing. Andrés Mena por su apoyo, paciencia y conocimientos adquiridos en el trascurso de mi trabajo de titulación, de igual manera agradezco a la Ing. BQF. Yolanda Buenaño por su colaboración, paciencia, por su tiempo entregado y por ser guía para finalizar con proyecto.

Andreina

## INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
RESUMEN .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1

### CAPÍTULO 1

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2

### CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
2.1. Antecedentes.....	5
2.2.1. <i>Entornos extremos</i> .....	6
2.2.2. <i>Microorganismos extremófilos</i> .....	6
2.2.3. <i>Clasificación de microorganismos extremófilos</i> .....	7
2.2.3.1. <i>Actividad del agua</i> .....	7
2.2.3.2. <i>Temperatura</i> .....	9
2.2.3.3. <i>pH</i> 9 .....	
2.2.3.4. <i>Presión</i> .....	10
2.4. Fuentes termales .....	12
2.6. Potenciales usos biotecnológicos de organismos extremófilos.....	14
2.7. Métodos de identificación bacteriana .....	16
2.7.1. <i>Características macroscópicas</i> .....	16
2.7.2. <i>Características microscópicas</i> .....	17
2.7.3. <i>Caracterización bioquímica</i> .....	18
2.7.3.1. <i>Catalasa</i> .....	18
2.7.3.2. <i>Oxidasa</i> .....	19
2.7.3.3. <i>Ureasa</i> .....	19
2.7.3.4. <i>Indol</i> 20 .....	
2.7.3.5. <i>Citrato</i> .....	20

2.7.4.	<i>Métodos moleculares</i> .....	20
--------	----------------------------------	----

### CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	26
3.1.	<b>Ubicación</b> .....	26
3.2.	<b>Tipo de investigación</b> .....	26
3.3.	<b>Diseño de la investigación</b> .....	27
3.4.	<b>Población y muestra de estudio</b> .....	27
3.5.	<b>Materiales, equipos y reactivos</b> .....	27
3.5.1.	<i>Materiales</i> .....	27
3.5.2.	<i>Equipos</i> .....	28
3.5.3.	<i>Reactivos</i> .....	28
3.6.	<b>Etapas de la investigación</b> .....	29
3.6.1.	<i>Fase de campo</i> .....	29
3.6.2.	<i>Muestreo y toma de muestra</i> .....	29
3.6.3.	<i>Fase de laboratorio</i> .....	30
3.6.3.2.	<i>Transporte de muestra</i> .....	30
3.6.3.3.	<i>Preparación del medio de cultivo</i> .....	31
3.6.3.4.	<i>Aislamiento y purificación</i> .....	31
3.6.3.5.	<i>Caracterización macroscópica</i> .....	32
3.6.3.6.	<i>Caracterización microscópica</i> .....	32
3.6.3.7.	<i>Caracterización bioquímica</i> .....	33
3.6.3.7.1.	<i>Catalasa</i> .....	33
3.6.3.7.2.	<i>Oxidasa</i> .....	34
3.6.3.7.3.	<i>Citrato</i> .....	34
3.6.3.7.4.	<i>TSI</i> 35	
3.6.3.7.5.	<i>Urea</i> 37	
3.6.3.7.6.	<i>Indol</i> 38	
3.6.3.8.	<i>Evaluación de producción enzimática</i> .....	39
3.6.3.8.1.	<i>Amilasas</i> .....	40
3.6.3.8.2.	<i>Celulasa</i> .....	40
3.6.3.8.3.	<i>Lipasa</i> .....	41



## **CAPÍTULO IV**

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	43
<b>4.1.</b>	<b>Caracterización del sitio</b> .....	43
<b>4.2.</b>	<b>Aislamiento y purificación de cultivos</b> .....	43
<b>4.3.</b>	<b>Características macroscópicas</b> .....	45
<b>4.4.</b>	<b>Características microscópicas</b> .....	45
<b>4.5.</b>	<b>Características bioquímicas</b> .....	46

## **CAPÍTULO V**

<b>CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	56
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Límite de crecimiento de la actividad del agua para algunos microorganismos. ....	8
<b>Tabla 1-2:</b> Límite de crecimiento de la actividad del agua para algunos microorganismos. ....	9
<b>Tabla 1-3:</b> Clasificación de microorganismos en función a su pH .....	10
<b>Tabla 1-4:</b> Clasificación de microorganismos en función a su presión.....	11
<b>Tabla 1-5:</b> Clasificación de fuentes termales.....	13
<b>Tabla 1-6:</b> Aplicaciones biotecnológicas de los principales grupos de extremófilos .....	15
<b>Tabla 2-1.</b> Composición del medio Agar Luria Bertani (LB) .....	31
<b>Tabla 2-2:</b> Composición del medio Agar Nutritivo (NA).....	31
<b>Tabla 2-3:</b> Composición del medio Agar Citrato de Simmons .....	35
<b>Tabla 2-4:</b> Composición del medio TSI .....	37
<b>Tabla 2-5:</b> Composición del medio de cultivo Agar Urea Base (Christensen) .....	38
<b>Tabla 2-6:</b> Composición del medio de cultivo Agar SIM.....	39
<b>Tabla 3-1.</b> Parámetros físico-químicos del muestreo del agua termal San Francisco – Guayllabamba en los dos momentos. ....	43
<b>Tabla 3-2:</b> Características macroscópicas de las cepas aisladas. ....	45
<b>Tabla 3-3.</b> Resultados de Tinción de Gram. ....	46
<b>Tabla 3-4.</b> Resultados de la caracterización bioquímica de cepas aisladas. ....	47
<b>Tabla 3-5:</b> Resultados de la actividad enzimática.....	48
<b>Tabla 3-6:</b> Resultados de la prueba de resistencia a antibióticos en Mueller Hinton. ....	49
<b>Tabla 3-7:</b> Resultados de la prueba de resistencia a antibióticos en Agar Nutritivo. ....	50
<b>Tabla 3-8:</b> Resultados de la prueba de resistencia a antibióticos en Agar Luria Bertani.....	50
<b>Tabla 3-9.</b> Valores obtenidos del análisis de cada colonia.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2-1:</b> Forma y disposición bacteriana. ....	18
<b>Figura 3-1:</b> Ubicación de Aguas Termales San Francisco – Guayllabamba. ....	26
<b>Figura 3-2:</b> Punto de recolección de muestra de agua. ....	30
<b>Figura 3-3:</b> Prueba de producción de catalasa. ....	33
<b>Figura 3-4:</b> Prueba de producción de oxidasa. ....	34
<b>Figura 3-5:</b> Comprobación de prueba de Citrato. ....	35
<b>Figura 3-6:</b> Técnica de realizar la siembra de un tubo con TSI. ....	36
<b>Figura 3-7:</b> Resultados de prueba de TSI. A. Rojo/rojo; B. Control (sin inocular); C. Rojo/amarillo; D. Amarillo/amarillo; E. Rojo/amarillo con H <sub>2</sub> S. ....	37
<b>Figura 3-8:</b> Comprobación de prueba de Urea. ....	38
<b>Figura 3-9:</b> Prueba de Indol. ....	39
<b>Figura 3-10:</b> Observación de halos de hidrólisis de almidón en placa. ....	40
<b>Figura 3-11:</b> Halo de hidrólisis de bacterias con actividad celulolítica. ....	40
<b>Figura 3-12:</b> Halo de hidrolisis de actividad lipolítica. ....	41
<b>Figura 4-1:</b> Dilución 10 <sup>-2</sup> , Agar LB. ....	44
<b>Figura 4-2:</b> Dilución 10 <sup>-2</sup> , Agar NA. ....	44
<b>Figura 4-3:</b> Cultivos puros aislados de agua termal San Francisco - Guayllabamba. A: cepa MG_C2.R2; B: cepa MG_C7.R1. ....	44
<b>Figura 4-4:</b> Tinción de Gram de las colonias. A: MG_C2; B: MG_C3; C:MG_C4; D: MG_C6 y E: MG_C7. ....	46
<b>Figura 4-5.</b> Resultados de la prueba t pareada de cada una de las colonias. ....	52

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 4-1.</b> Porcentaje de respuesta frente a pruebas de producción enzimáticas. ....	49
<b>Gráfico 4-2:</b> Porcentaje de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos .....	51
<b>Gráfico 4-3.</b> Comparativa de diámetros de inhibición entre agar Muller Hinton y Nutritivo.....	53
<b>Gráfico 4-4.</b> Comparativa de diámetros de inhibición entre agar Muller Hinton y Luria Bertani .....	54

## RESUMEN

Se desconocen datos de la diversidad microbiana de las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba, de hecho, la información sobre estudios de extremófilos en Ecuador es limitada, pero dadas las condiciones del sitio, se percibe la oportunidad para realizar importantes investigaciones biotecnológicas sobre la posible capacidad de síntesis enzimática de los microorganismos nativos, por ende, el objetivo de la presente investigación fue de caracterizar bacterias resistentes a altas temperaturas aisladas de las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba ubicadas en el cantón Chambo. El presente trabajo se desarrolló en el cantón Chambo, en donde se tomó una muestra puntual de las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba con fines de bioprospección de organismos resistentes a altas temperaturas. Tras el análisis de los parámetros físico-químicos se realizó un juego de diluciones seriadas de orden 10 hasta  $10^{-4}$  y se inocularon 0,1 ml de cada dilución en medio sólido Nutritivo y Luria Bertani utilizando la técnica de siembra por extensión en superficie, y se seleccionaron las colonias más representativas de acuerdo a su morfología macroscópica. De esta manera, se caracterizaron cinco colonias de bacterias termófilas con temperatura óptima de crecimiento de  $41^{\circ}\text{C}$ , observándose mediante microscopía cocos Gram positivos, así como bacilos cortos y largos Gram positivos y Gram negativos, con predominio de bacterias Gram positivas. Además, se aplicaron las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, indol, urea, citrato y TSI. Finalmente, se evaluó la capacidad de enzimas extracelulares, evidenciándose principalmente la producción de celulasas y amilasas, y adicionalmente se realizaron pruebas de resistencia a antibióticos, mostrando sensibilidad a amikacina, cloranfenicol, eritromicina, metilicina y resistencia a oxacilina.

**Palabras clave:** <EXTREMÓFILO>, <BIOPROSPECCIÓN>, <ENZIMAS>, <PRUEBAS BIOQUÍMICAS >, <ANTIBIÓTICO>.

0591-DBRA-UPT-2024



## ABSTRACT

The microbial diversity of San Francisco – Guayllabamba hot springs is unknown. In fact, information on extremophile studies in Ecuador is limited. However, given the conditions of the site, there is an opportunity for significant biotechnological research on the potential enzymatic synthesis capacity of native microorganisms. Therefore, the objective of this research was to characterize heat-resistant bacteria isolated from San Francisco – Guayllabamba hot springs located in Chambo town. This study was conducted in Chambo town, where a single sample of San Francisco – Guayllabamba hot springs was taken for the bioprospecting of organisms resistant to high temperatures. After analyzing the physicochemical parameters, a series of tenfold dilutions ranging from 10 to 10<sup>-4</sup> were prepared, and 0.1 ml of each dilution was inoculated onto Nutrient Agar and Luria Bertani solid media using the surface streaking technique. The most representative colonies were selected based on their macroscopic morphology. In this way, five colonies of thermophilic bacteria with an optimal growth temperature of 41°C were characterized by observing Gram-positive cocci, as well as, short and long Gram-positive and Gram-negative bacilli under microscopy. Gram-positive bacteria were predominant. Additionally, biochemical tests for catalase, oxidase, indole, urea, citrate, and TSI were performed. Finally, the capacity of extracellular enzymes was evaluated, mainly showing the production of cellulases and amylases. Additionally, antibiotic resistance tests were conducted, showing sensitivity to amikacin, chloramphenicol, erythromycin, methicillin, and resistance to oxacillin.

**Keywords:** <EXTREMOPHILE>, <BIOPROSPECTING>, <ENZYMES>, <BIOCHEMICAL TESTS>, <ANTIBIOTIC>.

0591-DBRA-UPT-2024



---

Ing. Romel Francisco Calles Jiménez Ms.

C.I: 0603877713

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos extremófilos viven en ecosistemas extremos con altas/bajas temperaturas/pH y alta presión y salinidad que incluyen los tres dominios de la vida, Bacteria, Archaea y Eukarya. Las bacterias termófilas habitan principalmente en aguas termales y pueden sobrevivir a temperaturas de 40–80°C. Debido a sus propiedades específicas, como el crecimiento a altas temperaturas y características macromoleculares únicas, los extremófilos pueden poseer un metabolismo fuerte, enzimas química y físicamente estables y un menor crecimiento, pero una mayor productividad que las especies mesófilas similares. Los termófilos se estudian intensamente debido a su potencial para producir enzimas termoestables como proteasas, amilasas, lipasas, xilanasas, pectinasas, quitinasas, celulasas y ADN polimerasas. Estas enzimas exhiben propiedades únicas que pueden ser adecuadas para llevar a cabo procesos biotecnológicos a temperaturas elevadas. Además, se ha informado que son estables frente a detergentes, disolventes y pH ácido y alcalino (Abdollahi, Ghane y Babaeekhou, 2021).

Entre estas enzimas de importancia industrial se encuentran las proteasas que representan alrededor del 60 % de la venta total de enzimas a nivel mundial. Las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas y polipéptidos. Tienen amplias aplicaciones industriales que incluyen la industria del cuero, la industria farmacéutica, la industria alimentaria y la fabricación de hidrolizados de proteínas y la industria de procesamiento de residuos. Las proteasas producidas por bacterias termófilas son importantes porque pueden catalizar las reacciones a temperaturas más altas, lo que da como resultado una mayor solubilidad de los reactivos y productos, lo que a su vez acelera las velocidades de reacción. Además, una temperatura de procesamiento más alta puede reducir el riesgo de contaminación microbiana por bacterias mesófilas (Abdollahi, Ghane y Babaeekhou, 2021).

La investigación de nuevas fuentes de enzimas útiles para la industria es uno de los campos de investigación más importantes en el sector de la biotecnología de las enzimas. Recientemente, se han estudiado proteasas resistentes al calor, pero la mayoría aún no están disponibles en el mercado. Las aguas termales en esta área aún no han sido investigadas en términos de composición microbiana y perspectivas biotecnológicas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es detectar nuevas bacterias resistentes a altas temperaturas con posible potencial biotecnológico.

## CAPÍTULO 1

### 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Planteamiento del problema

Debido a su ubicación geográfica a lo largo del llamado Cinturón de Fuego del Pacífico, las cuatro regiones del Ecuador: Costa, Sierra, Oriente y Galápagos, cuentan con actividad volcánica. Existen dos tipos de aguas termales en Ecuador, las que están contenidas en piscinas naturales de tierra, como es el caso de las que originalmente descubrieron y usaron los indígenas de la región, y las que son encausadas hacia piscinas artificiales, hechas por el hombre (Hopey, 2022). Los distintos balnearios termales que conforman gran parte del sistema de aguas en el Ecuador constan de 11 espacios principales. Entre ellos están las provincias: Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Guayas, Imbabura, Morona Santiago, Napo, Pichincha y Tungurahua (Enriquez, 2019). Ello convierte al país en uno de los mejores lugares del mundo para relajarse en un baño termal de aguas ricas en minerales (Hopey, 2022). La mayor parte de estudios realizados de estas aguas termales han sido realizados con fines terapéuticos o relacionados a la salud, sin embargo, se han realizado pocos estudios de análisis biotecnológicos de las mismas.

Siendo el Ecuador un país megadiverso con hábitats donde crecen microorganismos de suma importancia para investigaciones Biotecnológicas, se encuentran aquellas bacterias capaces de poseer mecanismos de defensa y tolerancia ante condiciones adversas como la resistencia a altas temperaturas. No obstante, la caracterización de estas bacterias es muy escasa en el Ecuador debido a las condiciones y medios de cultivos que deben ser especiales para cada especie. Pese a que se ha confirmado la importancia a nivel ambiental e industrial de estos microorganismos y se han elaborado estudios preliminares sobre el microbioma de ambientes extremos, en el Ecuador hay evidencia clara de que no existe investigación alguna de carácter científico que caracterice los microorganismos de las aguas termales.

Las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba provienen del volcán Sangay y están ubicadas en el cantón Chambo, se caracterizan por alcanzar temperaturas de hasta 42°C, con un pH de 6.5 según (INAMHI, 2013) y están compuestas por sulfuro, hierro y calcio (Daney, 2019) por lo que serían un hábitat ideal para microorganismos extremófilos. La importancia de este tipo de microorganismos radica en su estructura genómica, la cual es de gran interés en procesos industriales y aplicaciones de investigación debido a su capacidad para permanecer activas en condiciones severas.



## **1.2. Justificación del problema**

En la última década ha aumentado la atención por los ambientes extremos debido al interés por aislar microorganismos extremófilos previamente desconocidos en cultivos puros y de esta manera perfilar sus metabolitos, es así que los procesos microbianos han sido explotados para una variedad de industrias que incluyen procesamiento de alimentos, bebidas, biofertilizantes, productos farmacéuticos, polímeros y biorremediación (Sani et al., 2018).

Se desconocen datos de la diversidad microbiana de las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba, de hecho, la información sobre estudios de extremófilos en Ecuador es limitada. Dadas las condiciones del sitio, se percibe la oportunidad para realizar importantes investigaciones biotecnológicas sobre la capacidad de síntesis enzimática de los microorganismos nativos, de manera que exista la posibilidad de generar aportes muy significativos en la producción de metabolitos.

Por lo tanto, toda esta información podría ser un importante precedente sobre la diversidad microbiana con potencial enzimático aislada que podría apoyar a estudios posteriores que pretendan hacer análisis específicos y darles a las enzimas un uso de interés industrial.

### **1.3. Objetivos**

#### **General**

- Caracterizar bacterias resistentes a altas temperaturas aisladas de las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba ubicadas en el cantón Chambo.

#### **Específicos**

- Aislar bacterias resistentes a altas temperaturas de las aguas termales San Francisco – Guayllabamba.
- Caracterizar macroscópica, microscópica y bioquímicamente las bacterias aisladas en las aguas termales.
- Analizar el potencial enzimático de las bacterias aisladas.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 2.1. Antecedentes

Las bacterias son muy diversas y pueden sobrevivir en hábitats adversos. La mayoría de las bacterias presentes en el medio ambiente aún no se han explorado y, por lo tanto, siguen siendo desconocidas para sus funciones ecológicas (El-Gayar et al., 2017). El mundo microbiano es el mayor reservorio inexplorado de biodiversidad en la tierra. Es una frontera importante en biología bajo investigaciones intensivas. La amplia gama de actividades microbianas y su importancia para la biosfera y la economía humana proporcionan una sólida base para comprender su diversidad, conservación y explotación. (Verma et al., 2014).

Los extremófilos son microorganismos que pueden vivir y reproducirse en entornos hostiles. En los últimos 40 años, se han encontrado en aguas termales, áreas volcánicas, aguas profundas, en biotopos antárticos y en otros sitios geotérmicos particulares, todos los lugares que anteriormente se creía que eran demasiado severos para sustentar la vida. Más recientemente, las industrias impulsaron la búsqueda de nuevas especies porque se dieron cuenta de que la capacidad de estos microorganismos para sobrevivir en condiciones tan extremas estaba estrictamente relacionada con características especiales, que consisten principalmente en nuevas enzimas y vías bioquímicas. De hecho, generalmente es cierto que las enzimas de un organismo están adaptadas para funcionar de manera óptima en sus condiciones de crecimiento o cerca de ellas, por lo que el rango de extremos en los que se encuentra la vida define el rango de condiciones en las que se puede detectar la actividad enzimática (Khalil, 2011).

#### Importancia

Los entornos valorados por el ser humano como supremos están dominados por microorganismos adaptados a estos nichos sostenibles: los microorganismos que se consideran “extremos” se distinguen por su capacidad de vivir a temperaturas altas (termófilos e hipertermófilos). El manejo de los microorganismos en nuevos procedimientos biotecnológicos ha llamado la atención en sus investigaciones. En vista de que numerosos procesos industriales tienen lugar a cabo a elevadas temperaturas, las enzimas termoestables son cada vez más

importantes como biocatalizadores; algunas de estas enzimas hipertermófilas son eficaces a temperaturas muy altas hasta 110°C; las enzimas termófilas suelen estar activas entre 60-80°C, en tanto que las enzimas termófilas e hipertermófilas son activas a temperaturas altas e inactivas a temperaturas inferiores a 40°C (Suárez et al., 2004).

## **2.2. Marco conceptual**

### **2.2.1. Entornos extremos**

Podemos encontrar ecosistemas térmicos extremos como los aquellos que encontramos en los polos terrestres, o en las chimeneas submarinas de los fondos oceánicos donde aparecen surgimientos de aguas a altas temperaturas (Gomez, 2016). Durante las últimas décadas, los científicos se han sentido intrigados por los fascinantes organismos que habitan en ambientes extremos. Dichos organismos, conocidos como extremófilos, prosperan en hábitats que para otros aspectos de vida terrestres son intolerablemente hostiles o incluso letales. En nichos extremadamente calientes, fríos y salinos, así como en condiciones ácidas y alcalinas; algunos pueden crecer en desechos tóxicos, solventes orgánicos, metales pesados u otros hábitats que antes se consideraban inhóspitos para la vida (Rampelotto, 2013).

### **2.2.2. Microorganismos extremófilos**

Un extremófilo (del latín *extremus* que significa "extremo" y griego *filia*(*ὀρέξιβα*) que significa "amor") es un organismo que prospera e incluso puede requerir condiciones físicas o geoquímicas extremas que son perjudiciales para la mayoría de la vida en la Tierra. En contraste, los organismos que viven en ambientes más moderados pueden denominarse mesófilos o neutrófilos. En las décadas de 1980 y 1990, los biólogos revelaron que la vida microbiana posee una asombrosa flexibilidad para sobrevivir en ambientes extremos (nichos que son extraordinariamente calientes o ácidos, por ejemplo) que serían completamente inhóspito para los organismos complicados. Varios científicos incluso llegaron a concluir de que la vida puede haberse originado en la Tierra en fuentes hidrotermales en las profundidades de la superficie del océano (Gupta et al., 2014).

Los extremófilos se pueden distribuir en dos categorías extensas: extremófilos verdaderos (obligatorios) que requieren una o más condiciones extremas para crecer y multiplicarse y extremófilos facultativos que pueden tolerar bastante bien condiciones que son tóxicas y/o letales para los abrumadores. mayoría de los organismos vivos, aunque crecen de manera óptima en condiciones "normales". Actualmente, algunos órdenes o géneros contienen solo extremófilos, mientras que otros órdenes o géneros contienen tanto extremófilos como no extremófilos; sin embargo, con la identificación constante de organismos novedosos y la suposición de que hemos identificado menos del 2% de los supuestos microorganismos existentes, esta división puede cambiar con frecuencia (Canganella et al., 2011).

Desde un punto de vista antropocéntrico las condiciones extremófilas se definen generalmente como: temperaturas inferiores a 10° C (**psicrófilos**) y superiores a 40° C (**termófilos**); pH inferior a 5.0 (**acidófilos**) y superior a 8.0 (**alcalófilos**); presión superior a 1 atmósferas (**piezófilos**); concentración de sal superior a 30 g/ L (**halófilos**) y baja disponibilidad de agua (condiciones de sequedad): actividad de agua inferior a 0.9 (**xerófilos**), entre otras (Delgado Romero, 2021).

### **2.2.3. Clasificación de microorganismos extremófilos**

#### **2.2.3.1. Actividad del agua**

En 1953, William James Scott descubrió que el incremento de microorganismos en alimentos no depende del contenido de agua, como la mayoría de las personas esperaba, sino de la actividad del agua. Cuatro años más tarde, desarrolló la idea de actividad mínima del agua para el crecimiento de microorganismos. Hoy en día, los productores de alimentos utilizan habitualmente la actividad del agua para decidir si un producto es susceptible a las bacterias. Como todos los organismos, el crecimiento de microorganismos depende de la cantidad de agua presente en los alimentos. Absorben agua mediante las membranas celulares. Este mecanismo de movimiento del agua depende del gradiente de actividad del agua: el agua se traslada desde un ambiente de alta actividad de agua fuera de la célula a uno con menor actividad dentro de la célula. Cuando la actividad del agua al exterior de la célula disminuye lo suficiente, se produce estrés osmótico: la célula no es capaz de absorber agua y se vuelve inactiva. Los microorganismos no mueren, simplemente dejan de crecer lo suficiente como para causar una infección. Los diferentes organismos afrontan el estrés osmótico de distintas maneras. Por tanto, existen diversos límites de crecimiento para cada organismo. Algunos mohos y levaduras se han

adaptado para tolerar una actividad de agua muy baja (METER Group, 2022). La Tabla 1-1 muestra los límites de crecimiento de la actividad del agua para algunos microorganismos comunes.

**Tabla 2-1:** Límite de crecimiento de la actividad del agua para algunos microorganismos.

<b>a<sub>w</sub></b>	<b>Bacterias</b>	<b>Moho</b>	<b>Levadura</b>
0.97	<i>Clostridium botulinum E</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>		
0.95	<i>Escherichia coli</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Vibrio cholerae</i>		
0.94	<i>Clostridium botulinum A, B</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Stachybotrys atra</i>	
0.93	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	
0.92	<i>Listeria monocytogenes</i>		
0.91	<i>Bacillus subtilis</i>		
0.90	<i>Staphylococcus aureus</i> (anaeróbico)	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0.88			<i>Candida</i>
0.87	<i>Staphylococcus aureus</i> (anaeróbico)		
0.85		<i>Aspergillus clavatus</i>	
0.84		<i>Byssoclamys nivea</i>	
0.83		<i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium islandicum</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Deharymoces hansenii</i>
0.82		<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	
0.81		<i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium patulum</i>	
0.80			<i>Saccharomyces bailii</i>
0.79		<i>Penicillium martensii</i>	
0.78		<i>Aspergillus flavus</i>	
0.77		<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ochraceous</i>	
0.75		<i>Aspergillus restrictus</i> <i>Aspergillus candidus</i>	
0.71		<i>Eurotium chevalieri</i>	
0.70		<i>Eurotium amstelodami</i>	
0.62			<i>Saccharomyces rouxii</i>
0.61		<i>Monascus bisporus</i>	
0.60	Sin proliferación bacteriana		
0.50			
0.40			
0.30			
0.20			

Fuente: (METER Group, 2022)

Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023

### 2.2.3.2. Temperatura

La temperatura es una de las condiciones más significativas para la existencia de la vida, ya que su cambio actúa en gran medida en diferentes procesos físicos y biológicos. A altas temperaturas, se produce la mejora de la fluidez de la membrana, la desnaturalización de las proteínas y los ácidos nucleicos, y la solubilidad de los gases necesarios para las funciones vitales de los microorganismos (Morozkina et al., 2010). Si bien existe todo un espectro continuo de organismos, desde los que tienen la temperatura óptima muy baja hasta los que la tienen muy alta, es posible distinguir cuatro grandes clases de microorganismos con relación a su temperatura de crecimiento óptima: psicrófilos, con temperatura óptima baja; mesófilos, con temperatura óptima moderada; termófilos, con temperatura óptima alta, e hipertermófilos, con temperatura óptima muy alta.

**Tabla 2-2:** Límite de crecimiento de la actividad del agua para algunos microorganismos.

<b>Extremófilo</b>	<b>Descripción</b>
Hipertermófilos	La temperatura óptima para su crecimiento es superior a los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos se produce a temperaturas entre 110 y 113°C.
Termófilos	Crece por encima de los 45°C.
Termófilos facultativos	Crecen en temperatura óptima de 40 a 45°C.
Mesófilos	La temperatura óptima es de unos 37°C. Por lo general, pueden crecer en rangos entre 25 a 45°C.
Psicrófilos	Pueden crecer a temperaturas inferiores a 5°C y hasta 20°C. Habitualmente pueden crecer a temperaturas de alrededor de 10°C.
Psicrófilos facultativos	La temperatura óptima es de 15°C a 20°C.

**Fuente:** (Ramírez D. et al., 2006) y (Ollivier, y otros, 2000)

**Realizado por:** Martínez, T. Andreina, 2023

### 2.2.3.3. pH

Uno de los efectos que tiene la contaminación atmosférica es la acidificación del medio ambiente. La podemos definir como la pérdida de la capacidad neutralizante del suelo y del

agua, como consecuencia del retorno a la superficie de la tierra, en forma de ácidos, de los óxidos de azufre y nitrógeno descargados a la atmósfera (Estevéz, 2015).

El pH es un factor principal que afecta el crecimiento de los microorganismos, algunas bacterias tienden a crecer a un pH bajo (3.0) y los hongos también crecen a pH bajos (1.0). Sin embargo, el rango de pH óptimo para las bacterias varía de 6.0 a 8.5 y muy pocas prefieren un pH de 8.5 o superior (Cervantes, y otros, 2017).

**Tabla 2-3:** Clasificación de microorganismos en función a su pH

<b>Extremófilo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Óptimo</b>	<b>Máximo</b>
Acidófilos	pH > 0	$2.5 \leq \text{pH} \leq 3.0$	
Alcalinotolerantes		pH < 8.5	pH $\geq$ 9.0
Alcalófilos		pH $\geq$ 8.5	pH $\geq$ 10

**Fuente:** (Ollivier, y otros, 2000)

**Realizado por:** Martínez, T. Andreina, 2023

#### 2.2.3.4. Presión

Existen tres tipos de estos microorganismos: barotolerantes, son los microorganismos extremófilos que soportan altas presiones de hasta 400 atmósferas pero que viven mejor si la presión del ambiente es de una atmósfera (que es la presión en la superficie terrestre), barófilos son aquellos extremófilos que viven mejor si en el ambiente que les rodea hay una presión de entre 500 y 600 atmósferas. Por último, están los barófilos extremos, que crecen mejor si están sometidos a una presión de por encima de 700 atmósferas, aunque pueden sobrevivir si se les deja bajo la influencia de una presión ambiental de 1 atmósfera (Gomez, 2016).



**Tabla 2-4:** Clasificación de microorganismos en función a su presión

<b>Extremófilo</b>	<b>Descripción</b>
Barotolerantes	Pueden crecer a presión atmosférica, pero consiguen soportar presiones de hasta unas 500 atmósferas. Su hábitat son las aguas oceánicas con una profundidad de 2000 a 4000 metros.
Barófilos	Crecen de manera óptima a temperaturas superiores a 400 atmósferas. Hay barófilos moderados (facultativos) y barófilos extremos (obligatorios).
Barófilos moderados	Se trata de bacterias que pueden crecer a presión atmosférica, aunque sus óptimas rondan las 400 atmósferas. Viven a profundidades de 5000 a 7000 metros.
Barófilos extremos	Están aislados a profundidades de más de 10000 metros. Como la temperatura del agua a estas profundidades es de sólo 2-3°C, suelen ser al mismo tiempo criófilas.

**Fuente:** (Láñez, 2005)

**Realizado por:** Martínez, T. Andreina, 2023

### **2.3. Microorganismos resistentes a altas temperaturas**

Teniendo en cuenta el factor temperatura, los microorganismos, como es bien sabido, se dividen en psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos. Los microorganismos termófilos que están más extendidos que los hipertermófilos están representados por varias especies de bacterias, incluidas las bacterias fotosintéticas (cianobacterias, bacterias moradas y verdes), enterobacterias (*bacilo*, *Clostridium*, y algunas otras), bacterias tiónicas (*tiobacilo*) y arqueobacterias (*pirococo*, *termococo*, *Sulfolobus*, metanógenos). La capacidad de vivir bajo valores extremos de temperatura condujo al cambio de la estructura de la membrana citoplasmática, y también a la síntesis de extremoenzimas y proteínas de choque térmico (Morozkina et al., 2010).

Los microorganismos que son capaces de crecer a temperaturas entre 45 y 110 grados centígrados pertenecen a los dominios Bacteria y Archaea (Suárez et al., 2004). Pues existen microorganismos como la arquea de nombre *Pyrolobus fumarii* que le encanta el agua hirviendo, de hecho, su temperatura óptima para crecer es 106°C. Aunque en su medio ambiente sobrevive a temperaturas que varían entre 90 y 113°C (Santoyo Pizano, 2020). Entre las bacterias, el grupo mejor adaptado a diversas condiciones extremas es el de las cianobacterias. A menudo

forman tapetes microbianos con otras bacterias, desde el hielo antártico hasta las aguas termales continentales. Las cianobacterias también pueden desarrollarse en lagos hipersalinos y alcalinos, soportar altas concentraciones de metales y tolerar condiciones xerófilas (es decir, baja disponibilidad de agua), formando comunidades endolíticas en regiones desérticas. Sin embargo, las cianobacterias rara vez se encuentran en ambientes ácidos con valores de pH inferiores a 5–6 (Rampelotto, 2013).

El límite superior de temperatura para el crecimiento de cualquier organismo eucariota termófilo es de unos 62-65 °C. Y el límite superior para cualquier eucariota fotosintético es de unos 57 ° - para el alga roja *Cyanidium caldarium*, que crece alrededor de fuentes termales y tiene una temperatura óptima de 45 °C. En contraste con esto, algunas cianobacterias unicelulares pueden crecer hasta 75 °C, y algunos procariotas no fotosintéticos pueden crecer a 100 °C o más (Deacon, 2020).

#### **2.4. Fuentes termales**

Las aguas termales a menudo se asocian con el concepto de «ascensión» de las profundidades del mar. Esta condición muestra el importante papel de las fracturas abiertas limitando los tipos de agua de afloramiento a estructuras muy específicas que permiten una menor variabilidad que la del aguas subterránea en general (Pinuaga Espejel, 1993). Las fuentes termales son manantiales de aguas calientes que contienen sales minerales en diversas cantidades. Se forman en una región volcánica, cuando el agua de la lluvia se filtra en el terreno hasta que alcanza la roca porosa que la absorbe como si fuera una esponja. Como la roca está caliente, lo que sucede después es parecido a una olla a presión en la que el agua hierve. El agua en la roca tiene una presión inferior a la que está más arriba; por eso, cuando absorbe el calor de las rocas derretidas del fondo llega a alcanzar una temperatura de 250°C (Coaguila Pari, 2021).

##### *Origen de las fuentes termales*

A lo largo de los años, los fenómenos hidrotermales, especialmente los géiseres, han llamado la atención de los geólogos y de los científicos en general; dicho de otra manera, debemos entender los conceptos de la teoría moderna de la tectónica de placas, que afirma que casi toda la actividad volcánica se limita a la zona de influencia (en la superficie y en altitudes elevadas)

de los márgenes convergentes, divergentes y reformadores de las placas litosféricas. La lava ascendente creada por la convergencia puede crear un arco de isla. La convergencia, también relacionada con el fenómeno de expansión, es un mecanismo de formación de fuentes termales (Pantoja Alor et al., 2000).

El **agua de origen meteórico o de marea penetra en el suelo y cae a** capas más profundas, debido a la gravedad, aumentando su temperatura durante la circulación subterránea. Luego, esta agua puede fluir hacia la superficie, a través de grietas y hendiduras en la roca. Este proceso de formación a menudo se denomina «origen geotérmico». En cuanto a las **aguas de origen magmático**, se forman por la cristalización del magma, liberando componentes volátiles que pueden escapar en forma de fumarolas, constituidas principalmente por hidrógeno y vapor de agua, además de elementos como flúor, cloro, azufre, carbono, fósforo y boro (Pinuaga Espejel, 1993).

#### Clasificación de fuentes termales

**Tabla 2-5:** Clasificación de fuentes termales

<b>Tipo de agua</b>	<b>Descripción</b>
<b>Por su origen geológico</b>	
Magmáticas	Sus temperaturas son elevadas, siempre superiores a 50°C.
Telúricas	Las temperaturas rara vez llegan a los 50°C
<b>Por su conformación física</b>	
Aguas frías	Temperatura menos de 20°C
Hipotermas o poco frías	Temperaturas de 21 a 35°C
Mesotermas o calientes	Temperaturas 35 a 45°C
Hipertermas	Temperatura más de 45°C
<b>Por sus residuos secos</b>	
Oligominerales	Menos de 0,2 g/L
Medio minerales	De 0,2 a 1 g/L
Minerales	De 1 a 1,5 g/L

Fuente: (Zevallos Mendez, 2016)

Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023

## **2.5. Bioprospección**

La bioprospección consiste en la identificación, evaluación y explotación sistemática de la diversidad de vida en un lugar determinado, y tiene como objetivo buscar recursos genéticos

para propósitos comerciales. En cuanto a los microorganismos, comprende principalmente estrategias para explotar partes cultivables y no cultivables de la biodiversidad microbiana. Otro método que ha sido utilizado por la investigación es la prospección “*in silico*” de secuencias genómicas de microorganismos que ya están disponibles en bases de datos. Todo ello pretende identificar microorganismos, genes, enzimas y/o rutas metabólicas para futuras aplicaciones biotecnológicas en la industria o en la propia investigación (João y Almeida, 2015).

### *Bioprospección in silico*

La prospección *in silico* se basa en el descubrimiento de nuevos genes y rutas metabólicas mediante el análisis de secuencias del genoma en bases de datos. La disminución de los costes de secuenciación ha permitido generar una gran cantidad de información sobre genomas microbianos. La comunidad científica ha puesto a disposición cada vez más genomas completos de bacterias, hongos y arqueas. La prospección de esos genomas mediante genómica comparada y métodos de análisis evolutivo, con la ayuda de herramientas bioinformáticas, ha permitido la rápida identificación de nuevos genes y enzimas con una amplia gama de funciones y aplicaciones. La identificación y validación de nuevas enzimas relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica o el metabolismo de azúcares en bacterias y levaduras son buenos ejemplos de dónde se puede aplicar esta técnica (João y Almeida, 2015).

## **2.6. Potenciales usos biotecnológicos de organismos extremófilos**

La biotecnología es omnipresente y tiene un impacto mayor que el previsto anteriormente en varias industrias diversas, como la producción de piensos y alimentos, la generación de biocombustibles y energía, así como la producción sostenible de compuestos químicos de alto valor (Elleuche et al., 2014).

La utilidad de los extremófilos en diversas aplicaciones industriales y de otro tipo se debe a su amplio espectro de propiedades únicas. Un ímpetu importante que impulsa la investigación sobre los extremófilos es el potencial biotecnológico asociado con los microorganismos y sus productos celulares. Los procesos metabólicos y las funciones biológicas específicas de estos microorganismos están mediados por enzimas y proteínas que son responsables de las propiedades inusuales de los organismos. Con la idea de que los extremófilos son capaces de

sobrevivir en ambientes extremos, se supone que sus enzimas están adaptadas para funcionar de manera óptima en tales condiciones (Gupta et al., 2014).

Las extremozimas son enzimas derivadas de microorganismos extremófilos que pueden soportar condiciones adversas en procesos industriales que durante mucho tiempo se pensó que destruían las proteínas (Elleuche et al., 2014). Estas extremozimas son enzimas que han desarrollado mecanismos moleculares de adaptación a condiciones fisicoquímicas extremas que tienen aplicaciones relevantes como biocatalizadores en procesos industriales de biotransformación (Raddadi et al., 2015).

**Tabla 2-6:** Aplicaciones biotecnológicas de los principales grupos de extremófilos

<b>Organismos extremófilos</b>	<b>Enzimas y compuestos orgánicos</b>	<b>Aplicaciones y productos</b>
Termófilos e hipertermófilos (T 55-105°C)	Amilasas Xilanasas Proteasas	Glucosa, fructosa para edulcorantes Blanqueo de papel Producción de aminoácidos a partir de queratinas, procesamiento de alimentos, repostería, elaboración de cerveza, detergentes.
Psicrófilos y psicrotolerantes (T <20°C)	ADN polimerasas Proteasas neutras Proteasas Amilasas Lipasas Ácidos grasos poliinsaturados Deshidrogenasas	Ingeniería genética Maduración de queso, producción de lácteos aditivos degradadores de polímeros en detergentes. Productos farmacéuticos Biosensores
Acidófilos (pH <3)	Oxidación de azufre	Desulfuración de carbón
Alcalófilos (pH >8.5)	Celulasas Proteasas Amilasas Lipasas Ciclodextrinas Antibióticos	Aditivos degradadores de polímeros en detergentes Estabilización de sustancias volátiles Productos farmacéuticos
Halófilos (crecen con 3 -20% de sal)	Caroteno Glicerol Solutos compatibles Membranas	Colorante alimenticio Productos farmacéuticos Productos farmacéuticos Surfactantes para Productos farmacéuticos

Fuente: (Canganella y Wiegel, 2011)

Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023

## 2.7. Métodos de identificación bacteriana

### 2.7.1. Características macroscópicas

Las colonias son una forma macroscópica de observar la morfología de un grupo de bacterias, incluido los grupos formados por el crecimiento de las bacterias en el medio en el que fueron incubadas durante aproximadamente 24 horas; algunas bacterias requieren algunas semanas de incubación para crecer y pueden constar de millones de bacterias, por lo que las colonias pueden tener entre 0,5 a 4,0 mm de diámetro (Vargas et al., 2015).

La morfología de una colonia dependerá del borde y la forma en que se eleva sobre el medio de cultivo. Así, se menciona que la forma de una colonia puede ser:

- *Circular*: Pueden medir hasta 4,0 mm.
- *Puntiforme*: Denominados también en “cabeza de alfiler”.
- *Irregular*: No representan una forma geométrica.
- *Rizoide*: Presentan una forma helicoidal.
- *Fusiforme*: En forma de husos.

(Vargas et al., 2015)

En cuanto a los bordes estos pueden ser:

- *Enteros*: Son homogéneos en todo su recorrido.
- *Ondulados*: Presentan pequeñas fenestraciones.
- *Lobulados*: Sus bordes son curvados de manera irregular.
- *Filamentosos*: Presentan finos filamentos alrededor de toda la colonia.

(Vargas et al., 2015)

La elevación de la colonia puede ser:

- *Plana*
- *Convexa*
- *Elevada*

(Vargas et al., 2015)

Las colonias pueden presentar diferentes texturas, estas pueden ser:

- *Lisas*: Presentan una superficie homogénea
- *Concéntricas*: Su textura se extiende de manera circular, por lo general de afuera hacia adentro.
- *Arrugadas*: Su superficie presenta pequeñas áreas sobresalientes y leves depresiones.
- *Con curvas*: Llamadas también sinuosas, presenta una textura similar a la concéntrica, la diferencia radica en que este presenta un contorno más irregular.

(Vargas et al., 2015)

Las bacterias en conjunto presentan también otras características como:

- *Pigmentación*: Que puede ser verde, amarillo o grisáceo.
- *Olor*: frutal o putrefacto.
- *Consistencia*: mucoide, liso o rugoso.
- *Comportamiento óptico*: frente a luz transmitida estos pueden ser opacos, translúcidos o transparentes; frente a la luz reflejada estos pueden ser brillantes u opacos.

(Vargas et al., 2015)

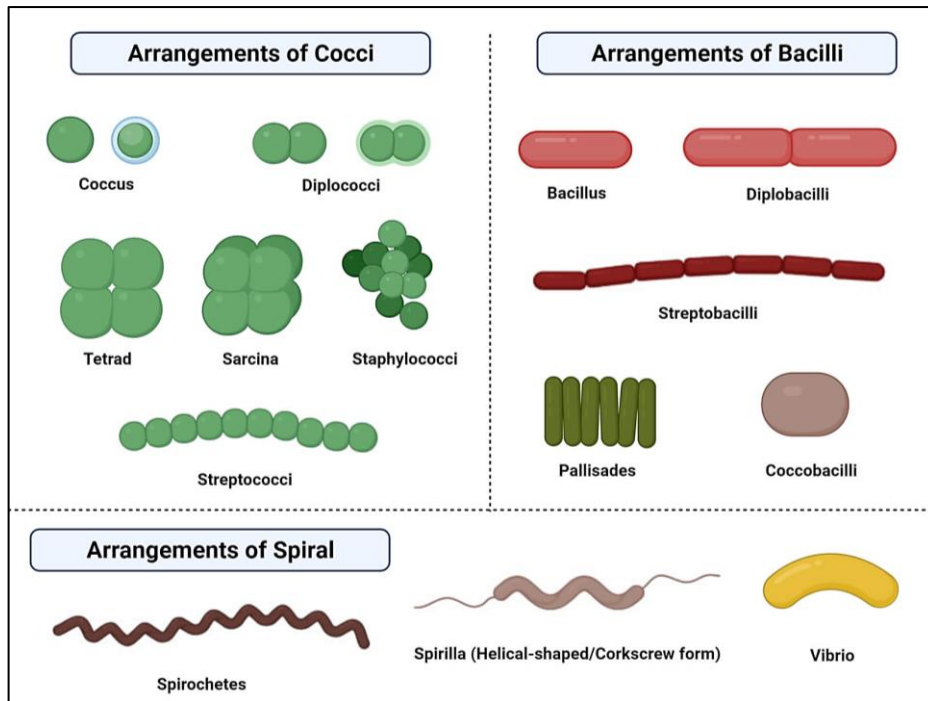
### 2.7.2. *Características microscópicas*

El análisis microscópico en fresco y después de la tinción nos permite determinar la forma, la agrupación, la estructura de las células y su tamaño. La tinción es el primer paso, y eventualmente el único paso para la identificar bacterias. Los colorantes más utilizados y solicitados son la del azul de metileno y la de Gram. La tinción de Gram es a menudo la primera y única herramienta que utilizamos el diagnóstico preliminar al identificar la mayoría de las bacterias (Bou et al., 2011).

Estos son algunos de los términos utilizados para preparaciones teñidas:

- tinción: uniforme, irregular, unipolar, bipolar, etc.
- forma: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, etc.
- cápsula: presente o ausente
- endosporas: ovals, esféricas, terminales, subterminales
- tamaño: cortos, largos, etc.
- bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares
- extremos: redondeados, puntiagudos
- disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.
- formas irregulares: variación en forma y tamaño, ramificados, fusiformes, etc.

(Bou et al., 2011)



**Figura 2-1:** Forma y disposición bacteriana.

Fuente: (Sapkota, 2023)

### 2.7.3. Caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las propiedades metabólicas de las bacterias identificadas. Algunas de estas pruebas son métodos rápidos porque evalúan la presencia de enzimas preformadas y sus resultados varían desde unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren la determinación del crecimiento microbiano con un periodo de incubación inicial de 18 a 48h; este grupo incluye la mayoría de las pruebas que determinan los componentes metabólicos o determinan la sensibilidad de los microorganismos a una sustancia dada después del cultivo en un medio de reconocimiento que contiene el sustrato metabolizado. Sin embargo, algunas de estas pruebas se pueden realizar rápidamente, después de un período de incubación de aproximadamente 2 a 6h (Bou et al., 2011).

#### 2.7.3.1. Catalasa

Esta prueba muestra la presencia de catalasa, una enzima que cataliza la liberación de oxígeno del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Se utiliza para distinguir las bacterias que producen la enzima catalasa, como los *estafilococos*, de las bacterias que no producen catalasa, como los



*streptococos*. Habitualmente se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % para el cultivo de rutina, mientras que para la detección de catalasa en anaerobios se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 15 % (Aryal, 2022).

#### 2.7.3.2. Oxidasa

La prueba de oxidasa se utiliza para identificar bacterias que producen citocromo c oxidasa, una enzima de la cadena de transporte de electrones bacteriana. (nota: todas las bacterias que son oxidasas positivas son aeróbicas y pueden utilizar oxígeno como aceptor terminal de electrones en la respiración. Esto NO significa que sean aerobias estrictas. Las bacterias que son oxidasas negativas pueden ser anaeróbicas, aeróbicas o facultativas; Un resultado negativo de oxidasa simplemente significa que estos organismos no tienen citocromo c oxidasa que oxida el reactivo de la prueba. Pueden respirar usando otras oxidasas en el transporte de electrones). Los géneros bacterianos caracterizados como oxidasa positivos incluyen *Neisseria* y *Pseudomonas*. Los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por ser oxidasa negativos (Arvidson, 2023).

#### 2.7.3.3. Ureasa

La prueba de ureasa identifica aquellos organismos que son capaces de hidrolizar la urea para producir amoníaco y dióxido de carbono. Se utiliza principalmente para distinguir *Proteaeae* ureasa positiva de otras *Enterobacteriaceae*. Normalmente se utilizan dos clases de medios para detectar la acción de la ureasa. El agar urea de Christensen se utiliza para detectar la actividad de la ureasa en una variedad de microorganismos. El caldo de urea de Stuart se utiliza principalmente para la diferenciación de especies de *Proteus*. En el agar urea de Christensen, la producción de ureasa se indica mediante la coloración de un rosa brillante (fucsia) en la parte inclinada que puede extenderse hasta la base después de 1 a 6 horas de incubación. El medio de cultivo permanecerá de color amarillento si el organismo es ureasa negativa. Para el caldo de urea de Stuart, la producción de ureasa está indicada por un color rosa brillante (fucsia) en todo el caldo (Brink, 2016).

#### 2.7.3.4. Indol

La prueba de indol busca la capacidad de un organismo para degradar el aminoácido triptófano y producir indol. Se emplea como parte de los métodos IMViC, una batería de pruebas diseñadas para distinguir entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. El triptófano es un aminoácido que puede sufrir propagación e hidrólisis por bacterias que expresan la enzima triptofanasa. El principal requisito para cultivar un organismo antes de realizar la prueba de indol es que el medio contenga una cantidad suficiente de triptófano. La presencia de indol cuando un microbio crece en un medio rico en triptófano demuestra que un organismo tiene la capacidad de degradar el triptófano. La detección de indol, un subproducto del metabolismo del triptófano, se basa en la reacción química entre el indol y el p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) en condiciones ácidas para producir el colorante rojo rosindol (MacWilliams, 2009).

#### 2.7.3.5. Citrato

Esta prueba se utiliza para determinar si un microorganismo puede utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos de amoníaco como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando alcalosis. Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, estas características aparecen en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* no pueden crecer cuando se utiliza citrato como única fuente de carbono (Bou et al., 2011).

#### 2.7.4. Métodos moleculares

Estos métodos detectan material genético (ácidos nucleicos), tanto ADN como ARN, que es específico de cada especie, así como sus variaciones como mutaciones, deleciones y translocaciones, que provocan que los resultados varían dependiendo de la situación de la investigación (Stamboulian et al., 2012).

### ARNr 16S (rrs)

El análisis de la secuencia de ARNr o ADNr 16S se ha convertido en una herramienta importante en la determinación de las relaciones entre bacterias y se utiliza ampliamente con fines de identificación. La resolución que ofrece el gen 16S rRNA no es lo suficientemente alta para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas. Las cepas disponibles en colecciones de cultivos se depositaron antes de la descripción de la mayoría de las especies conocidas y se clasificaron según datos fenotípicos, lo que puede llevar a una identificación incongruente por Secuenciación del ARNr 16S (García-López et al., 2014).

### ARNr 16S-23S y ARNr 23S

Con los continuos avances en la tecnología de secuenciación durante la última década, la secuenciación de próxima generación (NGS) ofrece varias ventajas sobre la secuenciación de Sanger, incluida una mayor resolución y precisión en la identificación de patógenos microbianos. Además, esta tecnología permite realizar pruebas independientes del cultivo a partir de muestras polimicrobianas complejas para detectar e identificar varios patógenos en paralelo (Rossen et al., 2018). Se ha desarrollado un método de diagnóstico basado en NGS de productos de amplificación por PCR de la región codificante del ARNr 16S-23S (~4,5 kb) (Benítez-Páez y Sanz, 2017), que muestra una resolución más alta y un tiempo reducido para obtener resultados para la identificación bacteriana en comparación con otros métodos de identificación (p. ej., secuenciación Sanger del gen 16S rRNA). Sin embargo, este método tenía algunas limitaciones, incluida la ausencia de una base de datos extensa de la región codificante del ARNr 16S-23S y la falta de software complementario que permitiera una identificación de especies fácil y confiable (Sabat et al., 2017).

### Extracción de ADN

Dependiendo de la velocidad del diagnóstico y/o complejidad del crecimiento del patógeno (bajo inóculo, tasa de crecimiento lenta, necesidad de medios sintéticos complejos, etc.), estos métodos se pueden aplicar directamente a muestras clínicas o cultivos bacterianos. El ADN genómico se extrae a partir de las células enteras utilizando una variedad de métodos estándar o sistemas comerciales, cuya versatilidad depende del tipo de muestra clínica o matriz de muestra,

en el caso de muestras reales, de producto o muestra ambiental. Dependiendo del tipo de bacteria se pueden realizar modificaciones para simplificar u optimizar la extracción de cromosomas (Bou et al., 2011).

### Amplificación

En biología molecular, la amplificación es un proceso mediante el cual una molécula de ácido nucleico se copia enzimáticamente para generar una población de progenie con la misma secuencia que la parental. El método de amplificación más utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El resultado de una amplificación por PCR de un segmento de ADN se denomina "amplicón". Los ácidos nucleicos también se pueden amplificar en una reacción isotérmica que involucra una transcriptasa inversa, que copia  $ARN \rightarrow ADN$ , y una ARN polimerasa dependiente de ADN, que transcribe  $ADN \rightarrow ARN$ . La amplificación isotérmica no genera ADN bicatenario y se utiliza principalmente para copiar ARN. Los métodos basados en ligasa, incluida la llamada reacción en cadena de la ligasa (LCR), también se pueden utilizar para la amplificación específica de ADN o ARN. Un cuarto método general para la amplificación de ácidos nucleicos implica clonar la molécula de ADN seleccionada en células bacterianas o eucariotas, permitiéndoles reproducirse y recolectar el ADN amplificado (Gargaud, y otros, 2011).

#### **2.7.5. Caracterización enzimática**

Los microorganismos termófilos y las enzimas procedentes de microorganismos termófilos se encuentran entre las enzimas extremófilas más estudiadas en los últimos años. Los bacilos termófilos son las principales bacterias utilizadas industrialmente como productoras de enzimas termoestables extracelulares (proteasas, amilasas, lipasas, pululanasa, xilanasas, etc.) (Kambourova, 2018)

##### *2.7.5.1. Lipasas*

Particularmente las lipasas microbianas, son importantes biocatalizadores industriales. Como resultado, la detección, síntesis y purificación de la enzima lipasa a partir de cepas microbianas están en constante evolución para satisfacer las necesidades de las industrias farmacéutica y

alimentaria (Kandasamy, y otros, 2021). Las lipasas termoestables y alcalófilas tienen un gran potencial para ser utilizadas en detergentes, aromatizantes alimentarios, procesamiento de cuero, productos farmacéuticos, cosméticos, etc. (Hasan, Shah y Hameed, 2006a). Las lipasas permanecen enzimáticamente activas en disolventes orgánicos, lo que mejora su potencial y flexibilidad como biocatalizadores contra una amplia gama de huéspedes no naturales (Schmid y Verger, 1998). Las lipasas microbianas suelen ser enzimas extracelulares producidas por diversos hongos, actinomicetos y bacterias (Gupta, Gupta y Rathi, 2004). Las lipasas son de gran importancia en la industria del cuero. Las lipasas pueden desempeñar un papel distinto en la resolución de problemas de la industria del cuero y las curtidurías. Por lo tanto, los investigadores siempre están buscando nuevas lipasas con altas tasas catalíticas a partir de fuentes microbianas (Hasan, Shah y Hameed, 2006b).

#### 2.7.5.2. Celulasas

Las celulasas microbianas se han convertido en los principales biocatalizadores debido a su naturaleza compleja y sus amplias aplicaciones industriales. Las celulasas y hemicelulasas encuentran su aplicación en la hidrolización de biomasa lignocelulósica con el objetivo de producir azúcares monoméricos que sean fácilmente utilizables para la fermentación por microorganismos (Jin et al., 2020). Tanto las bacterias como los hongos son capaces de secretar enzimas celulolíticas. La mayoría de las especies bacterianas se han utilizado predominantemente en procesos industriales, en los que el género *Bacillus* ha ocupado un espacio privilegiado para secretar una colección de enzimas hidrolíticas (Alokika, Kumar y Singh, 2023).

#### 2.7.5.3. Amilasas

Las amilasas son enzimas que hidrolizan las moléculas de almidón para dar diversos productos, incluidas dextrinas y polímeros progresivamente más pequeños compuestos de unidades de glucosa (Windish y Mhatre, 1965). Aunque las  $\alpha$ -amilasas pueden derivarse de varias fuentes, incluidas plantas, animales y microorganismos, las enzimas microbianas generalmente satisfacen las demandas industriales. La principal ventaja de utilizar microorganismos para la producción de  $\alpha$ -amilasas es la capacidad económica de producción a granel y los microbios son fáciles de manipular para obtener enzimas de las características deseadas (Lonsane y Ramesh, 1990). Hoy en día, un gran número de amilasas microbianas están disponibles comercialmente y

han reemplazado casi por completo la hidrólisis química del almidón (Pandey, y otros, 2000). Las  $\alpha$ -amilasas termoestables están disponibles de diferentes fuentes y tienen amplias aplicaciones comerciales en el procesamiento de almidón, la elaboración de cerveza y la producción de azúcar (Lévêque et al., 2000), el diseño en industrias textiles y en los procesos de fabricación de detergentes (Lin, Chyau y Hsu, 1998). Cada aplicación de  $\alpha$ -amilasa requiere propiedades únicas con respecto a la especificidad, la estabilidad y la dependencia de los valores de temperatura y pH (Tigue et al., 1995). Por lo tanto, la detección de microorganismos con mayor actividad de  $\alpha$ -amilasa podría facilitar el descubrimiento de nuevas amilasas adecuadas para nuevas aplicaciones industriales (Gupta et al., 2003).

#### **2.7.6. Resistencia a antibióticos**

El uso excesivo de antibióticos en los últimos años ha producido bacterias resistentes a una amplia gama de antibióticos. Varios elementos genéticos y no genéticos permiten que los microorganismos se adapten y prosperen en condiciones ambientales adversas, como dosis letales de antibióticos. Estos microorganismos se clasifican como extremófilos resistentes a los antibióticos (ARE). Los ARE desarrollan estrategias para obtener una mayor resistencia a los antibióticos mediante la acumulación de múltiples genes o plásmidos que albergan genes de resistencia a múltiples fármacos (MDR). Además de su expresión alterada de múltiples genes, los ARE también sobreviven produciendo enzimas como la penicilinasa que inactivan los antibióticos. Es interesante identificar los mecanismos moleculares subyacentes mediante los cuales los ARE pueden sobrevivir en presencia de una amplia gama de antibióticos en dosis altas (Gabani, Prakash y Singh, 2012).

La resistencia a los antibióticos ha sido ampliamente explorada en bacterias patógenas y no patógenas pertenecientes a los mesófilos. Por el contrario, la resistencia a los antibióticos en las bacterias termófilas ha recibido mucha menos atención por parte de los investigadores (Najar, Sherpa, et al., 2020). Como resultado, puede surgir la siguiente pregunta: ¿qué pasa si las bacterias termófilas desarrollan resistencia y se vuelven patógenas para los humanos? Las bacterias termófilas se están utilizando activamente en los ámbitos biotecnológico e industrial, lo que las convierte en una preocupación creciente. El aspecto más preocupante es que tenemos menos conocimiento de los mecanismos que rigen la aceptación, aparición y expresión de numerosos genes asociados con la resistencia a los antibióticos en bacterias termófilas (Najar, y otros, 2020).

La prueba de susceptibilidad a los antibióticos (AST) es una medida *in vitro* para evaluar la probabilidad de que un agente antimicrobiano en particular trate una infección causada por un organismo en particular. Los métodos básicos de AST incluyen una prueba cualitativa o difusión en disco de Kirby Bauer, un método cuantitativo que puede ser en forma de macrodilución o microdilución en caldo y también se puede realizar en un instrumento automatizado (Goldman, y otros, 2015). Con cualquiera de los métodos, la interpretación de los resultados se basa en las directrices proporcionadas por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Walker, 1999). En el método Kirby Bauer, se colocan discos de papel con una concentración específica de antibiótico sobre un césped de bacterias. Después de la incubación, se mide el diámetro de la zona de inhibición y los resultados se informan como susceptible, intermedio o resistente. La CIM representa la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación durante la noche. Las CIM también son importantes para confirmar la resistencia de los microorganismos a un agente antimicrobiano y también para determinar la potencia de nuevos antibióticos para los cuales no hay interpretaciones del CLSI disponibles (Wanger et al., 2017).

Los antibióticos también se pueden clasificar según su mecanismo de acción. Hay seis mecanismos principales por los cuales un antibiótico ejerce su acción farmacológica. Éstas incluyen:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas.
- Rotura de la membrana celular bacteriana.
- Daño a la membrana celular bacteriana.
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos bacterianos.
- Actividades antimetabolitos

(Open Education Resource, 2023)

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Ubicación

Las aguas termales San Francisco - Guayllabamba se encuentran ubicadas a 7 km del cantón Chambo en la provincia de Chimborazo, en el límite entre las comunidades de Guayllabamba y San Francisco a una altitud de 3400 sobre el nivel del mar y temperatura de 12°C. Estas son de origen volcánico, según estudios, son provenientes del volcán Sangay (situado en la provincia de Morona Santiago) y sobre todo, son aguas ricas en sulfuro (Veintimilla Andrade, 2015).



**Figura 3-1:** Ubicación de Aguas Termales San Francisco – Guayllabamba.

Fuente: Google Earth

#### 3.2. Tipo de investigación

La investigación es de tipo exploratorio y descriptivo, ya que analiza y examina un tipo de comunidad microbiana poco estudiada en el Ecuador con la finalidad de caracterizarla y proporcionar información nueva con los resultados obtenidos de la investigación y sea de utilidad para estudios posteriores.



### **3.3. Diseño de la investigación**

El diseño de la investigación sigue los objetivos específicos señalados en el presente trabajo, es de carácter no experimental tipo transversal ya que describe una o más bacterias que cumplan con la condición de resistencia térmica, caracterizándolas a nivel macro, micro y bioquímico.

### **3.4. Población y muestra de estudio**

La población de estudio en este trabajo son las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba, de las cuales se tomó una muestra de agua para su posterior análisis.

### **3.5. Materiales, equipos y reactivos**

#### **3.5.1. *Materiales***

- Mascarilla
- Mandil
- Guantes
- Botella Ámbar
- Cajas Petri
- Reverbero
- Mechero
- Pipetas de 1 y 10 mL
- Erlenmeyer de 100, 250 y 500mL
- Palillos de madera
- Probeta de 100 y 250mL
- Asa de platino
- Tubos de ensayo de 10mL
- Gradilla
- Placas porta y cubre objetos
- Marcador indeleble
- Cinta masking
- Puntas para micropipeta
- Hisopos

### 3.5.2. *Equipos*

- Micropipeta
- Cámara de flujo laminar
- Estufa bacteriológica
- Termómetro digital
- Autoclave
- Microscopio
- Incubadora
- Vortex
- Multiparámetro

### 3.5.3. *Reactivos*

- Agar Nutritivo
- Agar Luria Bertani
- Agar SIM
- Agar Citrato de Simmons
- Agar Urea
- Solución Urea
- Caldo Nutritivo
- Agua destilada
- Agua termal
- Peróxido de hidrogeno al 3%
- Carboximetilcelulosa (CMC)
- Mantequilla
- Tirillas de Oxidasa
- Cristal Violeta
- Lugol
- Cetona
- Safranina
- Rojo Congo
- Cloruro de sodio 1M
- Tween 80
- Reactivo de Kovac
- Discos de antibióticos

### **3.6. Etapas de la investigación**

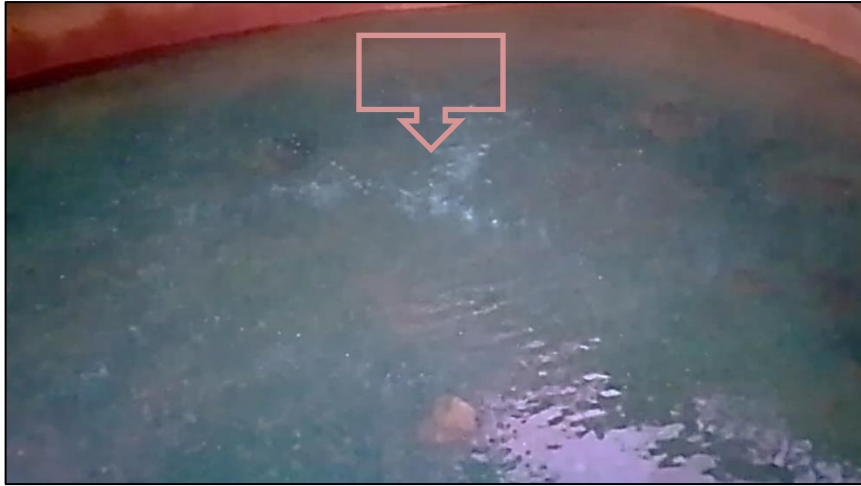
#### **3.6.1. Fase de campo**

Las piscinas recreacionales son alimentadas por las aguas naturales provenientes del volcán Sangay, por ende, se tomó una muestra de agua del punto con mayor caudal situado dentro de la piscina central de las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba ubicadas en el cantón Chambo de la provincia de Chimborazo, con coordenadas de latitud 1°47'27.787" S, longitud 78° 32'46.22" W y una altitud aproximada de 3253.35 msnm.

#### **3.6.2. Muestreo y toma de muestra**

El muestreo se realizó en las aguas termales de San Francisco – Guayllabamba en donde se basó en el procedimiento de (Veintimilla Andrade, 2015), se tomó una muestra de agua del punto de abastecimiento de la piscina principal de las aguas termales (Figura 2-2); cabe mencionar que anterior a la toma de muestra, las piscinas fueron previamente vaciadas e higienizadas. Se midieron in situ los parámetros de pH y temperatura por medio de un multiparámetro; un dato importante que se debe mencionar es que la temperatura fue tomada en tres puntos alrededor de la fuente termal.

Posterior a ello, se llevó a cabo un muestreo simple en la fuente de agua termal, en donde se abrió la botella en el interior de la piscina, evitando tocar la boca de la botella para no contaminarla y una vez abierto el recipiente se lo lavó por tres ocasiones con el agua termal a analizar, luego se tomó la muestra de agua definitiva llenando la botella hasta el tope y se tapó rápidamente, luego se trasladó la muestra de manera inmediata al laboratorio de Biotecnología de la facultad de ciencias de la ESPOCH. Siguiendo las normas NTE INEN 2176:1998 (Calidad de agua: Muestreo y técnicas de muestreo) y NTE INEN 2169:2013 (Calidad de agua: Muestreo, manejo y conservación de muestra), es importante mencionar que esta norma evalúa únicamente parámetros físicos-químicos y no microbiológicos.



**Figura 3-2:** Punto de recolección de muestra de agua.

Fuente: Martínez T. Andreina, 2023.

### **3.6.3. Fase de laboratorio**

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, ubicado en la Panamericana Sur km 1 1/2 de cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

#### **3.6.3.1. Caracterización físico-química de la muestra**

Los parámetros físico-químicos de la muestra de agua como el pH y temperatura se midieron in situ con ayuda del multiparámetro UEXCN YY-400 y el termómetro digital Traceable 4425. La conductividad fue el único parámetro medido en el laboratorio.

#### **3.6.3.2. Transporte de muestra**

El transporte de las muestras fue bajo la norma NTE INEN 2169:2013 (Calidad de agua: Muestreo, manejo y conservación de muestra). Debido a la distancia del agua termal y el laboratorio, las muestras se inocularon 2 horas después de la recolección.

### 3.6.3.3. Preparación del medio de cultivo

Para la investigación se realizó primero un ensayo preliminar con banco de diluciones, en donde se prepararon medios de Agar Nutritivo (NA) y Luria Bertani (LB), para obtener diluciones hasta la  $10^{-4}$  por triplicado. La esterilización del medio se llevó a cabo a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

**Tabla 3-1.** Composición del medio Agar Luria Bertani (LB)

Componente	Concentración g/L
Agar	15.000
Hidrolizado enzimático de caseína	10.000
Cloruro de Sodio	10.000
Extracto de levadura	5.000

Fuente: (HiMedia, 2015)

Realizado por: (Martínez, T. Andreina, 2023)

Se prepararon 7.68g del medio de cultivo LB en 192ml de agua.

**Tabla 3-2:** Composición del medio Agar Nutritivo (NA)

Componente	Concentración g/L
Agar	15.000
Extracto de res	3.000
Peptona	5.000

Fuente: (Becton Dickinson GmbH, 2014)

Realizado por: (Martínez, T. Andreina, 2023)

Se prepararon 5.38g del medio de cultivo NA en 192ml de agua.

### 3.6.3.4. Aislamiento y purificación

A partir de la muestra se realizó un juego de diluciones seriadas de orden 10 hasta  $10^{-4}$  y se inocularon 0,1 ml de cada dilución en medio sólido nutritivo y Luria Bertani utilizando la técnica de siembra por extensión en superficie por triplicado. Posterior a ello, considerando que la temperatura del agua termal tenía un promedio de  $41^{\circ}\text{C}$  se incubó a esa misma temperatura durante 24 a 48 horas. Pasadas 24 horas se seleccionaron las colonias más representativas del

aislamiento correspondiente a la dilución  $10^{-2}$  de los medios NA y medio LB, habiéndose seleccionado un total de 5 colonias: 2 colonias en medio LB y 3 en medio NA.

Para la obtención de cultivos puros se realizaron 4 repiques de las colonias representativas escogidas mediante la resiembra de cada una de ellas en cajas Petri con medio sólido NA y LB utilizando la técnica por estrías por triplicado, bajo incubación a  $41^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 horas.

#### 3.6.3.5. *Caracterización macroscópica*

Se evaluaron las cepas en cuanto a forma, borde, consistencia, superficie, elevación, pigmentación y propiedades ópticas (Peñañiel-Muñoz, 2023).

#### 3.6.3.6. *Caracterización microscópica*

Para obtener la clasificación de las bacterias se realizó tinción de Gram de las colonias aisladas para poder diferenciar entre Gram negativos, Gram positivos y a su vez la morfología microscópica.

#### *Proceso de tinción de Gram*

- a. En un portaobjetos colocar una gota de agua.
- b. Tomar una colonia con un asa de platino previamente esterilizada.
- c. Preparar un frotis y fijarlo cerca de la llama del mechero.
- d. El frotis se cubre con cristal violeta y dejar actuar durante 1 minuto.
- e. Lavar con abundante agua.
- f. Cubrir con lugol y esperar 1 minuto.
- g. Lavar con abundante agua.
- h. Decolorar con alcohol – cetona durante 10 segundos.
- i. Lavar con agua.
- j. Colocar safranina durante 1 minuto.
- k. Lavar con agua.
- l. Esperar a que seque

- m. Colocar una gota de aceite de inmersión y observar en el microscopio con lente de 100X

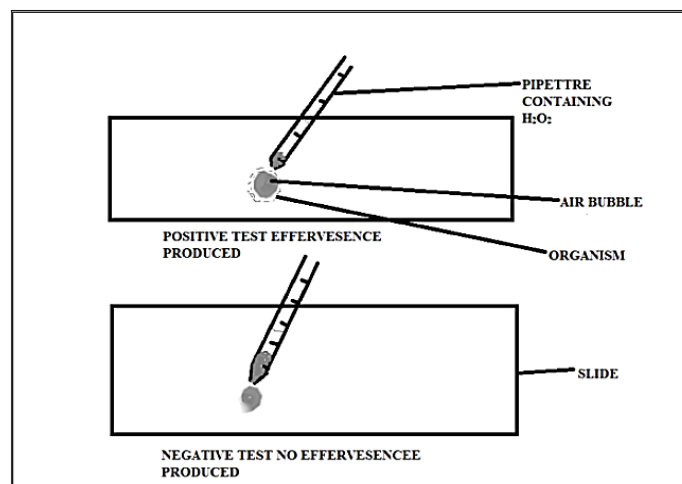
(Sanz Cervera, 2011 pág. 15)

### 3.6.3.7. Caracterización bioquímica

Según los estudios de (Mishra y Ghosh, 2019), (Akmar et al., 2011), (Baltaci et al., 2017), (Yakhlef y Darbouche, 2012), (Irdawati et al., 2018), (Tsoetsi et al., 2020), (Vashist, Sharma y Gupta, 2013) y (Verma, Gupta y Shirkot, 2014) en donde realizaron la caracterización de bacterias termófilas, se decidió trabajar con pruebas de catalasa, oxidasa, citrato, TSI, urea e indol.

#### 3.6.3.7.1. Catalasa

La producción de catalasa por aislados bacterianos se determinó utilizando peróxido de hidrógeno al 3% ( $H_2O_2$ ). Una gota de 3%  $H_2O_2$  se añadió a una cantidad completa de frotis bacteriano colocada con un asa bacteriológica en un portaobjetos de microscopio. Las burbujas de gas detectadas en 10 segundos indicaron una reacción positiva (Vashist et al., 2013), lo que no debe hacerse es homogeneizar el asa con el cultivo, pues puede producir falsos positivos (Alvarez, y otros, 1990 pág. 115).

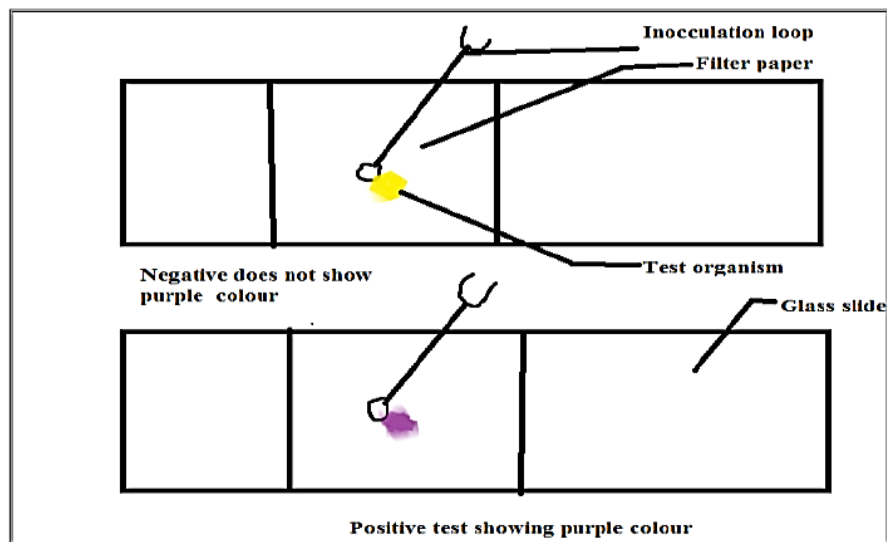


**Figura 3-3:** Prueba de producción de catalasa.

Fuente: (Vashist et al., 2013)

### 3.6.3.7.2. Oxidasa

La investigación del citocromo C oxidasa se realizó utilizando tiras de prueba Bactident oxidasa (Merck, Darmstadt, Alemania). Se aplicó un cultivo bacteriano sobre la superficie reactiva de la tira con un asa bacteriológica previamente esterilizada, si se observó un cambio de color purpura o azul intenso significa que es positivo a oxidasa (Tsoetsi et al., 2020).



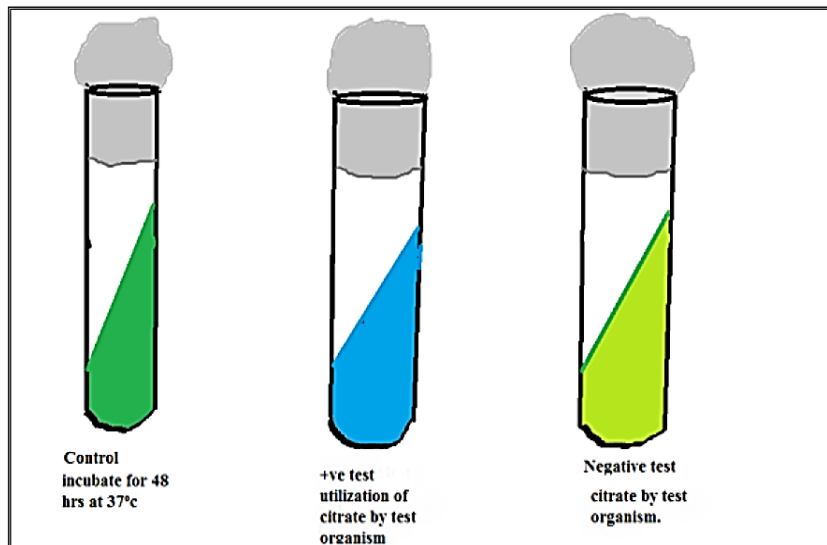
**Figura 3-4:** Prueba de producción de oxidasa.

Fuente: (Vashist et al., 2013)

### 3.6.3.7.3. Citrato

Para la prueba de citrato se preparó 2.18g de Agar de Simmons en 90mL de agua destilada, se asignaron 5mL en tubos estériles de 10mL y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, una vez salido del autoclave se dejó solidificar en pico de flauta. Se inocularon los aislados bacterianos mediante siembra por estría y de esta manera se realizó por triplicado para mayor factibilidad del resultado, luego se incubaron durante 24 horas a 41°C y si existe un cambio de color de verde a azul es una indicación de reacción positiva (Tsoetsi et al., 2020).





**Figura 3-5:** Comprobación de prueba de Citrato.

Fuente: (Vashist et al., 2013)

**Tabla 3-3:** Composición del medio Agar Citrato de Simmons

Componente	Concentración g/L
Citrato de sodio	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.2
Fosfato de amonio dihidrogenado	1.0
Fosfato dipotásico	10
Azul bromotimol	0.08
Agar	15.0

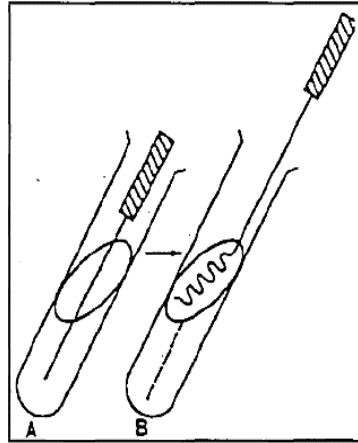
Fuente: (Becton Dickinson GmbH, 2015)

Realizado por: Martínez, Teresa, 2023

#### 3.6.3.7.4. TSI

En la prueba de TSI se pesaron 5.85g de agar en 90mL de agua destilada se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, una vez salido del autoclave se dejó solidificar en pico de flauta. Se inocularon los aislados bacterianos con ayuda de una aguja y se sembró por picadura hasta unos 0.6cm del fondo. Se retira la aguja siguiendo el mismo camino de entrada y, sin volver a cargar el asa se siembra mediante estría la superficie del pico de flauta y de esta manera se realizó por triplicado para obtener mejores resultados. Se incubaron a 41° durante 18-24 horas. Es

importante respetar estos tiempos, ya que lecturas de menor o mayor incubación pueden dar falsamente positivos o negativos (Alvarez, y otros, 1990).



**Figura 3-6:** Técnica de realizar la siembra de un tubo con TSI.

**Fuente:** (Sanz Cervera, 2011 pág. 35)

Pasado el tiempo de incubación se puede encontrar las siguientes reacciones:

- A. Muchos microorganismos pueden reducir el tiosulfato a sulfato de hidrogeno. Esta reacción es característica de los organismos que no fermentan la lactosa y producen sulfuro de hidrogeno ( $\text{SH}_2$ , gas). Típico de los géneros *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter* y algún *Proteus*.
- B. Microorganismos que son incapaces de fermentar la glucosa o lactosa. No existe cambio de color del medio. Característico de las bacterias no fermentadoras, como *Pseudomonas*.
- C. Organismos que solo fermentan la glucosa. Característico de las bacterias que no fermentan a lactosa (*Salmonella*).
- D. Organismos que fermentan la lactosa y la glucosa. Típico de las bacterias coliformes fermentativas como *E. coli* y *Klebsiella*.

(Sanz Cervera, 2011 pág 35-36)



**Figura 3-7:** Resultados de prueba de TSI. A. Rojo/rojo; B. Control (sin inocular); C. Rojo/amarillo; D. Amarillo/amarillo; E. Rojo/amarillo con H<sub>2</sub>S.

Fuente: (MDM, 2020)

**Tabla 3-4:** Composición del medio TSI

Componente	Concentración g/L
Digerido pancreático de caseína	10.0
Digerido péptico de tejido animal	3.0
Glucosa	1.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.
Sulfato ferroso de amonio	0.2
Cloruro sódico	5.0
Tiosulfato sódico	0.3
Rojo fenol	0.025
Agar	13

Fuente: (Becton Dickinson GmbH, 2003)

Realizado por: Martínez, Teresa, 2023

#### 3.6.3.7.5. Urea

Se disolvieron 2.27g de agar urea base (Christensen) en 90mL de agua destilada y 0.18 de solución urea pura (RPI) en 4.5 ml de agua destilada y se autoclavaron conjuntamente durante 15 a 121°C. Posterior a ello, se esperó a que los medios lleguen a una temperatura tolerada y se los mezcló; se debe tomar en cuenta que el color correcto de la solución debe ser de un tomate bajo, de lo contrario, se debería repetir el proceso. Mediante condiciones asépticas se procedió a colocar 5mL en tubos de 10mL y se dejó solidificar en pico de flauta. Después de haberse solidificado el agar se realizó la siembra por medio de estría por triplicado y se incubaron

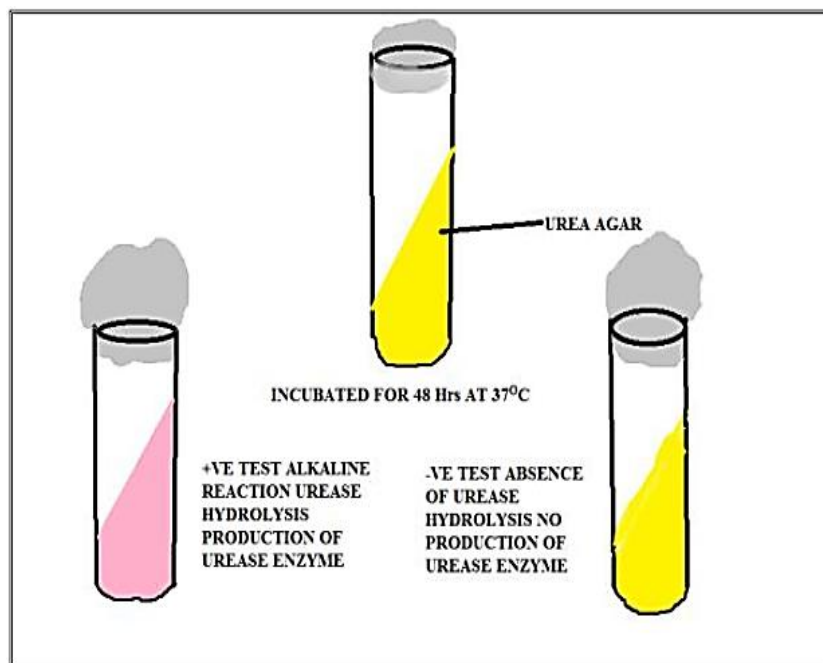
durante 24 horas a 41°C. Se observaron los cambios una vez transcurridos el tiempo de incubación y si presenta un color fucsia se considera una respuesta positiva.

**Tabla 3-5:** Composición del medio de cultivo Agar Urea Base (Christensen)

Componente	Concentración g/L
Peptona	1.0
Glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monopotásico	2.0
Rojo de fenol	0.012
Agar	15.0

Fuente: (Britania, 2021)

Realizado por: Martínez, Teresa, 2023



**Figura 3-8:** Comprobación de prueba de Urea.

Fuente: (Vashist, Sharma y Gupta, 2013)

### 3.6.3.7.6. Indol

Se prepararon 3.6g de agar SIM en 120mL de agua destilada y se asignaron 5mL en tubos estériles de 10mL y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. En este caso, se puso a solidificar de manera vertical y con ayuda de un asa en punta se introdujo el medio por el centro del tubo y

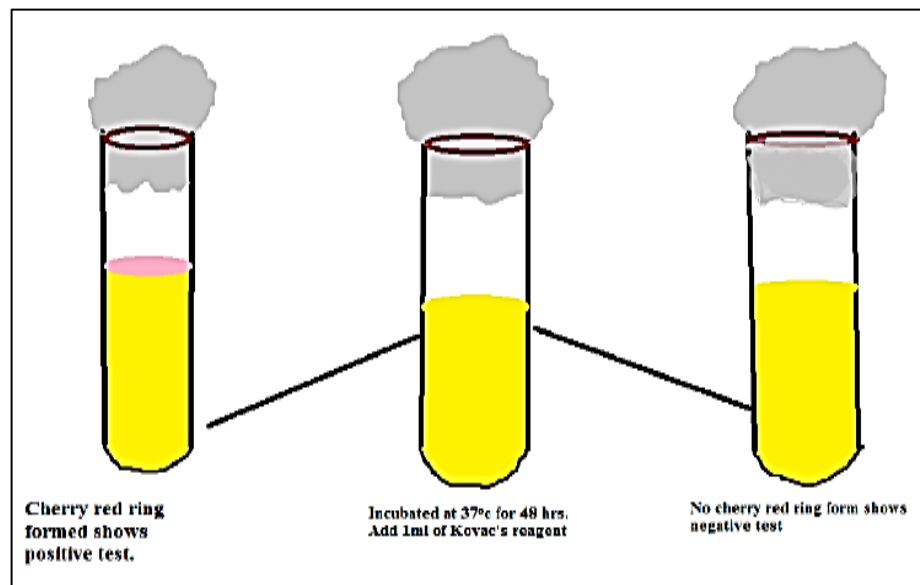
se incubaron durante 24 horas a 41°C. Luego de transcurrido el tiempo, se adicionaron 5 gotas de reactivo de Kovac y pasado 10 segundos se presentará la aparición de color rojo intenso, lo que significa una reacción positiva a indol (Tsotetsi et al., 2020).

**Tabla 3-6:** Composición del medio de cultivo Agar SIM

Componente	Concentración g/L
Peptona	6.1
Tripiana	20.0
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5

Fuente: (Laboratorio Britania S.A, 2001)

Realizado por: Martínez, Teresa, 2023



**Figura 3-9:** Prueba de Indol.

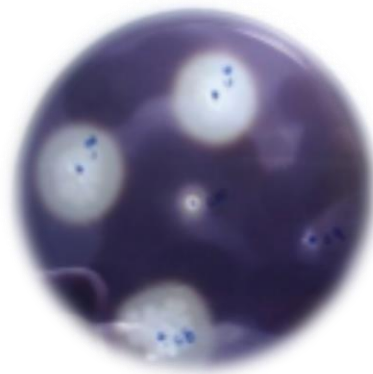
Fuente: (Vashist et al., 2013)

### 3.6.3.8. Evaluación de producción enzimática

Según los estudios de (Bouacem y Bouanane-darenfed, 2021), (El-Gayar, Al Abboud y Essa, 2017), (Baltaci et al., 2017), (Rollof, Hedström y Nilsson-Ehle, 1987), (Khalila, Fitri y Suhartono, 2020), (Mohammad et al., 2017) y (Abdollahi, Ghane y Babaeekhou, 2021), en donde realizaron ensayos sobre la capacidad de producción enzimática de bacterias termófilas, se decidió desarrollar las pruebas de producción de amilasas, celulasas y lipasas.

#### 3.6.3.8.1. *Amilasas*

Cada colonia se sembró en una placa de agar NA y LB suplementados con 1% de almidón y se incubó a 41 °C durante 24 – 48h. Después del período de incubación, las placas se inundaron con yodo de Lugol para detectar la presencia de halos claros alrededor de aquellas colonias bacterianas capaces de secretar amilasa (Bouacem y Bouanane-darenfed, 2021).



**Figura 3-10:** Observación de halos de hidrólisis de almidón en placa.

**Fuente:** (Avalos Zavaleta et al., 2016)

#### 3.6.3.8.2. *Celulasa*

Se utilizó sustrato de carboximetilcelulosa (CMC) al 1% (Sigma-Aldrich) para determinar la actividad celulasa de los aislados. Después de la incubación de la placa inoculada a 41°C durante 24–48h, unas gotas de solución de rojo congo (1%) se agregaron y se mantuvieron a temperatura ambiente por 15 min. Luego, se agregó NaCl 1M al medio para detectar la actividad enzimática. Las zonas claras alrededor de las colonias bacterianas en crecimiento indicaron hidrólisis de celulosa y el crecimiento sin aclaramiento alrededor de las colonias se evaluó como negativo (Abdollahi, Ghane y Babaeekhou, 2021).

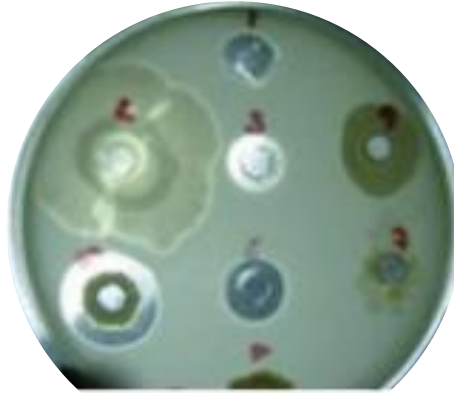


**Figura 3-11:** Halo de hidrólisis de bacterias con actividad celulolítica.

**Fuente:** (Santamaría-baldera et al., 2019)

### 3.6.3.8.3. *Lipasa*

La actividad de la lipasa se observa por la aparición de un halo turbio alrededor de los inóculos en placas de agar Na y LB suplementadas con mantequilla y Tween 80 al 1 %, como explicaron (Mohammad et al., 2017).



**Figura 3-12:** Halo de hidrolisis de actividad lipolítica.

**Fuente:** (Pedroza et al., 2017)

### 3.6.3.9. *Evaluación de sensibilidad a antibióticos*

Según los estudios de (Banoon, Ali y Salih, 2020), (Najar, Sherpa, et al., 2020) y (Najar, Das, et al., 2020) en donde realizaron la resistencia de bacterias termófilas a diferentes antibióticos, se decidió trabajar con amikacina (AK), cloranfenicol (C), eritromicina (EM), metilicina (ME) y oxacilina (OX).

Las 5 colonias fueron sometidas a cinco antibióticos utilizando la técnica de Kirby-Bauer o difusión en disco. En donde se utilizó el medio Mueller-Hinton junto con los medios NA y LB, con la finalidad de observar alguna reacción diferente del antibiótico sometido a la cepa bacteriana. Se preparan 5 tubos de ensayo previamente esterilizados con 1ml de agua destilada para las colonias bacterianas, con ayuda de un asa estéril se toma una muestra de las cepas y se colocaron en los tubos hasta que llegue a la tonalidad de la escala 0.5 de McFarland. Al mismo tiempo, con ayuda de hisopos estériles se tomaron las muestras de las cinco cepas y se inocularon mediante siembra por estrías. Posterior a ello, se procedió a colocar los 5 discos de manera superficial con ayuda de pinzas estériles en cada una de las cajas inoculadas y se incubaron a 41°C por 24 horas (Bernal R. y Guzmán, 1984).

### Medición de halos

Se midieron los diámetros de los halos incluyendo el diámetro del disco (6mm), cabe mencionar que, no se tomó en cuenta dicho diámetro debido a que no existe inhibición, la lectura del diámetro se midió con ayuda de una regla colocándole sobre la superficie de la caja reflejada a una luz para observar con claridad los halos (Bernal R. y Guzmán, 1984).



## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Caracterización del sitio

La siguiente tabla muestra los resultados de las mediciones de los parámetros de la temperatura y el pH tomados in situ.

**Tabla 4-1.** Parámetros físico-químicos del muestreo del agua termal San Francisco – Guayllabamba.

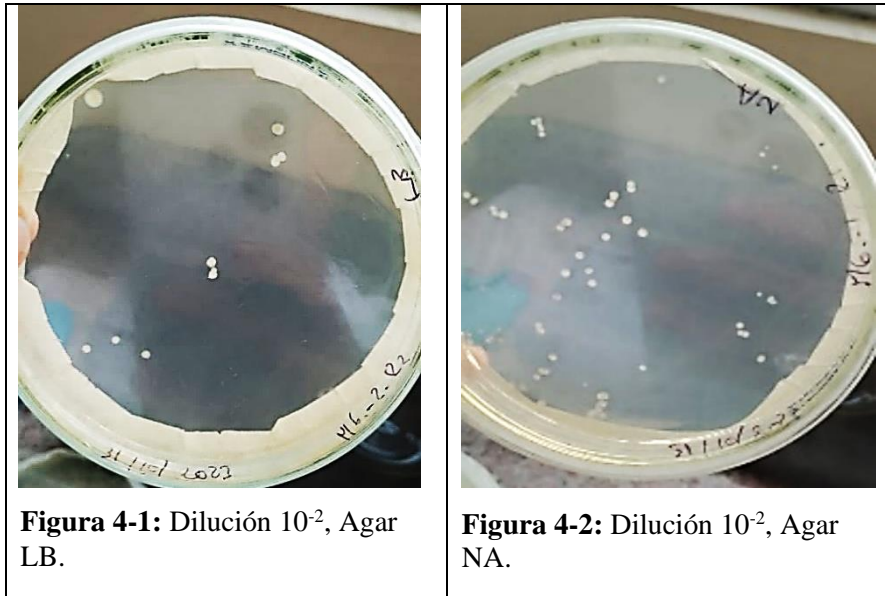
Temperatura (°C)			pH	Conductividad
P1	P2	P3		
42	41	40	6.51	1354
41				

Realizado por: Martínez, Teresa, 2023

Como se puede observar en la tabla 3-1 el promedio de la temperatura tomada en los tres puntos de la fuente termal da un valor de 41°C, por ende, se decidió trabajar a esa misma temperatura.

#### 4.2. Aislamiento y purificación de cultivos

Las bacterias se aislaron en medio NA y LB siguiendo la técnica de dilución en serie, optando por trabajar con los aislamientos de la dilución  $10^{-2}$  en ambos casos, como se muestra en la figura 3-1 y 3-2.

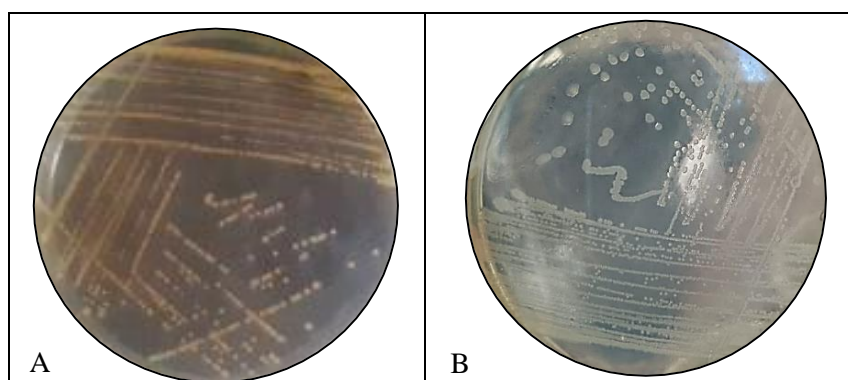


**Figura 4-1:** Dilución  $10^{-2}$ , Agar LB.

**Figura 4-2:** Dilución  $10^{-2}$ , Agar NA.

Realizado por: (Martínez, Teresa, 2023)

La obtención de cultivos puros se realizó mediante la técnica por estrías de las colonias más representativas en función a las características macroscópicas de la dilución escogida de los diferentes medios. Es necesario mencionar que se realizó un ensayo preliminar en donde se trabajó a temperaturas de  $41^{\circ}\text{C}$  (temperatura promedio) y  $50^{\circ}\text{C}$  (temperatura obtenida mediante revisión bibliográfica) para verificar la variación de la existencia en la diversidad de colonias obtenidas, teniendo como resultado un mayor crecimiento de colonias a temperatura de  $41^{\circ}\text{C}$ , por tal razón, las condiciones de crecimiento fueron a  $41^{\circ}\text{C}$  durante 24 - 48h. A partir de la evaluación de las características macroscópicas de las colonias aisladas, se decidió trabajar con 3 colonias del medio NA y 2 del medio LB, las cuales fueron purificadas mediante siembras por estría por 4 repiques. En la figura 3-3 se logra observar el estriado de los cultivos puros de dos colonias aisladas.



**Figura 4-3:** Cultivos puros aislados de agua termal San Francisco - Guayllabamba. A: cepa MG\_C2.R2; B: cepa MG\_C7.R1.

Realizado por: (Martínez, Teresa, 2023)

### 4.3. Características macroscópicas

**Tabla 4-2:** Características macroscópicas de las cepas aisladas.

Código Cepa	Características ópticas	Pigmentación	Borde	Forma	Elevación	Consistencia	Superficie
MG_C2	Opaca	Beige	Entero	Circular	Convexa	Creмоса	Lisa
MG_C3	Traslúcida	Blanca	Ondulado	Irregular	Plana	Seca	Lisa
MG_C4	Opaca	Beige	Entero	Circular	Convexa	Líquida	Lisa
MG_C6	Opaca	Amarilla clara	Entero	Circular	Convexa	Creмоса	Lisa
MG_C7	Traslúcida	Blanca Transparente	Ondulado	Irregular	Plana	Creмоса	Lisa

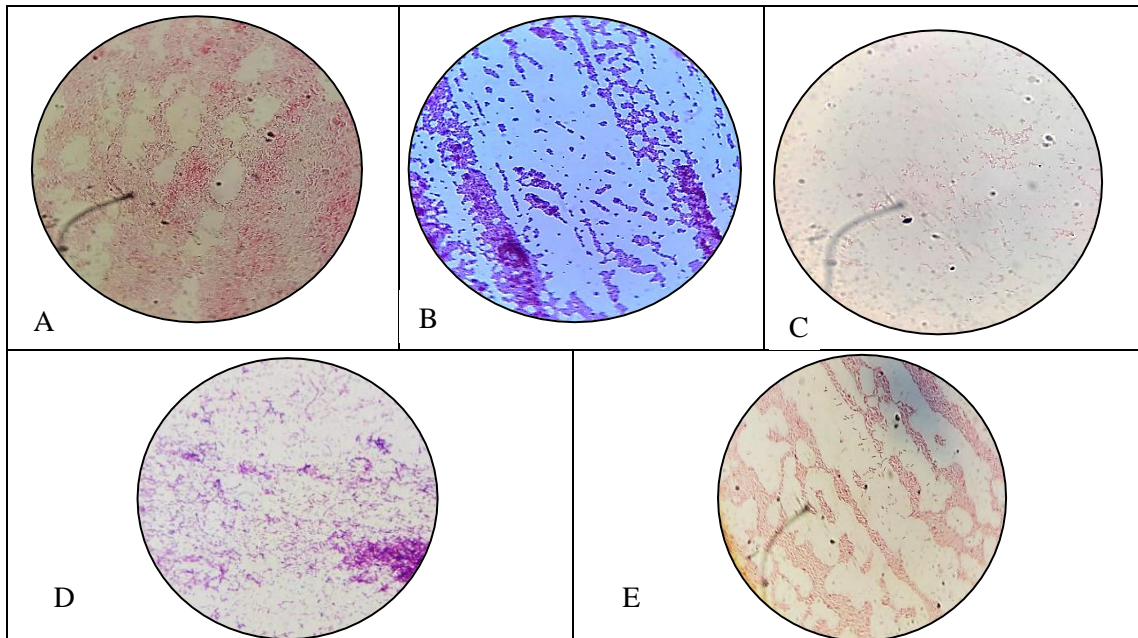
MG: Muestra Guayllabamba  
C: Colonia

Realizado por: Martínez, Teresa, 2023

En la tabla 3-2, se pueden observar los resultados de la caracterización macro de las 5 colonias, en donde el 40% fue translúcida y el 60% fue opaca, resultados que concuerdan con del trabajo de (Mohammad et al., 2017). La pigmentación de las colonias fue variada, ya que se vio que el 20% era blanca, 20% blanca trasparente, un 40% beige y el otro 20% amarilla clara, resultados que tienen coincidencia con el trabajo realizado por (Ifandi y Alwi, 2018) y con los resultados de (Arya et al., 2015) en donde demostraron que la mayoría de las colonias presentaron pigmentaciones similares a la de esta investigación. Se observó que el 60% presentaron bordes entero mientras que el 40% tenían bordes ondulados acorde al estudio realizado por (Hardoko et al., 2020). Con respecto a la forma de las bacterias se observó que el 60% era circular y el 40% irregular, demostrando similitud con los resultados de (Ishaq et al., 2023). En elevación, la convexa se manifestó en la mayoría de las colonias representando el 60% y el 40% era plana, como los resultados que obtienen (Mohammad et al., 2017), En la consistencia de las colonias solo el 20% era seca, el otro 20% era líquida y 60% resultó cremosa, esta información tiene similitud con (Zentgraf et al., 1992). Finalmente, se logró evidenciar que la totalidad de las colonias tuvieron superficie lisa, coincidiendo con los resultados obtenidos por (Arya et al., 2015).

### 4.4. Características microscópicas

La figura 3-4 muestra las imágenes resultantes de las tinciones a las que fueron sometidas las colonias seleccionadas, evidenciándose la presencia de cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos y Gram positivos.



**Figura 4-4:** Tinción de Gram de las colonias. A: MG\_C2; B: MG\_C3; C:MG\_C4: D: MG\_C6 y E: MG\_C7.

**Realizado por:** (Martínez, Teresa, 2023)

**Tabla 4-3.** Resultados de Tinción de Gram.

<b>Cod. Cepa</b>	<b>Forma</b>	<b>Tinción</b>
MG_C2	Bacilos	-
MG_C3	Cocos	+
MG_C4	Bacilos	-
MG_C6	Bacilos	+
MG_C7	Bacilos	-

**Realizado por:** Martínez, Teresa, 2023

Como se puede observar en la tabla 3-3, del total de las cepas aisladas el 40% es Gram positiva, mientras que el 60% es Gram negativa, resultados que concuerdan con el estudio realizado por (Wolella y Tilahun, 2020). Con respecto a su morfología se reveló que la mayoría de las colonias eran bacilos, mientras que una sola colonia presentaba cocos, similares con los resultados obtenidos por (Silaban, Sihotang y Gurning, 2021).

#### **4.5. Características bioquímicas**

La tabla 3-4 muestra los resultados de las pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos en donde se evidenció que las colonias MG\_C2 y MG\_C4 mostraron actividad negativa a prueba

de catalasa, mientras que las colonias MG\_C3, MG\_C6 y MG\_C7 fueron catalasa positiva. En la prueba de oxidasa se puede apreciar que la mayoría de colonias aisladas fueron positivas a esta prueba, a excepción de las colonias MG\_C3 y MG\_C7 que mostraron una respuesta negativa. Se puede observar que todos los aislados bacterianos arrojaron actividad negativa a prueba de indol, esto puede deberse a que las bacterias no poseen enzimas triptofanasas (las cuales son capaces de degradar el triptófano en el medio y producir indol, amoníaco y ácido pirúvico) (Sharma, y otros, 2023), no obstante, algunas colonias reflejaron movilidad variable.

Con respecto a la prueba de urea se pudo observar que las colonias MG\_C3 y MG\_C4 dieron positivo, mientras que las demás colonias fueron negativas. En citrato se puede notar que las colonias que reaccionan a esta prueba fueron MG\_C3, MG\_C4 y MG\_C7 y las colonias MG\_C2 y MG\_C6 reflejaron resultados negativos. Finalmente, en prueba de TSI se demostró que ninguna de las colonias tuvo reacción positiva a la producción de gas y H<sub>2</sub>S, lo que significa que no existe presencia de acidez ni tiosulfato sódico, respectivamente (Becton, Dickinson and Company, 2003), por otra parte, las colonias MG\_C2 y MG\_C4 no fermentan glucosa ni lactosa, mientras que las demás colonias fueron capaces de fermentar glucosa y lactosa.

**Tabla 4-4.** Resultados de la caracterización bioquímica de cepas aisladas.

Cod. Cepa	Catalasa	Oxidasa	SIM		Urea	Citrato	TSI			
			Indol	Movilidad			Gas	H <sub>2</sub> S	Glu.	Lac.
MG_C2	-	+	-	V	-	-	-	-	-	-
MG_C3	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
MG_C4	-	+	-	V	+	+	-	-	-	-
MG_C6	+	+	-	V	-	-	-	-	+	+
MG_C7	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023

De acuerdo con los resultados que arrojaron las pruebas bioquímicas se realizó una investigación profunda y se comparó mediante información bibliográfica, en donde las colonias aisladas podrían corresponder a los siguientes géneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Eikenella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

#### 4.6. Actividad enzimática

Se examinaron aislados bacterianos para comprobar su capacidad para producir importantes enzimas extracelulares en medios suplementados con los respectivos sustratos. Las enzimas probadas incluyeron: celulasa, lipasa y amilasa (Mulango, 2019).

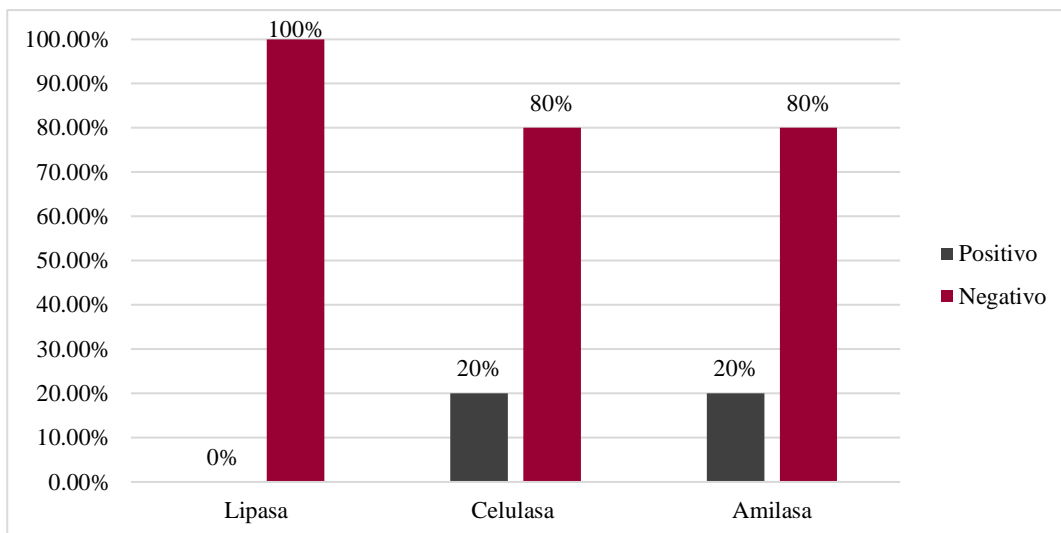
Como se puede observar en la tabla 3-5, ninguna de las colonias aisladas fue capaz de producir lipasa, resultados que coinciden con el estudio realizado por (Mohammad et al., 2017) en donde aislaron y caracterizaron bacterias termófilas de aguas termales jordanas y demostraron que ninguna de las bacterias tuvo la capacidad de producir actividad lipolítica. Con respecto a la actividad de la celulasa solo una de las bacterias aisladas presentó actividad celulolítica, mientras que las demás colonias fueron celulasa negativa, estos resultados son semejantes con el trabajo de (Abdollahi, Ghane y Babaekhou, 2021), quienes realizaron aislamiento y caracterización de bacterias termófilas de áreas geotérmicas en Turquía, la diferencia es que los resultados obtenidos en su estudio reflejaron que ninguna de las colonias presentó actividad a celulasa. Finalmente, la actividad de amilasa fue producida por la colonia MG\_C3, mientras que las colonias restantes tuvieron resultados negativos a esta enzima, resultados que concuerdan con el estudio de (Taha et al., 2020), los cuales investigaron el potencial de actividad enzimática de bacterias termófilas de aguas termales en Egipto y demostraron que una de las bacterias aisladas fue capaz de producir esta enzima.

Las enzimas de bacterias termófilas son cruciales para optimizar procesos industriales, desarrollar productos especializados, mejorar la calidad de alimentos, tratar residuos, y avanzar en la investigación biotecnológica debido a su estabilidad y eficacia a altas temperaturas (Oliart-Ros et al., 2016).

**Tabla 4-5:** Resultados de la actividad enzimática

<b>Cod. Cepa</b>	<b>Lipasas</b>	<b>Celulasas</b>	<b>Amilasas</b>
MG_C2	-	-	-
MG_C3	-	-	+
MG_C4	-	-	-
MG_C6	-	-	-
MG_C7	-	+	-

Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023



**Gráfico 4-1.** Porcentaje de respuesta frente a pruebas de producción enzimáticas.

Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023

#### 4.7. Resistencia a antibióticos

Los aislados bacterianos no solo se pusieron a prueba en el medio Mueller Hinton sino también se trabajó con el medio de cultivo en el que crecieron inicialmente, en los agares LB y NA. Los resultados fueron reflejados en las tablas 3-6, 3-7 y 3-8 respectivamente, mostrando la resistencia o sensibilidad al antibiótico con cada uno de sus diámetros de inhibición.

**Tabla 4-6:** Resultados de la prueba de resistencia a antibióticos en Mueller Hinton.

Cod. Cepa	ANTIBIÓTICO									
	Amikacina 30mcg	Ø (mm)	Cloranfenicol 30mcg	Ø (mm)	Eritromicina 15mcg	Ø (mm)	Meticilina 5mcg	Ø (mm)	Oxacilina 1mcg	Ø (mm)
MG_C2	Sensible	36	Sensible	40	Sensible	40	Sensible	30	Sensible	36
MG_C3	Sensible	13	Sensible	41	Sensible	40	Sensible	10	Resiste	0
MG_C4	Sensible	44	Sensible	42	Sensible	30	Sensible	41	Sensible	20
MG_C6	Sensible	38	Sensible	42	Sensible	38	Sensible	10	Sensible	37
MG_C7	Sensible	38	Sensible	35	Sensible	22	Sensible	36	Sensible	12

Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023

**Tabla 4-7:** Resultados de la prueba de resistencia a antibióticos en Agar Nutritivo.

Cod. Cepa	ANTIBIÓTICO									
	Amikacina 30mcg	Ø (mm)	Cloranfenicol 30mcg	Ø (mm)	Eritromicina 15mcg	Ø (mm)	Meticilina 5mcg	Ø (mm)	Oxacilina 1mcg	Ø (mm)
MG_C2	Sensible	40	Sensible	42	Sensible	40	Sensible	32	Sensible	36
MG_C3	Sensible	13	Sensible	40	Sensible	40	Sensible	10	Resiste	0
MG_C4	Sensible	44	Sensible	42	Sensible	30	Sensible	42	Sensible	20

Realizado por: Martínez, T.Andreina, 2023

**Tabla 4-8:** Resultados de la prueba de resistencia a antibióticos en Agar Luria Bertani.

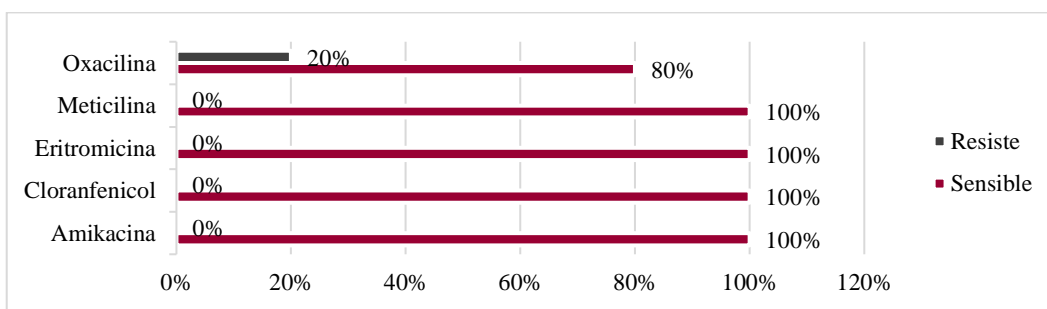
Cod. Cepa	ANTIBIÓTICO									
	Amikacina 30mcg	Ø (mm)	Cloranfenicol 30mcg	Ø (mm)	Eritromicina 15mcg	Ø (mm)	Meticilina 5mcg	Ø (mm)	Oxacilina 1mcg	Ø (mm)
MG_C6	Sensible	38	Sensible	40	Sensible	38	Sensible	10	Sensible	37
MG_C7	Sensible	38	Sensible	38	Sensible	24	Sensible	35	Sensible	10

Realizado por: Martínez, T.Andreina, 2023

Acorde a los resultados obtenidos en las tablas 3-6, 3-7 y 3-8 las bacterias objeto de estudio mostraron sensibilidad a los antibióticos de amikacina, cloranfenicol, eritromicina y meticilina, sin embargo, en el antibiótico oxacilina la colonia MG\_C3 registró resistencia tanto en el agar Mueller Hinton como en agar nutritivo, esto puede deberse “a los productos excesivos de  $\beta$ -lactamasa, entendiéndose que los microorganismos indican este tipo de resistencia a los medicamentos, como las cepas con resistencia borderline (Borderline resistant *Staphylococcus aureus*-BORSA) (resistencia fronteriza) o resistencia de bajo nivel”...“Estas cepas producen una gran cantidad de enzimas, lo que hace que oxacilina y meticilina, que fueron diseñadas para resistir la acción hidrolítica de la penicilinas, sean lenta aunque apreciablemente degradadas, mostrando una resistencia límite a oxacilina con una Concentración Inhibidora Mínima (CIM) de hasta 8  $\mu\text{g/ml}$ ” (González Castellano y Perozo-Mena, 2010), también la resistencia a la oxacilina logra ser concedida por una proteína ligadora de penicilina (PBP, por sus siglas en inglés), conocida como PBP2a o PBP2', la cual está ausente en las cepas susceptibles a la oxacilina y es codificada por el gen *mecA*, el cual forma parte de un complejo móvil (*mec*) que habita dentro de una isla genómica, un componente genético denominado cassette cromosómico



estafilocóccico (SCC, por sus siglas en inglés) (Gomez-Gamboa, y otros, 2016). La resistencia a la oxacilina en bacterias termófilas puede tener implicaciones variadas a nivel ambiental. En general, la oxacilina es un antibiótico utilizado para combatir infecciones causadas por bacterias grampositivas, como *Staphylococcus aureus*. La resistencia a este antibiótico suele ser una preocupación en ambientes clínicos, pero en bacterias termófilas que viven en condiciones extremas de temperatura, la resistencia a la oxacilina puede indicar una adaptación a ambientes con alta presión selectiva. A nivel ambiental, la presencia de bacterias termófilas resistentes a la oxacilina puede reflejar la existencia de mecanismos de resistencia que podrían transferirse a otras bacterias en el medio ambiente. Esto podría contribuir a la propagación de resistencia a antibióticos en diferentes contextos ecológicos (González Castellano y Perozo-Mena, 2010).



**Gráfico 4-2:** Porcentaje de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos

**Realizado por:** Martínez, T. Andreina, 2023

Se realizó un análisis individual de t pareada de los diámetros de los halos de inhibición generados por los 5 antibióticos a los que fueron expuestas cada una de las colonias en tres diferentes medios de cultivo: agar sugerido para pruebas de resistencia antibiótica (Mueller Hinton) y los dos agares utilizados inicialmente para el crecimiento de las colonias (Nutritivo y Luria Bertani), para establecer si este último factor incide en los resultados, se evaluaron los valores p para determinar si existen o no diferencias significativas según el tipo de agar empleado, datos que se pueden observar en la figura 3-5 y están resumidos en la tabla 3-9.

COLONIA MG_C2		
Antibiótico	MH	NA
Amikacina	36	40
Cloranfenicol	40	42
Eritromicina	40	40
Meticilina	30	32
Oxacilina	36	36

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	36,4	38
Varianza	16,8	16
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,9149063	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-2,13809	
P(T<=t) una cola	0,0496503	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318468	
P(T<=t) dos colas	<b>0,0993007</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764451	

COLONIA MG_C3		
Antibiótico	MH	NA
Amikacina	13	13
Cloranfenicol	41	40
Eritromicina	40	40
Meticilina	10	10
Oxacilina	0	0

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	20,8	20,6
Varianza	346,7	336,8
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,9998123	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1	
P(T<=t) una cola	0,1869505	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318468	
P(T<=t) dos colas	<b>0,373901</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764451	

COLONIA MG_C4		
Antibiótico	MH	NA
Amikacina	44	44
Cloranfenicol	42	42
Eritromicina	30	30
Meticilina	41	42
Oxacilina	20	20

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	35,4	35,6
Varianza	103,8	106,8
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,9991517	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-1	
P(T<=t) una cola	0,1869505	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318468	
P(T<=t) dos colas	<b>0,373901</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764451	

COLONIA MG_C6		
Antibiótico	MH	LB
Amikacina	38	38
Cloranfenicol	42	40
Eritromicina	38	38
Meticilina	10	10
Oxacilina	37	37

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	33	32,6
Varianza	169	160,8
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,9978828	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1	
P(T<=t) una cola	0,1869505	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318468	
P(T<=t) dos colas	<b>0,373901</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764451	

COLONIA MG_C7		
Antibiótico	MH	LB
Amikacina	38	38
Cloranfenicol	35	38
Eritromicina	22	24
Meticilina	36	35
Oxacilina	12	10

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	28,6	29
Varianza	125,8	146
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,9869088	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0,431331	
P(T<=t) una cola	0,3442285	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318468	
P(T<=t) dos colas	<b>0,6884571</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764451	

**Figura 4-5.** Resultados de la prueba t pareada de cada una de las colonias.

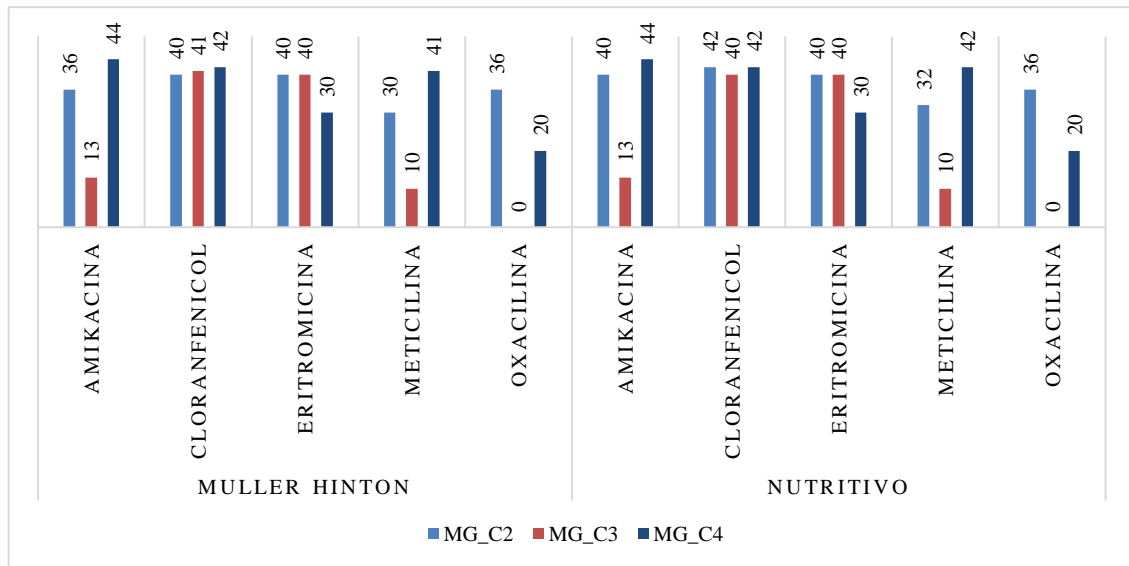
Realizado por: Martínez, T. Andreina, 2023

**Tabla 4-9.** Valores obtenidos del análisis de cada colonia.

Colonia	Valor p	Estadístico de prueba	Toma de decisión: H <sub>0</sub> : No hay diferencias H <sub>1</sub> : Hay diferencias
MG_C2	0,0993007	> 0,05	H <sub>0</sub>
MG_C3	0,373901	> 0,05	H <sub>0</sub>
MG_C4	0,373901	> 0,05	H <sub>0</sub>
MG_C6	0,373901	> 0,05	H <sub>0</sub>
MG_C7	0,6884571	> 0,05	H <sub>0</sub>

Realizado por: Martínez, Teresa, 2023

Existe suficiente evidencia para no rechazar H<sub>0</sub>, debido a que los p valores superan el valor establecido de alfa, además, con un nivel de confianza del 95% se puede decir que los diámetros de los halos de inhibición de los 5 antibióticos de cada colonia en los diferentes agarres no tienen diferencias significativas.

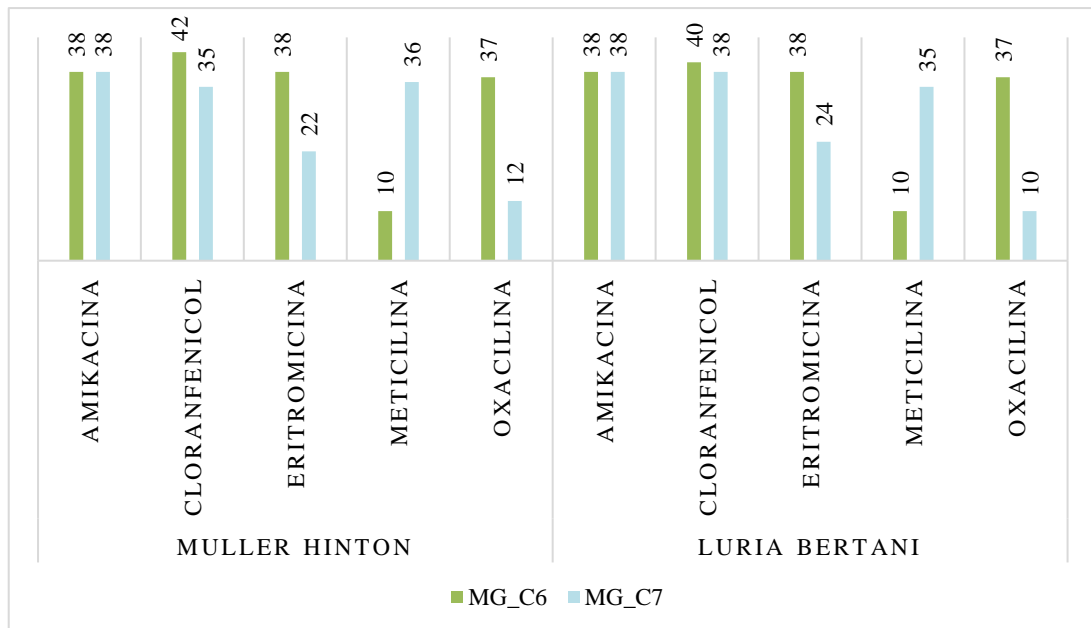


**Gráfico 4-3.** Comparativa de diámetros de inhibición entre agar Müller Hinton y Nutritivo

Realizado por: Martínez, T.Andreina, 2023

Como se puede observar en la gráfica 4-3, los diámetros de inhibición obtenidos en agar Mueller Hinton fueron comparados con los diámetros del medio Agar Nutritivo, determinándose que no existe diferencia significativa en sus diámetros, por ende, las colonias expuestas a amikacina no varían a excepción de la colonia MG\_C2 con diferencia de 4mm, con respecto a cloranfenicol se puede ver que la colonia MG\_C2 varía 2mm y la colonia MG\_C3 varía 1mm. En el antibiótico de eritromicina se mantienen constantes los valores de las tres

colonias. Para meticilina, la colonia MG\_C2 difiere de 2mm y la colonia MG\_C4 con 1mm. Finalmente, con el antibiótico oxacilina no existe diferencia en sus diámetros.



**Gráfico 4-4.** Comparativa de diámetros de inhibición entre agar Muller Hinton y Luria Bertani

**Realizado por:** Martínez, T.Andreina, 2023

En el gráfico 4-4 se logra observar la comparación de diámetros del medio Muller Hinton con el medio Luria Bertani, en donde se puede ver que las colonias MG\_C6 y MG\_C7 se mantienen sus diámetros constantes en el antibiótico de amikacina. En cloranfenicol, la colonia MG\_C6 difiere con 2mm y la colonia MG\_C7 de 3mm. En el antibiótico eritromicina la colonia MG\_C7 tiene 2mm de diferencia. Para meticilina la colonia MG\_C7 difiere de 1mm y finalmente, en oxacilina la colonia MG\_C7 es diferente con 2mm.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

Se aislaron y caracterizaron cinco bacterias termófilas: MG\_C2, MG\_C3, MG\_C4, MG\_C6 y MG\_C7, en donde la caracterización microscópica mostró aislados bacterianos en forma de bacilos Gram positivos, bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. Como se refleja en los resultados de la caracterización bioquímica, en las pruebas de catalasa se obtuvieron tres colonias positivas: MG\_C3, MG\_C6 y MG\_C7; en oxidasa se obtuvo positividad de las colonias MG\_C2, MG\_C4 y MG\_C6; las colonias MG\_C3, MG\_C6 y MG\_C7 reaccionaron positivamente frente a la fermentación de glucosa y lactosa; en prueba de citrato se tuvieron resultados positivos de las colonias MG\_C3, MG\_C4 y MG\_C7; las colonias MG\_C3 y MG\_C4 mostraron actividad ureásica; en pruebas de glucosa y lactosa las colonias que mostraron un resultado positivo fueron MG\_C3, MG\_C6 y MG\_C7; mientras que para indol, gas glucosa y H<sub>2</sub>S todas las colonias dieron negativo, lo que puede significar que no hubo presencia de enzimas triptofanas, acidez y tiosulfato sódico, respectivamente.

Del trabajo se resalta la capacidad de estas bacterias para la producción de importantes enzimas. Los cinco aislados bacterianos fueron capaces de hidrolizar almidón y CMC, lo que indica que son una fuente potencial de amilasas y celulasas.

El 80% de las colonias bacterianas mostraron sensibilidad para amikacina, cloranfenicol, eritromicina y metilina, mientras que el 20% restante tiene una resistencia frente a oxacilina lo que se debería a la ausencia de una proteína fijadora de penicilinas en estas bacterias.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar la caracterización molecular de las bacterias aisladas para su identificación a nivel de género y especie.

Continuar con el estudio de las enzimas para analizarlas con el fin de obtener beneficios aplicativos.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABDOLLAHI, P., GHANE, M. y BABAEKHO, L., 2021. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Gavmesh Goli Hot Spring in Sabalan Geothermal Field, Iran: Thermomonas hydrothermalis and Bacillus altitudinis Isolates as a Potential Source of Thermostable Protease. *Geomicrobiology Journal* [en línea], vol. 38, no. 1, pp. 87-95. ISSN 15210529. DOI 10.1080/01490451.2020.1812774. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1812774>.
- AKMAR, H.N., ASMA, I., VENUGOPAL, B., LATHA, L.Y. y SASIDHARAN, S., 2011. Identification of appropriate sample and culture method for isolation of new thermophilic bacteria from hot spring. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, no. 3, pp. 217-221. ISSN 19960808. DOI 10.5897/AJMR10.462.
- ALOKIKA, KUMAR, V. y SINGH, B., 2023. Biochemical characteristics of a novel ethanol-tolerant xylanase from Bacillus subtilis subsp. subtilis JJBS250 and its applicability in saccharification of rice straw. *Biomass Conversion and Biorefinery*, vol. 13, no. 3, pp. 1937-1949. ISSN 21906823. DOI 10.1007/s13399-020-01257-0.
- ARYA, M., JOSHI, G.K., GUPTA, A.K., KUMAR, A. y RATURI, A., 2015. Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains from Soldhar (Tapovan) hot spring in Central Himalayan Region, India. *Annals of Microbiology*, vol. 65, no. 3, pp. 1457-1464. ISSN 18692044. DOI 10.1007/s13213-014-0984-y.
- AVALOS ZAVALA, R., LLENQUE-DÍAZ, L. y SEGURA-VEGA, R., 2016. Aislamiento y selección de cultivos nativos de Bacillus productoris amilazas a partir de residuos amiláceos del mercado La Hermelinda, Trujillo, Perú. *Rebiol*, vol. 36, no. 2, pp. 16-26. ISSN 2313-3171.
- BALTACI, M.O., GENC, B., ARSLAN, S., ADIGUZEL, G. y ADIGUZEL, A., 2017. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Geothermal Areas in Turkey and Preliminary Research on Biotechnologically Important Enzyme Production. *Geomicrobiology Journal* [en línea], vol. 34, no. 1, pp. 53-62. ISSN 15210529. DOI 10.1080/01490451.2015.1137662. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1137662>.
- BANOON, S.R., ALI, Z.M. y SALIH, T.S., 2020. Antibiotic resistance profile of local thermophilic Bacillus licheniformis isolated from Maysan province soil. *Comunicata Scientiae*, vol. 11, no. July, pp. 1-6. ISSN 21769079. DOI 10.14295/cs.v11i0.3291.
- BECTON DICKINSON GMBH, 2003. Instrucciones de uso-medios en placa listos para usar:

- BD Triple Sugar IRon Agar (TSI Agar). [en línea], pp. 2-5. Disponible en: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254458.pdf>.
- BECTON DICKINSON GMBH, 2014. BBL™ Nutrient Agar. , pp. 6-7.
- BECTON DICKINSON GMBH, 2015. BBL Simmons Citrate Agar Slants. , no. October, pp. 1-3.
- BENÍTEZ-PÁEZ, A. y SANZ, Y., 2017. Multi-locus and long amplicon sequencing approach to study microbial diversity at species level using the MinION™ portable nanopore sequencer. *GigaScience*, vol. 6, no. 7, pp. 1-12. ISSN 2047217X. DOI 10.1093/gigascience/gix043.
- BERNAL R., M. y GUZMÁN, M., 1984. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, vol. 4, no. 3-4, pp. 112. ISSN 0120-4157. DOI 10.7705/biomedica.v4i3-4.1891.
- BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J.A. y VALDEZATE, S., 2011. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. S.l.: s.n. ISBN 9788461479320.
- BOUACEM, K. y BOUANANE-DARENFED, A., 2021. Isolation and characterization of thermophilic bacteria as producers of enzymes from Hammam Righa hot spring. ,
- BRINK, B., 2016. Urease Test Protocol. *American Society for Microbiology* [en línea], no. November 2010, pp. 1-7. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/ac4fe214-106d-407c-b6c6-e3bb49ac6ffb/urease-test-protocol-3223.pdf>.
- BRITANIA, 2021. Christensen Medio ( Urea Agar Base ). *Laboratorios Britania S. A.* [en línea], no. 3, pp. 1-2. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6054e95043249.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e95043249.pdf).
- CANGANELLA, F. y WIEGEL, J., 2011. Extremophiles: From abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, vol. 98, no. 4, pp. 253-279. ISSN 00281042. DOI 10.1007/s00114-011-0775-2.
- DELGADO ROMERO, J.A., 2021. MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS. VIDA MICROBIANA MÁS ALLÁ DE SUS CONDICIONES ÓPTIMAS Memoria que presenta. ,
- EL-GAYAR, K.E., AL ABOUD, M.A. y ESSA, A.M.M., 2017. Characterization of thermophilic bacteria isolated from two hot springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [en línea], vol. 11, no. 2, pp. 743-752. [Consulta: 4 agosto



- 2022]. ISSN 09737510. DOI 10.22207/JPAM.11.2.13. Disponible en: <https://www.microbiologyjournal.org/characterization-of-thermophilic-bacteria-isolated-from-two-hot-springs-in-saudi-arabia/>.
- ELLEUCHE, S., SCHRÖDER, C., SAHM, K. y ANTRANIKIAN, G., 2014. Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 29, no. 1, pp. 116-123. ISSN 18790429. DOI 10.1016/j.copbio.2014.04.003.
- GABANI, P., PRAKASH, D. y SINGH, O. V., 2012. Emergence of antibiotic-resistant extremophiles (AREs). *Extremophiles*, vol. 16, no. 5, pp. 697-713. ISSN 14310651. DOI 10.1007/s00792-012-0475-7.
- GARCÍA-LÓPEZ, M.L., SANTOS, J.A., OTERO, A. y RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M., 2014. Psychrobacter. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, vol. 3, pp. 261-268. DOI 10.1016/B978-0-12-384730-0.00285-8.
- GOMEZ, D.F., 2016. Vida en ambientes extremos. , pp. 147-165.
- GONZÁLEZ CASTELLANO, M. y PEROZO-MENA, A., 2010. Mecanismos de resistencia a antibióticos b-lactámicos en Staphylococcus aureus Mechanisms of Resistance To b-Lactam Antibiotics in Staphylococcus aureus. *Kasmera*, vol. 38, no. 1, pp. 18-35.
- GUPTA, G.N., SRIVASTAVA, S., KHARE, S.K. y PRAKASH, V., 2014. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, vol. 7, no. 2, pp. 371. ISSN 0974-1712. DOI 10.5958/2230-732x.2014.00258.7.
- GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K. y CHAUHAN, B., 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, vol. 38, no. 11, pp. 1599-1616. ISSN 13595113. DOI 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.
- GUPTA, R., GUPTA, N. y RATHI, P., 2004. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, no. 6, pp. 763-781. ISSN 01757598. DOI 10.1007/s00253-004-1568-8.
- HARDOKO, JOSEPHINE, C., HANDAYANI, R. y HALIM, Y., 2020. Isolation, identification and chitinolytic index of bacteria from rotten tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shells. *AAFL Bioflux*, vol. 13, no. 1, pp. 360-371. ISSN 18449166.
- HASAN, F., SHAH, A.A. y HAMEED, A., 2006a. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, no. 2, pp. 235-251. ISSN 01410229. DOI 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

- HASAN, F., SHAH, A.A. y HAMEED, A., 2006b. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Annals of Microbiology*, vol. 56, no. 3, pp. 247-252. ISSN 15904261. DOI 10.1007/BF03175013.
- HIMEDIA, 2015. Luria Bertani Broth, Miller M1245 Composition. [en línea], Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M1245.pdf>.
- IFANDI, S. y ALWI, M., 2018. Isolation of Thermophilic Bacteria from Bora Hot Springs in Central Sulawesi. *Biosaintifika*, vol. 10, no. 2, pp. 291-297. ISSN 23387610. DOI 10.15294/biosaintifika.v10i2.14905.
- IRDAWATI, I., SYAMSUARDI, S., AGUSTIEN, A. y RILDA, Y., 2018. Screening of Thermophilic Bacteria Produce Xylanase from Sapan Sungai Aro Hot Spring South Solok. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 335, no. 1. ISSN 1757899X. DOI 10.1088/1757-899X/335/1/012021.
- ISHAQ, K., SHAH, A.H., FARIQ, A., RASHEED, S. y JANNAT, S., 2023. Diversity of culturable thermophilic bacteria from Tata Pani hot spring of Kotli Azad Jammu and Kashmir. *Biodiversity Data Journal*, vol. 11. ISSN 13142828. DOI 10.3897/BDJ.11.E99224.
- JIN, X., SONG, J., MA, J. y LIU, G.Q., 2020. Thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus fumigatus*: Purification, characterization and potential application in lignocellulose bioethanol production. *Renewable Energy* [en línea], vol. 155, pp. 1425-1431. ISSN 18790682. DOI 10.1016/j.renene.2020.04.054. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.054>.
- JOÃO, R. y ALMEIDA, M., 2015. Microbial bioprospecting. *Embrapa* [en línea], pp. 1-6. Disponible en: [https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1034953/1/bioprospecao\\_microbianainglweb.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1034953/1/bioprospecao_microbianainglweb.pdf).
- KAMBOUROVA, M., 2018. Thermostable enzymes and polysaccharides produced by thermophilic bacteria isolated from Bulgarian hot springs. *Engineering in Life Sciences*, vol. 18, no. 11, pp. 758-767. ISSN 16182863. DOI 10.1002/elsc.201800022.
- KHALIL, A., 2011. Isolation and characterization of three thermophilic bacterial strains (lipase, cellulose and amylase producers) from hot springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 44, pp. 8834-8839. ISSN 16845315. DOI 10.5897/ajb10.1907.
- KHALILA, R., FITRI, L. y SUHARTONO, S., 2020. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria as Cellulolytic Enzyme Producer from the Hot Spring of Ie Seuum

- Aceh Besar, Indonesia. *Microbiology Indonesia*, vol. 14, no. 1, pp. 4. ISSN 1978-3477. DOI 10.5454/mi.14.1.4.
- LABORATORIO BRITANIA S.A, 2001. SIM medio. *Britain lab* [en línea], pp. 3. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070922459b84.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070922459b84.pdf).
- LÉVÊQUE, E., JANEČEK, Š., HAYE, B. y BELARBI, A., 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 26, no. 1, pp. 3-14. ISSN 01410229. DOI 10.1016/S0141-0229(99)00142-8.
- LIN, L., CHYAU, C. y HSU, W., 1998. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23 . *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 28, no. 1, pp. 61-68. ISSN 0885-4513. DOI 10.1111/j.1470-8744.1998.tb00513.x.
- LONSANE, B.K. y RAMESH, M. V., 1990. Production of Bacterial Thermostable  $\alpha$ -Amylase by Solid-State Fermentation: A Potential Tool for Achieving Economy in Enzyme Production and Starch Hydrolysis. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 35, no. C, pp. 1-56. ISSN 00652164. DOI 10.1016/S0065-2164(08)70242-9.
- MACWILLIAMS, M.P., 2009. Indole Test Protocol. *American Society for Microbiology for Microbiology*, no. December 2009, pp. 1-9.
- MDM, 2020. SERIES DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA ( UREA , CITRATO , LISINA , SIM Y TSI ) Kit x unidad, 10 unidades, 20 unidades de medio de cultivo en tubo, listo para usar. *MDM Científica S.A.S.* [en línea], no. 4, pp. 6. Disponible en: <https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/03/IS-24-SERIES-DE-IDENTIFICACION-BIOQUIMICA.pdf> [https://www.mineduc.gob.gt/DIGECADE/documents/Telesecundaria/Recursos Digitales/1o Recursos Digitales TS licencia CC BY-SA 3.0/01 CIENCIAS NATURALES/U4 pp.](https://www.mineduc.gob.gt/DIGECADE/documents/Telesecundaria/Recursos%20Digitales/1o%20Recursos%20Digitales%20TS%20licencia%20CC%20BY-SA%203.0/01%20CIENCIAS%20NATURALES/U4%20pp.pdf)
- METER GROUP, 2022. How water activity controls microbial growth. *Scientific knowledge base article* [en línea], vol. 4, no. 1, pp. 88-100. Disponible en: <https://www.metergroup.com/en/meter-food/expertise-library/microbial-growth>.
- MISHRA, S. y GHOSH, M., 2019. Economic Importance of Extremophilic Microorganisms. , vol. 6, no. 1, pp. 1335-1340.
- MOHAMMAD, B.T., AL DAGHISTANI, H.I., JAOUANI, A., ABDEL-LATIF, S. y KENNES, C., 2017. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates

- as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology* [en línea], vol. 2017. [Consulta: 4 agosto 2022]. ISSN 16879198. DOI 10.1155/2017/6943952. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2017/6943952/>.
- MOROZKINA, E. V., SLUTSKAYA, E.S., FEDOROVA, T. V., TUGAY, T.I., GOLUBEVA, L.I. y KOROLEVA, O. V., 2010. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 1-14. ISSN 00036838. DOI 10.1134/S0003683810010011.
- MULANGO, E., 2019. *ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF EXTREMOPHILIC BACTERIA FROM THE HOT SPRINGS OF LAKE MAGADI , KENYA MASTER OF SCIENCE ( Biotechnology ) JOMO KENYATTA UNIVERSITY OF*. S.l.: s.n.
- NAJAR, I.N., DAS, S., SHERPA, M.T. y THAKUR, N., 2020. Bacterial diversity and functional metagenomics expounding the diversity of xenobiotics, stress, defense and CRISPR gene ontology providing eco-efficiency to Himalayan Hot Springs. *Functional and Integrative Genomics* [en línea], vol. 20, no. 4, pp. 479-496. ISSN 14387948. DOI 10.1007/s10142-019-00723-x. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00723-x>.
- NAJAR, I.N., SHERPA, M.T., DAS, Sayak, DAS, Saurav y THAKUR, N., 2020. Diversity analysis and metagenomic insights into the antibiotic resistance and metal resistances among Himalayan hot spring bacteriobiome-insinuating inherent environmental baseline levels of antibiotic and metal tolerance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [en línea], vol. 21, pp. 342-352. ISSN 22137173. DOI 10.1016/j.jgar.2020.03.026. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.026>.
- OLIART-ROS, R.M., MANRESA-PRESAS, Á., SÁNCHEZ-OTERO, M.G., OLIART-ROS, R.M., MANRESA-PRESAS, Á. y SÁNCHEZ-OTERO, M.G., 2016. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT* [en línea], vol. 11, no. 1, pp. 79-90. ISSN 2007-7858. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es&nrm=iso&tlng=es).
- OPEN EDUCATION RESOURCE, 2023. *Microbiology* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 0854046356. Disponible en: [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiología/Microbiología\\_\(OpenStax\)/14%3A\\_Medicamentos\\_Antimicrobianos/14.03%3A\\_Medicamentos\\_dirigidos\\_a\\_otros\\_microorganismos](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiología/Microbiología_(OpenStax)/14%3A_Medicamentos_Antimicrobianos/14.03%3A_Medicamentos_dirigidos_a_otros_microorganismos).

- PANTOJA ALOR, J. y GÓMEZ CABALLERO, A., 2000. Géiseres y manantiales termales de México. *Ciencias. Revista de difusión*, no. 59, pp. 23-25.
- PEDROZA, C., ROMERO, M. y ORDUZ, S., 2017. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE MICROORGANISMOS AISIADOS DE AGUAS RESIDUAIES CONTAMINADAS CON GRASAS LIPOLYTIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS ISOIATED FROM WASTE WATERS CONTAMINATED WITH FATS ATIVIDADE LIPOLÍTICA DOS MICRORGANISMOS ISOIADOS DE ÁGUAS RESIDUAIS CONTAMI. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [en línea], vol. 15, no. 1, pp. 36-4436. ISSN 1909-9959. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18684/BSAA>.
- PEÑAFIEL-MUÑOZ, E., 2023. CHARACTERIZATION OF BACTERIAL STRAINS WITH RESISTANCE TO LOW TEMPERATURES FROM THE TOBAR DONOSO LAGOON IN THE PIÑAN COMMUNE OF THE IMBABURA PROVINCE. , pp. 16-25.
- PINUAGA ESPEGEL, J., 1993. Infraestructura hidrotermal. *Boletín Sociedad Española Hidrología Médica*, vol. 8, no. 2, pp. 81-83. ISSN 02142813. DOI 10.23853/bsehm.1993.0800.
- RADDADI, N., CHERIF, A., DAFFONCHIO, D., NEIFAR, M. y FAVA, F., 2015. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 19, pp. 7907-7913. ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-015-6874-9.
- RAMÍREZ D., N., SERRANO R., J.A. y SANDOVAL T., H., 2006. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea], vol. 37, pp. 56-71. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>.
- RAMPELOTTO, P.H., 2013. Extremophiles and extreme environments. *Life*, vol. 3, no. 3, pp. 482-485. ISSN 20751729. DOI 10.3390/life3030482.
- ROLLOF, J., HEDSTRÖM, S. y NILSSON-EHLE, P., 1987. Lipolytic Activity of Staphylococcus Aureus Strains From Disseminated and Localized Infections. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*, vol. 95 B, no. 1-6, pp. 109-113. ISSN 16000463. DOI 10.1111/j.1699-0463.1987.tb03096.x.
- ROSSEN, J.W.A., FRIEDRICH, A.W. y MORAN-GILAD, J., 2018. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* [en línea], vol. 24, no. 4, pp. 355-360. ISSN 14690691. DOI 10.1016/j.cmi.2017.11.001. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.001>.
- SABAT, A.J., VAN ZANTEN, E., AKKERBOOM, V., WISSELINK, G., VAN

- SLOCHTEREN, K., DE BOER, R.F., HENDRIX, R., FRIEDRICH, A.W., ROSSEN, J.W.A. y KOOISTRA-SMID, A.M.D.M., 2017. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification-increased discrimination of closely related species. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-12. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-017-03458-6.
- SANI, R.K. y RATHINAM, N.K., 2018. Extremophilic microbial processing of lignocellulosic feedstocks to biofuels, value-added products, and usable power. *Extremophilic Microbial Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Biofuels, Value-Added Products, and Usable Power*, pp. 1-308. DOI 10.1007/978-3-319-74459-9.
- SANTAMARÍA-BALDERA, N., MORI-ZAVALA, R. y KARINA, M., 2019. AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS DEL ISOLATION AND EVALUATION OF CELLULOLYTIC ACTIVITY OF RHIZOBACTERIA FROM BAGUA DISTRICT , AMAZONAS. *Rebiol*, vol. 39, no. 2, pp. 41-48.
- SANZ CERVERA, S.A., 2011. *Prácticas de Microbiología* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 9788469408704. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=100835>.
- SCHMID, R.D. y VERGER, R., 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 37, no. 12, pp. 1608-1633. ISSN 14337851. DOI 10.1002/(sici)1521-3773(19980703)37:12<1608::aid-anie1608>3.0.co;2-v.
- SILABAN, S., SIHOTANG, N.I.Y. y GURNING, K., 2021. Isolation and characterization of thermophilic bacteria as amylase enzyme produced by hots spring in rianiate samosir, indonesia. *Rasayan Journal of Chemistry*, vol. 14, no. 2, pp. 967-973. ISSN 09760083. DOI 10.31788/RJC.2021.1426296.
- STAMBOULIAN y STAMBULIAN, 2012. Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria. *Revista Bioanálisis* [en línea], no. Marzo-Abril, pp. 5. Disponible en: <http://www.revistabioanalisis.com/arxiu/notas/tecnicasmoleculares.pdf>.
- SUÁREZ, C., RAMÍREZ, F., MONROY, Ó., ALAZARD, D. y FERNÁNDEZ, L., 2004. Es posible la vida a altas temperaturas. *Innovacion y Ciencia*, vol. VIII, pp. 8-10.
- TAHA, G.H., EL-SHATOURY, E.H., TOLBA, S.T.M. y IBRAHIM, M.K., 2020. Potential enzyme activity of thermophilic bacteria from hot spring in Egypt. *NBER Working Papers* [en línea], vol. 16, no. 1, pp. 10. Disponible en: <http://www.nber.org/papers/w16019>.
- TIGUE, M.A.M., KELLY, C.T., DOYLE, E.M. y FOGARTY, W.M., 1995. The alkaline

- amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 17, no. 6, pp. 570-573. ISSN 01410229. DOI 10.1016/0141-0229(94)00098-C.
- TSOTETSI, L., PRENAVEN, R., MODISE, S.J. y MONAPATHI, M., 2020. Isolation and identification of xylanase producing thermophilic bacteria from compost piles and optimization of xylanase production. *Journal of Biotech Research*, vol. 11, no. January, pp. 122-132. ISSN 19443285.
- VARGAS, T. y KUNO, A., 2015. Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica* [en línea], vol. 49, no. 2, pp. 2594-2598. Disponible en: [http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280\\_2.pdf?sequence=1](http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequence=1).
- VASHIST, H., SHARMA, D. y GUPTA, A., 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare Journal of Life Science* [en línea], vol. 1, no. 1, pp. 1-7. Disponible en: <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijls/article/view/30/36>.
- VEINTIMILLA ANDRADE, A.V., 2015. Estudio microbiológico de las aguas termales de Guayllabamba o Aguallanchí situadas en el cantón Chambo, provincia de Chimborazo. *Facultad de Ciencias* [en línea], vol. Bachelor, pp. 85. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4455>.
- VERMA, A., GUPTA, M. y SHIRKOT, P., 2014. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria in Natural Hot Water Springs of Himachal Pradesh ( India ). *The bioscan*, vol. 9, no. 3, pp. 947-952.
- WALKER, R.D., 1999. *Standards for antimicrobial susceptibility testing*. S.l.: s.n. ISBN 9781684400669.
- WANGER, A., CHAVEZ, V., HUANG, R.S.P., WAHED, A., ACTOR, J.K. y DASGUPTA, A., 2017. *Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs*. S.l.: s.n. ISBN 9780128053515.
- WINDISH, W.W. y MHATRE, N.S., 1965. Microbial Amylases. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 7, no. C, pp. 273-304. ISSN 00652164. DOI 10.1016/S0065-2164(08)70389-7.
- WOLELLA, E.K. y TILAHUN, B., 2020. Isolation and Characterization of Extremophiles from Shalla / Abidjata Hot Springs , Ethiopia. *Acta Scientific Microbiology*, vol. 3, no. 2, pp. 1-5.
- YAKHLEF, W. y DARBOUCHE, A., 2012. Metabolic Diversity of Thermophilic Bacteria from Hot Springs in Algeria. *Journal Academica*, vol. 2, no. 1, pp. 57-65.

ZENTGRAF, B., HEDLICH, R., GWENNER, C., UYEN, N. V. y THAO, N.N., 1992. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from natural and artificial habitats. *Acta Biotechnologica*, vol. 12, no. 5, pp. 397-403. ISSN 15213846. DOI 10.1002/abio.370120507.





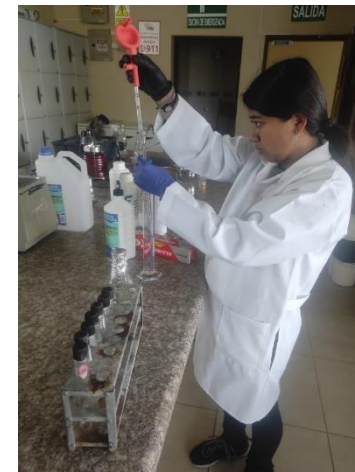
# ANEXOS

## ANEXO A: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

a.

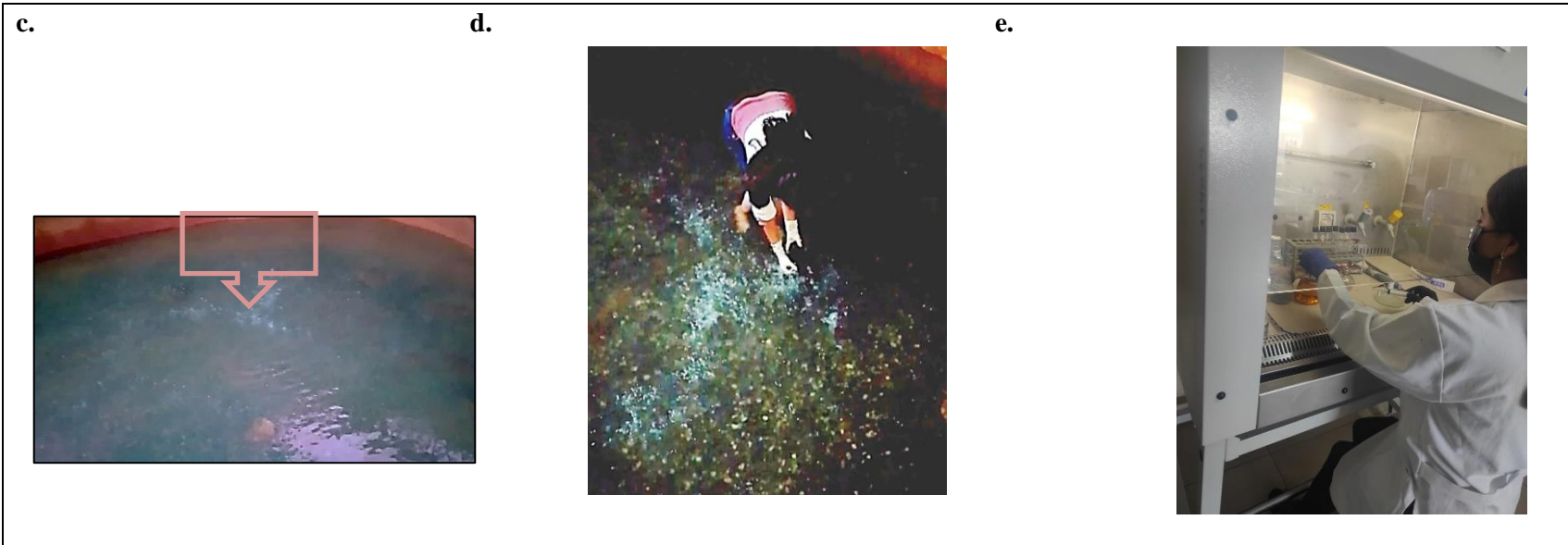


b.



NOTAS	CATEGORÍA DEL DIAGRAMA	<b>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</b> Elaborado por: T. Andreina Martínez	PREPARACIÓN DE MEDIOS		
a. Pesaje de medios. b. Preparación de banco de diluciones.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input checked="" type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		Lámina 1	Escala 1:1	Fecha: 14/08/2023

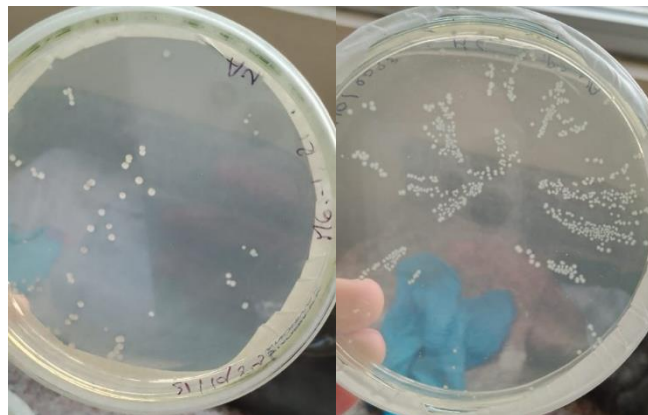
**ANEXO B: TOMA Y SIEMBRA DE MUESTRA**



<b>NOTAS</b>	<b>CATEGORÍA DEL DIAGRAMA</b>	<b>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</b> Elaborado por: T. Andreina Martínez	<b>TOMA DE MUESTRA</b>		
<p><b>c.</b> Punto de muestreo.</p> <p><b>d.</b> Toma de muestra.</p> <p><b>e.</b> Ensayo preliminar con banco de diluciones.</p>	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input checked="" type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		Lámina 2	Escala 1:1	Fecha: 14/08/2023

**ANEXO C: OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS**

**f.**



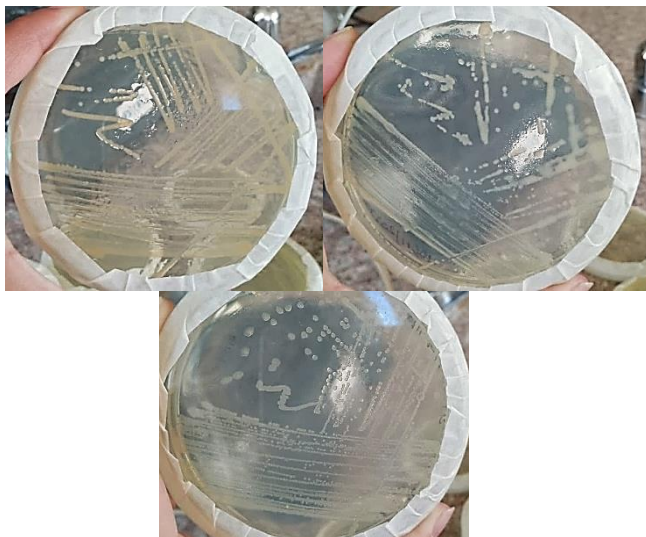
**g.**



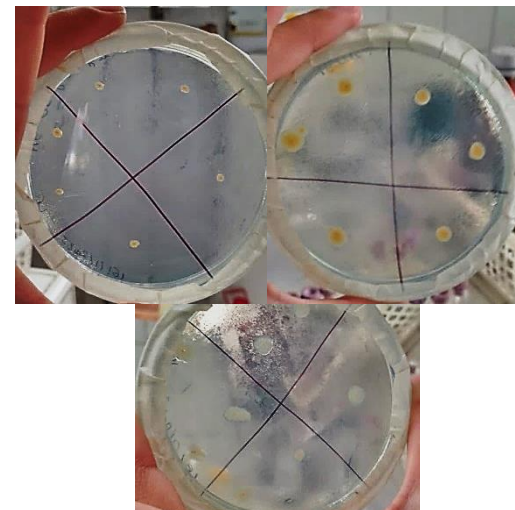
NOTAS	CATEGORÍA DEL DIAGRAMA	<b>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</b> Elaborado por: T. Andreina Martínez	OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS		
<p><b>f.</b> Bacterias obtenidas en ensayo preliminar.</p> <p><b>g.</b> Estriado de bacterias más representativas.</p>	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input checked="" type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		Lámina 3	Escala 1:1	Fecha: 04/09/2023

**ANEXO D: REPIQUES DE CULTIVOS PUROS**

**h.**



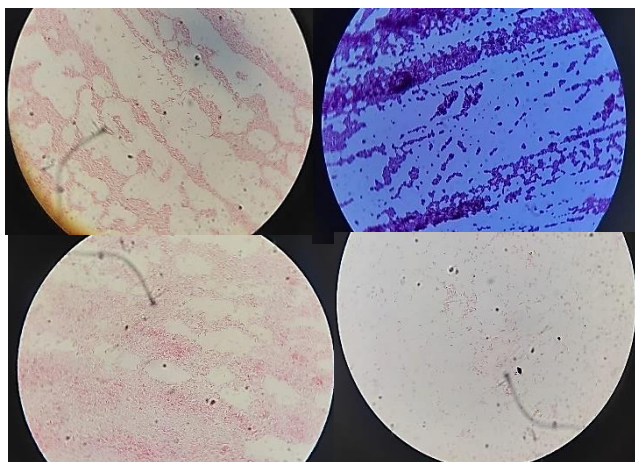
**i.**



NOTAS	CATEGORÍA DEL DIAGRAMA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO	ESTRIADO DE CULTIVOS PUROS		
<p><b>h.</b> Estriados de las colonias MG_C2, MG_C4 y MG_C7.</p> <p><b>i.</b> Clones de las colonias.</p>	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input checked="" type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		Elaborado por: T. Andreina Martínez	Lámina 4	Escala 1:1

**ANEXO E: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA Y BIOQUÍMICA**

**j.**



**k.**



**NOTAS**

- j.** Tinción Gram de las colonias.
- k.** Pruebas bioquímicas.

**CATEGORÍA DEL DIAGRAMA**

- Aprobado
- Certificado
- Información
- Preliminar
- Por aprobar
- Por calificar

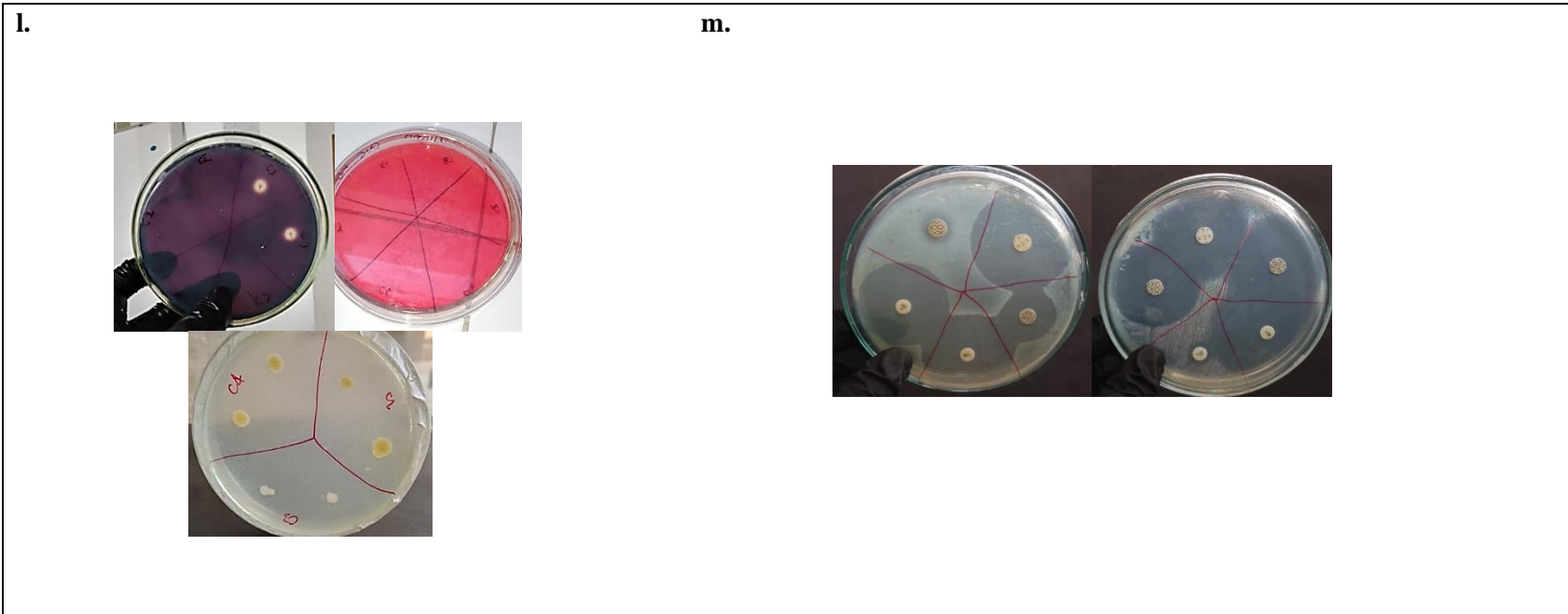
**ESCUELA SUPERIOR  
POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO**

Elaborado por:  
T. Andreina Martínez

**CARACTERIZACIÓN  
MICROSCÓPICA Y  
BIOQUÍMICA**

Lámina 5	Escala 1:1	Fecha: 02/10/2023
-------------	---------------	----------------------

**ANEXO F: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**



NOTAS	CATEGORÍA DEL DIAGRAMA	<b>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</b> Elaborado por: T. Andreina Martínez	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS		
<p><b>l.</b> Actividad enzimática de las colonias.</p> <p><b>m.</b> Resistencia a antibióticos.</p>	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input checked="" type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		Lámina 6	Escala 1:1	Fecha: 16/10/2023



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA**  
**NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO**

**Fecha de entrega:** 25/07/2024

**INFORMACIÓN DEL AUTOR**

**Nombres – Apellidos:** Teresa Andreina Martínez Garcés

**INFORMACIÓN INSTITUCIONAL**

**Facultad:** Ciencias

**Carrera:** Ingeniería Ambiental

**Título a optar:** Ingeniera Ambiental

**Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes, MSc.**

**Directora del Trabajo de Titulación**

**Cristina Gabriela Calderón Tapia, MSc.**

**Asesora del Trabajo de Titulación**