



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

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE LA  
LAGUNA NEGRA EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**TIPO: Proyecto de Investigación**

Presentado para optar al grado académico de:  
**INGENIERA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORA: EVELYN GISELA LÓPEZ PINO**  
**DIRECTOR: Ph.D. VERÓNICA LUCÍA CABALLERO SERRANO**

Riobamba – Ecuador  
2020

**©2020, Evelyn Gisela López Pino**

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

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

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que: el presente trabajo técnico de **“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE LA LAGUNA NEGRA EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”** de responsabilidad de la señorita EVELYN GISELA LÓPEZ PINO ha sido revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada así su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Andrés Beltran Dávalos <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	.....	.....02/03/2021.....
PhD. Verónica Lucía Caballero Serrano <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	.....	.....02/03/2021.....
Msc. Oswaldo Villacrés Cáceres <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	.....	.....02/03/2021.....

Yo, Evelyn Gisela López Pino, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 1 de diciembre del 2020

Evelyn Gisela López Pino

060438699-5

## DEDICATORIA

Dedicado con mucho amor al ser más maravilloso que diosito me pudo enviar, al gran Amor de mi vida mi angelito “André” quien, con sus locuras, y siempre con una sonrisa hace que todo sea posible, mi motor, mi inspiración, mi muso, mi “Príncipe Azul”.

A mis mejores amigas que siempre han estado ahí, levantándome, dándome su apoyo incondicional sin tener precio alguno, mostrándome que la vida es maravillosa pese a las caídas para ustedes mamita hermosa y mi ñañita María José.

A mis sobrinitos Iancito y María José jr., a quienes amo con mi vida, a Oswaldito que más que ser mi cuñado es como mi hermano mayor que al igual, ha estado ahí acompañándome.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi Dios por permitirme aun estar aquí, con salud y vida

Al tesoro más grande que diosito delego para que sea no solo mi madre, sino también mi cómplice, y quien me ha enseñado que la humildad es lo más grande que un ser humano puede tener y demostrándome que las limitaciones no existen.

A mi ñañita que, a pesar de no ser tan cariñosa, siempre está ahí dándome su apoyo y diciéndome que no me rinda.

A mi padre por apoyarme durante este transcurso, como a su vez dándome ánimos.

A mi tutora la Ing. Verónica Caballero por estar ahí en cada etapa de mi tesis, guiándome y brindándome sus conocimientos durante mi trabajo de titulación.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas y formar parte de la misma, siendo mi segundo hogar.

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
INDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN .....	xvi
SUMMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	xviii

## CAPÍTULO I

<b>1</b>	<b>MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Antecedentes de la investigación... ..</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Bioprospección.....</b>	<b>4</b>
<i>1.2.1</i>	<i>Aplicaciones de la Bioprospección.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.1</i>	<i>Ambientes extremos.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Temperatura en ambientes extremos.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.3</i>	<i>Microorganismos psicrófilos.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.4</i>	<i>Microorganismos psicrotolerantes.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.5</i>	<i>Aislamiento de microorganismos.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.6</i>	<i>Medios de cultivo.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.7</i>	<i>Morfología macroscópica y microscópica.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.8.1</i>	<i>Morfología microscópica.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.8.2</i>	<i>Morfología macroscópica.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.9</i>	<i>Identificación Microbiana.....</i>	<i>10</i>

1.2.9.1	<i>Tinción diferencial de Gram</i> .....	10
1.2.9.2	<i>Pared celular de las bacterias Gram Positivas</i> .....	10
1.2.9.3	<i>Pared celular de las bacterias Gram negativas</i> .....	11
1.2.9.4	<i>La pared celular y el mecanismo</i> .....	11
<b>1.2.10</b>	<b><i>Pruebas bioquímicas</i></b> .....	<b>11</b>
1.2.10.1	<i>Pruebas con lectura inmediata</i> .....	11
1.2.10.2	<i>Pruebas lentas con lectura de 18 a 48 h:</i> .....	12
<b>1.3</b>	<b><i>Enzimas</i></b> .....	<b>15</b>
1.3.1	<b><i>Tipos de enzimas</i></b> .....	<b>15</b>
1.2.10.1	<i>Lipasas</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Proteasas</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Deshidrogenasas</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Amilasas</i> .....	11
1.3.2	<b><i>Fuentes de especies microbianas</i></b> .....	<b>17</b>
1.2.10.1	<i>Bacterias</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Hongos</i> .....	11
1.3.3	<b><i>Aplicaciones biotecnológicas</i></b> .....	<b>18</b>
1.2.10.1	<i>Detergentes</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Industria de Cuero</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Industria Farmacéutica</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Cosméticos</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Industria alimenticia</i> .....	11
1.2.10.1	<i>Industria papelera</i> .....	11

## CAPÍTULO II

<b>2</b>	<b>MARCO METODOLOÓGICO</b> .....	20
<b>2.1</b>	<b>Hipótesis y especificación de las variables</b> .....	20
<b>2.1.1</b>	<b><i>Hipótesis</i></b> .....	20
<b>2.1.2</b>	<b><i>Variables</i></b> .....	20
<b>2.1.2.1</b>	<b><i>Variable dependiente</i></b> .....	20
<b>2.1.2.2</b>	<b><i>Variable independiente</i></b> .....	20
<b>2.2</b>	<b>Tipo de investigación</b> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Diseño de Investigación</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Unidad de análisis</b> .....	20
<b>2.5</b>	<b>Etapas de la investigación</b> .....	21
<b>2.5.1</b>	<b><i>Recolección de la muestra</i></b> .....	21
<b>2.5.1.1</b>	<b><i>Área de procedencia de las muestras</i></b> .....	21
<b>2.5.1.2</b>	<b><i>Procedimiento del muestreo</i></b> .....	21
<b>2.5.2</b>	<b><i>Aislamiento</i></b> .....	22
<b>2.5.2.1</b>	<b><i>Medios de cultivo</i></b> .....	22
<b>2.5.2.2</b>	<b><i>Siembra</i></b> .....	23
<b>2.5.2.3</b>	<b><i>Selección de las colonias bacterianas</i></b> .....	23
<b>2.5.2.4</b>	<b><i>Aislamiento por agotamiento por estría</i></b> .....	24
<b>2.6</b>	<b>Caracterización fenotípica</b> .....	24
<b>2.6.1</b>	<b><i>Caracterización macroscópica</i></b> .....	24
<b>2.6.2</b>	<b><i>Caracterización microscópica</i></b> .....	24
<b>2.6.2.1</b>	<b><i>Procdimiento de tinción Gram</i></b> .....	25
<b>2.6.3</b>	<b><i>Idntificación bioquímica bacteriana</i></b> .....	26
<b>2.6.3.1</b>	<b><i>Pruebas de lectura inmediata</i></b> .....	25

2.6.3.1.1	<i>Catalasa</i> .....	25
2.6.3.1.2	<i>Coagulasa</i> .....	25
2.6.3.2	<i>Pruebas de lectura lenta</i> .....	26
2.6.3.2.1	<i>Kligler Hierro Agar</i> .....	26
2.6.3.2.2	<i>Agar Citrato</i> .....	27
2.6.3.2.3	<i>Sulfuro-Indol-Mortalidad (SIM)</i> .....	27
2.6.3.2.4	<i>Ureasa</i> .....	28
2.6.3.2.5	<i>Agar de Sal de Manitol</i> .....	29
2.6.3.2.6	<i>Determinación cualitativa del potencial de la actividad proteolítica y lipolítica</i> .....	29

### CAPÍTULO III

<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	31
<b>3.1</b>	<b>Caracterización físico-química del agua de la Laguna Negra</b> .....	31
<b>3.2</b>	<b>Aislamiento de colonias bacterianas</b> .....	32
3.2.1	<i>Siembra y estimación del número de colonias de las muestras</i> .....	32
3.2.2	<i>Selección y aislamiento de las colonias</i> .....	32
3.2.3	<i>Caracterización macroscópica y microscópica</i> .....	34
3.2.3.1	<i>Tinción Gram</i> .....	34
<b>3.3</b>	<b>Caracterización macroscópica de los clones aislados</b> .....	36
3.3.1.	<i>Forma</i> .....	36
3.3.2.	<i>Borde</i> .....	37
3.3.3.	<i>Elevación</i> .....	38
3.3.4.	<i>Color</i> .....	39
<b>3.4</b>	<b>Identificación Bacteriana a través de pruebas bioquímicas</b> .....	42
<b>3.5.</b>	<b>Resultados de la cualificación proteolítica y lipolítica</b> .....	44

<b>CONCLUSIONES</b> .....	46
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	47
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas .....	15
<b>Tabla 2-1:</b> Clasificación de las proteasas de acuerdo a su sitio catalítico .....	16
<b>Tabla 1-2:</b> Composición del Medio de cultivo PCA. ....	22
<b>Tabla 2-2:</b> Composición del <i>medio Kligler Hierro Agar</i> .....	26
<b>Tabla 3-2:</b> Composición <i>del medio Agar Citrato</i> .....	27
<b>Tabla 4-2:</b> Composición del <i>medio Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM)</i> .....	27
<b>Tabla 5-2:</b> Composición del medio <i>Agar de Sal de Manitol</i> .....	29
<b>Tabla 1-3:</b> Características físico-químicas del agua de Laguna <i>Negra</i> .....	31
<b>Tabla 2-3:</b> Colonias por el número de muestras.....	31
<b>Tabla 3-3:</b> Identificación de las colonias para la caracterización .....	32
<b>Tabla 4-3:</b> Identificación de las colonias para la caracterización .....	32
<b>Tabla 5-3:</b> Observación cuantitativa de la actividad proteolítica de las colonia .....	33
<b>Tabla 6-3:</b> Clones obtenidos en los tres repiques realizados a <i>13°C</i> .....	33
<b>Tabla 7-3:</b> Clones obtenidos en los tres repiques realizados a <i>37°C</i> .....	34
<b>Tabla 8-3:</b> Tinción Gram (PCA+Mantequilla y PCA+Leche Descremada a <i>13°C</i> ).....	35
<b>Tabla 9-3:</b> Tinción Gram (PCA+Mantequilla y PCA+Leche Descremada a <i>37°C</i> ).....	40
<b>Tabla 10-3:</b> Caract. (PCA+Mantequilla y PCA+Leche Descremada a <i>13°C</i> ).....	41
<b>Tabla 11-3:</b> Caract. PCA+Mantequilla y PCA+ Leche Descremada a <i>37°C</i> .....	41
<b>Tabla 12-3:</b> Bacilos Gram <i>Negativos</i> .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1-1:** Agrupaciones de las bacterias .....9

**Figura 2-1:** Ubicación de la Laguna Negra.....21

## ÌNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos $13^{\circ}C$ .....	34
<b>Gráfico 2-3:</b> Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos $37^{\circ} C$ .....	35
<b>Gráfico 3-3:</b> Forma de los clones cultivados a $13^{\circ} C$ .....	36
<b>Gráfico 4-3:</b> Forma de los clones cultivados a $37^{\circ} C$ .....	36
<b>Gráfico 5-3:</b> Tipo de Borde de los clones cultivados a $13^{\circ} C$ .....	37
<b>Gráfico 6-3:</b> Tipo de Borde de los clones cultivados a $37^{\circ} C$ .....	37
<b>Gráfico 7-3:</b> Tipo de Elevación de los clones cultivados a $13^{\circ} C$ .....	38
<b>Gráfico 8-3:</b> Tipo de Elevación de los clones cultivados a $37^{\circ} C$ .....	38
<b>Gráfico 9-3:</b> Tipo de Color de los clones cultivados a $13^{\circ} C$ .....	39
<b>Gráfico 10-3:</b> Tipo de Color de los clones cultivados a $37^{\circ} C$ .....	39

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A: LAGUNA NEGRA**

**ANEXO B: RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS**

**ANEXO C: SIEMBRA DE LAS MUESTRAS TOMADAS**

**ANEXO E: SIEMBRA DE LAS COLONIAS AISLADAS**

**ANEXO F: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA**

**ANEXO G: PRUEBAS CON LECTURA INMEDIATA**

**ANEXO H: PRUEBAS LENTAS**

**ANEXO I: PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar bacterias de la Laguna Negra ubicada en el Parque Nacional Sangay en la Provincia de Chimborazo. Se tomaron cinco muestras de agua superficial recogidas en diferentes puntos de la laguna. Para la estimación de cepas, se consideraron las diluciones: 10-4, 10-5 y 10-6, se obtuvieron un total de 81 cepas sembradas en el medio de cultivo PCA (Plate Count Agar ) a temperatura ambiente, 37°C y 45°C . Para evaluar la estabilidad y adaptación de las cepas se realizaron tres réplicas de cada una de las diluciones, inoculadas por la técnica de siembra en superficie en dos medios diferentes: mantequilla industrial y leche descremada, teniendo como base el medio PCA llevadas a temperatura ambiente y a 37°C. Se seleccionaron 13 clones debido a que dieron positivos para las pruebas bioquímicas donde se obtuvo como posibles géneros a *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcaceae* y *Psychrobacter*. Para la evaluación de la actividad proteolítica y lipolítica se realizó a través de métodos cualitativos, mediante una observación de cambio de color alrededor de las cepas obteniéndose la presencia de halos de aclaramiento en dos cepas bacterianas a 13 °C. Se concluyó que el agua de la laguna está compuesta principalmente por una microbiota de bacterias psicrófilas.

**Palabras claves:** <CARACTERIZACION DE BACTERIAS>, <MICROORGANISMOS >, < CULTIVO PCA>, < PSICROFILOS >, <AMBIENTES FRIOS >, <ENZIMAS>



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



0637-DBRAI-UPT-2021

## **SUMMARY**

The purpose of the current research was to characterize the bacteria present in Laguna Negra located in Sangay National Park, Chimborazo province. Five superficial water samples were collected at different points of the lagoon. For the strain estimation, the dilutions: 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup>, were considered and a total of 81 strains were planted in a Plate Count Agar (PCA) growth medium at room temperature, 37 ° C and 45 ° C. To evaluate the stability and adaptation of the strains, three replications of each one of the dilutions were made and inoculated with the surface seeding technique in two different media: industrial butter and skim milk, based on the PCA medium at room temperature and at 37 ° C. 13 clones were selected, since they tested positive for biochemical tests where some possible genres such as Pseudomonas, Flavobacterium, Micrococcacea and Psychrobacter were obtained. The evaluation of the proteolytic and lipolytic activity was carried out through qualitative methods, with the observation of color change around the strains, obtaining the presence of clearance halos in two bacterial strains at 13 °C. It was concluded that the water in the lagoon is mainly composed by a microbiota of psychrophilic bacteria.

**Keywords:** <CHARACTERIZATION OF BACTERIA>, <MICROORGANISMS>, <PCA GROWTH >, <PSYCHROPHILES'>, <COLD ENVIRONMENTS>, <ENZYMES>

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la contaminación ha sido considerada como uno de los factores más importantes y significativos a nivel mundial en cuanto a entornos naturales, uno de ellos son los lagos que se encuentran en altas montañas y con ambientes extremos, que son afectados a consecuencia de actividades antrópicas que alteran el equilibrio de estos ecosistemas.

Las lagunas de origen glaciar y de alta montaña ocupan el número más importante, encontrándose a una posición altitudinal entre los 3000 y 3600 msnm (Flores & Ríos, 1998, pp. 29-32).

Durante las últimas décadas se ha incrementado la investigación de microorganismos presentes en hábitats extremos, en especial bacterias y hongos que forman parte de la microbiota del Ártico y la Antártida. El interés se debe a que presentan características especiales o la capacidad que tienen sus enzimas, demostrando un gran potencial y como un recurso sustentable a nivel biotecnológico. (Dominguez, 2008, pp. 4-5).

Las enzimas de los microorganismos de hábitats fríos como los psicrófilos y psicrotolerantes catalizan reacciones a bajas temperaturas, lo cual hace que tengan un gran potencial de aplicación en procesos biotecnológicos empleados en el ámbito industrial. Un ejemplo biotecnológico, es la aplicación de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, amilasas y celulasas, en la formulación de detergentes, puesto que ofrecen una gran ventaja en cuanto a la reducción de consumo de energía y el desgaste textil al llevar a cabo el lavado en frío. Otra aplicación es de las del tipo proteasas y queratinasas psicrófilas en el depilado de pieles y cueros al eliminar el calentamiento y la necesidad de utilizar compuestos químicos que afecten en el ambiente (Cavicchioli, et al., 2011).

En el área ambiental, las lipasas, amilasas y deshidrogenasas de los psicrófilos, se han utilizado como alternativa a los métodos fisicoquímicos de biorremediación de sólidos y aguas residuales contaminados con hidrocarburos, aceites y lípidos empleando métodos y estrategias eficaces que conllevan a las bacterias a ser tolerantes a condiciones adversas que generan una contaminación.

## **JUSTIFICACIÓN**

La aplicación de la biotecnología en ambientes considerados extremos permite la búsqueda e identificación de microorganismos poco frecuentes, especialmente la vida microbiana presentes en ambientes fríos. Capaces de resistir las condiciones drásticas de los procesos industriales, tanto química, farmacéutica y de alimentos. (Oliart. et al., 2016, pp. 79-90)

Ecuador es un país biodiverso considerado como uno de los países más importantes tanto a nivel faunístico como de flora, por tener una mega diversidad de lagunas en cada una de sus provincias. Un ejemplo de ella es la provincia de Chimborazo que se encuentra en la región Sierra, y que se caracteriza por tener un clima frío y una gran diversidad de lagunas como es el complejo lacustre de Atillo.

La caracterización de bacterias de la laguna Negra pretende contribuir al conocimiento de los ecosistemas microbianos tolerantes a ambientes fríos y de agua dulce presentes en la provincia de Chimborazo que han sido poco estudiados. Organismos psicrófilos y psicrotolerantes presentan un gran potencial en el ámbito biotecnológico ya que sus enzimas permiten que en sus procesos fisiológicos y ecológicos presentan características únicas de proteínas, membranas y sus respuestas genéticas a los cambios térmicos se logren con éxito (Sanchez, 1998).

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivo General**

- Caracterizar bacterias de la laguna Negra del Parque Nacional Sangay de la provincia de Chimborazo.

### **Objetivos Específicos**

- Aislar las bacterias mediante cultivos microbiológicos en ensayos de laboratorio
- Examinar las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas en la laguna Negra
- Evaluar cualitativamente la actividad proteolítica y lipolítica de las cepas aisladas

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes de la investigación

Los microorganismos extremófilos antiguamente eran explorados por pocos grupos de investigadores en todo el mundo, hoy en día son de gran interés debido a que sus enzimas presentan una estabilidad térmica y una aceleración química a grandes velocidades que se dan en su metabolismo (Demirjian. et al., 2001, p. 144) .

Kibori, et al., (1984) realizaron los primeros estudios de microorganismos psicrófilos y sus usos enzimáticos biotecnológicos en la elaboración de aditivos emergentes, industria alimentaria, biorremediación ambiental, biotransformación y biología molecular. Bowman J.et al., (1997, pp. 3068-3078) aislaron bacterias psicrófilas y psicrotóficas de muestras de hielo y agua de la Antártida. Puguin B. et al., (2014, p. 7061) reportaron una bacteria antártica de tipo psicrófila, identificada como *Pseudomonas sp.* Que demostró tener la capacidad de sintetizar nanopartículas de telurio, de manera intracelular.

En Ecuador se realizaron investigaciones en lagunas de alta montaña. En la laguna Amarilla ubicada en el Nevado el Altar localizada en la provincia de Chimborazo se aislaron bacterias psicrófilas y psicrotolerantes pertenecientes a los géneros *Flavobacterium*, *Shewanella*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* o *Psychrobacter*. Moreno, (2017, p. 48). Se aislaron e identificaron bacterias psicrófilas pertenecientes a la clase Gamma-Proteobacteria que corresponden a las especies *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas spp*, *Alcaligenes spp*, *Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter iwoffii*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus spp*, *Moraxella spp*, *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus xylosus* encontradas en el agua de la laguna de Quilotoa en la reserva ecológica Los Ilinizas, Provincia de Cotopaxi Escobar,(2019, p. 6).

### 1.2. Bioprospección

La bioprospección microbiana es el uso de microorganismos a través de procesos biotecnológicos como el desarrollo de productos y nuevas fuentes biológicas sostenibles viables mediante la utilización de su material genético, enzimas que puedan contribuir de manera beneficiosa, económica y social como una solución para el medio ambiente y la humanidad (Quezada, 2007).

### ***1.2.1. Aplicaciones de la Bioprospección***

La bioprospección tiene una gran diversidad de aplicaciones que son utilizadas en la actualidad, ya que se puede llegar a obtener productos rentables con un alto valor potencial, mediante el uso de métodos amigables que permitan generar alternativas y soluciones ambientales como, por ejemplo:

- Biorremediación ayuda a la restauración de aguas, suelos y aire que han sufrido alteraciones en el ecosistema por algún factor contaminante.
- Biomédica, en la cual se pueden obtener medicamentos, pruebas diagnósticas, vacunas, biomateriales, biodispositivos médicos, fitoterapia.
- En la industria de alimentos, se pueden obtener ingredientes naturales, bioactivos, alimentos funcionales, alimentos médicos, pre/probióticos.
- En la industria cosmética, se pueden obtener ingredientes naturales para la elaboración de ciertos productos, cosméticos naturales, cosmeceúticos, nutricosméticos.
- En el sector agrícola se pueden obtener bioproductos que ayuden a la fertilidad del suelo y a mantener el estado de ciertos cultivos como: biopesticidas, biofertilizantes, bioplaguicidas, como a su vez en el sector industrial la obtención de sustancias para la generación de bioplásticos, fabricación de pinturas, en general para aplicaciones biotecnológicas (Carranza, 2017, p. 4).

### ***1.2.2. Ambientes extremos***

Los ambientes extremos son aquellos donde las variables fisicoquímicas como temperatura, salinidad, pH o presión, no condicionan el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos (ContactoS, 2013, p. 6).

En este tipo de ambientes se encuentran microorganismos extremófilos, que pueden habitar en condiciones sumamente extremas como a temperaturas altas o bajas, altas concentraciones de sales, altas presiones e incluso valores extremos de pH; debido a que han desarrollado rutas metabólicas que hacen que puedan sobrevivir y desarrollarse a estas condiciones (ContactoS, 2013, p. 6) (Velásquez A. et al., 2018, p. 10).

### ***1.2.3. Temperatura en ambientes extremos***

Las temperaturas extremadamente bajas o elevadas son utilizadas como uno de los factores claves y primordiales para la conservación de microorganismos o a su vez un limitante para su desarrollo.

- A temperaturas extremadamente bajas, la membrana plasmática y el citoplasma microbiano disminuyen totalmente el paso de nutrientes, impidiendo que las reacciones enzimáticas propias del metabolismo puedan realizarse.
- A temperaturas demasiado elevadas, inactivan sistemas enzimáticos, desnaturalizando proteínas y provocando daños en las envolturas celulares.

Un rango óptimo de crecimiento permite que los microorganismos sean capaces de incorporar nutrientes del medio ambiente, transportarlos por caminos catabólicos y anabólicos necesarios para el desarrollo y división celular. Dando como resultado, el crecimiento de una población que alcancé su máxima velocidad en ese ambiente (Apella & Araujo, 2005, p. 43) .

#### **1.2.4. Microorganismos psicrófilos**

Este tipo de microorganismos presentan una temperatura óptima de crecimiento por debajo de los 20°C y una temperatura máxima de crecimiento a 0°C. Se encuentran en ambientes extremadamente fríos como en regiones polares, sedimentos marinos, agua dulce, marina, suelos polares, alpinos altos y alimentos congelados. Algunos ejemplos de bacterias psicrófilas son las que corresponden al género *Flavobacterium*, y otras especies de hábitats distintos a los polares como *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* (Maruyama, 2000, p. 835–846).

La capacidad de los psicrófilos para sobrevivir y desarrollarse a bajas temperaturas en ambientes permanentemente fríos, se debe a la modificación de su actividad metabólica como : reducción a la actividad enzimática; disminución de la fluidez de la membrana; transporte alterado de nutrientes y productos de desecho; disminución de las tasas de transcripción, traducción y división celular; desnaturalización en frío de proteínas; plegamiento inadecuado de proteínas; y formación de hielo intracelular (D'Amico, et al., 2006, p. 385–389).

Algunos de los géneros más comunes de este tipo de microorganismos son bacterias Gram negativas del tipo  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$  como *Pseudomonas* spp y *Vibrio* spp, el phylum Cytophaga–Flavobacterium–Bacteriodes; entre los Gram positivos se encuentran especialmente *Arthrobacter* sp. y *Micrococcus* sp. (D'Amico, et al., 2006, p. 385–389).

#### **1.2.5. Microorganismos psicrotolerantes**

Los microorganismos psicrotolerantes pueden crecer a 0°C, pero su temperatura óptima de crecimiento está entre los 20 a 40°C (Madigan, et al., 2015) .Tienen una distribución más amplia ya que se pueden aislar del suelo y de aguas de climas templados, así como también de alimentos congelados como carne, leche y productos derivados (Castillo, 2005, p. 384).

Los géneros más frecuentemente aislados en ambientes fríos dentro de este tipo de microorganismos se encuentran: *Pseudomonas*, *Psychrobacter* y *Photobacterium* (Yumoto & Yamazaki, 2013).

#### **1.2.6. Aislamiento de microorganismos**

El aislamiento de microorganismos a partir de muestras naturales ya sea de agua o suelo se realiza mediante la obtención de colonias aisladas en cultivos sólidos, durante un periodo de incubación a condiciones ambientales óptimas necesarias.

Los microorganismos psicrófilos se aíslan y se cultivan en medios solidificados y en incubadoras de baja temperatura. La calidad y cantidad de nutrientes, el valor de pH, la salinidad y otros factores, deben ajustarse adecuadamente para el hábitat desde el cual se toman los inóculos (Brock & Rose, 1969, p. 164).

A diferencia de los psicrófilos, los psicrotolerantes aislados tienden a ser más tolerantes al incremento extremo de temperatura, pero ambos son sensibles al calentamiento llevado a temperaturas moderadas. Los efectos de estos cambios de temperatura ocasionan daños en la membrana celular, pérdida de nutrientes esenciales y otros componentes. Por lo que se recomienda mantener las muestras congeladas durante el transporte al laboratorio (Russell, 2006, pp. 1-7).

Los aislamientos microbianos permiten un sustento amplio y significativos en cuanto a estudios fisiológicos y bioquímicos sobre la supervivencia y adaptación a ambientes sumamente fríos (Bronwyn Kirby. et al., 2010).

#### **1.2.7. Medios de cultivo**

Un medio de cultivo proporciona los nutrientes necesarios y óptimos para el crecimiento adecuado de los microorganismos en el laboratorio, sean estos suministrados en grandes cantidades como los macronutrientes: N, C, P y en pequeñas cantidades como los micronutrientes: K, Cu, Ni, Cr, Ni, Mo, Se y Zn acompañados con factores de crecimiento como vitaminas, aminoácidos determinando un balance apropiado para evitar el desarrollo de los mismos (Latorre, 2007, pp. 22-23).

Podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos dependiendo de las características que presenten y del medio que se va utilizar, como también por la disponibilidad de nutrientes (Pàres & Juárez, 2012, p. 17), por ejemplo el medio PCA presenta características como: la Triptona y Extracto de

Levadura actúan como fuentes de nitrógeno y de vitaminas para el crecimiento de los microorganismos (Melguizo, 2009).

### **Según la proporción de agar:**

**Líquidos (caldos):** No contiene ningún agente solidificante, permitiendo que los microorganismos crezcan de forma rápida, gracias a la facilidad de moverse y adquirir los nutrientes en todo el medio (Barrero, 2016, pp. 6-48).

**Sólidos:** Tienen una proporción de agar de, aproximadamente, el 1,5% p/v. El crecimiento se desarrolla solamente en la superficie del medio. Estos medios pueden depositarse en placas de Petri o en tubos de ensayo. (Barrero, 2016, pp. 6-48).

**Semisólidos:** Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5% p/v. Son utilizados para realizar pruebas bioquímicas y de movilidad. (Barrero, 2016, pp. 6-48).

### **Según su utilidad:**

**Nutritivos:** permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por ser muy comunes, un ejemplo de este tipo de medio es el agua de peptona y el caldo de tripticasa-soja. (Barrero, 2016, pp. 6-48).

**De enriquecimiento:** medios complejos con nutrientes que benefician el crecimiento de determinados microorganismos (principalmente heterótrofos exigentes). Ejemplo: extracto de tejidos de animales o plantas, agar Mosel (Latorre, 2007, pp. 24-25).

**Selectivos:** presentan componentes que impiden el desarrollo de microorganismos no deseados. Esto hace que el microorganismo que se desea cultivar lo haga con mayor facilidad. Como ejemplo, el agar MacConkey contiene cristal violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, facilitando el desarrollo de bacterias gramnegativas (Barrero, 2016, pp. 6-48).

**Diferenciales:** permiten diferenciar dos o más tipos de bacterias en función a su comportamiento dependiendo del tipo de nutriente que se encuentra en el medio. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene lactosa y rojo neutro (como indicador); las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosapósitivas) aparecen de color rosa intenso, mientras que las no fermentadoras de lactosa son incoloras (Latorre, 2007, pp. 24-25).

## **1.2.8. Morfología macroscópica y microscópica**

### **1.2.8.1. Morfología microscópica**

Dentro de las características morfológicas principales que presentan los microorganismos se encuentran su tamaño y forma:

Tamaño: Oscilan entre los 0.5µm y 3 µm, aunque en algunos tipos pueden llegar a medir 10 µm.

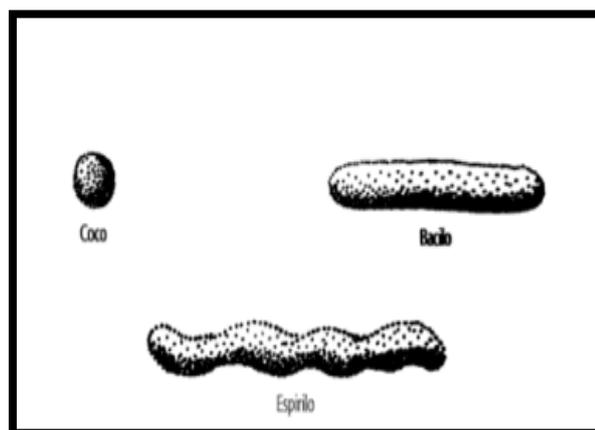
Forma: determinada por la rigidez de la pared celular, dentro de los tres tipos de morfología se encuentran: cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o bastones rectos - curvos) y espiral (Pérez, 2006, p. 24).

Dentro de la morfología microscópica de acuerdo a su forma se encuentran:

Cocos: Son bacterias que presentan mayor diversidad de agrupaciones debido a su crecimiento y a la tendencia de sus células a permanecer unidas después de su división celular.

Bacilos: no forman agrupaciones tan complejas como los cocos, se presentan en pares (diplococos) o cadenas (estreptobacilos).

Espirilo: sin agrupaciones, el número de vueltas del espirilo es característico de la especie (García, 2004, pp. 42-43).



**Figura 1-1:** Agrupaciones de las bacterias

Fuente: (García, 2004)

### *1.2.8.2. Morfología macroscópica*

La morfología macroscópica de un cultivo puro permite observar ciertas características a simple vista después de haber sido aisladas correctamente y sembradas en un medio de cultivo dentro de un lapso de 36 a 48 horas (Ospina, 1981, pp. 24-35).

Dentro de estas características tenemos las siguientes:

**Forma:** puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, ahusada.

**Elevación:** plana, elevada, convexa, pulviniforme (forma de almohada), en forma de botón, umbilicada.

**Borde:** liso o continua, ondulado, lobulado, corroído, filamentos, encrespado.

**Color:** blanca, amarilla, negra, beige, naranja.

**Superficie:** brillante, mate, otras.

**Densidad:** opaca, translúcida, transparente.

**Consistencia:** untuosa o mantecosa, membranosa, quebradiza (Ospina, 1981, pp. 24-35).

### *1.2.9. Identificación Microbiana*

#### *1.2.9.1. Tinción diferencial de Gram*

Una de las técnicas que permite observar la morfología y clasificar a las bacterias de acuerdo a la pared celular que presentan, en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, a excepción de bacterias carentes de pared como los micoplasmas y bacterias muy pequeñas como las espiroquetas (Porres & Ruiz, 2018, p. 35).

#### *1.2.9.2. Pared celular de las bacterias Gram Positivas*

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular compuesta por varias capas de peptidoglucano lo que hace que presenten una estructura gruesa y rígida, posee ácidos teicóicos compuestos por un alcohol y fosfato (lipoteicoico y teicoico mural); estos ácidos cumplen funciones esenciales: previenen la ruptura de la pared celular y por ende el riesgo que se genere una lisis a su vez también permiten la identificación de bacterias mediante ciertas pruebas de laboratorio (Tortora, et al., 2007, pp. 87-88).

### *1.2.9.3. Pared celular de las bacterias Gram Negativas*

La pared de las bacterias Gram negativas está formada por una capa de peptidoglucano unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas) mediante enlaces covalentes y una membrana externa compuesta por polisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos. La membrana cumple funciones especializadas como: debido a su carga negativa dificulta la fagocitosis y la lisis de las células; actúa como barrera impidiendo el paso de ciertos antibióticos de enzimas digestivas, de detergentes, metales pesados y ciertos colorantes (Tortora, et al., 2007, pp. 87-88).

### *1.2.9.4. La pared celular y el mecanismo*

La pared celular de las bacterias Gram positivas retienen el colorante violeta de genciana tiñéndose de color violeta oscura o púrpura, la capa peptidoglucano es gruesa, el espacio periplasmático y membrana externa permanecen ausentes, mientras que el contenido de LPS (lipolisacárido) es nulo.

La pared de las bacterias Gram negativas retienen la safranina y se tiñen de color rosa, la capa es delgada aquí el espacio periplasmático y membrana externa permanecen presentes, y el contenido de LPS es elevado (Tortora, et al., 2007, pp. 87-88).

### *1.2.10. Pruebas bioquímicas*

Permiten identificar la actividad metabólica que tienen las cepas bacterianas puras. Dentro de este tipo de pruebas se encuentran las rápidas con una lectura menos de 6 horas, las de lecturas inmediatas y las lentas, con lectura que va entre los 18 a 48 horas dependiendo de la incubación previa que se le dé al microorganismo (Fernández. et al., 2010, p. 6).

#### *1.2.10.1 Pruebas con lectura inmediata*

##### **Catalasa**

Enzima propia de la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos, a excepción de *Streptococcus*. Su función es descomponer el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) separando el oxígeno libre (Fernández. et al., 2010, p. 6).

##### **Interpretación de resultados:**

**Positivo:** desprendimiento de burbujas de gas *Micrococos*.

**Negativo:** *Streptococcus*.

### *1.2.10.2 Pruebas lentas con lectura de 18 a 48 h:*

#### **TSI (Agar triple azúcar hierro)**

Permite determinar la capacidad que tiene un microorganismo para generar gas y producir H<sub>2</sub>S, la fermentación de los azúcares se manifiesta por la producción de ácido. Este tipo de pruebas es característico de la familia Enterobacteriaceae (Vega. et al., 2019, p. 82).

#### **Interpretación de resultados:**

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta glucosa.
- Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): microorganismo no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
- El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico (Britania, 2019, pp. 1-2).

#### **Kligler**

Determina la capacidad que tiene un microorganismo para atacar un hidrato de carbono y a su vez incorporar la producción de gas o ácido sulfhídrico (Bailòn. et al., 2003, pp. 92-223).

#### **Interpretación de resultados:**

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta glucosa.
- Superficie acida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa y lactosa.
- Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): microorganismo no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
- El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico (Britania, 2019, pp. 1-2).

## **SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad)**

Determina si un organismo es móvil o inmóvil, capaz de liberar ácido sulfhídrico mediante la acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre: metionina, cistina y cisteína; finalmente la capacidad de oxidar la molécula del triptófano, produciendo indol (Bailòn. et al., 2003, pp. 92-223).

### **Interpretación de resultados:**

#### **Movilidad**

**Positivo:** presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra

**Negativo:** crecimiento solamente en la línea de siembra

#### **Producción de SH<sub>2</sub>**

**Positivo:** ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.

**Negativo:** el medio permanece sin cambio de color.

#### **Prueba de indol**

Se agrega al cultivo de 3 a 5 gotas del reactivo de Kovac's.

**Positivo:** color rojo.

**Negativo:** el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento (Britania, 2019, pp. 1-2).

#### **Urea de Christensen**

Determina si un microorganismo tiene la capacidad de hidrolizar la urea mediante la acción de la enzima ureasa, esta característica es propia de la familia Enterobacteriaceae, especies de los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Yersinia* (Vega. et al., 2019, p. 90).

### **Interpretación de resultados:**

**Microorganismos que hidrolizan la urea:** el medio de cultivo es de color rosado-rojizo

**Microorganismos que no hidrolizan la urea:** el medio de cultivo permanece de color amarillo (Britania, 2019, pp. 1-2)

### **Citrato**

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono para su metabolismo, como a su vez algunas bacterias suministran energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico (Vega. et al., 2019, p. 87).

### **Interpretación de resultados:**

**Positivo:** Crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta

**Negativo:** Ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo (Britania, 2019, pp. 1-2).

### **Manitol**

Utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos, para la determinación de *Staphylococcus aureus* (BD, 2013, pp. 1-3).

### **Interpretación de resultados:**

**Positivo:** Microorganismo fermentadores de manitol colonias de color amarillo

**Negativo:** Microorganismo no fermentadores colonias rojas rodeadas, o no halo rojizo-purpura (Britania, 2019, pp. 1-2).

### **Coagulasa**

Determina si un microorganismo tiene la capacidad de coagular el plasma gracias a la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulosa positiva) de otras especies del mismo género (Fernández. et al., 2010, p. 7).

### **Interpretación de resultados**

**Positivo:** presencia de coagulo en el fondo del tubo, diferencia al *Staphylococcus aureus* (coagulosa positiva) de otros estafilococos y micrococos.

**Negativo:** No hay la presencia del coagulo.

### 1.3 Enzimas

Las enzimas son biocatalizadores cuya función es catalizar un solo tipo de reacción gracias a la especificidad que presenta su estructura tridimensional de la molécula enzimática, a diferencia de la mayoría de reacciones químicas convencionales (Madigan, et al., 2015).

Las enzimas de microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes son eficientes especialmente para compensar la reducción de las velocidades de reacción que se dan a bajas temperaturas a través del mejoramiento en cuanto al número de rotación (kcat) o de la eficiencia fisiológica (kcat/ Km) (Hoyoux, et al., 2001).

#### 1.3.1. Tipos de enzimas

##### 1.3.1.1. Lipasas

Pertencen al grupo de las enzimas hidrolíticas, su función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos con la finalidad de obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o productos intermedios como mono o di glicéridos (Sanchez, 1998, p. 76).

La actividad lipolítica ocurre cuando la enzima se encuentra en la fase orgánica- acuosa, donde se produce un fenómeno de absorción inicial sobre la fase orgánica, con la formación de complejo enzima-substrato y posterior una liberación de productos en la fase acuosa con la regeneración de la enzima (Sanchez, 1998, p. 76).

**Tabla 1-1:** Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas

<b>Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas</b>	
<b>Reacciones de hidrólisis</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Hidrólisis de aceites vegetales en la industria química</li><li>➤ Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasas</li><li>➤ Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria</li></ul>
<b>Reacciones de síntesis</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Producción de esteroides para la industria farmacéutica</li><li>➤ Síntesis de esteres glucidicos para la industria cosmética</li><li>➤ Síntesis de precursores de péptidos</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Eliminación de ácidos grasos encargados de causar la inestabilidad en el sabor de ciertas mantequillas y aceites</li></ul>
<b>Reacciones de transesterificación</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Preparación de compuestos netamente puros</li></ul>

Realizado por: López Evelyn, 2019

Fuente: (Sanchez, 1998, p. 8).

### 1.3.1.2. Proteasas

Las proteasas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total de las proteínas. Gracias a los avances y a la utilización de técnicas analíticas se ha demostrado que las proteasas conducen modificaciones altamente específicas y selectivas de proteínas, como a su vez el transporte de proteínas secretoras a través de las membranas puesto que son considerados dentro de los tres grupos más grandes a nivel industrial, representando aproximadamente el 60% de la venta total mundial de enzimas (Kuddus & Pramod, 2012, pp. 330-338.) y (Hamza, 2017, pp. 1-10).

Son responsables de los procesos que intervienen en la fisiología normal de la célula, así como en condiciones patológicas anormales. Debido a su gran participación en organismos causantes de enfermedades, se han convertido en un objetivo potencial en la industria farmacéutica como por ejemplo: en la elaboración de fármacos contra el cáncer y el SIDA.

Se clasifican, de acuerdo a su sitio catalítico, en proteasas de serina, de cisteína, proteasas aspárticas y metaloproteasas.

**Tabla 2-1:** Clasificación de las proteasas de acuerdo a su sitio catalítico

<b>Clasificación de las proteasas de acuerdo a su sitio catalítico</b>	
<b>Proteasas de serina</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Presentan un residuo de serina en su sitio activo</li><li>➤ Responsable del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico blanco.</li><li>➤ Utilizada en formulaciones de detergentes.</li><li>➤ Ejemplo: <i>Bacillus licheniformis</i> (Fullana, 2014)</li></ul>
<b>Proteasas de cisteína</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ El mecanismo catalítico involucra la formación de un intermediario enzimático acilado</li></ul>
<b>Metaloproteasas</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Son proteasas neutras</li><li>➤ Presenta un ión catiónico en su sitio activo, que coordina una molécula de agua y el oxígeno carbonílico del enlace peptídico.</li><li>➤ La Termolisina, una proteasa extracelular es secretada por la bacteria <i>Bacillus thermoproteolyticus</i>.</li></ul>

**Realizado por:** López Evelyn, 2019

**Fuente:** (Fullana, 2014)

### *1.3.1.3. Deshidrogenasas*

Pertencen al grupo de las oxido- reductoras que catalizan reacciones de óxido –reducción o a su vez en ciertos casos incorpora átomos de oxígeno al sustrato, utilizan siempre alguna coenzima como: nucleótidos de nicotinamida (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>), nucleótidos de flavina (FAD, FMN), ácido ascórbico (Arias, 2013). Un ejemplo de este se realizó en la cepa *Vibrio sp* que catalizo el NADH oxidasa a bajas temperaturas (Takada, et al., 1981).

### *1.3.1.4. Amilasas*

Son enzimas que catalizan al azar la hidrólisis de enlaces glicosídicos -1,4 de polisacáridos como el almidón y el glicógeno, para producir maltosa, oligosacáridos en varias cadenas (Maheshwari, et al., 2002). En la industria este tipo de enzimas son de gran importancia ya que son utilizados a nivel: textil, papelería y farmacológica, y aunque las fuentes productoras de  $\alpha$ -amilasas incluyen plantas, animales y microorganismos, son las enzimas microbianas las que encuentran mayor demanda en aplicaciones industriales (Espinel & López, 2009).

## **1.3.2. Fuentes de especies microbianas**

Las enzimas producidas por los microorganismos psicrófilos y psicotolerantes tienen una gran complementariedad entre el sitio activo y el sustrato por tener un bajo costo energético en cuanto a su alta actividad específica que se lleva a cabo a bajas temperaturas (Hernandez, 2012, p. 4). Algunas fuentes de especies microbianas son:

### *1.3.2.1. Bacterias*

La mayoría de las proteasas comerciales, especialmente las de tipo neutras y alcalinas, son producidas por microorganismos que pertenecen al género *Bacillus sp*. Las de tipos neutras se generan a un pH entre 5 y 8, con una termotolerancia netamente baja que hace que se pueda controlar su reactividad durante la producción hidrolizada durante la elaboración de un alimento. Debido a su velocidad de reacción intermedia, estas generan menos amargor en las proteínas alimenticias hidrolizadas a comparación de las proteínas animales por lo que tienen un alto valor dentro de la industria alimentaria y cervecera (Rao, et al., 1998, pp. 597-635).

En cambio, las de tipos alcalinas se identifican por su alta actividad a un pH alcalino y su gran especificidad de sustrato, cuyas propiedades hacen que sean adecuadas para la elaboración de detergentes. Un muestra de este tipo de enzima producida por los organismos pertenecientes al género *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp* y *Aeromonas sp* (Sánchez, et al., 2004, pp. 179-186)

### *1.3.2.2. Hongos*

Los hongos psicrófilos y psicrotolerantes al igual que las bacterias son una fuente microbiana muy importante debido a las características que presentan en cuanto a su desarrollo y evolución para su supervivencia gracias a la producción de enzimas activas en ambientes fríos. (Hassan, et al., 2016). Un ejemplo de este tipo es el microorganismo psicrotolerante *Rhodospiridium diobovatum*, que tiene la capacidad de descomponer la instauración de ácidos grasos para la funcionalidad de su membrana plasmática a baja temperatura (Hassan, et al., 2016).

### *1.3.3. Aplicaciones biotecnológicas*

Las aplicaciones de enzimas psicrófilas y psicrotolerantes, actualmente han sido utilizadas en la industria a nivel mundial tanto como textil, alimentaria, láctea, cervecera, vinícola, limpieza e incluso en procesos de biorremediación. (Villalta, 2013, p. 33).

#### *1.3.3.1. Detergentes*

En la elaboración de detergentes se utiliza una gran variedad de enzimas como aditivos: proteasas, lipasas,  $\alpha$ -amilasas cuya función es ayudar a la liberación de material proteico de las manchas, permiten temperaturas de lavado menores y períodos cortos de agitación, después del periodo de enjuagado (García & Montoya, 2017). A su vez provocan una disminución del aporte de energía y una reducción del desgaste textil (Javed & Qazi, 2016).

#### *1.3.3.2. Industria del cuero*

Antiguamente en la elaboración de cuero no se contaba con procesos adecuados para la obtención de este material. Hoy en día a medida que ha ido avanzando la tecnología y a base de estudios realizados se ha implementado el uso de enzimas proteasas alcalinas que proporcionan y aseguran una absorción más rápida de agua y una reducción del tiempo necesario para el remojo. Para el tratamiento del depilado se usa proteasas alcalinas con cal hidratada y cloruro de sodio, permitiendo una gran minimización significativa de la cantidad de aguas residuales generadas. (Rao, et al., 1998).

Otra aplicación en esta industria es la enzima proteasa alcalina generada por la cepa *Conidiobolus coronatus* debido a que se utiliza en operaciones de percutido para la fabricación de cuero (Laxman, y otros, 2005). Un mayor uso de enzimas durante el proceso de depilación y eliminación ayuda a tener un ahorro eficaz en cuanto a la energía, así de esta manera evitar problemas de contaminación.

#### 1.3.3.3. *Industria farmacéutica*

A través de los años la industria farmacéutica ha logrado grandes avances biotecnológicos, consideradas como una de las industrias que mayor demanda tiene. Actualmente las enzimas activas en frío como las deshalogenasas que ayudan en la formación de intermediarios de fármacos ópticamente puros. Las especies de microorganismos *Shewanella* y *Colwellia* son productores de las PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados), eficaces para combatir numerosos trastornos como la aterosclerosis, la diabetes y la hipertensión. (Javed & Qazi, 2016).

La mezcla entre la enzima proteasa y amilasa del género *Bacillus* especie *subtilis* ayuda a la eliminación la placa dental (Banerjee, et al., 2016, pp. 16-24).

#### 1.3.3.4. *Cosméticos*

En la actualidad, la industria cosmética de China está utilizando enzimas psicrófilas en la fabricación y mejoramiento de la calidad de sus productos (Javed & Qazi, 2016). Las enzimas lipasas activas en frío se consideran un factor esencial en la composición de los triglicéridos hidrófobos (grasas insolubles en agua) de cadena larga que son componentes atractivos en varios tensioactivos y algunos productos cosméticos. Cuya composición ayuda a evitar a que se genere una irritación o alergia sobre la piel.

#### 1.3.3.5. *Industria alimenticia*

La industria alimentaria gracias a la implementación de procesos químicos y biotecnológicos facilita el procesamiento de productos como por ejemplo: la elaboración de la leche a base de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, con la finalidad de reducir la lactosa presente en la misma y a su vez facilitar una fermentación de forma rápida en la generación de glucosa y galactosa (Javeda & Qazi, 2016). Otra aplicación es la utilización de las enzimas amilasa, proteasas psicrozimas para la elaboración de productos de panadería, estas ayudan a que exista una buena calidad de masa, miga retención de aromas, gluten y las hemicelulasas presentes en la harina (Javeda & Qazi, 2016).

#### 1.3.3.6. *Industria papelera*

En la elaboración de papel al igual que en otras industrias se utilizan enzimas activas en frío que participan en la catálisis de la madera y otras sustancias lignocelulósicas a dióxido de carbono, agua y sustancias húmicas. A demás son empleados en procesos biotecnológicos en procesos de separación microbiana y como biosensores para el análisis de superficies de fibra de pulpa (Javed & Qazi, 2016)

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLOÓGICO

#### 2.1. Hipótesis y especificación de las variables

##### 2.1.1. *Hipótesis*

En la laguna Negra de la provincia de Chimborazo, existen bacterias con actividad enzimática que pueden ser aisladas y caracterizadas en el laboratorio.

##### 2.1.2. *Variables*

###### 2.1.2.1. *Variable dependiente*

Presencia de bacterias con actividad enzimática

###### 2.1.2.2. *Variable independiente*

Condiciones ambientales

#### 2.2. Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo descriptivo- exploratorio, debido a que se describe las condiciones ambientales que presenta el lugar con el objetivo de encontrar que tipo de microorganismos puedan crecer y así realizar un estudio independiente de cada característica que permitan precisar la hipótesis planteada

#### 2.3. Diseño de Investigación

La presente investigación es de tipo descriptivo-cualitativo, donde se encontraron bacterias con características psicrófilas y/o psicrotolerantes en la laguna Negra en la provincia de Chimborazo.

#### 2.4. Unidad de análisis

Muestras de agua superficial de la Laguna Negra ubicada en el Parque Nacional Sangay, en la provincia de Chimborazo.

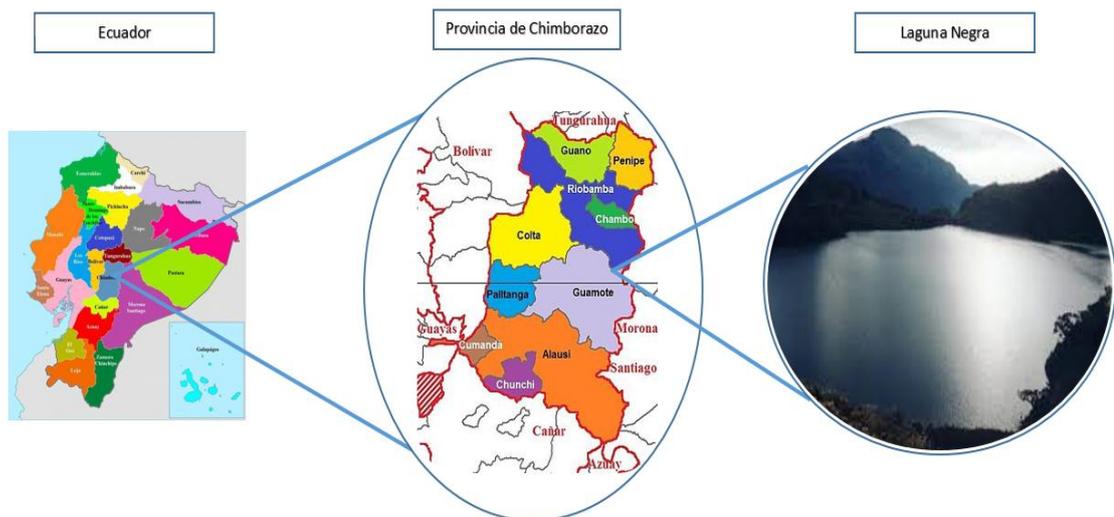
## 2.5. Etapas de la investigación

### 2.5.1. Recolección de la muestra

Según la norma INEN 2176 Técnicas de muestreo de aguas superficiales, se tomará una muestra compuesta de las dos zonas de acceso a la laguna.

#### 2.5.1.1. Área de procedencia de las muestras

La Laguna Negra se encuentra localizada en el cantón Riobamba a un costado la carretera Guamote Macas, en la división provincial de las provincias de Morona Santiago y Chimborazo a 3 km de la laguna de Atillo, ubicada a una altitud de 3500 msnm, con un rango de temperatura ambiente entre 9 y 18°C. Pertenece al sistema Lacustre de Atillo del Parque Nacional Sangay, tiene un diámetro de 710 metros con coordenadas geográficas UTM: 2°10' 35" Sur y 78°30'11" Oeste. (NotiAmazonia, 2019)



**Figura. 1-2.** Ubicación Laguna Negra

Realizado por: Lopez, Evelyn, 2020

#### 2.5.1.2. Procedimiento del muestreo

- Se realizó un reconocimiento de la laguna Negra, para determinar los puntos de muestreo y recolección
- Se seleccionaron 5 puntos de muestreo de agua representativa de la laguna Negra.

Se utilizaron 5 envases de polietileno estériles, con tapa hermética, etiquetados y enumerados cada uno

Los envases fueron enjuagados tres veces con el agua de la laguna, y se recolecto 100ml de agua cada envase y sellados herméticamente.

Las muestras fueron transportadas en una caja fría cada uno con su respetiva rotulación( P1,P2,P3,P4 y P5) indicando el diferente punto de muestreo, hasta llegar al laboratorio de Bioquímicos y Bacteriológicos ubicado en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para su respectivo análisis microbiológico (INEN , 2013).

### **2.5.2. Siembra y aislamiento térmico**

Para la siembra inicial se utilizó la técnica de la dilución seriada y como medio de cultivo PCA.

Se realizó un aislamiento térmico de las placas bajo tres condiciones de temperatura, una a condición ambiente (temperatura del laboratorio de 13-16°C) a 37°C y 45°C.

Las placas llevadas a temperatura a condición ambiente fueron asiladas en condiciones oscuras, sin la presencia de luz solar.

Las placas llevadas a temperatura a 37°C y 45°C fueros aisladas en la incubadora microbiológica del laboratorio.

#### **2.5.2.1. Medios de cultivo**

Se preparó como agar base el medio de cultivo PCA ya que este medio es utilizado para la enumeración de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales y alimentos, como a su vez gracias a la Triptona y Extracto de Levadura que suministran fuentes de nitrógeno y de vitaminas para el crecimiento de los microorganismos (Melguizo, 2009).A continuación se presenta la composición del medio PCA. A continuación se muestra la composición del medio.

**Tabla 1-2:** Composición del Medio de cultivo PCA

<b>Componente</b>	<b>Cantidad en (g/L)</b>
Digestión pancreática de caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1.0

Agar	15.0
------	------

**Realizado por:** López, Evelyn 2020

A continuación, se describen los dos medios utilizados para la selección y aislamiento puro de cada uno de los clones procedentes de la laguna:

– *Medio PCA con Mantequilla industrial*

Simbología: “AM”

El medio inicial (PCA) se preparó según las indicaciones del fabricante: 23,5 gramos de medio en 1 litro de agua destilada, suplementado con (75g) de mantequilla (dependiendo de la cantidad de cajas a utilizar), se mezcló y fue esterilizada durante 15min a 121°C, distribuyéndose en placas Petri.

– *Medio PCA con Leche descremada*

Simbología: “LD”

Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, agregando (21 ml) de leche. (Dependiendo de la cantidad de cajas a utilizar), se procedió a colocar en cada una y se dejó secar durante 2 horas.

#### 2.5.2.2. Siembra

- Se utilizó el método de la dilución de  $10^{-6}$ , donde se tomó 10 ml de cada muestra tomada y se mezcló con los 90 ml de agua de peptona.
- Se prepararon las diluciones desde la  $10^{-1}$  hasta la  $10^{-6}$ .
- Se tomó 1 ml de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  y se procedió a colocar en las cajas Petri por triplicado
- Posteriormente se incubó a tres temperaturas a condición ambiente (13-16°C), 37°C y a 45°C con su respectiva rotulación.
- Finalmente se efectuó el conteo del número de bacterias existentes en cada caja Petri.

#### 2.5.2.3. Selección de las colonias bacterianas

Los clones seleccionados fueron replicados en nuevas placas e incubados a las temperaturas de (13 °C-16°C) y 37° C.

#### *2.5.2.4. Aislamiento por agotamiento por estría*

- Con el asa flameada en el mechero y enfriada se procedió a la siembra de los clones en las respectivas cajas Petri en cada uno de los medios preparados (AM y LD).
- La técnica de siembra usada fue agotamiento por estría.
- Posteriormente se procedió a flamear el asa y se realizó la respectiva rotulación en cada caja Petri para diferenciar los diferentes clones
- Se encubó a temperaturas de (13°C-16°C) y 37°C.

Las clones que presentaban contaminación se sembraron nuevamente en el respectivo medio de cultivo (AM y LD), con ayuda del asa siguiendo el método antes descrito.

## **2.6. Caracterización fenotípica**

Para la caracterización fenotípica se procedió a diferenciar y a observar cada uno de los clones adaptados tomando en cuenta las siguientes características:

### *2.6.1. Caracterización macroscópica*

La caracterización macroscópica fue realizada por observación directa de las características de cada uno de los clones aislados por estría principalmente su forma, borde, elevación, superficie y color que presentaban en los respectivos medios utilizados (AM y LD).

### *2.6.2. Caracterización microscópica*

Para la identificación microscópica de los clones se realizó la prueba de Tinción Gram, permitiendo la identificación y clasificación en Gram positivos o negativos de acuerdo a su coloración; y según su morfología microscópica (cocos y bacilos). (López Luis. et al., 2014)

#### *2.6.2.1. Procedimiento de tinción Gram*

- Se suspendió sobre un portaobjetos los clones aislados, extendiendo cada uno de los mismos hasta conseguir una capa fina y homogénea.
- Para la fijación de la muestra se pasó sobre el calor del mechero flameándolo tres veces.
- Se aplicó una gota de cristal violeta sobre la muestra fijada durante un minuto, y se procedió a lavar con abundante agua destilada cada uno de los portaobjetos.
- Posteriormente se aplicó Lugol por un minuto, y se enjuago con agua destilada
- Se añadió alcohol-cetona durante 30 segundos, dejándolo actuar para luego enjuagar con agua destilada.

- Se añadió safranina durante un minuto, se enjuagó y se dejó secar cada una de las muestras a temperatura ambiente.
- Para la visualización correcta en el microscopio se añadió una gota de aceite de inmersión.
- Y finalmente se observó la preparación con el lente de 100x (Alvarez, et al., 1995, p. 24).

### **2.6.3. Identificación bioquímica bacteriana**

Para la identificación bacteriana de los clones con un crecimiento óptimo a temperatura ambiente 13°C y a 37°C se realizaron las siguientes pruebas:

#### *2.6.3.1. Pruebas de lectura inmediata*

##### *2.6.3.1.1. Catalasa*

Se realizó un frotis del microorganismo con el asa esterilizada sobre un portaobjeto sin dejar secar, se añadió una gota de peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30 %. Finalmente se observó si existió un burbujeo entre los 10-20 segundos (Alvarez, et al., 1995, p. 115)

#### **Interpretación de Resultados:**

Positivo: si se observa un burbujeo

Negativo: no se observa burbujeo

##### *2.6.3.1.2. Coagulasa*

Se tomaron muestras de sangre en tubos BD Vacutainer de tapa lila, y fueron colocadas en la centrifuga durante una hora. Luego de ese tiempo, se procedió a extraer todo el plasma que se formó con una micropipeta digital, posteriormente se añadió 0.5ml de plasma en los tubos esterilizados y rotulados conjuntamente con una alícuota de los clones aislados. Finalmente, para su lectura se llevó a baño maría a 37°C durante 4 horas (Gutiérrez, et al., 2017).

#### **Interpretación de Resultados:**

- La formación de un coágulo visible se considera como positivo, y ninguna formación como negativo.

### 2.6.3.2. Pruebas de lectura lenta

#### 2.6.3.2.1. Kligler Hierro Agar

Se preparó el agar con las respectivas instrucciones, se colocaron 3ml en cada tubo. Se dejó enfriar el medio a manera de pico de flauta y se procedió a sembrar en dos formas con ayuda de la aguja bacteriológica-esterilizada. Se tomó un inóculo de los clones puros aislados donde se realizó una punción sin llegar al fondo del tubo y en la parte del pico de flauta se sembró por estría. Para su lectura se llevaron a incubación a 37°C durante 24 horas. A continuación se muestra la composición del medio Kligler (Alvarez, et al., 1995, p. 140).

**Tabla 2-2:** Composición del medio Kligler Hierro Agar

Componente	Cantidad en g/L
Digestión pancreática de caseína	10.0
Digestión péptica de tejido animal	10.0
Lactosa	10.0
Dextrosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
citrato férrico de amonio	0.5
tiosulfato de sodio	0.5
Agar	15.0
Fenol rojo	0.025

Realizado por: López, Evelyn 2020

#### **Interpretación de Resultados:**

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta glucosa.
- Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa y lactosa.
- Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): microorganismo no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
- El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico

#### 2.6.3.2.2. Agar Citrato

Se preparó el agar citrato, colocando 3ml del mismo en los tubos estériles y rotulados según el código asignado a cada uno, dejándoles secar en forma de pico de flauta. Con ayuda del asa esterilizada se tomó a cada uno de los cultivos puros y se aplicó la técnica de siembra por estría desde el fondo del tubo hasta la parte superior. Para su lectura se incubaron durante 24 horas. (Alvarez, et al., 1995, p. 116). A continuación se presenta la composición del medio Agar Citrato

**Tabla 3-2:** Composición del medio Agar Citrato

Componente	Cantidad en g/L
Dihidrogenofosfato de amonio	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Agar	15.0
Azul de bromotimol	0.08

Realizado por: López, Evelyn 2020

#### Interpretación de Resultados:

El crecimiento del microorganismo en el pico de flauta de color azul demuestra que es positivo, mientras que el color verde es negativo.

#### 2.6.3.2.3. Sulfuro-Indol-Mortalidad (SIM)

Se preparó el agar SIM, colocando 3ml en cada tubo estéril de manera vertical. Después de haber dejado secar con ayuda de la aguja bacteriológica esterilizada se inoculó en el medio el microorganismo con la técnica de siembra por picadura, es decir: sin llegar hasta el fondo y retirando en la misma dirección la misma, a su vez fueron incubados los tubos durante 24 horas. Para su lectura se añadió tres gotas del reactivo Kovac's. (Alvarez, et al., 1995, p. 127). A continuación se presenta la composición del medio (SIM).

**Tabla 4-2:** Composición del medio Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM)

Componente	Cantidad en g/L
Digestión pancreática de caseína	20.0
Digestión péptica de tejido animal	6.1
Sulfato de amonio ferroso	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5

Realizado por: López, Evelyn 2020

### **Interpretación de Resultados:**

#### – **Producción de SH<sub>2</sub>**

Positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio, si el medio permanece sin cambio de color es negativo

#### – **Indol:**

Positivo: Al mostrar una coloración roja en la superficie

Negativo: coloración amarilla

#### – **Motilidad:**

Si se observa una formación de nubosidad en el fondo alrededor de la siembra indica positivo, mientras que si se observa una línea es negativo.

#### 2.6.3.2.4. *Ureasa*

Se preparó el Agar base Urea de Christensen, colocando 3ml en los tubos estériles y se dejó solidificar en forma de pico de flauta, con ayuda del asa bacteriológica esterilizada se inoculó y se sembró en forma de estría la superficie del pico de flauta. Para su lectura se dejó incubar durante 24 horas (Alvarez, et al., 1995, p. 142).

### **Interpretación de Resultados:**

- Si se torna de color rosado-rojizo indica que la prueba es positiva y negativo si es de color amarillo.

#### 2.6.3.2.5. Agar de Sal de Manitol

Se preparó el agar manitol siguiendo las instrucciones, colocando 3 ml a los tubos estériles y se dejó solidificar a manera de pico de flauta, con ayuda del asa bacteriológica se inoculo y se sembró en forma de estría la parte superficial del pico de flauta, los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas para su lectura. A continuación se presenta la composición del Agar de Sal de Manitol.

**Tabla 5-2:** Composición del medio Agar de Sal de Manitol

Componente	Cantidad en g/L
Digestión pancreática de caseína	5.0
Digestión péptica de tejido animal	5.0
Extracto de carne	1.0
Cloruro de sodio	75.0
D-Manitol	10.0
Fenol rojo	0.025
Agar	15.0

Realizado por: López, Evelyn 2020

#### **Interpretación de Resultados:**

Al observarse una coloración amarilla del agar es positiva, mientras que una coloración rojiza es negativa.

#### 2.6.3.2.6. Determinación cualitativa del potencial de la actividad proteolítica y lipolítica

##### **Actividad proteolítica**

Para la determinación potencial de la actividad proteolítica se utilizó Agar Plate count (PCA) suplementado con leche descremada UHT al 1% p/v, se incubó durante 96 horas a 37 °C; para la interpretación de los resultados se determinó cualitativamente la formación de halos de aclaramiento de proteólisis en el agar. (Rodas M & Botello S, 2016, p.38)

##### **Actividad lipolítica**

Para la determinación del potencial de la actividad lipolítica se preparó el medio PCA+ ,mantequilla (1% v/v) , se incubó durante 96 horas a 37°C; para la interpretación de los

resultados se determinó cualitativamente la formación de halos de aclaramiento alrededor de las colonias, en contraste con el resto del medio que permanece turbio. (López A & Soria N, 2018, p.20)

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización físico-química del agua de la Laguna Negra

Las características físico químicas de temperatura y pH en las 5 muestras de agua tomadas de la Laguna Negra en la provincia de Chimborazo se detallan en la Tabla. 1-3

**Tabla 1-3:** Características físico-químicas del agua de Laguna Negra

Número de Punto	Temperatura (°C)	pH
P1	12.5	6.5
P2	12.7	6.2
P3	11.5	6.5
P4	11.2	7.0
P5	13.1	7.0

Realizado: López, Evelyn, 2020

La temperatura registrada de la laguna Negra oscila entre los 6 y 13°C. Sin embargo, las lagunas que no son afectadas por actividades antropogénicas y que permiten la preservación de la flora y la fauna de agua fría dulce el rango de pH según la legislación se encuentra entre los 6.5 a 9 (Acuerdo Ministerial 097, 2015).

Las muestras tomadas presentaron temperaturas que oscilan desde los 11.2 hasta los 13.1 °C. Cuyas temperaturas probablemente obedecen a la gran variación climática que existe (Camacho, 2013) además esta laguna se encuentra ubicada entre la región Sierra y Oriente, por lo que los primeros puntos tomados (P1, P2 y P5) se encuentran a una temperatura mayor entre los 12.5°C, 12.7°C y 13.1°C, a diferencia de los puntos (P3 y P4) que presentan una temperatura menor de 11.2°C a 11.5°C.

Para la obtención de resultados en cuanto al pH entre los 5 puntos (P1: 6.5, P2: 6.2, P3: 6.5, P4:7.0 y P5: 7.0) se realizó un promedio donde el valor fue de 6.6 indicando así que este tipo de agua es ácida lo cual permite que exista un desarrollo óptimo de la microbiota existente (Tabla 1-3).

### 3.2. Aislamiento de colonias bacterianas

#### 3.2.1. Siembra y estimación del número de colonias de las muestras

A temperatura ambiente es decir a (13°C-16) se observó crecimiento a 48 horas, a 37°C se obtuvieron colonias visibles a 24 horas, mientras que a la temperatura de 45°C se observó dentro de 72 horas. El promedio de colonias bacterianas se detalla en la Tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Colonias por el número de muestras

Promedio del número de colonias			
Numero de muestras	PCA		
	13°C	37°C	45°C
Punto 1	13	0	1
Punto 2	12	8	0
Punto 3	27	3	0
Punto 4	3	0	0
Punto 5	2	2	0
Promedio	67	13	1
Total	81		

Realizado por: López, Evelyn, 2020

Después de haber realizado la siembra, se observó solamente crecimiento bacteriano en dos temperaturas, a temperatura ambiente (13°C) se presentó un mayor número de unidades formadoras de colonia; mientras que a 37°C se presentaron un menor número de colonias. A 45°C no hubo presencia de bacterias sino de hongos. Para las siguientes etapas de la fase experimental se consideraron las bacterias obtenidas en las dos temperaturas (13°C y 37°C).

#### 3.2.2. Selección y aislamiento de las colonias

De cada placa sembrada tanto a temperatura ambiente 13°C como a 37°C, se tomó una muestra de cada uno de los tipos de colonias obtenidas. Estas fueron sembradas en los dos medios de cultivo de PCA, con Mantequilla industrial y Leche descremada como se detallan en la Tabla 3-3.

**Tabla 3-3:** Identificación de las colonias para la caracterización a Temperatura de 13°C

Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización a 13°C		
Muestra	PCA+ Mantequilla	PCA +Leche Descremada
P1	4	4
P2	9	7
P3	7	7
P4	2	3
P5	2	2

<b>TOTAL</b>	26	23
--------------	----	----

Realizado por: López, Evelyn, 2020

A temperatura ambiente se observó un crecimiento total de 49 colonias. En el medio PCA++Mantequilla crecieron 26 colonias, mientras que en el medio PCA+ Leche Descremada solamente crecieron 23 colonias.

**Tabla 4-3:** Identificación de las colonias para la caracterización a 37°C

<b>Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización a 37°C</b>		
<b>Muestra</b>	<b>PCA + Mantequilla</b>	<b>PCA + Leche Descremada</b>
<b>P1</b>	---	---
<b>P2</b>	3	3
<b>P3</b>	1	1
<b>P4</b>	---	---
<b>P5</b>	2	2
<b>TOTAL</b>	6	6

Realizado por: López, Evelyn, 2020

A 37°C hubo un crecimiento total de 12 colonias, tanto en el medio PCA + Mantequilla como al igual en el medio PCA + Leche Descremada crecieron 6 colonias para la caracterización e identificación de las mismas.

**Tabla 5-3:** Promedio de las siembras por triplicado de los clones obtenidos a 13°C

<b>Identificación de las colonias seleccionadas por triplicado para la caracterización a 13°C</b>		
<b>Muestra</b>	<b>PCA + Mantequilla</b>	<b>PCA +Leche Descremada</b>
<b>P1</b>	2	2
<b>P2</b>	7	6
<b>P3</b>	5	5
<b>P4</b>	3	3
<b>P5</b>	1	1
<b>TOTAL</b>	18	17

Realizado por: López, Evelyn, 2020

Después de realizar los tres repiques a la temperatura de 13°C, se obtuvieron un total de 35 clones, de los cuales en el medio PCA+ Mantequilla crecieron 18, mientras que en el medio PCA + Leche descremada crecieron 17 clones como se indica en la tabla 6-3.

**Tabla 6-3:** Promedio de las siembras por triplicado de los clones obtenidos a 37°C

<b>Identificación de las colonias seleccionadas por triplicado para la caracterización a 37°C</b>		
<b>Muestra</b>	<b>PCA+ Mantequilla</b>	<b>PCA +Leche Descremada</b>
<b>P1</b>	--	--
<b>P2</b>	1	1

<b>P3</b>	--	--
<b>P4</b>	--	--
<b>P5</b>	2	2
<b>TOTAL</b>	3	3

Realizado por: López, Evelyn, 2020

A 37 °C se observó el crecimiento de 6 clones, 3 clones en el medio PCA+ Mantequilla y 3 clones en el medio PCA + Leche Descremada como se muestra en la tabla 6-3.

### 3.2.3. Caracterización macroscópica y microscópica

#### 3.2.3.1. Tinción Gram

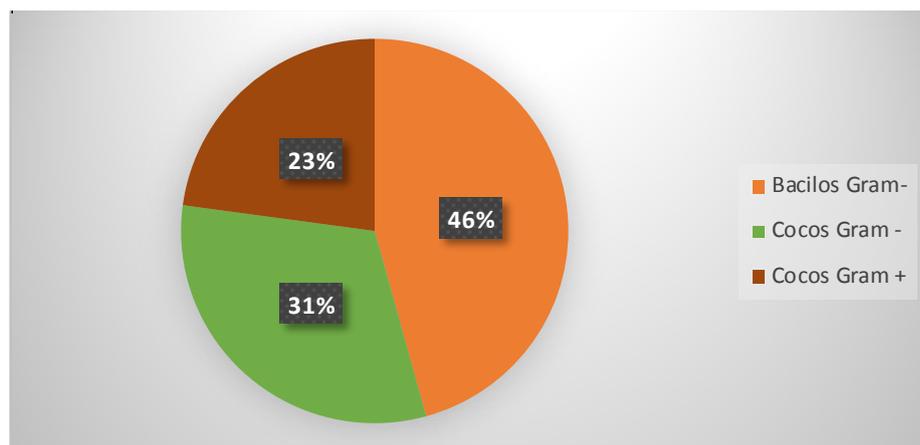
A través de la técnica diferencial de Gram fue posible identificar la morfología microscópica y el comportamiento de cada uno de los clones aislados y replicados.

**Tabla 7-3:** Resultados de la Tinción diferencial de Gram de los clones sembrados y aislados en los medios PCA +Mantequilla y PCA+Leche Descremada a 13°C

Clones aislados									
Clones	Medio PCA + Mantequilla				Medio PCA + Leche Descremada				
	T°C	Forma de la colonia	Coloración	Tinción Gram	Clones	T°C	Forma de la colonia	Coloración	Tinción Gram
<b>P11</b>	13	Cocos	Rojos	-	<b>P11</b>	13	Cocos	Rojos	-
<b>P14</b>	13	Bacilos	Rojos	-	<b>P14</b>	13	Bacilos	Rojos	-
<b>P21B</b>	13	Bacilos	Rojos	-	<b>P21B</b>	13	Bacilos	Rojos	-
<b>P22A</b>	13	Bacilos	Rojos	-	<b>P22A</b>	13	Bacilos	Rojos	-
<b>P21T</b>	13	Cocos	Rosados	-	<b>P21T</b>	13	Cocos	Rosados	-
<b>P25T</b>	13	Cocos	Morados	+	<b>P25T</b>	13	Cocos	Morados	+
<b>P23</b>	13	Bacilos	Rosados	-	<b>P23</b>	13	Bacilos	Rosados	-
<b>P24</b>	13	Cocos	Rosados	-	<b>P24</b>	13	Cocos	Rosados	-
<b>P32</b>	13	Cocos	Rojos	-	<b>P32</b>	13	Cocos	Rojos	-
<b>P34</b>	13	Cocos	Morados	+	<b>P35</b>	13	Bacilos	Rosados	-
<b>P35</b>	13	Bacilos	Rosados	-	<b>P31T</b>	13	Bacilos	Rojos	-
<b>P36</b>	13	Cocos	Morados	+	<b>P36</b>	13	Cocos	Morados	+
<b>P31T</b>	13	Bacilos	Rojos	-	<b>P41</b>	13	Cocos	Morados	+
<b>P41</b>	13	Cocos	Morados	+	<b>P42</b>	13	Bacilos	Rosados	-
<b>P42</b>	13	Bacilos	Morados	+	<b>P43</b>	13	Cocos	Rojos	-
<b>P43</b>	13	Cocos	Rojos	-	<b>P52</b>	13	Bacilos	Rojos	-
<b>P52</b>	13	Bacilos	Rojos	-	<b>P53</b>	13	Cocos	Morados	+
<b>P53</b>	13	Cocos	Morados	+					

“GRAM positivo (+)”, “GRAM negativo (-)”

Realizado por: López, Evelyn, 2020



**Gráfico 1-3:** Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos 13°C

Realizado por: López, Evelyn, 2020

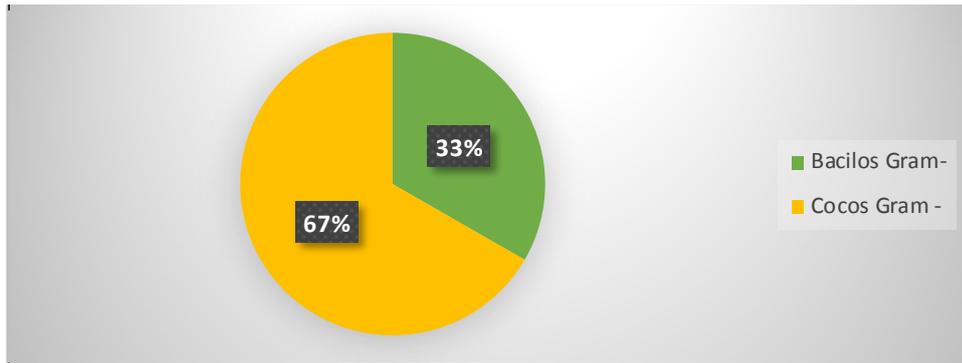
Los resultados de los clones seleccionados a la temperatura de 13°C se detallan en el gráfico 1-3. Donde se obtuvo que el 46% indica que son Bacilos Gram negativos, el 31% Cocos Gram negativos mientras que el 23% corresponde a Cocos Gram positivos.

**Tabla 8-3:** Resultados de la Tinción diferencial de Gram de los clones sembrados y aislados en los medios PCA+Mantequilla y PCA+Leche Descremada a 37°C

Clones aislados									
Medio PCA + Mantequilla					Medio PCA +Leche Descremada				
Clones	T °(C)	Forma de la colonia	Coloración	Tinción Gram	Clones	T° (C)	Forma de la colonia	Coloración	Tinción Gram
P22	37	Bacilos	Rojos	-	P22	37	Bacilos	Rojos	-
P52	37	Cocos	Rojos	-	P52	37	Cocos	Rojos	-
P51	37	Cocos	Rojos	-	P51	37	Cocos	Rojos	-

“GRAM positivo (+)”, “GRAM negativo (-)”

Realizado por: López, Evelyn, 2020



**Gráfico 2-3:** Porcentaje de clones bacterianos Gram positivos y Gram negativos 37° C.

**Realizado por:** López, Evelyn, 2020

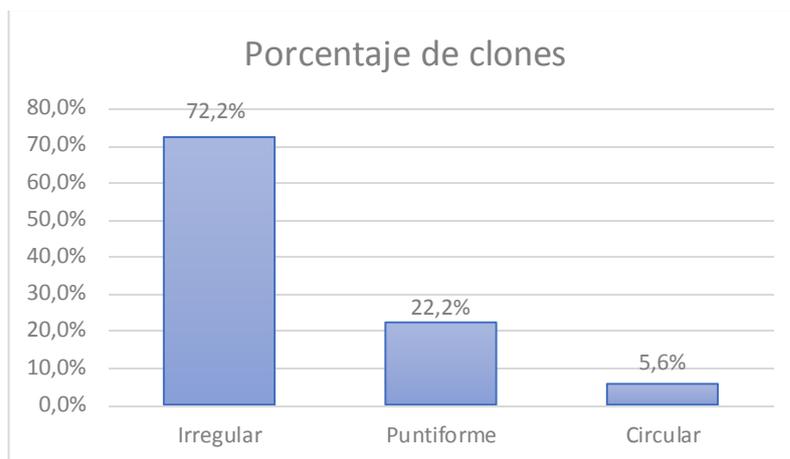
En el Gráfico 2-3 los 6 clones desarrollados a 37°C fueron Bacilos Gram negativos con un porcentaje de 33%, mientras que el 67% indica que son Cocos Gram negativos. Estos resultados arrojados tanto del gráfico 1-3 y 2-3 coinciden con bibliografía encontrada donde menciona que, en ambientes extremos fríos, especialmente en nieve, hielo y escombros Antárticos existen Gram negativos o cocos Gram positivos formadores de esporas (Hoovera & Pikuta, 2010, pp. 2-4).

### 3.3. Caracterización macroscópica de los clones aislados

Los resultados obtenidos en la evaluación de caracterización macroscópica de los clones aislados se describe a continuación:

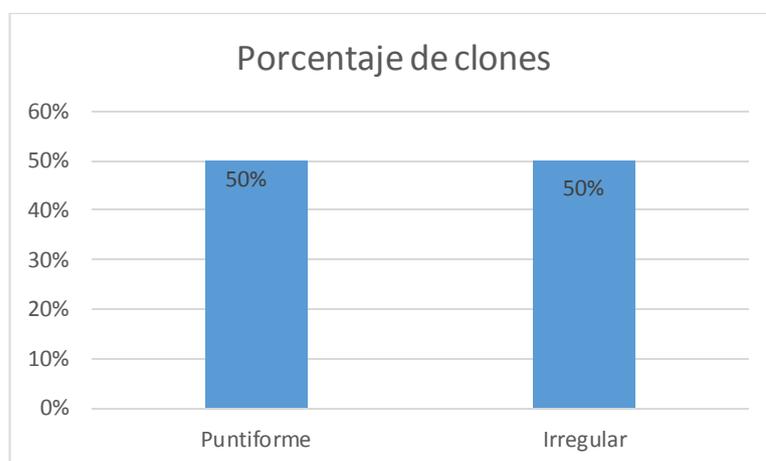
#### 3.3.1. Forma

La forma que presentaron los clones aislados se detalla en los Gráficos 3-3 y 4-3. La mayor parte de clones (72,2%) presentaron morfología irregular tanto a la temperatura de 13°C y en un 50% los clones desarrollados a 37°C. La morfología de forma puntiforme de los clones a 13°C correspondió al 22,2% y a 37°C al 50%, el 5,6% presentaron una morfología circular a 13°C. Lo que determinó que la forma de los clones aislados depende del medio en las que se desarrollan (Navarrete, 2017).



**Gráfico 3-3:** Forma de los clones cultivados a 13° C

**Realizado por:** López, Evelyn, 2020

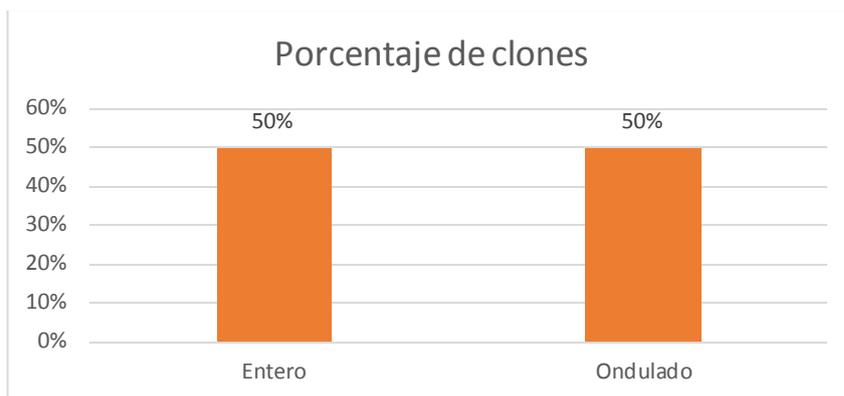


**Gráfico 4-3:** Forma de los clones cultivados a 37° C

**Realizado:** López, Evelyn, 2020

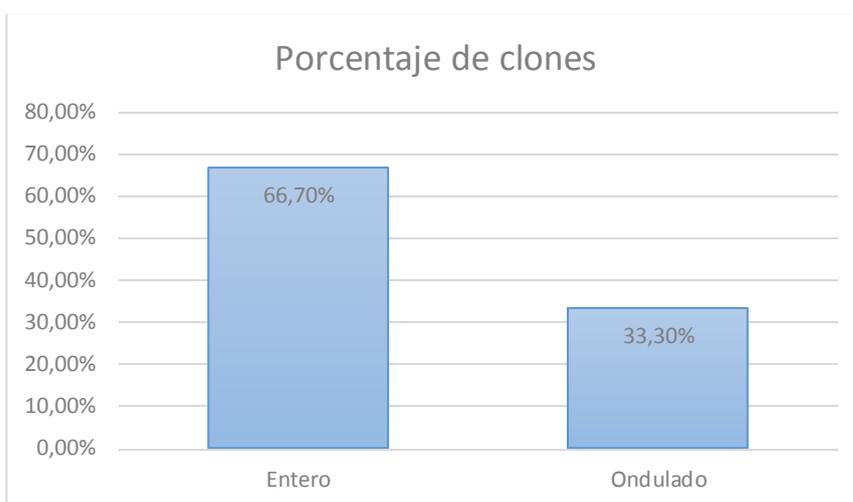
### 3.3.2. Borde

El borde de los clones analizados en ambas temperaturas indicó la presencia de dos tipos de borde, entero y ondulado. Como se muestra en el gráfico 5-3, a 13°C se observó el borde entero en el 50% de los clones y un 50% de borde ondulado. Para los clones desarrollados a 37°C el porcentaje fue de 66,70% con borde entero, mientras el 33,30% del borde ondulado.



**Gráfico 5-3:** Tipo de Borde de los clones cultivados a 13° C.

**Realizado por:** López, Evelyn, 2020



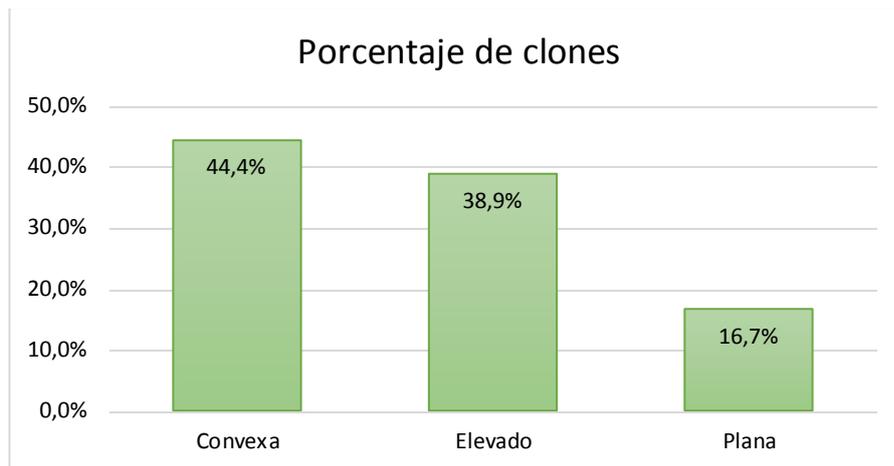
**Gráfico 6-3:** Tipo de Borde de los clones cultivados a 37° C.

**Realizado por:** López, Evelyn, 2020

### 3.3.3. Elevación

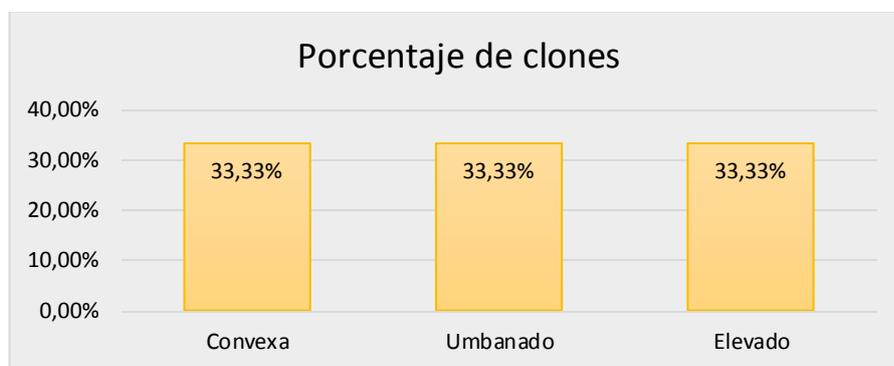
El análisis de la elevación que presentaron los clones desarrollados en ambos medios de cultivo (PCA + Mantequilla y PCA + Leche D) a 13°C se muestra en el Gráfico 7-3. El 44,4% de elevación de los clones analizados fue de tipo convexo, el 38,9% elevado y de 16,7% plano.

A 37°C, no hubo ninguna variación entre los tres tipos de elevación obteniéndose un porcentaje de 33,3% representado en el Gráfico 8-3.



**Gráfico 7-3:** Tipo de Elevación de los clones cultivados a 13° C.

**Realizado por:** López, Evelyn, 2020

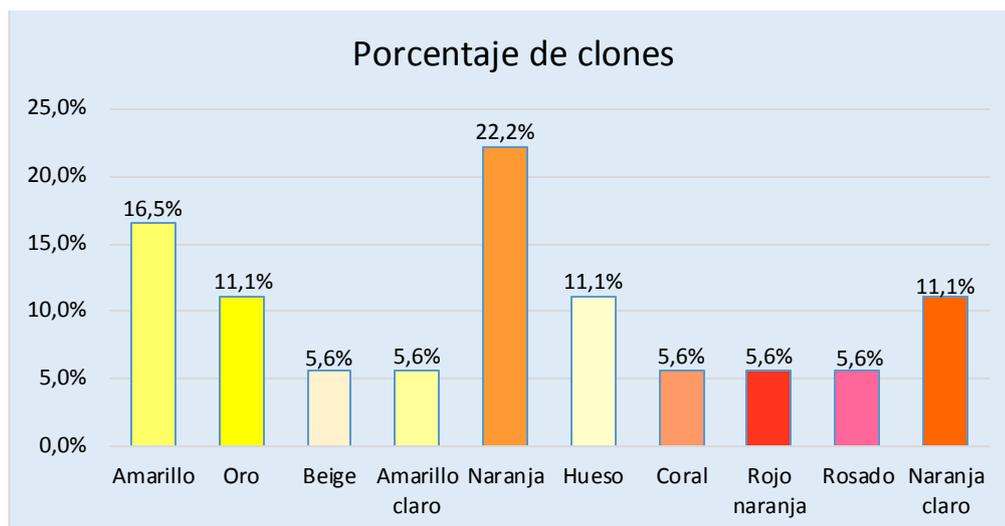


**Gráfico 8-3:** Tipo de Elevación de los clones cultivados a 37° C.

**Realizado por:** López, Evelyn, 2020

### 3.3.4. Color

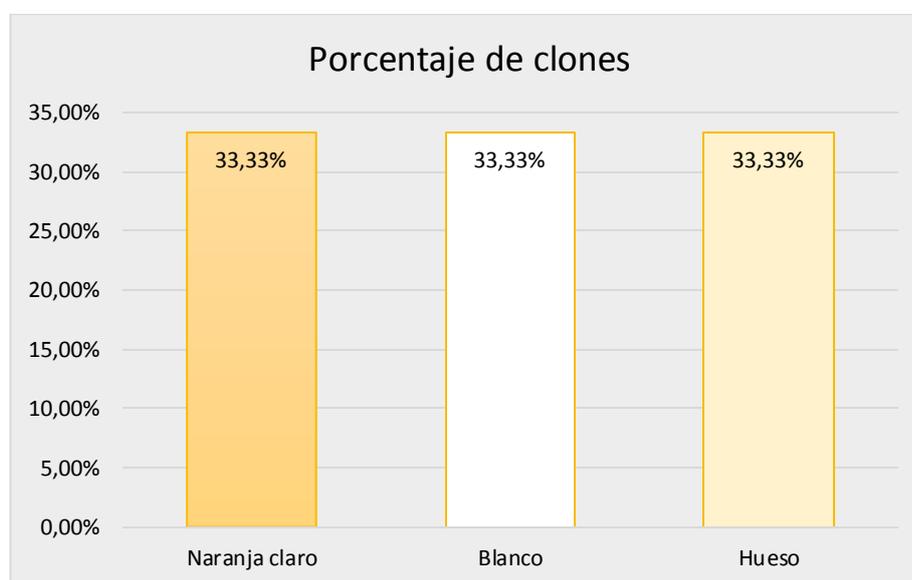
El análisis de la coloración que tomaron los clones en los medios utilizados demostró variaciones en cada clon como se muestra en el Grafico 9-3. Se observó cómo predominante el color naranja con un 22,2% en relación al porcentaje 16,5% del color amarillo, un 11,1% entre los colores oro, hueso, naranja claro y con tan solo con un mínimo de porcentaje de 5,6% para los colores: beige, amarillo claro, coral, rojo naranja y rosado llevados a cabo en la temperatura 13°C.



**Gráfico 9-3:** Tipo de Color de los clones cultivados a 13° C.

Realizado por: López, Evelyn, 2020

En el caso de las coloraciones para la temperatura a 37°C observados en el Gráfico 10-3 se obtuvieron tres tipos los cuales presentaron un porcentaje de 33,3% no variado entre: hueso, naranja y blanco.



**Gráfico 10-3:** Tipo de Color de los clones cultivados a 37° C.

Realizado por: López, Evelyn, 2020

**Tabla 9-3:** Caracterización macroscópica de los clones aislados en los medios PCA + Mantequilla y PCA +Leche Descremada a 13°C

Clones	T°C	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color	Olor	Fecha de Crecimiento	Fecha de Siembra
P11	13	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Amarillo	Sin	17/01/20	15/01/20
P14	13	Irregular	Ondulado	convexa	Brillante	oro	Sin	17/01/20	15/01/20
P21B	13	Irregular	Entero	Elevado	Brillante	beige	Sin	17/01/20	15/01/20
P22A	13	puntiforme	Entero	convexa	brillante	Amarillo claro	Sin	17/01/20	15/01/20
P21T	13	Irregular	Entero	Elevado	Brillante	Naranja	Sin	17/01/20	15/01/20
P25T	13	Circular	Entero	convexa	brillante	Naranja	Sin	17/01/20	15/01/20
P23	13	puntiforme	Entero	Convexa	Brillante	Oro	Sin	17/01/20	15/01/20
P24	13	irregular	ondulado	convexa	brillante	Amarillo	Sin	17/01/20	15/01/20
P32	13	Irregular	Ondulado	Elevado	Brillante	Hueso	Sin	17/01/20	15/01/20
P34	13	Irregular	Ondulado	Elevado	Brillante	Naranja claro	Sin	17/01/20	15/01/20
P35	13	Irregular	Entero	Elevado	Brillante	Amarillo	Sin	17/01/20	15/01/20
P36	13	Irregular	ondulado	elevado	brillante	Naranja	Sin	17/01/20	15/01/20
P31T	13	Irregular	ondulado	Plana	Brillante	Naranja	Sin	17/01/20	15/01/20
P41	13	Irregular	Ondulado	Convexa	Brillante	Coral	Sin	17/01/20	15/01/20
P42	13	Puntiforme	Entero	convexa	brillante	Rojo naranja	Sin	17/01/20	15/01/20
P43	13	Puntiforme	Entero	plana	Seca polvorosa	Rosado	Sin	17/01/20	15/01/20
P52	13	Irregular	Ondulado	Plana	Liso, brillante	Naranja claro	Sin	17/01/20	15/01/20
P53	13	Irregular	Ondulado	Elevado	Liso, brillante	Hueso	Sin	20/01/20	15/01/20

Realizado por: López, Evelyn, 2020

Los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización macroscópica de los clones aislados en los medios PCA+ Mantequilla y PCA+ Leche Descremada a 13°C se indica en los gráficas (3-3; 5-3; 7-3; y 9-3).

**Tabla 10-3:** Caracterización macroscópica de los clones aislados en los medios PCA + Mantequilla y PCA+ Leche Descremada a 37°C

Clones	T°C	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color	Olor	Fecha de Crecimiento	Fecha de Siembra
P22	37	Puntiforme	Entera	Convexa	Seco brillante	Naranja claro	sin	17/01/20	15/01/20
P52	37	Irregular	Ondulado	Umbanado	Seco polvoroso	Blanco	sin	17/01/20	15/01/20
P51	37	Irregular	Entero	Elevado	Seco polvoroso	Hueso	sin	17/01/20	15/01/20

Realizado por: López, Evelyn, 2020

Para la caracterización macroscópica a 37°C los resultados obtenidos se muestran en las gráficas (4-3; 6-3; 8-3 y 10-3).

### 3.4. Identificación Bacteriana a través de pruebas Bioquímicas

Para la identificación de los posibles géneros microbianos aislados a las temperaturas de (13°C y 37°C), se utilizó el manual de técnicas en microbiología clínica de (Alvarez, et al., 1995, pp. 74-86).

**Tabla. 11-3:** Bacilos Gram Negativos

CARACTERISTICAS			KLIGLER							SIM					
Clon	T° ( C)	Forma colonia	Gram	Catalasa	Coagulasa	Glucosa	Gas/GL	Lactosa	SH2	Citrato	Manitol	Ureasa	Indol	Movilidad	SH2
P21 B	13	Bacilos	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P52	13	Bacilos	-	+	-	K/K	K/K	K/K	K/K	-	-	+	-	+	-
P35	13	Bacilos	-	+	-	K/K	K/K	K/K	K/K	-	-	+	-	-	-
P22	37	Bacilos	-	-	-	K/K	K/K	K/K	K/K	-	-	-	-	+	-
P22 A	13	Bacilos	-	+	-	K/K	K/K	K/K	K/K	-	-	+	-	+	-
P31 T	13	Bacilos	-	+	-	K/K	K/K	K/K	K/K	+	-	+	-	+	-
P23	13	Bacilos	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
P14	13	Bacilos	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
P42	13	Bacilos	-	+	-	K/K	K/K	K/K	K/K	-	+	+	-	+	-

<b>P36</b>	13	Cocos	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>P53</b>	13	Cocos	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>P41</b>	13	Cocos	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>P25</b>	13	Cocos	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>T</b>															

**Realizado por:** Lopez, Evelyn, 2020

K/K: el microorganismo no es fermentador de azúcares

De los 21 clones aislados y seleccionados, se realizaron en 13 clones debido a que fueron positivos a las pruebas bioquímicas. Los resultados obtenidos mostraron que el 69% son bacterias Gram (-) mientras que 31% son bacterias Gram (+).

A partir de la caracterización microscópica, macroscópica, pruebas bioquímicas se puede establecer que los clones bacterianos pertenecen posiblemente a los siguientes géneros:

El clon (P21B) presenta motilidad negativa, catalasa positiva, bacteria Gram negativa psicrotolerantes presente en la superficie de peces y aves adaptadas al frío (Montes, 2005) por lo que coincide con el género de *Psychrobacter*.

Para los clones (P53, P36, P41 y P25T) son cocos Gram positivos por lo que coincide posiblemente con el género *Micrococcaceae*. La prueba de catalasa dio positivo evidenciando la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno y agua. La presencia de algunas especies no forman pigmento, pero otras forman pigmento amarillo, naranja o rojo, algunas especies son móviles o muestran variedades móviles (Breed Robert. et al., 1957).

El clon (P14), son anaerobios facultativos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa y reducen el nitrato, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pueden encontrarse en las aguas dulces, en las hojas vegetales, frutos, hongos hierbas, musgos y leche (Fernandez, 2002). Con prueba de indol negativo, movilidad positiva coincide al género *Serratia*.

Los clones (P42, P52, P31, P22A, P35 y P22) son bacilos Gram negativos, no fermentadores de azúcares llamados quimioorganotrofos capaces de obtener su energía de compuestos orgánicos (Washington W. et al., 2006) presentan catalasa positiva, indol negativo y movilidad positiva dependiendo de la especie, con una coincidencia con el género *Pseudomonas spp.*,

El clon (P23) coincide posiblemente con el género *Flavobacterium* es una bacteria gramnegativa, su detección se ha basado principalmente en el cultivo tradicional en placa de agar (Wilkund & Madetoja, 2002, pp. 259-266.) .No degrada quitina, almidón y xantinas. Si presenta,

aunque débilmente, actividad positiva a catalasa y oxidasa, pero con actividad negativa a indol, ácido sulfhídrico, lisina y ornitina (Burgos, 2014).

La identificación no siempre puede ser posible, particularmente con géneros o especies que no son susceptibles de ser caracterizados por los tradicionales test bioquímicos o fisiológicos. En tales casos, puede ser necesario acudir a procedimientos relativamente complicados para obtener una identificación correcta, procedimientos tales como la electroforesis de proteínas celulares en gel de poliacrilamida (PAGE), la composición lipídica celular o la hibridación de ácidos nucleicos (Razin & Rottem, 1967, pp. 1807-1810).

Las investigaciones realizadas en lagos oligotróficos de agua dulce que se hallan en alta montaña muestran de datos precisos en cuanto a la microbiota existente, ya que no permite tener con exactitud los posibles géneros que se puedan encontrar, varias especies identificadas coinciden con el estudio de la laguna amarilla del Altar y otros (Moreno, 2017, p. 58).

### 3.5. Resultados de la cualificación proteolítica y lipolítica

**Tabla 12-3** Observación cualitativa de la actividad proteolítica de las colonias  
Seleccionadas para la caracterización a 13°C y 37°C

Clones	T° C	Crecimiento Agar Mantequilla	Halo bacteriano	Crecimiento Agar Leche D.	Halo bacteriano
P11	13	Si	No	Si	No
P14	13	Si	No	Si	No
P21B	13	Si	No	Si	No
P22A	13	Si	No	Si	No
P21T	13	Si	No	Si	No
P25T	13	Si	No	Si	No
P23	13	Si	No	Si	No
P24	13	Si	No	Si	No
P32	13	Si	No	Si	Si
P34	13	Si	No	Si	No
P35	13	Si	No	Si	No
P36	13	Si	No	Si	No
P31T	13	Si	No	Si	No
P41	13	Si	No	Si	Si
P42	13	Si	No	Si	No
P43	13	Si	No	Si	No
P52	13	Si	No	Si	No
P53	13	Si	No	Si	No
P22	37	Si	No	Si	No

<b>P51</b>	37	Si	No	Si	No
<b>P52</b>	37	Si	No	Si	No

**Realizado por:** López, Evelyn, 2020

Para la cualificación de la actividad lipolítica (mantequilla) se obtuvo como resultado que el 100% de los clones a temperatura ambiente (13 ° C) y a 37 ° C no presentaron halo bacteriano, debido a que el sustrato que se empleó no actúa eficientemente como fuente de carbono para la producción de lipasas. Para Montesinos Segui (1993, p.19) afirma que: el mejor sustrato para la producción de lipasas es el aceite de oliva ya que tiene un efecto inductor y está constituido por una doble molécula de sacarosa y un triglicérido.

Para la cualificación de la actividad proteolítica se obtuvo como resultado que del 89 % solo el 11% de los clones aislados a temperatura ambiente (13 ° C) presentaron una menor actividad proteolítica.

## CONCLUSIONES

Se caracterizó un total de 21 clones determinándose que la mayor presencia de bacterias encontradas en laguna Negra en la provincia de Chimborazo fue de microorganismo psicrófilos.

En la evaluación macroscópica se identificó características predominantes como: A temperatura ambiente (13-18°C) los clones aislados presentaron con un mayor porcentaje de (72,2%) de morfología irregular, borde (50%), elevación de tipo convexo en un (44,4%) y la coloración en los clones en su mayoría fue de (22,2%). Mientras que a 37°C presentaron los siguientes: la morfología de forma irregular fue del (50%), tipo de borde entero fue de (66,70%) en cuanto a elevación no hubo variación obteniéndose un porcentaje de (33,3%) no hubo variación en cuanto a la coloración obteniéndose un (33,3%) entre naranja y blanco. En la evaluación microscópica se determinó que el mayor porcentaje corresponde a bacterias de tipo Gram negativos (46% a 13°C y 33% a 37°C) presentando una morfología en forma de bacilos y una coloración roja por lo que se puede concluir que los posibles géneros son : *Pseudomonas spp*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Microcaceae* y *Psychrobacter* de acuerdo a las pruebas bioquímicas.

Mediante la evaluación cualitativa de la actividad proteolítica se concluye que los clones aislados que presentaron actividad proteolítica fueron los clones P32 y P41 llevados a cabo a la temperatura ambiente (13°C), mientras que no hubo la presencia de actividad lipolítica del 100% de los clones expuestos en Agar PCA suplementado con mantequilla llevados a cabo en las temperaturas a (13°C ) y (37°C) puesto que el sustrato empleado no aportó eficientemente como fuente de carbono para la producción de lipasas.

## **RECOMENDACIONES**

Continuar con el estudio y el aislamiento de microorganismos existentes en lugares que aún siguen sin ser explorados con la finalidad de encontrar nuevas especies de las que ya se han venido investigando.

Emplear técnicas moleculares (PCR, análisis del 16S, replica del ADN bacteriano) para la identificación más precisa y verificación de los clones aislados.

Estudiar la actividad enzimática proteolítica y lipolítica de las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes que conlleven al uso potencial en el ámbito biotecnológico.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALVAREZ, Victoria; et al.** *Manual de técnicas en microbiología clínica*. 2ª ed. Madrid-España: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas, 1995, pp. 24-140.

**APELLA, María, & ARAUJO, Paula.** *Microbiología de agua. Conceptos básicos*. [En línea] Buenos Aires - Argentina: UNSAM, 2005 [Citado el: 30 Agosto 2019]. Disponible en: [https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

**BAILÓN, Lucía; et al.** "Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias". [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores de Zaragoza, Ciudad de México, México. 2003. pp. 92-223. [Citado el: 16 Octubre 2019 ]. Disponible en: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>

**BARRERO, Laura.** "Microbiología clínica". *Síntesis* [En línea], 2016 (Madrid) p. 40. [Citado el: 16 Octubre 2019]. ISBN 978-84-9077-318-5. Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>

**BDADVANCING THE WORLD OF HEALTH**BD Mannitol Salt Agar. [En línea]. Heidelberg, Alemania, 2013. [Citado el: 16 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>

**BELTRÁN, Miguel J.; & OGURA, Tetsuya F.,** "Catalasas de Hongos Fitopatógenos: ¿Factores de Virulencia y resistencia a los fungicidas?". *Mexicana de Fitopatología*, vol. 24, nº 1 (2006), (México) pp. 50-58.

**BENERJEE, Rajarshi; et al.** "Psychrophilic microorganisms: Habitats and exploitation potentials". *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, vol.4, nº 3 (2016), (India) pp. 16-24.

**BOWMAN, Jhon ; et al.** "Diversity and Association of Psychrophilic Bacteria in Antarctic Sea Ice". *Applied and environmental microbiology*, vol. 63, nº 8 (1997), (Australia) pp. 3068-3078.

**BREED, Robert; et al.** *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7ª ed. United State-America: The Williams & Wilkins Company, 1957. pp. 544.

**BRITANIA.** *T.S.I. Agar*. [En línea]. Argentina, 2019. [Citado el: 16 octubre 2019]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a297d2411990.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297d2411990.pdf)

**BROCK, T., & ROSE, A.** *Psychrophiles and Thermophiles* [En línea]. New York-USA: Academic/Plenum, 2001. [Citado el: 19 octubre 2019]. Disponible en: [https://scihub.tw/10.1016/S0580-9517\(08\)70506-3](https://scihub.tw/10.1016/S0580-9517(08)70506-3)

**BRONWYN, Kirby; et al.** "Ecological Distribution of Microorganisms in Terrestrial, Psychrophilic Habitats". *Extremophiles Handbook*, nº 81 (2010), (Tokyo) pp. 839-863.

**BURGOS, Alvaro J.** "Detección molecular de flavobacterium psychrophilum trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) cultivada en el lago Guamuéz municipio de Pasto República de Colombia. *Laboratorio de biotecnología*, (2014), (Ecuador) pp. 1-10.

**CARRANZA HERNANDEZ, Ximena.** La bioprospección de microorganismos en Colombia como uso sostenible de la biodiversidad. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ingenierías, Bogotá, Colombia. 2017. pp. 4. [Citado el: 18 abril 2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/5344/aba47ba4a5201ca7623e23f4ab2ff147960e.pdf>

**CASTILLO, Francisco; et al.** *Biotecnología ambiental*. 2ª ed. Madrid- España: Tèbar, 2005, pp. 384

**CAVICCHIOLI, R; et al.** "Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles". *Microb Biotechnol*, vol. 4, nº 4 (2011), (Australia) pp. 449–460.

**COBO SALCEDO, Carlos Fernando.** Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis*. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad San Francisco de Quito, Colegios de Ciencias e Ingeniería. Quito- Ecuador. 2017. pp. 13. [Citado el: 31 octubre 2019]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>

**CONTACTOS.** "Conceptos básicos utilizados en genética de poblaciones". *Revista de educación en ciencias e ingeniería*, vol 3, nº87 (2013), (España) pp. 1-62.

**D'AMICO, Salvino; et al.** "Psychrophilic microorganisms: Challenges for life". *EMBO Reports*, vol. 7, nº 4 (2006), (Belgica) pp. 385–389.

**DEMIRJIAN, David; et al.** "Enzymes from extremophiles". *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, nº 2 (2001), (United States) pp. 144-151.

**DOMINGUEZ, Mariana.** "Bacterias antárticas y agentes antibacterianos". *OceanDocs*, vol. 27, nº 2 (2008), (Chile) pp 4-5.

**ESCOBAR FREIRE, Jèssica Jhoret.** Estudio de la Biodiversidad Microbiana en las aguas de la Laguna del Quilotoa, Provincia Cotopaxi-Ecuador. [En línea] (Trabajo de titulaciòn). Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ingeniería en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental, Quito, Ecuador. 2019, pp 6. [Citado el:16 diciembre 2019]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18197/1/T-UCE-0012-FIG-095.pdf>

**ECUADOR.** Acuerdo Ministerial 097, 07/2015, 4 Noviembre. Registro Oficial, 4 de noviembre de 2015, nùm. 387, p. 6-26.

**ESPINEL, Esperanza; & LÓPEZ, Elizabeth.** "Purificación y caracterización de a-amilasa de penicillium commune producida mediante fermentación en fase sólida". *Revista Colombiana de Química*, vol. 38, nº 2 (2009), (Colombia) pp. 191-208.

**FERNÁNDEZ, Amparo; et al.** "Procedimientos en microbiología clínica". *Seimc*, vol. 1 nº 1 (2010), (España) pp. 1-52.

**FERNÁNDEZ, Roberto Alonso.** Métodos fenotípicos y genotípicos de análisis intraespecífico en *Serratia marcescens*. [En línea] (Trabajo de titulaciòn). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de ciencias Biológicas, Madrid, España. 2002. pp. 21. [Citado el:31 octubre 2019]. Disponible en: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:g9QDXmSK8mcJ:https://eprints.ucm.es/3394/1/T16957.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec>

**FLORES, Antonio, & RÌOS, Katherine.** "Las Lagunas de alta montaña". *Cuadernos de Geografía*, vol. 7, nº 2 (1998), (Colombia) pp. 25-49

**FULLANA, Natalia.** Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura. [En línea] (Maestría). Instituto Antártico Uruguayo, Facultad de Ciencias, Monte video, Uruguay. 2014. pp. 45. [Citado el:31 octubre 2019]. Disponible en: <http://www.iau.gub.uy/wp-content/uploads/2018/08/Producci%C3%B3n-y-caracterizaci%C3%B3n-parcial-de-una-proteasa-bacteriana-activa-a-baja-temperatura-2014-ilovepdf-compressed.pdf>

**GARCIA ACEVEDO, Joan Sebastian, & MONTOYA NIÑO, Luisa Fernanda.** Evaluación de la incorporación de enzimas proteasas en undetergente líquido para la remoción de manchas de sangre, aplicando la metodología de diseño de productos químicos. [En línea] (Trabajo de titulación). Fundación Universidad de América, Facultad de Ingenierías, Programa de Ingeniería Química, Bogota, Colombia. 2017. pp. 21. [Citado el: 31 octubre 2019]. Disponible en: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:G3AbFYaCQPEJ:https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6031/1/6102483-2017-1>.

**GARCÍA, V. C.** *Introducción a la microbiología*. 2ª ed. Costa Rica: EUNED, 2004, pp. 42-44.

**HAMZA, Temam.** "Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use". *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, vol. 3, n°1 (2017), (Etiopia) pp. 1-10.

**HASSAN, Noor; et al.** "Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review". *Rev. Environ Sci Biotechnology*, vol. 15, n° 2 (2016), (Pakistán) pp. 1-27.

**HERNANDEZ ASCENCIO, Walter Ismael.** Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Postgrado en Microbiología, Parasitología y Química clínica para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología. [En línea] (Maestría). Universidad de Costa Rica, Sistema de estudios de posgrado, Rodrigo Facio, Costa Rica, 2012. pp. 4. [Citado el: 31 octubre 2019]. Disponible en: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/2041/1/33877.pdf>

**HOOVERA Richard; & PIKUTA Richard.** "Psychrophilic and Psychrotolerant Microbial Extremophiles in Polar Environments". *Book depository*, (2010), (United State) pp. 2-4.

**HOYOUX, A; et al.** "Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*". *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, n° 4 (2001), (Bélgica) pp. 1529–1535.

**INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS.** Boletín técnico Índices de precios al consumidor. [En línea]. Quito, Ecuador. 2019. [Citado el: Diciembre 2019]. Disponible en: [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Inflacion/2019/Noviembre\\_2019/Boletin\\_tecnico\\_11-2019-IPC.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Inflacion/2019/Noviembre_2019/Boletin_tecnico_11-2019-IPC.pdf)

**JAVED Anam; & QAZI Javed.** "Psychrophilic Microbial Enzymes Implications in Coming Biotechnological Processes". *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, vol. 23, n°1 (2016), (Pakistán) pp. 103-120.

**KIBORI, DC; et al.** "Enzymes from extremophiles". *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, nº 2 (2001), (United State) pp. 144-151.

**KUDDUS, Mohammed; & PRAMOD, Ramteke.** "Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases". *Crit Rev Microbiol*, vol 38, nº 4 (2012), (United state) pp. 330-338.

**LATORRE BARRIOS, Nelcy Edith.** Evaluaciòn de los medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperaciòn de heteròtrofos edàficos en la ecoregiòn cafetera de los Andes. [En línea] (Trabajo de titulaciòn). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogota, Colombia. 2007. pp. 22-25. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis112.pdf>

**LÓPEZ A, Jocelyne Vanessa & SORIA N, Liliana Carlota.** Evaluaciòn Prospectiva de la Actividad Lipolítica y Proteolítica en Bacterias de aguas termales. [En línea] (Trabajo de Titulaciòn). (Ingeniería) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Químicas. Riobamba, Ecuador. 2018, p.20. [Citado el: 27 de Octubre de 2020.] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10419/1/236T0389.pdf>.

**LÓPEZ, L ; et al.** "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". *Medigraphic*, vol. 3, nº1 (2014) (México), pp. 10-18.

**MADIGAN, Michael; et al.** *Brock Biología de los microorganismos*, 14ª ed. Madrid- España: Pearson Prentice Hall, 2015. pp. 1-1099.

**MAHESHWARI, Maheshwari; et al.** " Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes". *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 64, nº 3 (2002), (India) pp. 461-488.

**MARUYAMA, A. et al.** "Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov". *Microbiology research*, vol.50, nº 1 (2000), (Japon) pp. 835-846.

**MELGUIZO SORIA, Franciso.** *Ficha tècnica*. [blog]. [Citado el: 31 Octubre 2019]. Disponible en: <https://fdocuments.ec/amp/document/ft-plate-count-agar-f-soriaesf-soriaesinformoriadifco-fichas-tecnicasplacas.html>

**MORENO AYALA, Lourdes Verònica.** Caracterizaciòn de cepas bacterianas de la laguna amarillas perteneciente al nevado el Altar en la provincia de Chimborazo. [En línea] (Trabajo de titulaciòn). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de

Ciencias Químicas, Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 14-58. [Citado el: 31 Octubre 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7877/1/236T0302.pdf>.

**MONTES LÒPEZ, María Jesús.** Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antártidos: descripción de cuatro nuevas especies. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, Departamento de microbiología, Barcelona, España. 2005. pp. 185-198. [Citado el: 31 Octubre 2019]. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42390>

**MONTESINOS , José L.** Definición de estrategias de operación en procesos biotecnológicos mediante el uso de técnicas de monitorización y modelización. Aplicación a la producción de lipasas por *Candida rugosa*. [En línea] (Trabajo de Titulación). (Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Ciencias, Barcelona. 1993. p. 19. [Citado el: 27 Octubre 2020]. Disponible en: [www.tdx.cat/](http://www.tdx.cat/): <https://www.tdx.cat/handle/10803/3287#page=1>

**NOTIAMAZONIA.** Turismo. *Misahuallí, mas que en un puerto* [En línea]. Ecuador, 2019. [Citado el: 19 Agosto 2019]. Disponible en: <http://www.notiamazonia.com/regional/misahuallimas-que-un-puerto-un-destino-de-multiples-opciones-en-la-amazonia/>

**OLIART Rosa, et al.** "Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development". *CienciaUAT*, [En línea], 2016, (México) vol 11, nº1, pp. 79-90. [Citado el: 31 Octubre 2019]. ISSN 2007-7858. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S200778582016000200079&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S200778582016000200079&lng=es&nrm=iso&tlng=en)

**OSPINA, H.F.** *Enfermedades bacterianas del Frijol: Identificación y control*. Cali- Colombia: CIAT, 1981, p. 42.

**PÍREZ, María C.** "Morfología y estructura bacteriana". *Instituto de higiene*, vol. 2, nº 1 (2006) (España) pp. 23-42.

**PORRES, N. & RUIZ, E.** *Tinción diferencial Gram*. 1ª ed. Madrid- Espana: Piraninfo, 2018, pp. 35

**PUGUIN Benoit; et al.** "Glutathione reductase-mediated synthesis of tellurium-containing nanostructures exhibiting antibacterial properties". *Appl Environ Microbiol*, vol. 80, nº22 (2014), (United State) p. 7061.

**QUEZADA, F.** *Status and potential of commercial bioprospecting activities in Latin America and the Caribbean*. Santiago de Chile: Cepal, 2007, pp.58

**RAO, M; et al.** "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases". *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 62, nº3 (1998), (India) pp. 597-635.

**RAZIN, Shmuel; & ROTTEM, Shlomo.** "Identification of Mycoplasma and Other Microorganisms by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis of Cell Proteins". *Journal of Bacteriology*. vol. 94, nº 6 (1967), (United State) pp. 1807-1810.

**RODAS M, Elkin & BOTELLO S, Wilmar.** Actividad Hidrolítica de Aislados Bacterianos con Potencial Aplicación en el Tratamiento de Efluentes. [En línea] (Maestría) Universidad Estatal Paulista, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Colombia. 2016, p.38. [Citado el: 13 de Octubre de 2020.] Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/325496970\\_Actividad\\_hidrolítica\\_de\\_aislados\\_bacterianos\\_con\\_potencial\\_aplicacion\\_en\\_el\\_tratamiento\\_de\\_efluentes\\_de\\_frigorifico/link/5b1155420f7e9b498101781d/download](https://www.researchgate.net/publication/325496970_Actividad_hidrolítica_de_aislados_bacterianos_con_potencial_aplicacion_en_el_tratamiento_de_efluentes_de_frigorifico/link/5b1155420f7e9b498101781d/download).

**RUSSELL, Nicholas.** "Antarctic micro-organisms: coming in from the cold". *Oxoid*, vol 27, nº2 (2006), pp. 1-7.

**SÀNCHEZ FERRER, Antonio.** Recuperación, purificación y caracterización de las lipasas producidas por *Cándida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Autònoma de Barcelona, Escuela tècnica superior de ingenieria. Barcelona, España. 1998. pp. 76. [Citado el: 31 Octubre 2019]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5317/asf1de2.pdf>.

**SÀNCHEZ, Tito; et al.** "Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros". *Revista Peruana de Biología*, vol. 11, nº2 (2004), (Perú) pp. 179-186

**SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** Norma técnica ecuatoriana. [En línea]. Quito, Ecuador. 2013. [Citado el: 31 Octubre 2019]. Disponible en: <http://www.trabajo.gob.ec/wp-content/uploads/2012/10/NTE-INEN-2176-AGUA.-CALIDAD-DEL-AGUA.-MUESTREO.-T%C3%89CNICAS-DE-MUESTREO.pdf>

**TAKADA, Yasuhiro; et al.** "Temperature-dependence and distribution of nadh dehydrogenase in a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain abe-1". *J. Gen. App! Microbiol*, vol 27, nº1 (1981), (Japón) pp. 327-337

**TORTORA, Gerald; et al.** *Introduccion a la microbiologia*. 9º ed. Buenos aires-Argentina: Mèdica panamericana, 2007, pp. 87-88.

**VEGA, Alba; et al.** *Guia de trabajos Practicos: Microbiologia*. San Luis-Argentina: MDE, p. 82.

**VELÀSQUEZ, Anyela. et al.** "Microorganismos marinos extremòfilos con potencial interes en estudios de bioprospeccion". *Unal*, vol 7, nº2 (2018), (Colombia) pp. 10.

**VILLALTA PASTUZO, José David.** Estudio polifásico de bacterias psicrófilos colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile (Continente Antártico). [En línea] (Trabajo de titulacion). Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, Escuela de Biología, Guayaquil, Ecuador. 2013. pp. 33. [Citado el: 31 Octubre 2019]. Disponible en: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3917/1/Estudio%20polif%20C3%A1sico%20de%20bacterias%20psicr%20C3%B3filas%20colectadas%20en%20la%20isla%20Greenwich%20C2%20Bah%20C3%ADa%20Chile%20\\_Villalta%20Jose.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3917/1/Estudio%20polif%20C3%A1sico%20de%20bacterias%20psicr%20C3%B3filas%20colectadas%20en%20la%20isla%20Greenwich%20C2%20Bah%20C3%ADa%20Chile%20_Villalta%20Jose.pdf).

**WASHINGTON, Winn; et al.** *Koneman Diagnostico microbiologico*. 6ª ed. Madrid-España: Medica panamericana, 2006, pp. 354-1495.

**WILKLUND, Jari; & MADETOJA, Tom.** "Detection of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in Water from Fish Farms". *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 25, nº2 (2002), (Dinamarca) pp. 259-266.

**YUMOTO , I. & YAMAZAKI, K.** *Ecología y taxonomía de bacterias psicrotolerantes en ambientes fríos artificiales*. 1ª ed. Irlanda: Caister Academic Press, Norfolk. 2013, pp. 1-226.

## ANEXOS

### ANEXO A: LAGUNA NEGRA



**Fotografía 1:** Visita y Observación de la Laguna Negra

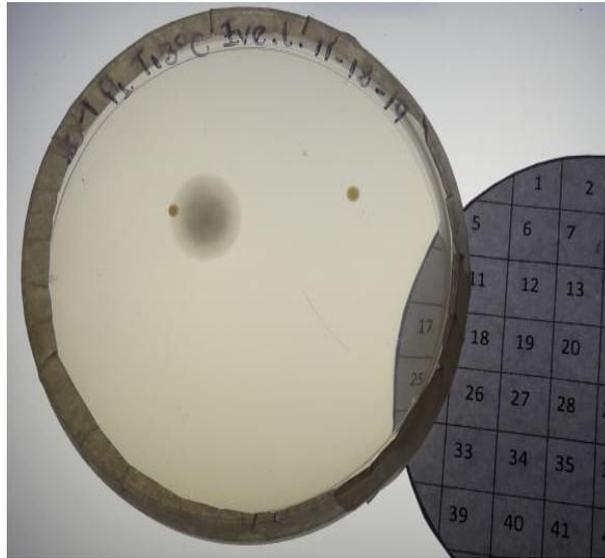
### ANEXO B: RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS



**Fotografía 2:** Identificación de los puntos

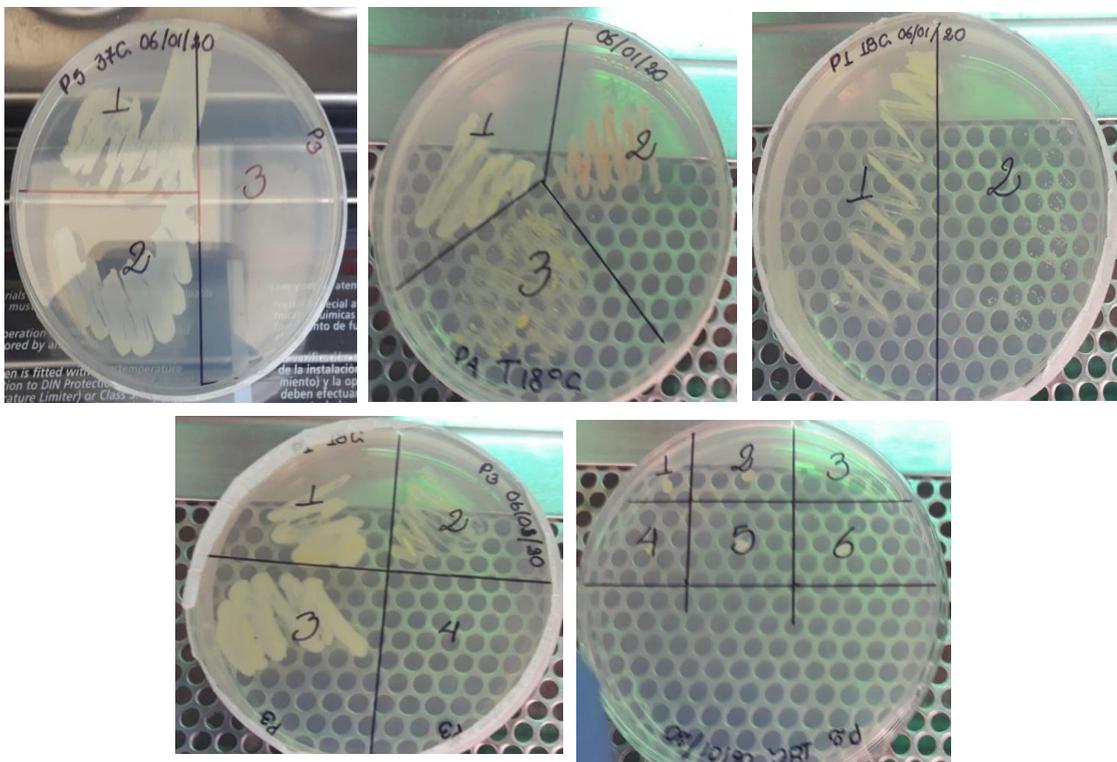


## ANEXO C: SIEMBRA DE LAS MUESTRAS



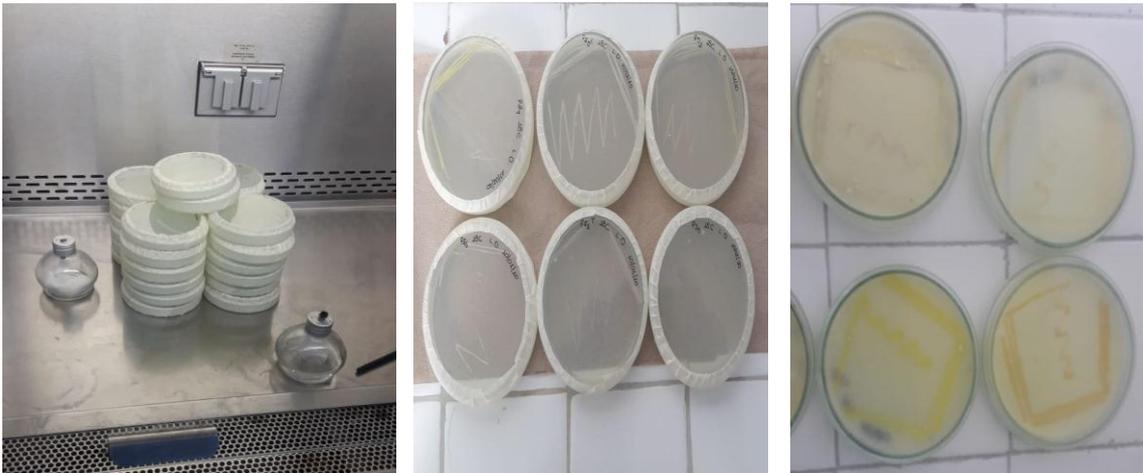
**Fotografía 3:** Conteo microbiológico de la siembra de las muestras tomadas

## ANEXO D: SELECCIÓN DE COLONIAS



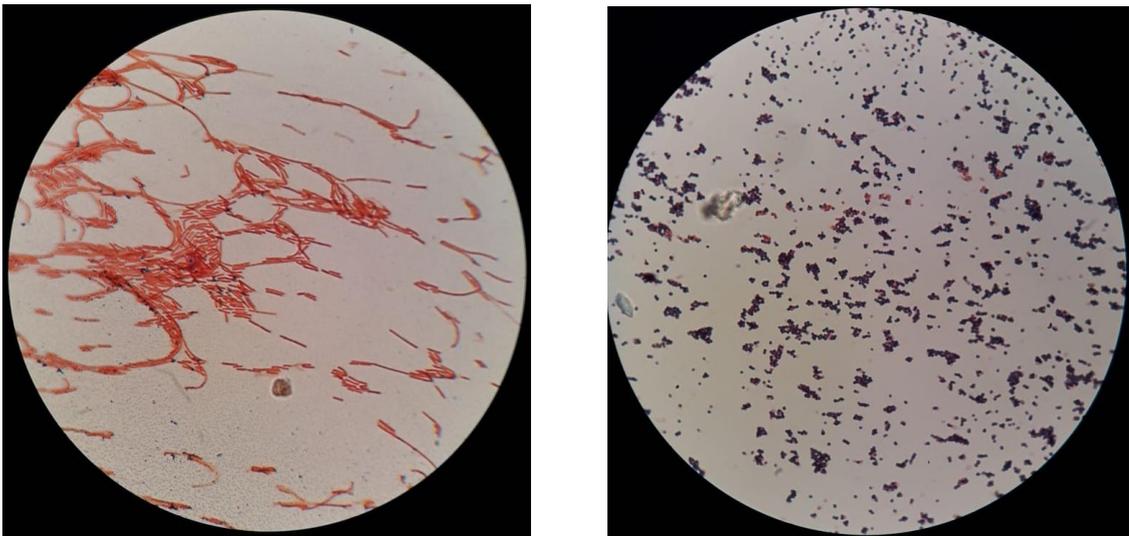
**Fotografía 4:** Siembra por agotamiento

## ANEXO E: SIEMBRA DE LAS COLONIAS AISLADAS



**Fotografía 5:** Aislamiento de las colonias en medio PCA+Mantequilla y Leche D.

## ANEXO F: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA



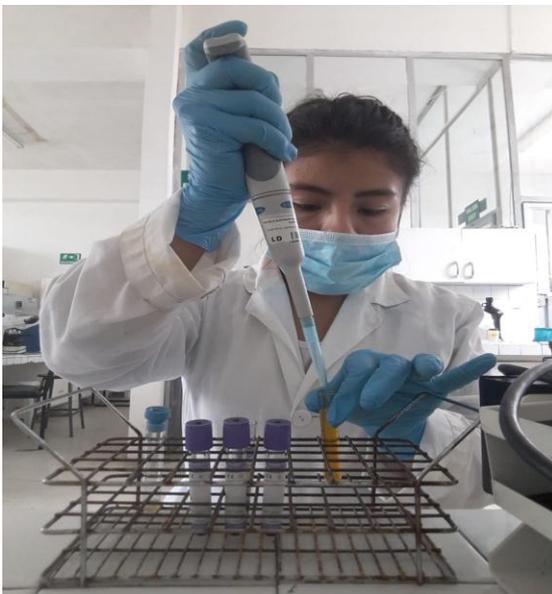
**Fotografía 6:** Tinción Gram Bacilos Negativos y Cocos Gram Positivos

## ANEXO G: PRUEBAS CON LECTURA INMEDIATA



**Fotografía 7:** Prueba Catalasa (+)

## ANEXO H: PRUEBAS LENTAS



**Fotografía 8:** Prueba Coagulasa

## ANEXO I: PRUEBAS BIOQUÍMICAS



**Fotografía 9: SIM**



**Fotografía 9: Urea negativa (-)**



**Fotografía 10:** Citrato positivo (-)



**Fotografía 11:** Kligler