



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
TERMÓFILAS DE LA FUENTE GEOTERMAL ALUCHÁN
UBICADA EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: OSCAR LIVARDO UMAJINGA GUANOTUÑA

DIRECTORA: Ing. CRISTINA GABRIELA CALDERÓN TAPIA MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Oscar Livardo Umajinga Guanotuña

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

Yo, OSCAR LIVARDO UMAJINGA GUANOTUÑA, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 10 de marzo de 2022



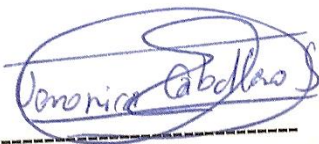
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Oscar Livardo Umajinga Guanotuña', written in a cursive style.

Oscar Livardo Umajinga Guanotuña

0504011503

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; tipo: Proyecto de Investigación, **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TERMÓFILAS DE LA FUENTE GEOTERMAL ALUCHÁN UBICADA EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI**, realizado por el señor: **OSCAR LIVARDO UMAJINGA GUANOTUÑA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Juan Carlos Gonzáles García PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 -----	2022-03-10
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MSc. DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	 -----	2022-03-10
Dra. Verónica Lucía Caballero Serrano PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 -----	2022-03-10

DEDICATORIA

Principalmente a Dios por darme la fortaleza y valor, permitiendo llegar hasta este momento tan importante en mi vida.

A mis padres José y María Victoria por su apoyo incondicional en situaciones buenas y malas, permitiendo que logre terminar mi carrera profesional.

A mis hermanos, familiares y amigos por depositar la confianza en mí para seguir adelante cada día.

Oscar

AGRADECIMIENTO

Sobre todo, a Dios por darme la vida y salud, a mis padres por todo el apoyo moral y económico para alcanzar mis sueños y metas.

A mi tutora, Ing. Cristina Calderón por su colaboración, paciencia, por su valioso tiempo y por ser guía durante mi trabajo de titulación, también un sincero agradecimiento a la Dra. Verónica Caballero por su ayuda y sugerencias durante la revisión para mejorar mi trabajo de investigación.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), a la Facultad de Ciencias, especialmente a la Escuela de Ciencias Químicas y a mis maestros por las enseñanzas recibidas durante mi formación profesional.

Al Grupo de Investigación-Desarrollo para el Ambiente y Cambio Climático GIDAC – ESPOCH, con el proyecto "Opportunities and challenges of renewable energies as a territorial development in zones of the province of Chimborazo" por el financiamiento para los análisis moleculares de trabajo de titulación.

Oscar

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Marco conceptual	4
1.2.1. <i>Ambientes extremos</i>	4
1.2.2. <i>Microorganismos extremófilos</i>	5
1.2.3. <i>Clasificación de microorganismos extremófilos</i>	5
1.2.3.1. <i>Según el pH</i>	6
1.2.3.2. <i>Según la salinidad</i>	6
1.2.3.3. <i>Según la presión</i>	6
1.2.3.4. <i>Según la radioactividad</i>	7
1.2.3.5. <i>Según la temperatura</i>	7
1.2.4. <i>Hábitats de los microorganismos termófilos</i>	8
1.2.5. <i>Taxonomía de los microorganismos termófilos</i>	8
1.2.6. <i>Metabolismo de microorganismos termófilos</i>	9
1.2.7. <i>Adaptaciones moleculares de los microorganismos termófilos</i>	10
1.2.8. <i>Aplicaciones de microorganismos extremófilos</i>	11
1.2.9. <i>Caracterización morfológica bacteriana</i>	13
1.2.9.1. <i>Características macroscópicas</i>	13
1.2.9.2. <i>Características microscópicas</i>	14
1.2.10. <i>Caracterización bioquímica</i>	15
1.2.10.1. <i>Prueba de la catalasa</i>	15
1.2.10.2. <i>Prueba de la ureasa</i>	15
1.2.10.3. <i>Prueba del citrato</i>	15
1.2.11. <i>Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo</i>	16
1.2.11.1. <i>Extracción de ADN</i>	16

1.2.11.2. <i>PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)</i>	17
1.2.11.3. <i>Secuenciación del ADN</i>	17
1.2.11.4. <i>Secuenciación Sanger</i>	18
1.2.12. <i>Fuentes geotermales</i>	18
1.2.13. <i>Fuentes geotermales del Ecuador</i>	19
1.2.14. <i>Fuentes geotermales Aluchán</i>	19

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	20
2.1. Tipo de investigación	20
2.2. Diseño de la investigación	20
2.3. Localización del estudio	20
2.4. Población de estudio	21
2.5. Tamaño de la muestra	21
2.6. Fases de la investigación	21
2.6.1. <i>Fase de campo</i>	21
2.6.2. <i>Caracterización del sitio</i>	21
2.6.3. <i>Toma de muestras</i>	22
2.6.3.1. <i>Muestras para aislamiento de bacterias</i>	23
2.7. Fase de laboratorio	23
2.7.1. <i>Preparación de medio de cultivo</i>	23
2.7.2. <i>Procesamiento y siembra de las muestras</i>	23
2.7.3. <i>Obtención de cultivos puros</i>	24
2.7.4. <i>Caracterización macroscópica del cultivo</i>	24
2.7.5. <i>Caracterización microscópica del cultivo</i>	24
2.7.5.1. <i>Procedimiento de tinción Gram</i>	24
2.7.6. <i>Caracterización bioquímica</i>	25
2.7.6.1. <i>Catalasa</i>	25
2.7.6.2. <i>Ureasa</i>	25
2.7.6.3. <i>Citrato</i>	26
2.7.7. Caracterización molecular	26
2.7.7.1. <i>Extracción de ADN</i>	26
2.7.7.2. <i>Amplificación del gen rpoB y 16S rRNA</i>	27
2.7.7.3. <i>Secuenciación</i>	28
2.7.7.4. <i>Limpieza y ensamblaje</i>	28

2.7.7.5.	<i>Análisis de similitud y homología</i>	28
----------	--	----

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1.	Caracterización del sitio del muestreo	29
3.2.	Análisis fisicoquímico	29
3.2.1.	<i>Temperatura</i>	30
3.2.2.	<i>pH</i>	31
3.2.3.	<i>Conductividad</i>	31
3.2.4.	<i>Dureza total</i>	32
3.2.5.	<i>Sodio</i>	32
3.2.6.	<i>Calcio</i>	32
3.2.7.	<i>Potasio</i>	33
3.2.8.	<i>Fosfatos</i>	33
3.2.9.	<i>Nitritos</i>	33
3.2.10.	<i>Sulfatos</i>	33
3.2.11.	<i>Hierro total</i>	34
3.2.12.	<i>Magnesio</i>	34
3.2.13.	<i>Manganeso</i>	34
3.2.14.	<i>Cloruros</i>	34
3.2.15.	<i>Arsénico</i>	35
3.2.16.	<i>Cobre</i>	35
3.3.	Obtención de cultivos puros	35
3.4.	Caracterización macroscópica	36
3.5.	Caracterización microscópica	37
3.6.	Caracterización bioquímica	38
3.7.	Caracterización molecular	39
3.7.1.	<i>Extracción de ADN</i>	39
3.7.2.	<i>Amplificación del gen rpoB y 16S rRNA</i>	40
3.7.3.	<i>Análisis de similitud</i>	40
3.7.3.1.	<i>Bacillus subtilis</i>	41
3.7.3.2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	41
3.7.3.3.	<i>Vogesella sp</i>	42

CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
BIBLIOGRAFÍAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de los microorganismos según su temperatura de desarrollo	6
Tabla 2-1: Aplicaciones industriales de los microorganismos extremófilos	13
Tabla 3-1: Datos hidrogeoquímicos de la fuente geotermal Aluchán	19
Tabla 1-2: Composición del medio de cultivo Agar LB	23
Tabla 2-2: Composición del medio de cultivo Agar Urea Base (Christensen).....	25
Tabla 3-2: Composición del medio cultivo Agar Citrato de Simmons	26
Tabla 4-2: Primers universales para el gen rpoB y 16S	27
Tabla 5-2: Condiciones de la PCR	27
Tabla 1-3: Análisis fisicoquímico de muestra de agua de la fuente geotermal Aluchán	30
Tabla 2-3: Resultados de la caracterización macroscópica de las cepas aisladas.....	36
Tabla 3-3: Resultados de la Tinción diferencial de Gram.....	38
Tabla 4-3: Resultados de la caracterización bioquímica.....	39
Tabla 5-3: Microorganismos identificados en la fuente geotermal Aluchán.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Comparación de fosfolípidos de membrana entre arqueas (arriba) y bacterias (abajo).....	11
Figura 2-1.	Morfología.....	14
Figura 1-2.	Ubicación fuente geotermal Aluchán.....	20
Figura 2-2.	Puntos de muestreo	21
Figura 3-2.	Medición de temperatura y pH	22
Figura 4-2.	Recolección de muestras de la fuente geotermal Aluchán	22
Figura 1-3.	Cultivos puros aislados de la fuente geotermal Aluchán A: cepa bacteriana R1_M1.3; B: cepa bacteriana R1_2M2.1	36
Figura 2-3.	Tinción Gram de las cepas R1_2M2.1 y R1_2M3.1, 100X.	37
Figura 3-3.	Gen rpoB de cepas (R1_M1.3, R1_2M1.3, R1_2M3.1) y gen 16S de cepa (R1_2M2.1)	40

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO
- ANEXO B:** SITIOS DE MUESTREO
- ANEXO C:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y MEDICIÓN DE TEMPERATURA Y PH
- ANEXO D:** SIEMBRA DE LAS MUESTRAS
- ANEXO E:** CRECIMIENTO BACTERIANO
- ANEXO F:** COLONIAS AISLADAS
- ANEXO G:** CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA
- ANEXO H:** CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA
- ANEXO I:** CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

msnm:	metros sobre el nivel del mar
mL:	mililitro
pH:	potencial de hidrogeno
LB:	Luria Bertani
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido Ribonucleico
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
°C:	Grados centígrados
μL:	microlitro
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
INAMHI:	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
mg:	miligramo
μS:	microsiemens
g:	gramos
h:	hora
GIDAC:	Grupo de Investigación – Desarrollo para el Ambiente y Cambio Climático
L:	Litro
%:	Porcentaje
μM:	micromolar
ng:	nanogramo
pb:	pares de bases
V:	Voltio
mA:	miliamperio

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo aislar e identificar las bacterias termófilas de la fuente geotermal Aluchán, ubicada a 3531 msnm, provincia de Cotopaxi, Ecuador. Se tomó un volumen total de 2050 mL de muestra de agua tanto para el análisis fisicoquímico y para el aislamiento de bacterias. Se realizaron dos muestreos en diferentes períodos del año, el primero se realizó el 12 de octubre del 2021 y el segundo el 21 de enero del 2022. Se tomaron muestras in-situ para los parámetros de temperatura y pH, mientras que de forma ex-situ se analizó conductividad, pH, calcio, magnesio, fosfatos, nitratos, hierro, arsénico, cobre. En el laboratorio, las muestras fueron inoculadas en medio de cultivo agar LB (Luria Bertani) por técnica de siembra en superficie e incubadas a 37 grados Celsius durante 24 a 48h, donde se aislaron un total de quince cepas bacterianas. Las cepas aisladas fueron caracterizadas de acuerdo con su morfología macroscópica y microscópica, además se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa, ureasa y citrato. Para la identificación molecular se utilizaron cuatro cepas que mostraron diferencias en las características antes descritas. Para el análisis molecular se utilizó la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los resultados de análisis fisicoquímico muestran que el agua se clasifica como agua dura, pH neutro o ligeramente ácido, conductividad alta y se clasifica como hipertermal. Del total de bacterias aisladas, el 100% fueron Gram positivas. Por técnicas moleculares se identificaron las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis*, *Vogesella sp.*, *Staphylococcus epidermidis*. Los microorganismos identificados se encuentran relacionadas con la biodiversidad microbiana de otras fuentes geotermales del Ecuador y del mundo a excepción de *Vogesella sp.*, no existe documentación de este género en nuestro país. Se recomienda continuar con la investigación sobre el microbiota bacteriano presente en la fuente geotermal Aluchán.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <ALUCHÁN (FUENTE GEOTERMAL)>, <MICROORGANISMO TERMÓFILOS>, <FUENTE GEOTERMAL>, <SECUENCIACIÓN DE ADN>, <PUJILÍ (CANTÓN)>, <COTOPAXI (PROVINCIA)>.

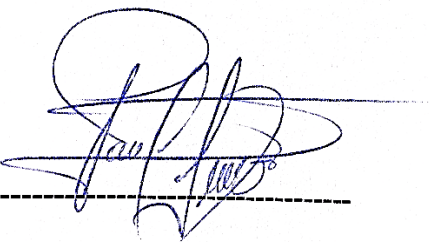


0913-DBRA-UTP-2022

SUMMARY

The aim of the current research was to isolate and identify the thermophilic bacteria found in Aluchán hot spring, located 3531 meters above the sea level in Cotopaxi province, Ecuador. A total volume of 2050 mL from the water sample was reserved, both for the physical-chemical analysis and for the bacterial isolation. Two samplings were carried out at different times of the year, the first sampling was carried out on October 12, 2021 and the second one on January 21, 2022. Some in-situ samples were taken for the temperature and pH parameters, while for conductivity, pH, calcium, magnesium, phosphates, nitrates, iron, arsenic and copper, ex-situ analysis was carried out. Once in the laboratory, the samples were inoculated into an agar LB (Luria Bertani) culture medium through a surface seeding technique and incubated at 37 degrees Celsius during 24 to 48h, where a total of fifteen bacterial strains were isolated. The isolated strains were characterized according to their macro and microscopic morphology; in addition, catalase, urease and citrate biochemical tests were also carried out. Four strains were used for the molecular identification reflecting differences on the characteristics mentioned before. For the molecular analysis, NCBI (National Center for Biotechnology Information) data base was used. The physical-chemical analysis results revealed that water is classified as hard water, neutral pH or slightly acidic and high conductivity; thus, it is classified as hyperthermal. Of the total number of bacteria isolated, 100% were Gram-positive. With the use of molecular techniques, it was possible to identify the following bacteria: *Bacillus Subtilis*, *Vogesella sp.*, *Staphylococcus epidermidis*. The microorganisms identified are connected with microbial biodiversity from other hot springs in Ecuador and the world, excluding *Vogesella sp.*, since there is no documentation related in our country. Further research on bacterial microbiota present in Aluchán hot spring is recommended.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <ALUCHÁN (HOT SPRING)>, <THERMOPHILIC MICROORGANISM>, <HOT SPRING>, <DNA SEQUENCING>, <PUJILÍ (COUNTY)>, <COTOPAXI (PROVINCE)>.



Paul Rolando Armas Pesantez

0603289877

INTRODUCCIÓN

Ecuador está ubicado en el anillo de fuego del Pacífico y su relación con el proceso de subducción, donde la placa de Nazca desciende por debajo de la placa de Sudamericana, la cual incide que las fuertes actividades magmáticas permitan que las aguas subterráneas que circulan a grandes profundidades adquieran un grado geotérmico alto, que en superficie se manifiestan como aguas calientes. Las aguas termales del país están relacionadas con las características de los volcanes jóvenes y los sistemas de fallas y fisuras (Burbano et al., 2015, p. 21).

A causa de estos fenómenos naturales, existen múltiples sistemas geotérmicos en todo el país, principalmente en la sierra y en la región oriental. Las aguas termales se han utilizado con fines terapéuticos y recreativos en balnearios, hospitales y hoteles de lujo en general durante décadas (Miranda y Jutglar, 2010, p. 13).

Las aguas termales, generalmente contienen una gran cantidad de minerales disueltos. Esto se debe a que la mayoría de los minerales se disuelven más rápido en agua caliente que en agua fría. Algunas personas creen que las aguas de muchas fuentes termales tienen efectos curativos debido a su alto contenido de minerales. Para aprovechar este poder curativo, se han construido muchos balnearios en todo el mundo alrededor de las fuentes termales (Monroe et al., 2008, p. 34).

Se ha descubierto que existen microorganismos del género *Thermus* a altas temperaturas. La primera bacteria aislada en 1969 fue *Thermus aquaticus*, que se obtuvo de una fuente termal en el Parque Nacional Yellowstone, EE. UU. Una enzima (Taq polimerasa) aislada de *Thermus* ha revolucionado la biología molecular al poder amplificar pequeñas cantidades de ADN en grandes cantidades utilizando la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Alonso, 2011; Reed et al. 2013, p. 15).

Si bien se ha demostrado la importancia industrial de los microorganismos termófilos, se puede evidenciar claramente que en el Ecuador no existen estudios de carácter científico que identifiquen los microorganismos de las fuentes geotermales mediante técnicas moleculares, donde se pueda demostrar el origen y tipo de especies bacterianas que habitan en las fuentes geotermales del país (Faz, 2018, p. 27).

Se han realizado estudios fisicoquímicos en la fuente geotermal Aluchán, sin embargo, no se han realizado un análisis microbiológico, por lo que esta es la primera investigación que presenta dicho análisis.

La fuente geotermal Aluchán posee condiciones adecuadas de temperatura y pH para el desarrollo de bacterias termófilas, por lo citado anteriormente para el presente trabajo de Integración Curricular de tipo investigación tiene como objetivo aislar e identificar bacterias termófilas presentes en el mencionado cuerpo acuífero.

JUSTIFICACIÓN

Se han realizado varios estudios sobre fuentes geotermales en el mundo, pero en nuestro país hay muy poca información (Burbano et al., 2015, p. 23). Debido a la falta de información suficiente y actualizada, en 2012 el INAMHI, a través del Grupo de Investigación Hidrogeológica, considera de fundamental importancia de realizar un inventario y monitoreo de los recursos minerales térmicos en el Ecuador, lo que constituye un aporte al conocimiento de los recursos hídricos, especialmente en este campo. Existe un estudio sobre aguas subterráneas realizado por el INAMHI donde se inventarió y georreferenció aproximadamente 120 fuentes termales y se determinó la temperatura, pH y conductividad en cada una de las fuentes (Burbano et al., 2015, p. 2). El descubrimiento de formas de vida en ambientes extremos ha despertado un gran interés por parte de microbiólogos y bioquímicos, quienes han comenzado a descifrar el metabolismo de organismos extremófilos que ocurren en condiciones de temperaturas extremas, salinidad, la acidez o la presión. El interés de los organismos extremófilos radica en las posibles aplicaciones técnicas de las enzimas (termoenzimas) que pueden funcionar en condiciones donde otras proteínas están desnaturalizadas (Curtis y Schnek, 2008, p. 49).

En los últimos años se ha potenciado la investigación sobre microorganismos extremófilos por la posibilidad de que estos organismos, o sus productos, puedan ser utilizados en procesos industriales en estas condiciones, con el interés de descifrar los mecanismos asociados al desarrollo de la vida (Navas et al., 2014, p. 63).

El presente trabajo de investigación tiene como propósito aislar e identificar las bacterias termófilas presentes en la fuente geotermal Aluchán, siendo un indicio para trabajos futuros donde se podrá buscar potenciales aplicaciones biotecnológicas e industriales.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Aislar e identificar las bacterias termófilas de la fuente geotermal Aluchán ubicada en la provincia de Cotopaxi.

Objetivos específicos

- Realizar el análisis fisicoquímico y microbiológico del agua de la fuente geotermal Aluchán.
- Identificar las bacterias termófilas mediante identificación molecular.
- Analizar de manera descriptiva sobre los resultados de la identificación molecular de bacterias termófilas encontradas en la fuente geotermal Aluchán.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.2. Antecedentes

El término extremófilo fue utilizado por primera vez por Macelroy en 1974 (Ramírez et al., 2006, p. 16). El descubrimiento de microorganismos extremófilos a mediados de la década de los setenta facilitó el refuerzo de proyectos destinados a encontrar vida más allá de la Tierra. Ha contribuido a la teoría de la panspermia, que puede ser una posible explicación del origen de la vida en la tierra; promovió el desarrollo de la industria biotecnológica y como la conocemos, ha llevado a una mejor comprensión de lo que es esencial para la vida (Ramírez, 2010, p. 26).

La aplicación de estos microorganismos a nuevos procesos biotecnológicos ha despertado interés en sus investigaciones. Las enzimas termoestables son cada vez más importantes como catalizadores biológicos porque muchos procesos industriales tienen lugar a altas temperaturas. La mayoría de las enzimas hipertermófilas funcionan a altas temperaturas incluso a 110°C. Las enzimas termófilas generalmente están activas a 60-80°C. Las enzimas termófilas e hipertermófilas que operan a altas temperaturas están inactivadas a temperaturas por debajo de los 40°C (Suárez et al., 2004, p. 31).

Gracias a la colaboración universitaria entre el grupo de investigación en microbiología del agua de la Universidad de los Andes en Venezuela y los grupos de investigación en microbiología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - ESPOCH y el grupo de investigación en microbiología y biotecnología ambiental de la Universidad Central del Ecuador-UCE, se realizó la primera investigación sobre microbiología de las aguas mineromedicinales en Ecuador, esto se debe gracias al apoyo económico tanto del Instituto de Investigación de la ESPOCH como de la Dirección de Investigación y Postgrado de la UCE (Andueza et al., 2020, p. 23).

Los microorganismos termofílicos son de gran importancia mundial en la ingeniería genética, ya que pueden producir enzimas termoestables, que son compuestos capaces de resistir efectos orgánicos, tensioactivos y agentes caotrópicos. Entre estas enzimas, se encuentra el ADN polimerasa (Rodríguez et al., 2013, p. 36).

1.2. Marco conceptual

1.2.1. *Ambientes extremos*

En los ambientes que se consideran extremos se encuentran los microorganismos denominados “extremos”, caracterizados por su capacidad de resistir a altas temperaturas (bacterias termófilos

e hipertermófilos), bajas temperaturas (bacterias psicrófilas), alto contenido de sal (halófilas) o de alta presión (barófilos), y medio ácido o alcalino (acidófilo y alcalófilo). Los organismos con una temperatura de crecimiento óptima superior a 45 grados centígrados se denominan bacterias termófilas, y si está por encima de 80 grados centígrados, se clasifican como bacterias hipertermófilas (Suárez et al., 2004, p. 41).

Estos ambientes se extienden por todo el mundo y se conforman de manantiales termales, lagunas ácidas, desiertos, salinas, ríos de negras, alta montaña, entre otros. El mejor conocido y estudiado incluye entornos Antárticos de baja temperatura, altas temperaturas que rodean las aguas termales en el parque nacional de Yellowstone, la sequedad y el nivel UV en el desierto de Atacama y las grandes profundidades de la Fosa de las Marianas (Velásquez et al., 2018, p.17).

En condiciones extremas, ciertos organismos, especialmente los procariontes, se desarrollan y tienen adaptaciones biológicas especiales (Rinardo, 2018, p. 64).

Las propiedades químicas y la composición elemental de ambientes termales son diferentes. Algunas aguas termales contienen cloro, algunas son sulfuradas y sulfurosas que contienen azufre, es decir, el azufre se combina con sulfato de calcio, sodio, o magnesio entre otros. Esta diversidad de composición permite el crecimiento de un número muy diverso de bacterias, algunas de las cuales no se pueden cultivar, pero la resistencia de estos microorganismos a crecer en condiciones extremas hace que sus metabolitos tengan un enorme potencial biotecnológico (Belkova et al., 2007, p. 72).

1.2.2. Microorganismos extremófilos

Los extremófilos son la fuente de una amplia gama de extremoenzimas. Estos microorganismos son capaces de vivir en ambientes extremos a niveles de pH (alcalófilos o acidófilos), temperaturas extremadamente altos o bajos (termófilos y psicrófilos), baja humedad (xerófilos) o alta presión (piezófilos) y concentración de sal (halófilos) o pueden vivir bajo radiación ionizante (radiófilos) (Farías y Contreras, 2018, p. 81).

La ventaja de ser extremófilos es que casi no hay competencia, porque muchos aspectos de la vida que conocemos no la soportan en estas condiciones (Farías y Contreras, 2018, p. 17).

1.2.3. Clasificación de microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos se clasifican en termófilos, acidófilos, neutrófilos, alcalófilos, halófilos, psicrófilos y barófilos, cada uno con sus propias condiciones mínimas, óptimas y máximas para su crecimiento como se muestra en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Clasificación de los microorganismos según su temperatura de desarrollo

Extremófilos	Mínimo	Óptimo	Máximo
Termófilos facultativos	35°C	40-45°C	>50°C
Termófilos estrictos	45°C	50-75°C	>80°C
Extremos/hipertermófilos	65°C	80-105°C	>100°C
Acidófilos	pH>0	pH 2.5-3	
Neutrófilos		pH 4.2-8.5	
Alcalófilos		pH 8.5-10	
Halófilos discretos		2-5%NaCl	
Halófilos moderados		5-20%NaCl	
Halófilos extremos		20-30%NaCl	
Psicrófilos	=0°C	<25-30°C	
Barófilos	P>0.1 MPa	P=10-50 MPa	P≤100 MPa

Fuente: Ollivier et al., 2000.

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

1.2.1.1. Según el pH

La concentración de iones hidrógeno es el factor más importante en el crecimiento microbiano. Según el rango de pH en el que puedan desarrollarse, se dividen en tres categorías: acidófilos (crecen a un pH entre 1-5), neutrófilos (pH 5,5-8) y basófilos o alcalófilos (pH 8,5-11,5) (Apella y Araujo, 2005, p. 52).

1.2.1.2. Según la salinidad

Los halófilos son microorganismos que se encuentran en ambientes con altas concentraciones de sal. Los halófilos se pueden encontrar en lagos salados, estanques de evaporación de salinas y salmueras de aguas. Según su respuesta a la concentración de sal, se puede clasificar como halófilos discretos (requieren 1-6%NaCl), moderados (6-15%NaCl) y extremos (15-30%NaCl) (Castillo, 2005, p. 49).

1.2.1.3. Según la presión

Se conocen como barófilos a los microorganismos que viven a alta presión como en el fondo oceánico y subsuelo terrestre. Hay tres tipos de estos microorganismos, que son barotolerantes que pueden soportar una alta presión de hasta 400 atmósferas, barófilos sobreviven si hay una presión entre 500 a 600 atmósferas y por último, existen los barófilos extremos crecen a presiones superiores a 700 atmósfera (Gómez, 2016, p. 73).

1.2.1.4. Según la radioactividad

Los organismos llamados radiófilos, son organismos que pueden soportar altos niveles de radiación (Oliart et al., 2016, p. 89). Como representante de este grupo tenemos a *Deinococcus radiodurans* que se destaca por su alta concentración de RecA, una proteína que repara el daño del ADN y sobrevive (Castillo, 2005, p. 63).

1.2.1.5. Según la temperatura

Microorganismos psicrófilos

Los psicrófilos viven en ambientes fríos, y su temperatura óptima suele estar por debajo de los 15-20 °C. Estos microorganismos existen en hábitats marinos, como el hielo marino, ambientes subglaciales y el océano profundo, y su supervivencia se debe a que utilizan una serie de cambios estructurales para mantener la movilidad de los lípidos a bajas temperaturas, como la insaturación de ácidos grasos (Velásquez et al., 2018, p. 36).

Microorganismos mesófilos

La mayoría de los mesófilos son capaces de vivir en climas templados y tropicales. La temperatura óptima de crecimiento para los mesófilos es de 25 a 40°C y la temperatura máxima es de 35 a 47°C (Morejón y Pardo, 2008, p. 38).

Microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos crecen a temperaturas muy altas, sobreviven a una temperatura mínima de 25 °C, la óptima es de 40-60 °C y la temperatura más alta es de 80 °C (García y Silva, 2004, p. 63). Para algunos microorganismos (miembros del dominio Archaea), la temperatura de crecimiento óptima está por encima de 80 °C. La mayoría de estos microorganismos se denominan hipertermófilos que tienen proteínas y enzimas termoestables que pueden resistir a altas temperaturas, estos microorganismos se encuentran en fuentes termales relacionadas con la actividad volcánica. El azufre es generalmente importante en su actividad metabólica (Tortora et al., 2007, p. 86). Los microorganismos de ambientes de aguas profundas pueden representar una fuente potencial de moléculas originales para nuevas aplicaciones industriales (Querellou, 2004, p. 58).

En particular, los microorganismos termófilos han encontrado su lugar en la "biotecnología blanca", que se define como el uso de moléculas y enzimas para controlar la industria y producir materiales, productos químicos y energía (Ovando et al., 2020, p. 70).

En los últimos 20 años, los organismos termófilos se han convertido en modelos biológicos muy relevantes en diversos campos de las ciencias biológicas. Uno de los aspectos es utilizar la estabilidad intrínseca de sus componentes para desarrollar aplicaciones biotecnológicas de gran impacto, como el proceso de amplificación del ADN utilizando la enzima Taq polimerasa aislado de la bacteria *Thermus aquaticus*, lo que significa un salto enorme en la detección de información genética en pruebas diagnósticas, forense, así como en todos los campos de la biología (Berenguer, 2014, p. 10).

1.2.2. Hábitats de los microorganismos termófilos

Los termófilos son microorganismos amantes del calor que se han originado en grandes corrientes de aguas profundas, fuentes termales terrestres y otros sitios geográficos extremos, así como en sitios volcánicos y fallas tectónicas activas (Panda et al., 2019, p. 62).

También hay entornos artificiales donde se han encontrado los organismos hipertermófilos como en pilas de compost (aproximadamente de 65°C), actividades industriales, calentadores de agua, plantas de energía geotérmica y nuclear (Canganella y Wiegel, 2014, p. 52).

1.2.3. Taxonomía de los microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos pertenecen al dominio de las arqueas y las bacterias. Actualmente, el campo de las arqueas incluye los límites más extremos de resistencia fisiológica a factores fisicoquímicos (Garrity et al., 2004, p. 5). Hay algunas eucariotas termófilas como cianobacterias *Leptolyngbya boryana*, *Cyanobacterium aponinum* y *Lyngbya aestuarii*, pero la mayoría de los termófilos son procariotas (Anwar et al., 2020, p. 13).

Las arqueas prefieren la sal, son resistentes a altas temperaturas y ácidos, y estrictamente son anaeróbicas. Las arqueas como *Pyrolobus fumarii* también se denominan hipertermófilos porque pueden soportar temperaturas de hasta 121°C, mientras que las bacterias *Geothermobacterium ferrireducens* pueden soportar temperaturas de hasta 95°C (Salwan y Sharma, 2020, p. 49).

Algunas eucariotas crecen en el medio por encima de 50°C. En particular, el grupo de bacterias termófilas marinas incluye bacterias fototróficas (cianobacterias, bacterias verdes y púrpuras), archaeas (*Thermoplasma sp.*, *Sulfolobus sp.*, *Pyrococcus sp.*, *Thermococcus sp.*) y dominios bacterianos (*Clostridium sp.*, *Bacillus sp.*, *Thermus sp.*, *Desulfotomaculum sp.*, *Thiobacillus sp.*, bacterias fermentadoras, espiroquetas, etc.) (Velásquez et al., 2018, p. 87).

Estos microorganismos sólo están representados por bacterias y arqueas, y se han aislado de varios ambientes marinos naturales, terrestres y ambientes artificiales que contienen agua. Las comunidades terrestres de bacterias hipertermófilas se encuentran en fuentes termales y campos solfatáricos con un amplio rango de pH (0,5-9,0), bajo contenido de sal (0,1-0,5%) y estratificación petrolífera por calentamiento geotérmico profundo. La comunidad biológica marina natural es un sistema térmico de aguas poco profundas, respiraderos de abismo térmico (fumadores negros) y montes submarinos activos con alta salinidad (3%) y pH entre 5.0 y 8.5. Los entornos artificiales donde se han descubierto hipertermófilos incluyen pilas de desechos de carbón y lavados térmicos de plantas de energía geotérmica y nuclear (Bouzas et al., 2006, p. 85).

1.2.4. *Metabolismo de microorganismos termófilos*

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos en su mayoría son anaeróbicos y se caracterizan por dos clases de metabolismo. Quimiolitotrófico (organismos que obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos para fijar CO₂) o quimiorganotrofo (organismos que obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos). Por lo tanto, independientemente del tipo de metabolismo, estos microorganismos anaerobios termófilos pueden usar aceptores de electrones externos para oxidar de forma más eficaz los compuestos orgánicos e inorgánicos que utilizan como fuentes de carbono (Posada et al., 2004, p. 30).

Hay muchos microorganismos termófilos que son autótrofos, quimiolitotrofos o quimiorganotrofos. La mayoría de los microorganismos termófilos que se están estudiando actualmente utilizan carbohidratos poliméricos, como xilano, celulosa, ácido poligalacturónico, almidón y lignina, como fuentes de carbono (Labrador, 2006, p. 39).

Las reacciones productoras de energía en las hipertermófilas quimiolitotrofos es anaeróbica y aeróbica durante la respiración. La mayoría de estos microorganismos exhiben un sistema quimiolitotrofos de nutrición, las reacciones redox inorgánicas actúan como una fuente de energía (quimiolitotrofico) y el dióxido de carbono es la única fuente de carbono necesaria para almacenar el material celular orgánico (autótrofos). Estos organismos fijan dióxido de carbono a través de quimiosíntesis y se denominan quimiolitotrofos. Muchos hipertermófilos quimiolitotrofos son bacterias heterótrofas facultativas. Por lo tanto, estos microorganismos pueden utilizar materia orgánica como sustituto de los nutrientes inorgánicos siempre que el medio ambiente proporcione materia orgánica, por ejemplo, por células en descomposición (Stetter, 1999, p. 101).

Los hipertermófilos heterótrofos obtienen energía a través de la respiración aeróbica o por diferentes tipos de respiración anaeróbica, utilizando sustancias orgánicas como donantes de

electrones o a través de fermentación. Los tipos de respiración anaeróbica son la respiración de nitrato, sulfato, hierro férrico, dióxido de carbono y azufre (Stetter, 1999, p. 152).

La demanda de azufre es casi universal en los termófilos anaeróbicos se basa en la necesidad de aceptores de electrones para la respiración anaeróbica o donantes de electrones para el metabolismo quimiolitotrofos. Utilizando electrones derivados de compuestos orgánicos o de H₂, el azufre elemental S⁰ se reduce a H₂S. De manera similar, muchos organismos termófilos e hipertermófilos utilizan H₂ como fuente de energía para el crecimiento de forma quimiolitótrofa. Por ejemplo, los miembros del género *Pyrodictium* crecen estrictamente de forma anaeróbica a temperaturas de hasta 100 ° C en un medio de sal mineral suplementado con H₂ y S⁰ (Labrador, 2006, p. 141).

1.2.5. Adaptaciones moleculares de los microorganismos termófilos

Existen muchos mecanismos que permiten que los microorganismos sobrevivan a temperaturas que normalmente desnaturarían las proteínas, membranas celulares hasta e incluso material genético (Bouzas et al., 2006, p. 83).

Para el crecimiento, los microorganismos termófilos e hipertermófilos necesitan someterse a una adaptación molecular a altas temperaturas. Por tanto, la función de sus macromoléculas es óptima a altas temperaturas, y sus enzimas y proteínas son termoestables (Naquiche, 2014, p. 95).

Ya sea a bajas o altas temperaturas, la clave de la función enzimática es mantener un equilibrio adecuado entre la estabilidad molecular y la flexibilidad estructural. El mecanismo adaptativo que tienen los microorganismos termofílicos para resistir a elevadas temperaturas es la producción de chaperoninas (Maier y Neilson, 2015, p. 166). Las cuales son proteínas termoestables y resistentes a la desnaturación y proteólisis, las proteínas desnaturadas a altas temperaturas son replegadas gracias a las chaperoninas, ayudando así a restaurar a su forma natural (Sternier y Liebl, 2001, p. 76). Además, los microorganismos también tienen una adaptabilidad específica, lo que puede mejorar la estabilidad de las proteínas a altas temperaturas (Maier y Neilson, 2015, pp. 185-186), incluyendo:

- Un mayor número de puentes de disulfuro
- Aumento de las interacciones entre péptidos aromáticos
- Aumento de la unión de hidrógeno entre péptidos

Las proteínas y otras enzimas en las células son los principales mecanismos de síntesis de proteínas de los termófilos e hipertermófilos, y otras estructuras (como la membrana citoplasmática) son termoestables. Cuando se trata de membranas, los termófilos conservan su estabilidad y función a altas temperaturas porque tienen una membrana lipídica rica en ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos saturados forman un entorno hidrófobo muy fuerte, que promueve la estabilidad y rigidez de la membrana (Crespo 2009, p. 28). Las membranas de arqueas son más estables térmicamente que las membranas bacterianas por la presencia de lípidos de

membrana con enlaces éter, en lugar de enlaces éster. La membrana celular de las arqueas es estructuralmente diferente a la de las bacterias, como se muestra en la figura (Maier y Neilson, 2015, p. 56).

Finalmente, para el ácido nucleico, los hipertermófilos producen una enzima única denominada ADN girasa. El papel de esta enzima es inducir un superenrollamiento positivo en el ADN y, en teoría, puede proporcionar una estabilidad térmica considerable (Maier y Neilson, 2015, p. 82).

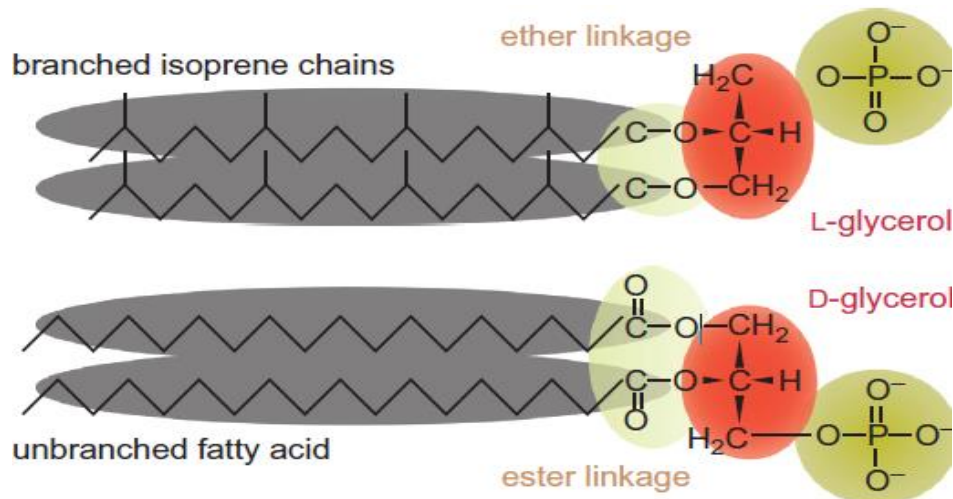


Figura 1-1. Comparación de fosfolípidos de membrana entre arqueas (arriba) y bacterias (abajo).

Fuente: (Maier y Neilson 2015).

En las arqueas, los lípidos se unen al glicerol a través de enlaces éter, mientras que en las bacterias se utilizan enlaces éster. Además, los lípidos de las arqueas se basan en unidades repetidas de isopreno de 5 carbonos y suelen tener una longitud de 20 átomos de carbono. Los lípidos bacterianos son ácidos grasos de cadena lineal de 16 – 18 átomos de carbono de longitud (Maier y Neilson, 2015, p. 73).

1.2.6. Aplicaciones de microorganismos extremófilos

Existe enorme biodiversidad en ambientes extremos y la capacidad de sintetizar proteínas y enzimas (extremoenzimas), por este sentido, los microorganismos extremófilos constituyen la opción más prometedora en procesos industriales, porque la mayoría de los procesos ocurren en condiciones de temperaturas extremas, pH, presión, disolventes orgánicos y fuerza iónica. Además, mediante la manipulación genética de microorganismos, se pueden utilizar enzimas extremas como modelos para diseñar y construir proteínas con nuevas características de interés para aplicaciones industriales específicas (Haki y Rakshit, 2003, p. 63).

El descubrimiento y estudio de bacterias termófilas y sus enzimas proporcionan datos valiosos y aplicaciones potenciales en biología molecular y evolutiva, y ocupan una posición importante en el entorno de la biotecnología ambiental. Las aplicaciones cubren los campos de la agricultura, la biomedicina y la industria, como la alimentación, la lavandería, los productos farmacéuticos, petróleo y la biorremediación (Pinzón et al., 2010, p. 184).

Las bacterias termófilas y las hipertermófilas son termófilos extremos más estudiadas porque las enzimas aisladas de ellos tienen una estabilidad térmica muy fuerte y generalmente son resistentes a los efectos de agentes caotrópicos, detergentes, desnaturalizantes, solventes orgánicos y pueden tolerar pH extremos, por lo que ha convertido en objeto de diversas investigaciones, aplicaciones industriales y biotecnológicas (Sarmiento et al., 2015, p. 113).

Las enzimas termófilas se han utilizado en procesos industriales donde se utilizan altas temperaturas para acelerar las reacciones, como en la obtención de ciclodextrinas a partir del maíz. La ciclodextrina es una estructura muy útil para la administración de ciertos medicamentos, estabilizar sabores de los alimentos y diversas aplicaciones industriales (Lozano, 1997, p. 25).

Enzimas como las lipasas, oxidasas, peroxidasas, pectinasas y catalasas de termófilos y psicrófilos en el campo ambiental, se han utilizado como alternativas a los métodos fisicoquímicos para la biorremediación de sólidos y aguas residuales contaminadas por hidrocarburos, aceites y lípidos (Oliart et al., 2016, p. 72).

La pectinasa es una de las enzimas empleadas en los procesos industriales, derivada de bacterias termófilas. Los microorganismos obtenidos a partir de termófilos pueden ayudar a reducir el tiempo y esfuerzo en los procesos industriales en los que se utilizan (Salazar et al., 2020, p. 33).

Una de las enzimas más importantes relacionadas con la biotecnología es la amilasa, que representa el 25-30% del mercado enzimático mundial, de particular interés en aplicaciones industriales como alimentos, detergentes, textiles, curtidos y productos farmacéuticos (Reyes et al., 2020, p. 85).

Además de la capacidad de los microorganismos termófilos para producir enzimas termoestables, se han sugerido a las bacterias anaerobios termófilos como alternativas para la producción de etanol, compuestos orgánicos como ácidos orgánicos (ácidos grasos volátiles) y otros alcoholes (isopropanol, butanol y propanodiol) (Crespo, 2009, p. 21).

Tabla 2-1: Aplicaciones industriales de los microorganismos extremófilos

Enzimas	Microorganismos	Aplicaciones	Industria
Proteasas	<i>Bacillus sp.</i>	Detergentes, hidrolisis de alimentos y bebidas, panificación	Lavandería, alimentaria, panadera
Glucosilhidrolasas (amilasas, glucoamilasas, celulasas)	<i>Streptomyces sp.</i>	Procesamiento de almidón, celulosas, pectinas y procesamiento de textiles	Papelera, textil
Quitinasas	<i>Trichoderma sp.</i>	Modificaciones de quitina para uso farmacéutico y alimenticio	Farmacéutica, alimentaria
Xilanasas	<i>Bacillus sp.</i>	Blanqueo de papel	Papelera
Lipasas, esterases	<i>Geobacillus sp.</i>	Detergentes, modificación de grasas y lácteos	Lavandería, lechera
ADN polimerasa Deshidrogenasa	<i>Thermus aquaticus</i>	Biología molecular (PCR) Reacciones de óxido-reducción	Investigación biológica, forense

Fuente: Oliart et al., 2016; Suárez et al., 2004.

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

En la tabla 2-1 se muestran las enzimas aisladas de microorganismos extremófilos que son utilizados en los procesos de diferentes industrias.

1.2.7. Caracterización morfológica bacteriana

Se pueden utilizar métodos fenotípicos (macroscópicas y microscópicas) para la identificación bacteriana, que se basan en la determinación de algunas propiedades observables de las bacterias. Sin embargo, los resultados de los métodos fenotípicos no brindan certeza absoluta, pero pueden indicar a qué género o especie más probable pertenecen las bacterias estudiadas (Ruiz y Porres, 2018, p. 52).

1.2.7.1. Características macroscópicas

En las primeras etapas de identificación, es fundamental determinar la morfología de las colonias. Por esta razón, es esencial observar las colonias puras y frescas (Ruiz y Porres, 2018, p. 79). Los criterios a evaluarse son: forma (circular, puntiforme, irregular, fusiforme), bordes (enteros,

ondulados, lobulados, filamentosos), elevación (plana, convexa, elevada), texturas (lisas, concéntricas, arrugadas, con curva), pigmentación (blanca, verde, amarillo), consistencia (cremosa, mucoide), y comportamiento óptico (opacos, translucidos) (Vargas y Kuno, 2014, p. 108).

1.2.7.2. Características microscópicas

La observación de la forma de las bacterias bajo el microscopio está determinada por la dureza de su pared celular. Según su forma, se clasifica en bacilos, cocos y espirilos (Pérez y Mota, 2006, p. 206).

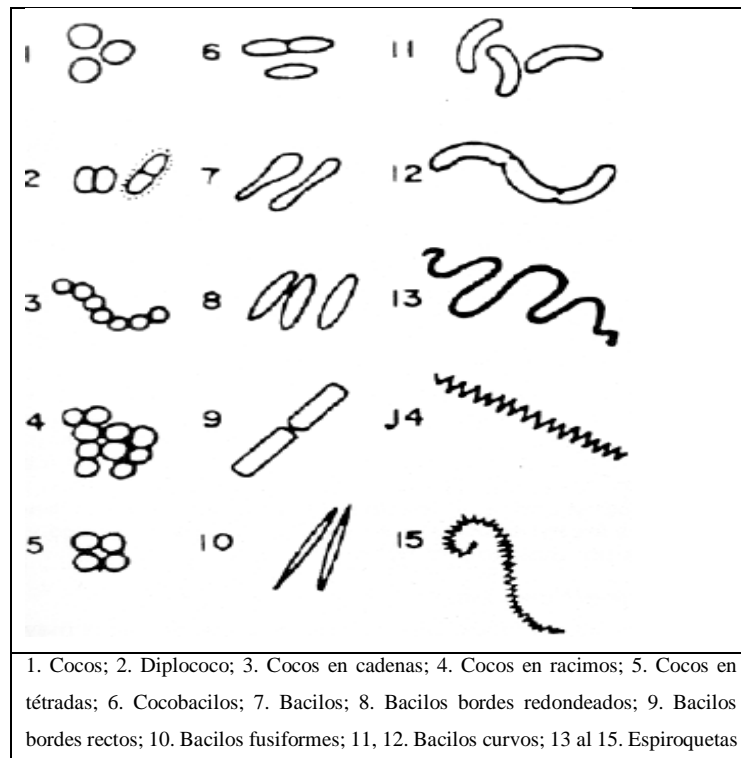


Figura 2-1. Morfología

Fuente: (Pérez y Mota, 2006).

Tinción Diferencial de Gram

La tinción Gram divide las bacterias en dos categorías principales. Las que se retienen la tinción azul-violeta se denomina Gram positivas y las que se tiñen de rosa-fucsia por el colorante usado (safranina) se denominan bacterias Gram negativas. La diferencia de coloración de unas de otras se debe a la estructura de la pared celular de los dos tipos de bacterias. Las Gram positivas poseen una pared celular gruesa conformada de peptidoglicanos y polímeros, y son impermeables, lo que las hace resistentes a la decoloración. Por el contrario, las Gram negativas poseen una capa fina

de peptidoglicanos y una doble capa de lipoproteínas que pueden eliminarse con la decoloración (Rodríguez y Arenas, 2018, p. 45).

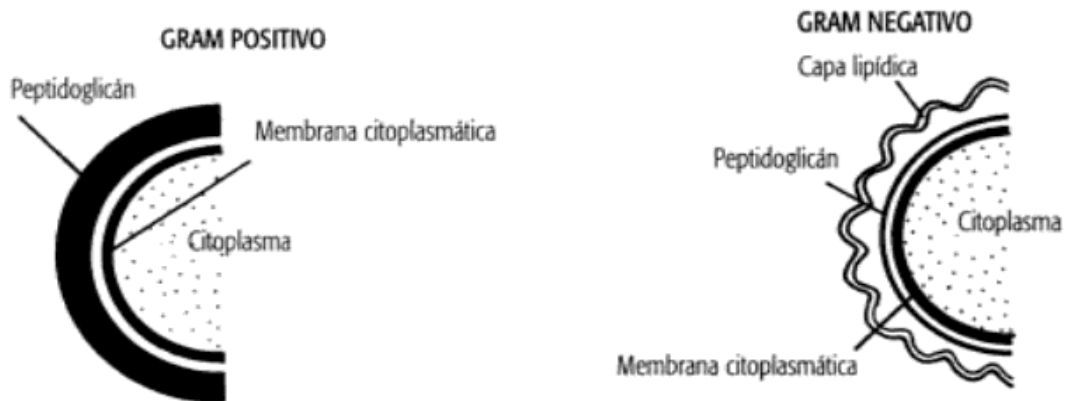


Figura 3-1. Diferencia de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y negativas

Fuente: (García, 2004).

1.2.8. Caracterización bioquímica

1.2.8.1. Prueba de la catalasa

La prueba de la catalasa se usa para verificar la presencia de la enzima catalasa en la mayoría de las bacterias. La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Esta prueba se utiliza para distinguir los géneros. *Streptococcus* (-) de *Micrococcus* (+) y *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-) (MacFaddin, 2003, p. 18).

1.2.8.2. Prueba de la ureasa

La prueba de la ureasa se usa para determinar si un organismo es capaz de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco mediante la acción de la enzima ureasa. Es una actividad característica de especies de *Proteus* y se utiliza para distinguir *Klebsiella* (+) de *Escherichia coli* (-) y *Yersinia pseudotuberculosis* (+) de *Yersinia pestis* (-) (Lopardo et al., 2016, p. 56).

1.2.8.3. Prueba del citrato

La prueba del citrato es utilizada para verificar si un organismo posee la capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuesto de amoníaco como fuente de nitrógeno en su metabolismo, lo que da como resultado los siguientes géneros *Clostridium* (+), *Bacillus* (+),

Salmonella(+), *Aeromonas* (+), *Escherichia*(-), *Citrobacter* (+) y *Pseudomonas* (-) (Bou et al., 2011, p. 13).

1.2.9. Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo

A finales de la década de 1990, los métodos moleculares abrieron un nuevo campo de comprensión de la ecología microbiana. Estos métodos generalmente se denominan independientes de cultivo, que permiten la detección e identificación de microorganismos directamente en el sistema al analizar su ADN o ARN sin cultivarlos ni aislarlos. Su novedad radica en la extracción directa de ácidos nucleicos de la matriz y posterior análisis de los mismos mediante métodos que pueden resaltar la diversidad de microorganismos. Al estudiar el ADN, podemos determinar la cantidad y los tipos de microorganismos presentes en una muestra en particular, por otro lado, el estudio de ARN nos permite comprender qué parte de la población es metabólicamente activa (Cocolin et al., 2010, p. 74).

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son los métodos independientes de cultivo más utilizados por los investigadores. En PCR-DGGE, los ácidos nucleicos se amplifican utilizando cebadores universales, teóricamente, los cebadores universales pueden amplificar todo el ADN o ARN de bacterias y levaduras que existen en un ecosistema específico (Cocolin et al., 2010, p. 36).

1.2.9.1. Extracción de ADN

Esta etapa constituye el primer paso en cualquier investigación de la comunidad microbiana (López, 2012, p. 95). El proceso básico puede constar de 5 pasos. El primero es la ruptura de las células, el método de lisis celular más utilizado son los detergentes (utilizado principalmente para extraer el ADN de parásitos, células en cultivos y tejidos, el más utilizado para la ruptura de la membrana celular es dodecilsulfato de sodio (SDS)), enzimas (utilizada específicamente para extraer el ADN bacteriano, la enzima a utilizar es la lisozima) y agentes desnaturizantes (cloruro de guanidina es el más utilizado para la extracción de ADN de diferentes tipos de células y tejidos). El segundo es eliminación de las proteínas, se logra en un solo paso mediante el uso de enzimas proteolíticas como la proteinasa K. El tercero es la eliminación de ARN, esto se logra mediante la aplicación del ARNasa como la ribonucleasa A del páncreas bovino. El cuarto es la eliminación de proteínas, donde la desnaturización de las proteínas se realiza con solventes orgánicos como fenoles y cloroformo. El quinto es la concentración de ADN, obtenida por precipitación con etanol en presencia de un catión monovalente a una concentración de 0,1 - 0,5 M (Puerta y Urueña, 2005, p. 109).

Para la extracción de ADN, se debe considerar que el procedimiento a utilizar debe ajustarse al tipo de microorganismo a analizar. Actualmente existen protocolos estándares o kits comerciales en los que los proveedores proporcionan métodos de trabajo. Uno de los procedimientos estándar más utilizados es el método de extracción con bromuro de hexadeciltrimetilamonio, un reactivo conocido por la abreviatura CTAB en inglés, que puede extraer ADN de bacterias y hongos (Carrasco et al., 2020, p. 99).

1.2.9.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método enzimático *in vitro* que permite amplificar una secuencia de ADN específica (Pedrosa 1999, p. 25). A partir de un fragmento de ADN del tamaño de un gen, la PCR se puede usar para hacer miles de millones de copias en tan solo unas pocas horas (Tortora et al. 2007, p. 94). La PCR es una herramienta biotecnológica de gran utilidad para el diagnóstico de bacterias o virus que son difíciles de cultivar *in vitro* (Romero et al., 2010, p. 80).

La tecnología de PCR sigue tres etapas. El primero es la desnaturalización, en la que se separan dos cadenas de ADN complementarias, lo que se logra elevando la temperatura de reacción entre 92 a 98°C en 30 a 90 segundos. El segundo paso es la alineación, que incluye un emparejamiento específico entre el fragmento de partida (oligonucleótido) y la hebra única desnaturalizada de ADN, la temperatura de reacción se reduce a 50 o 60°C durante 30 a 60 segundos. Finalmente, es la extensión, en esta etapa, el ADN polimerasa alarga la longitud del fragmento inicial conectado al ADN blanco para generar nuevas hebras complementarias a las dos hebras simples del ADN desnaturalizado que existía al comienzo de la reacción, debe aumentarse a 70 o 74°C, la duración media de esta fase es de 30 a 90 segundos. Generalmente, consta de 20 a 30 ciclos repetidos de las tres etapas. La reacción de síntesis es catalizada por un ADN polimerasa termoestable obtenida de *Thermus aquaticus* (Pedrosa, 1999, p. 150).

1.2.9.3. Secuenciación del ADN

Esta es una técnica para determinar secuencias completas de ADN del genoma humano y para identificación de microorganismos; incluye determinar la secuencia de las bases adenina, citosina, guanina y timina en un fragmento de ADN. Usando esta técnica, se puede obtener secuencias de hasta aproximadamente 500 bases, que se ensamblan en un genoma de referencia para la secuenciación del genoma completo. Este método ha cambiado la forma en que entendemos la genética al identificar las causas reales de la herencia, centrándose en la investigación genética de individuos con fenotipos claros y enfermedades mendelianas causadas por genes conocidos. Son

muy sensibles para detectar mutaciones evaluando el fenotipo y la secuencia de estos genes afectados (Angarita et al., 2017, p. 46).

1.2.9.4. Secuenciación Sanger

Para la técnica de secuenciación de Sanger se utilizan pares de cebadores de oligonucleótidos para buscar regiones específicas de ADN. Este método comienza con la desnaturalización del ADN bicatenario. A continuación, el ADN monocatenario se hibrida con cebadores oligonucleótidos y se extiende con una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs). Los dNTPs son proporcionados por adenina (A), citosina (C) y timosina (T) y guanina (G) que son esenciales en la formación de nuevas estructuras bicatenarias. Además, cada nucleótido contiene una pequeña cantidad de trifosfato de didesoxinucleótido de terminación de cadena (ddNTPs). La secuencia seguirá prolongando con dNTPs hasta que se conecte ddNTP. Dado que los dNTPs y los ddNTPs tienen la misma posibilidad de unirse a una secuencia, cada secuencia terminará con una longitud diferente. Cada ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) también contiene una etiqueta fluorescente. Cuando el ddNTP se une a la secuencia extendida, la base emitirá fluorescencia de acuerdo con el nucleótido relacionado. Generalmente, A está representado por fluorescencia verde, T por rojo, G por negro y C está representado por azul (Gomes y Korf, 2018, p. 28).

El método de secuenciación de Sanger es muy caro y se utiliza para secuenciar pequeños fragmentos de ADN (como plásmidos bacterianos). No es eficaz para secuenciar genomas completos grandes (metagenómica) porque no se pueden procesar múltiples fragmentos de moléculas de ADN al mismo tiempo. En estas situaciones, se utilizan nuevas tecnologías de secuenciación denominadas secuenciación de nueva generación (SNG) (Pinedo y Ball, 2020, p. 72), que se pueden generar en paralelo millones de fragmentos de ADN a gran escala en un solo proceso de secuenciación, mejorando significativamente el rendimiento a un costo menor y proporcionando un rendimiento significativo en comparación con los sistemas tradicionales (González y Lezana, 2017, p. 15).

1.2.10. Fuentes geotermiales

Las fuentes termales son flujos de agua caliente que fluyen desde el suelo. Se encuentran en lugares con actividad volcánica en la parte inferior de la corteza terrestre. Hay aguas termales en todo el mundo, hasta en los océanos (Kalman 2009, p. 19). La temperatura del agua de las fuentes geotérmicas es superior a 40 ° C y es rica en diversidad microbiana (Salazar et al., 2020, p. 38).

Los sistemas geotérmicos ricos en compuestos azufrados a menudo se componen de sulfuros y azufre elemental, este último liberado desde el interior de la tierra por los flujos volcánicos junto

con gases como el H_2S . El H_2S se oxida espontáneamente con O_2 o se oxida por la reacción del H_2S con el SO_2 . En entornos terrestres, las fuentes termales son ricas en azufre, los lodos y los suelos pueden alcanzar los $100^\circ C$, y que suelen ser ácidos debido a la producción de ácido sulfúrico. El H_2SO_4 se genera a partir de la oxidación biológica ácido sulfhídrico y el azufre elemental (Gomez, 2017, p. 41).

1.2.11. Fuentes geotermales del Ecuador

En Ecuador se puede demostrar que existe mucho conocimiento de los ancestros sobre el uso de métodos cálidos como medicina alternativa para tratar diversas dolencias. La existencia de aguas termales se ha asociado a la presencia de volcanes que muchas personas han utilizado con fines terapéuticos y recreativos durante décadas (Andueza et al., 2020, p. 87).

1.2.12. Fuentes geotermales Aluchán

Se ubica en la cumbre occidental de la parroquia de Cusubamba en la comunidad de Rumiquincha en cantón Pujilí, Cotopaxi, Ecuador. Dos pequeños arroyos corren entre los dos ramales montañosos, el río Chilcatingo y el río Cuchihuasi. La fuente se encuentra ubicada en las siguientes coordenadas, latitud $1^\circ 02' 56.39'' S$, longitud $78^\circ 46' 15.48'' O$ a 3531msnm de altura, su temperatura es de $45^\circ C$ aproximadamente y el caudal estimado es de 6 a 8 litros por segundo (Navas, 2010, p. 32). El paisaje es muy hermoso, muy tranquilo y lleno de plantas como *Buddleja incana*, *Sambucus*, *Baccharis latifolia* y otros arbustos (Toledo, 2005, p. 55).

Tabla 3-1: Datos hidrogeoquímicos de la fuente geotermal Aluchán

Parámetro	Unidad	Valor	Cationes (mg/L)			
			Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
pH		6,99				
CE	uS/cm	1455	26,45	46,30	187,10	6,79
Temperatura	°C	43	Aniones (mg/L)			
			CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
			0	420,9	214,78	38

Fuente: (Carrera y Guevara, 2017).

Los datos de la tabla 3-1 muestran que las aguas de la fuente geotermal Aluchán tienen un pH neutro, por temperatura se clasifica como hipertermales, mientras que por relación iónica se clasifica como aguas cálcicas, magnésicas, sódicas, cloruradas y sulfatadas.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación

Es exploratorio, ya que se busca examinar un tema o problema de investigación que ha sido poco estudiado en el Ecuador. La finalidad de esta investigación es encontrar nueva información, lo que permitirá establecer el tipo de bacterias que se desarrollan sean bacterias termófilas.

2.2. Diseño de la investigación

Experimental, consiste en la manipulación de variables independientes como la temperatura para el aislamiento de bacterias termófilas.

2.3. Localización del estudio

Las muestras para el presente trabajo de tipo investigativo se tomaron de la fuente geotermal Aluchán ubicada en cantón Pujilí, provincia de Cotopaxi y los análisis de laboratorio se desarrollarán en la ESPOCH ubicado en Panamericana Sur km 1 ½, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador.

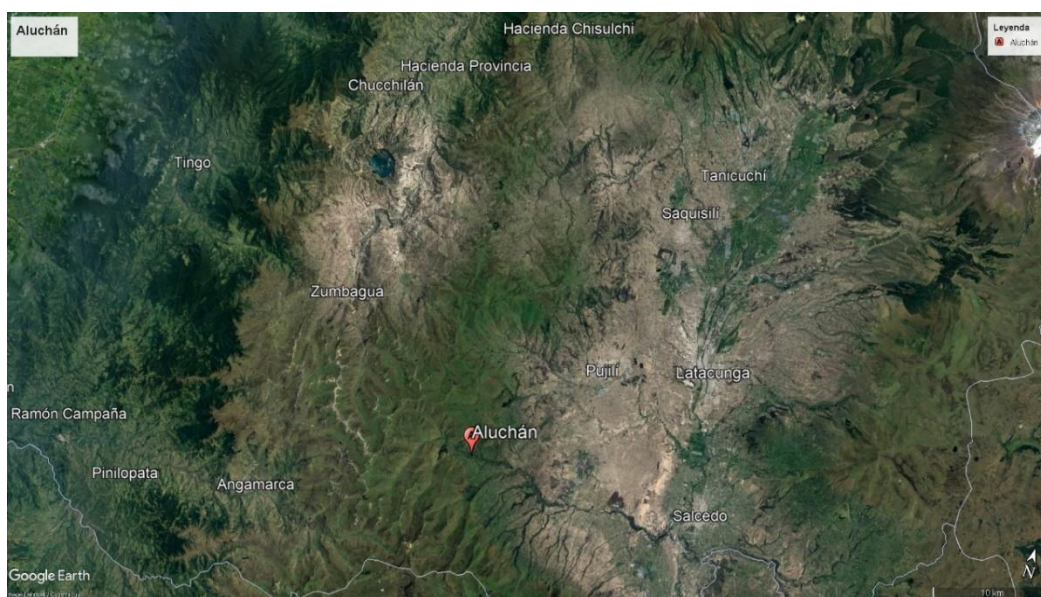


Figura 1-2. Ubicación fuente geotermal Aluchán

Fuente: Google Earth, 2022.

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

2.4. Población de estudio

Fuente geotermal Aluchán

2.5. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se eligió en base a una revisión bibliográfica de un estudio realizado en la fuente geotermal Papallacta (Faz, 2018, p. 64). Se realizó un muestreo aleatorio a conveniencia de 50mL de agua de cada punto de la fuente geotermal de Aluchán para el aislamiento de bacterias.



Figura 2-2. Puntos de muestreo

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

2.6. Fases de la investigación

2.6.1. Fase de campo

La fase de campo se realizó en la fuente geotermal Aluchán ubicada en la parroquia de Cusubamba, cantón Pujilí, provincia de Cotopaxi, Ecuador; con coordenadas de latitud $1^{\circ}02'56.39''S$, longitud $78^{\circ}46'15.48''O$ a una altitud aproximada de 3531 msnm.

2.6.2. Caracterización del sitio

Para la caracterización fisicoquímico de la fuente termal, se recolectaron dos litros de agua en botellas PET. Las botellas se enjuagaron previamente dos veces con el agua a muestrear y luego se envió a Quito al laboratorio LABOLAB (NTE-INEN-2169, 2013, p. 57); (NTE-INEN-2176, 2013, p. 96).

La muestra se tomó una sola vez de la fuente termal. Se midieron in situ los parámetros fisicoquímicos como la temperatura y el pH.



Figura 3-2. Medición de temperatura y pH

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

2.6.3. Toma de muestras

Se realizaron dos muestreos para corroborar los resultados, el primero el 12 de octubre del 2021 y el segundo el 21 de enero del 2022.

Para la toma de muestras se establecieron tres puntos de muestreo, como se observa en la figura 2-2. Se mantuvieron las condiciones estériles de los materiales para la recolección de las muestras y el uso de protección personal como mandil, guantes y mascarilla para evitar la contaminación.



Figura 4-2. Recolección de muestras de la fuente geotermal Aluchán

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

2.6.3.1. *Muestras para aislamiento de bacterias*

Se recolectaron 50mL de agua en tubos falcón estériles en 3 puntos de la vertiente. Las muestras se transportaron en un termo portátil para mantener la temperatura del agua.

2.7. Fase de laboratorio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), ubicado en Panamericana Sur km 1 ½, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador.

2.7.1. *Preparación de medio de cultivo*

Se preparó 8g del medio de cultivo Agar LB (Luria Bertani) en 200mL de agua destilada. La esterilización se realizó a 121°C durante 15 minutos.

Tabla 1-2: Composición del medio de cultivo Agar LB

Componente	Concentración g/L
Agar	15.00
Hidrolizado enzimático de caseína	10.00
Cloruro de sodio	10.00
Extracto de levadura	5.00

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

Agar Luria Bertani es un medio de crecimiento microbiano que contiene la peptona caseína y el extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico.

2.7.2. *Procesamiento y siembra de las muestras*

Debido a la distancia entre la fuente termal y el laboratorio, las muestras se inocularon en el laboratorio 4 horas después de la recolección.

El transporte de las muestras se realizó según la norma NTE-INEN 2169, 2013 “Manejo y conservación de muestras”, se colocó las muestras en un termo portátil para mantener la temperatura del agua, los recipientes que contienen las muestras fueron sellados y protegidos para evitar que no se deterioren hasta llegar al laboratorio.

Se inocularon 100µL de la muestra de cada punto por triplicado en placas Petri con medio sólido (Agar LB-Luria Bertani) utilizando la técnica de extensión con asa de vidrio (Drigalski).

Posteriormente, en base a una revisión bibliográfica, se incubó bajo tres condiciones de temperatura a 37°C, 45°C, 50°C durante 48 horas y se observó el crecimiento en las placas con temperatura de 37°C (Naranjo, 2017, p. 63).

2.7.3. *Obtención de cultivos puros*

Para la obtención de cepas puras, se observó el crecimiento en las placas iniciales y se procedió a realizar la resiembra de una sola colonia en una nueva placa Petri con medio sólido LB utilizando la técnica del estriado y luego se incubó a 37°C durante 24 horas (Naranjo 2017, p. 36).

2.7.4. *Caracterización macroscópica del cultivo*

Se evaluó las cepas puras de acuerdo con los siguientes criterios: pigmentación, forma, bordes, elevación, superficie, consistencia y características ópticas.

2.7.5. *Caracterización microscópica del cultivo*

Con el propósito de clasificar las bacterias se realizó la tinción Gram de todas las cepas aisladas para diferenciar entre Gram positivos y negativos y su morfología (bacilos y cocos).

2.7.5.1. *Procedimiento de tinción Gram*

- Colocar una gota de agua sobre el portaobjeto.
- Con un asa de siembra previamente esterilizada tomar una colonia.
- Realizar un frotis y fijarlo en la llama del mechero.
- Colocar cristal violeta en toda la muestra y esperar 1 a 2 minutos.
- Lavar con abundante agua.
- Cubrir con lugol y esperar 1 a 2 minutos.
- Lavar con abundante agua.
- Agregar con alcohol acetona y esperar 1 a 2 minutos.
- Lavar con abundante agua.
- Cubrir con safranina y esperar 1 a 2 minutos.
- Lavar con abundante agua.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Observar al microscopio con el objetivo de 100X con una gota de aceite de inmersión (Espinal, 2005, p. 36).

2.7.6. Caracterización bioquímica

2.7.6.1. Catalasa

Con un palillo previamente esterilizado, se tomó una colonia pura, se colocó la colonia sobre el portaobjeto y se procedió a colocar una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% sobre la colonia. Si la colonia presenta desprendimiento de burbujas se considera como positivo caso contrario como negativo (Koneman y Allen, 2008, p. 63).

2.7.6.2. Ureasa

Se disolvió 0,63g de Agar Base Urea (Christensen) en 25mL de agua destilada, se autoclavaron el agar urea y la solución de urea (40%) a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, se mezclaron el medio agar urea y la solución de urea. En condiciones asépticas se procedió a colocar 3mL en tubos de ensayo y se dejó solidificar en forma inclinada (pico de flauta). Después de obtener el agar inclinado se realizó la siembra en forma de estría, los tubos fueron incubados durante 24h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se observó los resultados, considerando la coloración roja como positivo y amarillo como negativo (Pascual y Calderón, 1999, p. 48).

Tabla 2-2: Composición del medio de cultivo Agar Urea Base (Christensen)

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

Fuente: Britania, 2015.

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

Es utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica. La peptona y la glucosa aporta los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el rojo de fenol es el indicador de pH. El agar es el agente solidificante.

2.7.6.3. Citrato

Se preparó 0,73g de Agar Citrato de Simmons, esterilizó a 121°C durante 15 minutos, se distribuyó 3mL en tubos estériles y se dejó solidificar en forma inclinada. La inoculación se realizó mediante la técnica de siembra por estría, la cual se incubó a 37°C durante 24h. Finalmente, se reportan los resultados, si hay un cambio de color de verde a azul se considera como positivo (MacFaddin, 2003, p. 83).

Tabla 3-2: Composición del medio cultivo Agar Citrato de Simmons

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

Fuente: Bio-Rad, 2005.

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

El fosfato de amonio es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la fuente de carbono, ambos componentes son necesarios para el desarrollo de las bacterias. El sulfato de magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene al osmótico, el azul de bromotimol es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante.

2.7.7. Caracterización molecular

2.7.7.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las cepas aisladas se realizó bajo los protocolos de la empresa IDgen. En el que se utilizó aproximadamente 50mg de la muestra, se concentró la muestra en tubos eppendorf de 1.5 mL con tres perlas de vidrio estériles. Adicionar 500µL de buffer de extracción y agitar la muestra vigorosamente usando BeadBeater a velocidad máxima de 2 veces hasta que el tejido quede pulverizado. Incubar en baño maría a 60°C por 30 min, mezclar invirtiendo cada 10 min. Añadir 500µL de cloroformo, homogenizar en Vortex por 30 segundos, dejar reposar unos minutos y centrifugar a 14500 rpm por 5 min. Tomar el sobrenadante de aproximadamente 400µL y colocar en un nuevo tubo estéril de 1.5mL. Añadir al sobrenadante 150µL de acetato de sodio, 300µL de etanol 70% para precipitar el ADN y dejar -20°C toda la noche. Centrifugar a

14500 rpm por 17 min y eliminar el sobrenadante conservando el pellet. Realizar 2 lavados con etanol 70%, pipetear y descartar el etanol por inversión. Suspender el pellet de ADN con 25µL de agua ultrapura, añadir 1µL de RNAsa y dejar incubar 30 min a 37°C. Almacenar las muestras a -20°C hasta su posterior uso.

Finalmente, las concentraciones y radios de pureza del ADN extraído fueron cuantificadas mediante espectrofotómetro NanoDrop 8000UV-Vis. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20ng/uL para la amplificación.

2.7.7.2. Amplificación del gen *rpoB* y *16S rRNA*

La amplificación de la región *rpoB* y *16S* se realizó mediante la técnica de PCR, con un volumen final de 25µL por muestra, se preparó un master mix utilizando el kit GoTaq® GreenMasterMix con un volumen de 12.5µL con los primers universales (*rpoB*-F/R y 27F/1492R) de 1µL forward y 1µL reverse, 2µL de muestras de ADN y 8.5µL de agua ultra pura.

Tabla 4-2: Primers universales para el gen *rpoB* y *16S*

Gen	Primers	Secuencia 5'-3'	Tamaño
rpoB	rpoB-F	CGCGATCAAGGAGTTCTTC	118pb
	rpoB-R	TGACAGACCGCCGGGCCC	
16S	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1500pb
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	

Fuente: (Galarza et al., 2018).

Una vez obtenido el máster mix de 25µL, se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones que se detallan en tabla 5-2.

Tabla 5-2: Condiciones de la PCR

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	5min	1
Desnaturalización	95	30seg	25
Alineamiento	58	30seg	
Extensión	72	1min	
Extensión final	72	7min	1

Fuente: (Galarza et al., 2018).

Los productos de PCR se observaron en gel de agarosa al 1%. La electroforesis se corrió a 85V, 250mA durante 35min utilizando un marcador molecular de 100bp Opti-DNA Markers. Finalmente se visualizó bajo la luz ultravioleta en el equipo High Performance UV – transiluminador.

2.7.7.3. Secuenciación

Los productos de PCR fueron purificados y enviados a Macrogen en Korea para su posterior secuenciación.

2.7.7.4. Limpieza y ensamblaje

Los resultados de secuencias enviadas por Macrogen fueron limpiadas y ensambladas utilizando el software Geneious. Finalmente se obtuvieron secuencias consenso.

2.7.7.5. Análisis de similitud y homología

Las secuencias consenso se corrieron con la ayuda de Nucleotide BLAST (blastn) y comparadas con la base de datos de NCBI.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del sitio del muestreo

Los parámetros como la temperatura y el pH se tomaron en el área el momento del muestreo, la temperatura es de 43°C y el valor del pH es neutro o ligeramente ácido, los datos de pH luego fueron confirmados con los análisis otorgados por LABOLAB.

3.2. Análisis fisicoquímico

En la tabla 1-3 se muestran los resultados de análisis fisicoquímico de muestras de agua otorgados por el laboratorio LABOLAB. De acuerdo a los resultados, en cuanto al pH la fuente geotermal Aluchán se caracteriza por tener un pH neutro o ligeramente ácido, la conductividad del agua es de 1287 μ S/cm se clasifica como conductividad alta según INAMHI, el valor de la dureza total es 161.66mg/L según la OMS se define como agua dura, en cuanto a la relación iónica se clasifica como aguas cálcicas, magnésicas, sódicas y sulfatadas.

Tabla 1-3: Análisis fisicoquímico de muestra de agua de la fuente geotermal Aluchán

Parámetro	Unidad	Método	Resultado
pH (20°C)	...	PEE/LA/10 INEN ISO 10523	6,82
Conductividad (25°C)	μS/cm	PEE/LA/A03 Standard Methods 2510 B	1287
Alcalinidad total	mg/L	PEE/LA/A10 Standard Methods 2320 B	455,15
Dureza total	mg/L	PEE/LA/A11 Standard Methods 2340 C	161,66
Calcio	mg/L	PEE/LA/A12 Standard Methods 3500-Ca B	30,58
Magnesio	mg/L	PEE/LA/A12 Standard Methods 3500-Mg B	20,75
Cloruros	mg/L	PEE/LA/A13 Standard Methods 4500-Cl ⁻ B	107,03
Sodio	mg/L	Electrodo selectivo	170
Potasio	mg/L	Electrodo selectivo	5
Color	UCA	Visual	2
Turbiedad	NTU	Nefelométrico	5
Carbonatos	mg/L	PEE/LA/A10 Standard Methods 2320 B	0
Bicarbonatos	mg/L	PEE/LA/A10 Standard Methods 2320 B	455,15
Fosfatos	mg/L	Standard Methods 4500-P C	< 0,10
Nitritos	mg/L	Standard Methods 4500 NO ₂ ⁻ B	< 0,05
Sulfatos	mg/L	Standard Methods 4500-SO ₄ ²⁻ E	135,21
Hierro total	mg/L	Standard Methods 3500-Fe B	0,72
Manganeso	mg/L	Standard Methods 3500-Mn B	< 0,03
Solidos totales	mg/L	Standard Methods 2540 B	916
Solidos disueltos totales	mg/L	Standard Methods 2540 C	657
Solidos suspendidos	mg/L	Standard Methods 2540 D	259
*Arsénico	mg/L	Gutzeit Modificado	0,50
Cobre	mg/L	Standard Methods 3111 B Modificado	< 0,01

Nota: *Compuestos que superan los límites máximos permisibles

Fuente: LABOLAB

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

3.2.1. Temperatura

En el presente estudio, la temperatura de la fuente geotermal Aluchán es de 43°C, según el INAMHI, se clasifica como hipertermales, este valor coincide con el estudio realizado por Carrera y Guevara en 2017, sin embargo, la temperatura reportada por reportó INAMHI en 2015 fue de 44.8°C mientras que en el estudio realizado por SENAGUA en 1984, reportó una temperatura de 48°C, lo que indica una variación de temperatura con el presente estudio. Posiblemente este cambio de temperatura tiene que ver con la época del año en el que se realizó el muestreo, ya que en Ecuador, noviembre a marzo es generalmente la época de invierno (Faz, 2018, p. 86).

La temperatura de la fuente geotermal de Aluchán es similar con la fuente geotermal El Tingo (43.2°C) ubicada en la provincia de Pichincha (Carrera y Guevara, 2017, p. 41).

En el proceso de crecimiento de los microorganismos, la temperatura es uno de los factores más importantes, los microorganismos necesitan una temperatura óptima para su desarrollo. Si la temperatura aumenta o disminuye, el crecimiento será más lento, ya sea por encima de la temperatura máxima o por debajo de la temperatura mínima, la tasa de crecimiento disminuirá, pero no siempre hay muerte de los microorganismos (Chaucalá, 2018, p. 63).

3.2.2. pH

La fuente geotermal Aluchán se caracteriza por tener un pH neutro o ligeramente ácido de 6,82. La normativa ecuatoriana (Acuerdo Ministerial 097) establece el rango de pH de 6.5 a 8.3, lo que indica que, en el presente proyecto, el pH se encuentra dentro del rango permitido para aguas destinadas con fines recreativos (Acuerdo ministerial 097, 2015, p. 23).

Según el estudio realizado por Carrera y Guevara en 2017, en la fuente geotermal de Puetate ubicada en la provincia de Carchi, reportó un pH de 6.68, que es similar al pH de la fuente geotermal de Aluchán.

Las bacterias termófilas pueden crecer a un pH entre 5.5 – 8, por lo que podemos decir que el agua de la fuente geotermal de Aluchán posee las condiciones de pH para el crecimiento de estos microorganismos (Cangahuamin, 2021, p. 56).

3.2.3. Conductividad

La conductividad del agua está ligada con la concentración de sales en disolución, la disociación de sales produce iones que pueden transmitir corriente eléctrica y la concentración de iones conduce a un aumento de la conductividad. La temperatura influye en la solubilidad de la sal en el agua, por lo tanto, la conductividad varía según la temperatura del agua (Solís et al., 2018, p. 36). El valor de conductividad es usado como sustituto de la concentración de Sólidos Disueltos Totales (SDT) (Delgadillo et al., 2010, p. 43).

La conductividad del agua de fuente geotermal Aluchán es de 1287 $\mu\text{S}/\text{cm}$, por lo cual se clasifica como conductividad alta según INAMHI (Burbano et al., 2015, p. 76).

A medida que aumenta la conductividad, aumenta los SDT, de esta forma podemos justificar los valores descritos en la tabla 1-3, donde la conductividad es de 1287 $\mu\text{S}/\text{cm}$ mientras que los SDT es de 657 mg/L.

Según estudios realizados por Carrera y Guevara (2017, p. 63), en la fuente geotermal Aluchán, reportó un valor de 1455 $\mu\text{S}/\text{cm}$, comparado con el valor del presente estudio, se puede evidenciar que existe una disminución de 168 $\mu\text{S}/\text{cm}$ durante los últimos 4 años.

La conductividad obtenida en la fuente geotermal Aluchán se asemejan a otras fuentes termales como son La Calera ubicada en la provincia de Carchi con una conductividad de 1267 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Cununyacu y La Merced ubicada en la provincia de Pichincha con una conductividad de 1230 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 1210 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivamente (Carrera y Guevara, 2017, p. 41).

3.2.4. Dureza total

El valor obtenido en el presente trabajo es de 161.66 mg/L, según la clasificación de la OMS se define como agua dura. El valor se encuentra dentro del rango permitido por la Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, TULSMA, Libro VI, Anexo 1, Tabla 1 que es de 500 mg/L (TULSMA, 2011, p. 52).

En el estudio realizado por Carrera y Guevara en el (2017, p. 54), la concentración de la dureza total de la fuente geotermal Aluchán difieren a la de otras fuentes termales, por ejemplo, en la fuente termal “El Salado” ubicada en la provincia de Tungurahua, donde se obtuvo un valor de 2332.88 mg/L, valor muy superior al obtenido en el presente trabajo.

La dureza del agua se debe a la presencia de sales de calcio y magnesio disueltas, se expresa como carbonato de calcio (CaCO_3), esto se debe principalmente a la disolución de rocas y minerales (Pimienta, 1980, p. 23).

3.2.5. Sodio

El sodio se encuentra en diferentes concentraciones en las fuentes termales, en aguas termales de Aluchán es de 170 mg/L. El estudio realizado por Carrera y Guevara en año 2017 reportó una concentración de 187.10 mg/L en la misma fuente termal, lo que demuestra que existe una corta variación en la concentración de sodio durante este tiempo.

La OMS y la Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, TULSMA, Libro VI, Anexo 1, Tabla 1 recomiendan un límite máximo permisible de 200 mg/L, lo cual indica que la concentración de sodio en aguas termales de Aluchán se encuentra dentro del rango permitido (Truque, 2012, p. 27).

3.2.6. Calcio

El calcio, junto con el magnesio, es el principal causante de la dureza e incrustación del agua. La concentración de calcio en las aguas subterráneas es variable, la concentración de calcio en Chachimbiro es de 122.81 mg/L, en Papallacta es superior a 40 mg/L mientras que, en el actual

estudio, la concentración se encuentra a 30.58 mg/L, siendo menor en comparación a las otras fuentes (Faz, 2018, p. 85).

3.2.7. Potasio

El potasio es uno de los elementos mayoritarios en aguas naturales, se encuentra en concentraciones más bajas que el sodio, compatible con una extensa difusión en la naturaleza en forma de cloruro, sulfato, fluoruro y fosfatos. El agua no suele superar los 15 mg/L (Bolaños, 2014, p. 43).

El potasio en las termas de Aluchán se encuentra en una concentración de 5 mg/L, hay una mínima variación con respecto al estudio realizado por Carrera y Guevara en 2017, donde la concentración fue de 6.79 mg/L.

3.2.8. Fosfatos

La concentración de fosfatos en aguas de la fuente geotermal de Aluchán se encuentra menor a 0.10 mg/L. Carrera y Guevara (2017, p. 56), en su análisis fisicoquímico sobre el fosfato reportó una concentración de 1.10 mg/L en esta fuente geotermal.

Los fosfatos suelen formar sales extremadamente insolubles y se precipitan fácilmente en forma de fosfato cálcico, lo que hace que el agua se vuelva alcalina.

La OMS, la EPA y el TULSMA no establecen límites máximos permisibles de fosfato.

3.2.9. Nitritos

El nitrito es un compuesto soluble que está formado por nitrógeno y oxígeno, generalmente se convierte fácilmente en nitrato en el medio ambiente, lo que significa que el nitrito rara vez se encuentra en aguas subterráneas (Bolaños et al, 2017, p. 65).

La OMS recomienda una concentración de 3 mg/L de nitrito, la EPA de 1 mg/L, mientras que la normativa ecuatoriana (Acuerdo ministerial 097) de 0.2 mg/L.

La concentración de nitritos en las aguas geotermales de Aluchán es menor a 0.05 mg/L, por lo tanto, se encuentra dentro del rango establecido.

3.2.10. Sulfatos

Los sulfatos se encuentran en mayores concentraciones en aguas subterráneas. La concentración de sulfatos en Aluchán es de 135.21 mg/L.

La OMS y la EPA estipulan un valor máximo de 250 mg/L. Por otro lado, la normativa ecuatoriana (Acuerdo Ministerial 097) establece un valor máximo de 500 mg/L, al comparar estos datos con el valor obtenido en el presente trabajo no excede los rangos establecidos por la normativa vigente.

3.2.11. Hierro total

El hierro es muy frecuente encontrar en las aguas subterráneas y la concentración de hierro en Aluchán fue de 0.72 mg/L.

De acuerdo con la normativa ecuatoriana (Acuerdo Ministerial 097), el país establece un límite permisible de 1 mg/L de hierro. Por lo tanto, la concentración del hierro en el presente estudio cumple con la normativa vigente.

3.2.12. Magnesio

El magnesio en el agua está en forma de carbonato de magnesio ($MgCO_3$) que, junto con el calcio, le da la dureza al agua. La concentración de magnesio en las termas de Aluchán es de 20.75 mg/L. (Carrera y Guevara, 2017, p. 63), reportaron concentraciones similares a las obtenidas en el presente estudio, como en las termas de San Miguel ubicada en la provincia de Carchi, con una concentración de 24.2 mg/L, mientras que en Santa Catalina ubicada en la provincia de Pichincha reportó una concentración más baja de 9.04 mg/L y en El Salado, ubicada en la provincia de Tungurahua, una concentración de 641.3 mg/L, la más alta a la del presente estudio.

3.2.13. Manganeso

La concentración de manganeso analizado en la fuente geotermal de Aluchán se encuentra menor a 0.03 mg/L. La OMS establece una concentración de manganeso de 0.4 mg/L, la EPA de 0,05 mg/L y el TULSMA de 0,1 mg/L, por lo cual la fuente geotermal de Aluchán se encuentra dentro del rango permitido, tanto por la normativa internacional como en la ecuatoriana.

El manganeso de origen natural se encuentra en muchas fuentes de aguas subterráneas y superficiales, especialmente en condiciones anaeróbicas, su presencia suele estar asociada a la del hierro, aunque la mayor concentración de manganeso generalmente proviene de los alimentos (OMS, 2006, p. 63).

3.2.14. Cloruros

Los cloruros (Cl^-) presentes en el agua natural provienen de la disolución del suelo y de las rocas al poner contacto con el agua. En fuente geotermal de Aluchán la concentración de Cl^- es de 107.03 mg/L.

Según la OMS, EPA y el TULSMA, considera como límite máximo de una concentración de 250 mg/L de Cl^- . Los Cl^- presentes en aguas termales de Aluchán se encuentra dentro del rango permitido.

3.2.15. Arsénico

La concentración de arsénico en la fuente termal de Aluchán fue de 0.50 mg/L. La OMS y la EPA recomiendan un límite máximo permisible de 0.01 mg/L, mientras que el Acuerdo Ministerial 097 recomienda una concentración de 0.1 mg/L. La concentración obtenida en Aluchán supera los límites máximos permisibles establecidos por la normativa internacional y ecuatoriana, por lo que presenta una mínima contaminación.

El arsénico es un metaloide que ha sido ampliamente estudiado y considerado como tóxico para la salud humana, tiene un alto contenido en fuentes termales y otras fuentes geotérmicas. Según análisis fisicoquímico realizado en termas de Santa Catalina ubicada en la provincia de Pichincha, la concentración reportada fue de 0.714 mg/L, similares a las concentraciones obtenidas en Aluchán (Jiménez, 2018, p. 71).

3.2.16. Cobre

La concentración de cobre (Cu) en la fuente geotermal de Aluchán es menor a 0.01 mg/L. Si la concentración de Cu en el agua es superior a 1 mg/L, manchará la ropa lavada y en niveles superiores a 5 mg/L, se tiñe el agua y le da un sabor amargo indeseable (OMS, 2006, p. 23).

La concentración de cobre (Cu) obtenida en el presente trabajo no supera los límites permisibles establecidos por la OMS (2 mg/L), EPA (1.3 mg/L) y la normativa ecuatoriana (2 mg/L).

3.3. Obtención de cultivos puros

En la fuente geotermal Aluchán se obtuvo un total 15 cultivos puros en dos muestreos. Las condiciones de crecimiento fueron a 37°C durante 24h. En la tabla 2-3 se muestran las características macroscópicas de cada cepa bacteriana. En la figura 1-3 se puede observar dos ejemplos de cultivos puros.

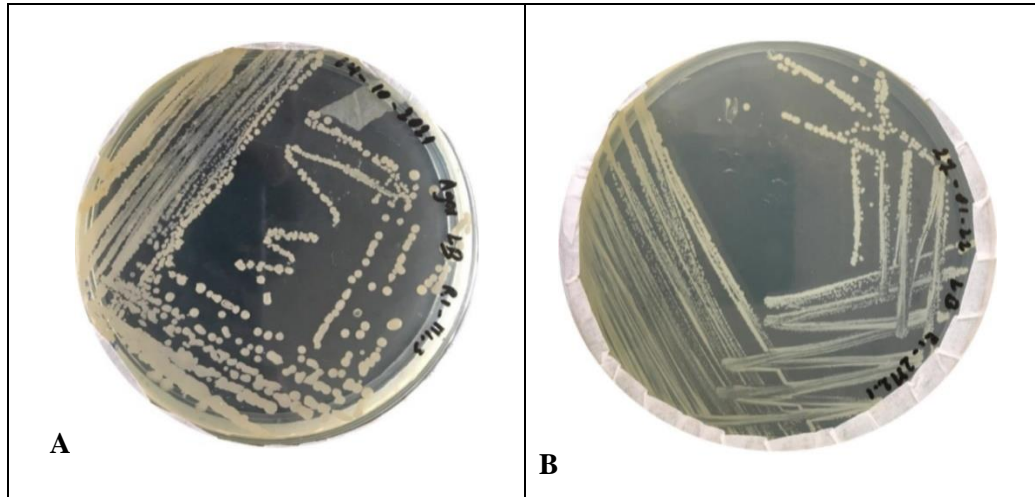


Figura 1-3. Cultivos puros aislados de la fuente geotermal Aluchán A: cepa bacteriana R1_M1.3; B: cepa bacteriana R1_2M2.1

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

3.4. Caracterización macroscópica

Tabla 2-3: Resultados de la caracterización macroscópica de las cepas aisladas

Clon	Pigmentación	Forma	Bordes	Elevación	Superficie	Consistencia	Características ópticas
R1_M1.1	Blanca	Circular	Entera	Plana	Lisa	Cremosa	Translúcida
R1_M1.2	Blanca	Irregular	Rizada	Plana	Rugosa	Cremosa	Opaca
R1_M1.3	Blanca	Irregular	Crenada	Efusa	Rugosa	Cremosa	Opaca
R1_M2.1	Blanca	Circular	Entera	Plana	Lisa	Cremosa	Opaca
R1_M2.2	Blanca	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Cremosa	Opaca
R1_M2.3	Blanca	Irregular	Entera	Plana	Lisa	Cremosa	Translúcida
R1_M3.1	Blanca	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Cremosa	Translúcida
R1_M3.2	Blanca	Irregular	Filamentosa	Plana	Rugosa	Cremosa	Translúcida
R1_M3.3	Blanca	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Cremosa	Opaca
R1_2M1.2	Blanca	Circular	Entera	Convexa	Lisa	Cremosa	Opaca
R1_2M1.3	Blanca	Circular	Entera	Plana	Lisa	Cremosa	Translúcida
R1_2M2.1	Blanca	Irregular	Entera	Plana	Lisa	Cremosa	Opaca
R1_2M2.3	Blanca	Circular	Entera	Plana	Lisa	Cremosa	Opaca
R1_2M3.1	Blanca	Irregular	Entera	Convexa	Lisa	Cremosa	Opaca
R1_2M3.3	Blanca	Circular	Entera	Plana	Lisa	Cremosa	Opaca

Realizado por: Umajinga, Oscar, 2022.

Se realizó la caracterización macroscópica de un total de 15 cepas bacterianas. En cuanto a la pigmentación se observó que el 100% de las colonias son de color blanco. Por su forma, se

observó que las colonias en un 60% tienen una forma irregular y 40% circular. Con respecto al borde de las colonias, se observaron bordes enteros (60%), onduladas (20%), rizada (6,66%), crenada (6,66%) y filamentosas (6,66%). En elevación el 80% de clones analizados fueron planos, 13,33 fue de tipo convexa y el 6,66% de tipo efusa. La superficie que presentan las colonias es lisa en un porcentaje de 60% y rugosa en un 40%. Por su consistencia las colonias muestran que el 100% son cremosas. En las características ópticas, el 66,67% son colonias opacas y 33,33% son colonias translúcidas.

En general, las características más importantes que se pueden resaltar son la pigmentación blanca, forma irregular, bordes enteros, elevación plana, superficie lisa, consistencia cremosa y características ópticas opacas.

Según Crespo (2009, p. 52), en su estudio de aguas termales en altiplano boliviano, 8 cepas fueron caracterizadas macroscópicamente, reportando forma irregular de 50%, elevación plana de 21,43% y 25% de características ópticas como opacas. Mientras que en el estudio realizado por Salazar (2017, p. 38) en los géiseres de Calientes en Tacna-Perú, de las 9 cepas, reportó que el 45,45% de las colonias tienen una forma irregular, elevación plana de 18,18% y consistencia cremosa de 90,91%.

3.5. Caracterización microscópica

Para determinar las características microscópicas se realizó una Tinción diferencial Gram de las cepas aisladas. En la figura 2-3 se muestran las tinciones Gram de algunas cepas vistas al microscopio con un aumento de 100X.

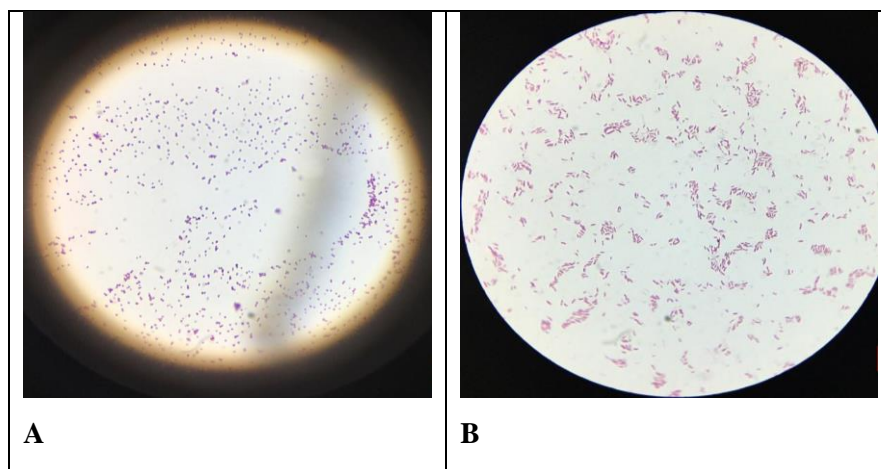


Figura 2-3. Tinción Gram de las cepas R1_2M2.1 y R1_2M3.1, 100X.

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

A. Cepa R1_2M2.1, cocos Gram positivos.

B. Cepa R1_2M3.1, bacilos Gram positivos.

Tabla 3-3: Resultados de la Tinción diferencial de Gram

Clon	Forma	Tinción Gram
R1_M1.1	Bacilos	+
R1_M1.2	Bacilos	+
R1_M1.3	Bacilos	+
R1_M2.1	Bacilos	+
R1_M2.2	Bacilos	+
R1_M2.3	Bacilos	+
R1_M3.1	Bacilos	+
R1_M3.2	Bacilos	+
R1_M3.3	Bacilos	+
R1_2M1.2	Bacilos	+
R1_2M1.3	Bacilos	+
R1_2M2.1	Cocos	+
R1_2M2.3	Cocos	+
R1_2M3.1	Bacilos	+
R1_2M3.3	Bacilos	+

Realizado por: Umajinga, Oscar, 2022

En la tabla 3-3 se muestra que, de las 15 cepas analizadas, el 100% fueron Gram positivas. De acuerdo a la morfología el 86,67% pertenecen a bacilos y 13,33% a cocos.

Estos resultados son similares con la investigación realizada por Rivas (2017, p. 25) en la fuente geotermal “Aguas Hediondas” ubicada en la provincia de Carchi, donde se reportó el 100% de bacterias como Gram positivas de tipo bacilos.

De acuerdo con la tabla 3-3, la mayoría de las cepas aisladas son bacilos Gram positivos. Varios estudios sobre bacilos termófilos han reportado los siguientes géneros: *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermoactinomyces*, *Thermobacillus* y *Geobacillus* (Salazar, 2017, p. 73).

3.6. Caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas ayudan a determinar las características metabólicas de las bacterias a identificar. Existen pruebas de identificación preliminar que se pueden leer inmediatamente, como la prueba de catalasa y oxidasa, mientras que las pruebas lentas requieren de 18 a 48h de incubación, como las pruebas de ureasa y citrato (Bou et al., 2011, p. 25).

Tabla 4-3: Resultados de la caracterización bioquímica

Clon aislado	Catalasa	Ureasa	Citrato
R1_M1.1	+	-	-
R1_M1.2	+	-	-
R1_M1.3	+	-	+
R1_M2.1	+	-	-
R1_M2.2	+	-	-
R1_M2.3	+	-	-
R1_M3.1	+	-	-
R1_M3.2	+	-	-
R1_M3.3	+	-	-
R1_2M1.2	-	-	-
R1_2M1.3	-	-	-
R1_2M2.1	+	+	-
R1_2M2.3	+	+	-
R1_2M3.1	-	-	-
R1_2M3.3	-	-	-

Realizado por: Umajinga, Oscar, 2022.

En la tabla 4-3 se muestran los resultados obtenidos de un total de 15 cepas aisladas. Arrojaron que el 73,33% son positivos y 26,67% negativos para la prueba de catalasa, en la prueba de la ureasa se observó que el 86,67% de cepas aisladas es negativo y 13,33% positivo, mientras en la prueba del citrato 93,33% dio como negativo y 6,67% como positivo.

Con los resultados obtenidos en este estudio se compararon con la información bibliográfica, donde las cepas bacterianas podrían pertenecer a los siguientes géneros: *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Citrobacter* y *Pseudomonas*.

Finalmente se escogieron 4 cepas aisladas que tenían características diferentes para su posterior secuenciación, 1 cepa (R1_M1.3) del primer muestreo y 3 cepas (R1_2M1.3, R1_2M2.1, R1_2M3.1) del segundo muestreo.

3.7. Caracterización molecular

3.7.1. Extracción de ADN

Para la identificación molecular, los valores de ADN extraídos fueron de alta calidad. Para evaluar la pureza de ADN se utilizó la relación de absorbancias 260/280, finalmente las concentraciones del ADN fueron ajustadas a 20ng/uL para la amplificación mediante PCR.

3.7.2. Amplificación del gen *rpoB* y *16S rRNA*

Se amplificó el gen *rpoB* de las muestras R1_M1.3, R1_2M1.3, R1_2M3.1 y el gen *16S* de la muestra R1_2M2.1 utilizando primers universales *rpoB*-F/R y 27F/1492R, para poder visualizar se corrió una electroforesis con un marcador molecular de 100pb Opti-DNA Marker, las bandas obtenidas muestran un peso aproximadamente de 1200pb como se muestra en la figura 3-3.

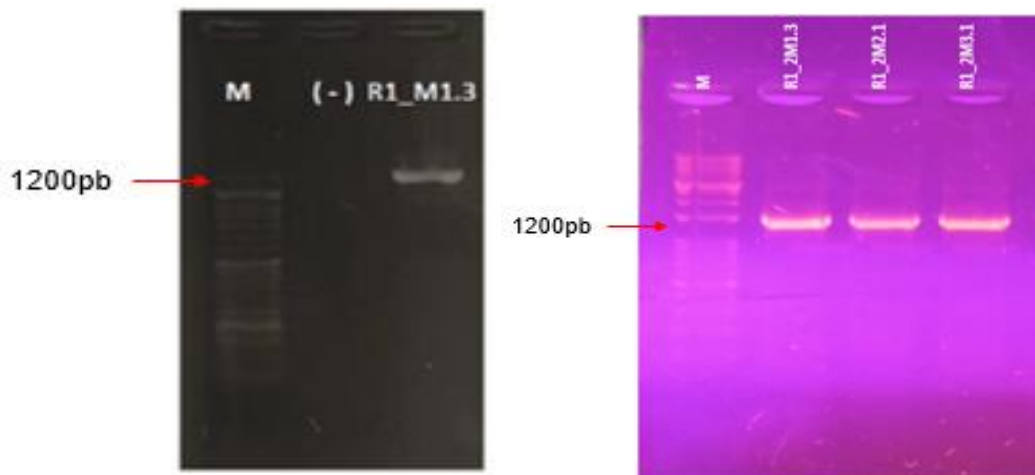


Figura 3-3: Gen *rpoB* de cepas (R1_M1.3, R1_2M1.3, R1_2M3.1) y gen *16S* de cepa (R1_2M2.1).

Nota: M marcador molecular, (-): control negativo

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

3.7.3. Análisis de similitud

Las secuencias consenso obtenidas del software Geneious se analizaron utilizando la herramienta Nucleotide BLAST (blastn) en NCBI y se compararon con secuencias de cepas bacterianas encontradas en el sistema. En la tabla 5-3 se encuentran los principales grupos de bacterias obtenidas en la fuente geotermal Aluchán.

Tabla 5-3: Microorganismos identificados en la fuente geotermal Aluchán

Cepa	Organismos más próximos	Número de acceso (NCBI)	Query Coverage	Percent Identity	Phylum
R1_M1.3	<i>Bacillus subtilis</i>	CP051306.1	100%	99.9%	Firmicutes
R1_2M1.3	<i>Vogesella sp.</i>	CP085530.1	100%	90.71%	Proteobacteria
R1_2M2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MT613456.1	100%	100%	Firmicutes
R1_2M3.1	<i>Vogesella sp.</i>	CP085530.1	100%	90.58%	Proteobacteria

Realizado por: (Umajinga, Oscar, 2022).

3.7.3.1. *Bacillus subtilis*

Es un bacilo aerobio Gram positivo, que crece en un rango de temperatura de 25 a 45°C. Son microorganismos que tienen la capacidad de formar esporas que pueden sobrevivir a circunstancias adversas (alta temperatura, desecación y UV), por esta razón se pudo identificar esta bacteria en la fuente geotermal Aluchán a 43°C. Se puede aislar de muchos entornos terrestres y acuáticos (Earl et al., 2008, p. 23).

La comparación de secuencias de genes *rpoB* indica que la cepa R1_M1.3 representa a un miembro del *Bacillus subtilis*, pertenece a la clase Bacilli de la familia Bacillaceae con un porcentaje de identidad de 99.9%, se trata de una secuencia con una extensión de 1028pb, es un ADN lineal, tiene proteínas de 446 aminoácidos y el contenido de Guanina (G) y Citosina (C) es de 43.6%.

Es una bacteria con diversas aplicaciones, desde la producción de enzimas (como amilasas, lipasas, proteasas y DNAsas) y la fermentación de alimentos hasta el control biológico de plantas. Las biopelículas formadas por *B. subtilis* es de gran importancia industrial ya que ayuda a la reducción de la corrosión del acero (Kunst et al., 1997, p. 254).

A partir de una fuente geotermal a 38°C en Malasia fue aislado e identificado *B. subtilis* con un porcentaje de similitud de 97-99%, reportándolo como un microorganismo productor de enzimas lipolíticas (Hernández, 2016, p. 135).

La presencia de este microorganismo en la fuente geotermal Aluchán coincide con la investigación realizado por Arias (2016, p. 63) en la fuente geotermal Papallacta (54°C) y Guapante (30°C), donde también se identificó *B. subtilis* con un porcentaje de similitud de 100%.

3.7.3.2. *Staphylococcus epidermidis*

Bacteria en forma de coco Gram positivo, aerobio, coagulasa negativa y catalasa positiva que crece en un amplio rango de temperatura de 10 a 50°C. Es un patógeno que forma biopelículas,

el cual se adhiere fuertemente a los dispositivos médicos que utilizan los pacientes como prótesis, válvulas, tubos de diálisis, etc. causando graves infecciones (Moreno y Ruiz, 2007, p. 35).

La comparación de secuencias de genes 16S rRNA indica que la cepa R1_2M2.1 representa a un miembro del *Staphylococcus epidermidis*, pertenece a la clase Bacilli de la familia Staphylococcaceae con un porcentaje de identidad de 100%, se trata de una secuencia con una extensión de 1275pb y es un ADN lineal.

Estas bacterias sintetizan enzimas como lipasas y hemolisinas. Las lipasas tienen diversas aplicaciones tales como hidrólisis de grasas en la elaboración de detergentes, tratamiento de aguas residuales, en la industria farmacéutica se utilizan como catalizadores, etc. (Aceves y Castañeda, 2012, p. 138). Mientras que la hemolisina tiene aplicaciones potenciales en la producción de vacunas (Bakás et al., 2015, p. 54).

En el estudio realizado por Guallpa (2016, p. 35) en aguas termales de Cununyacu, provincia de Pichincha también se reportó esta bacteria, lo cual concuerda con la presente investigación.

3.7.3.3. *Vogesella sp*

Es un bacilo Gram negativo en forma de bastón, aerobio o anaerobio facultativo. No existe mucha información, *Vogesella perlucida*, fue identificado por primera vez en 2008 en una fuente termal en Taiwán, la cual fue reportada como positivo para lipasa, catalasa y oxidasa. Y no existen casos reportados de enfermedades causados por *Vogesella* (Yu et al., 2020, p. 32).

La comparación de secuencias de genes rpoB indica que la cepa R1_2M1.3 representa a un miembro del *Vogesella sp.*, pertenece a la clase Betaproteobacteria de la familia Chromobacteriaceae con un porcentaje de identidad de 90.71%, se trata de una secuencia con una extensión de 1441pb, es un ADN lineal, tiene proteínas de 1391 aminoácidos y el contenido de Guanina (G) y Citosina (C) es de 62.95%. Tiene una similitud con *Pseudogulbenkiania sp.* (88.76%) y *Aquitalea sp.* (88.56%).

El rango de temperatura de crecimiento del género *Vogesella* en agua de manantial es de 10 a 45° con un pH de 7 a 9 (Lan et al., 2020, p. 57).

En el estudio realizado por Villalba et al. (2017, p. 25) en la Patagonia, Argentina se aisló de la muestra de agua una bacteria productora de pigmento azul (llamado indigoidina) y a través de análisis molecular se identificó como *Vogesella sp.*

Las aplicaciones de este microorganismo aún se deben explorar, pero existen estudios donde reportan a *Vogesella* como un potencial productor de indigoidina un pigmento azul que utiliza en la industria textil (Pinker, 2021, p. 124).

Las enzimas termoestables aisladas de *Bacillus subtilis* son amilasas, proteasas y lipasas, mientras que las aisladas de *Staphylococcus epidermidis* son lipasas. Estas enzimas tienen diversas

aplicaciones en la industria. Las amilasas son activas a temperaturas entre 30 y 60°C y se utilizan principalmente en la industria de almidón y textil en el proceso de descolado (Valderruten, 2021, p. 58).

Las proteasas se utilizan en la industria alimentaria y como aditivos en detergentes. Las lipasas se encuentran entre las enzimas más prometedoras en la industria debido a su mayor estabilidad a altas temperaturas. En la industria alimentaria se utilizan para el hidrólisis de grasas, principalmente en la elaboración de productos lácteos (Oliart et al., 2016, p. 26).

En el presente trabajo se realizó la amplificación de los genes *rpoB* y 16S rRNA. El gen *rpoB* codifica la subunidad β de la ARN polimerasa de bacterias y plantas, que actualmente se utiliza el gen como un código de barras genético (barcode) para la identificación taxonómica de plantas (Navarrete y Suasnavas, 2015, p. 55). El gen 16S rRNA tiene aplicaciones en estudio de la composición de la microbiota en los campos de la microbiota del intestino, la piel, la cavidad oral, suelo, etc., lo que proporciona nueva información para la composición taxonómica de las comunidades bacterianas (Martínez, 2019, p. 59).

CONCLUSIONES

Las características fisicoquímicas de muestras de agua de la fuente geotermal Aluchán presenta los siguientes valores: temperatura 43°C, pH 6.82, conductividad 1287 $\mu\text{S}/\text{cm}$, calcio 30.58mg/L, magnesio 20.75 mg/L, cloruros 107.03 mg/L, sodio 170 mg/L, potasio 5 mg/L, fosfatos <0.10 mg/L, nitritos <0.05 mg/L, sulfatos 135.21 mg/L, hierro total 0.72 mg/L, cobre <0,01 mg/L, arsénico 0.50 mg/L, con lo se concluye que las aguas de dicha fuente poseen condiciones adecuadas para el crecimiento de microorganismos termófilos.

Se aislaron 15 cepas bacterianas las cuales crecieron en el medio de cultivo LB. Se realizó la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas, del total, el 100% resultó ser Gram positivas, de las cuales el 86.67% son bacilos y 13.33% cocos.

Para la identificación molecular se amplificó el gen *rpoB* y el gen 16S mediante PCR usando los primers universales *rpoB*-F/R, 27F/1492R y se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1200pb, lo cual permitió su secuenciación e identificación molecular de 4 cepas donde se obtuvo las especies: *Bacillus subtilis* (99.9%), *Vogesella sp.* (90.71%), *Vogesella sp.* (90.58%), *Staphylococcus epidermidis* (100%).

Las bacterias aisladas de la fuente geotermal Aluchán poseen potenciales aplicaciones biotecnológicas encontradas en la investigación bibliográfica realizada, principalmente por la producción de enzimas termoestables, lo que contribuyen a mejorar la eficiencia de diversos procesos industriales.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una secuenciación masiva, con el fin de identificar las comunidades microbianas no cultivables presentes en la fuente geotermal Aluchán.

Se recomienda evaluar la resistencia de las bacterias a antibióticos.

Se recomienda extraer enzimas termoestables, debido a su potencial aplicación industrial y biotecnológica.

BIBLIOGRAFÍAS

ACEVES, A. y CASTAÑEDA, L., PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LIPASAS MICROBIANAS, UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA LA UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. 2012. *Vitae* [en línea], vol. 19, no. 3, pp. 244-247. [Consulta: 24 febrero 2022]. ISSN 0121-4004. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-40042012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

ACUERDO MINISTERIAL 097., NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES: RECURSO AGUA. [en línea], pp. 21. 2015. Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu155128.pdf>.

ALONSO, J., *Cómo hacer compost* [en línea]. España: Editorial Paraninfo. ISBN 978-84-8476-430-4. 2011. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=Zx0jXU7aGfUC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

ANDUEZA, F., et al., DIVERSIDAD BACTERIANA EN AGUAS MINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO “URAUCO”. PICHINCHA. ECUADOR. 2020. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* [en línea], no. 86(01), pp. 19-28. [Consulta: 24 noviembre 2021]. ISSN 1697-428X. DOI 10.53519/analesranf.2020.86.01.03. Disponible en: https://analesranf.com/wp-content/uploads/2020/86_01/8601_ar03.pdf.

ANGARITA, M., et al., Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. 2017. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* [en línea], vol. 16, no. 5, pp. 796-807. [Consulta: 21 junio 2021]. ISSN 1729-519X. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2017000500012&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

ANWAR, U., ZWAR, I. y DE SOUZA, A., Chapter 12 - Biomolecules produced by extremophiles microorganisms and recent discoveries. 2020. En: A.G. RODRIGUES (ed.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* [en línea]. S.l.: Elsevier, pp. 247-270. [Consulta: 20 mayo 2021]. ISBN 978-0-444-64301-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444643018000123>.

APELLA, M. y ARAUJO, P., Microbiología de agua. Conceptos básicos. 2005. [en línea], pp. 18. Disponible en: https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf.

ARIAS, J., *Aislamiento e identificación de bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta* [en línea]. 2016. S.l.: ESPE. [Consulta: 21 febrero 2022]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/11850/T-ESPE-053265.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

BAKÁS, L., et al., Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. 2015. [en línea], vol. 47. [Consulta: 24 febrero 2022]. ISSN 0325-2957. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53529348012.pdf>.

BELKOVA, N., et al., Activity of bacteria in water of hot springs from Southern and Central Kamchatskaya geothermal provinces, Kamchatka Peninsula, Russia. 2007. *Microbiological Research* [en línea], vol. 162, no. 2, pp. 99-107. [Consulta: 15 junio 2021]. ISSN 0944-5013. DOI 10.1016/j.micres.2006.01.006. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501306000085>.

BERENGUER, J., Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas. *Spanish Society of Microbiology*. 2014. [en línea]. [Consulta: 17 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.sem microbiologia.org/subgrupos-especializados/biotecnologia-y-genetica-de-bacterias-termofilas-extremas>.

BIO-RAR., Simmons Citrate. 2005. [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 17 diciembre 2021]. Disponible en: https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/61834_11_2005_ES.pdf.

BOLAÑOS, J., Determinación de cationes en agua potable del cantón de Grecia, Costa Rica por absorción atómica. 2014. *InterSedes* [en línea], vol. 15, no. 30. [Consulta: 19 noviembre 2021]. ISSN 2215-2458. DOI 10.15517/isucr.v15i30.14871. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/666/66631279005.pdf>.

BOLAÑOS, J., CORDERO, G. y SEGURA, G., Determinación de nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos en agua potable como indicadores de contaminación ocasionada por el hombre, en dos cantones de Alajuela (Costa Rica). 2017. *Revista Tecnología en Marcha* [en línea], vol. 30, no. 4, pp. 15. [Consulta: 25 noviembre 2021]. ISSN 2215-3241, 0379-3982. DOI

10.18845/tm.v30i4.3408. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v30n4/0379-3982-tem-30-04-15.pdf>.

BOU, G., et al., Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea]. 2011. vol. 29, no. 8, pp. 601-608. [Consulta: 22 diciembre 2021]. ISSN 0213005X. DOI 10.1016/j.eimc.2011.03.012. Disponible en:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

BOUZAS, T. de M., VELAZQUEZ, J. y GONZALEZ, T., Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review. *Protein and Peptide Letters* [en línea]. 2006. vol. 13, no. 7, pp. 645-651. DOI 10.2174/092986606777790548. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ppl/2006/00000013/00000007/art00001>.

BURBANO, N., et al., *INTRODUCCIÓN A LA HIDROLOGÍA DEL ECUADOR*. [en línea]. 2015. S.l.: s.n. [Consulta: 27 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ppl/2006/00000013/00000007/art00001>.

BRITANIA., *Urea Agar Base*. [en línea]. 2015. S.l.: s.n. [Consulta: 17 diciembre 2021]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e95043249.pdf.

CANGAHUAMIN, S., *Calidad fisicoquímica y microbiológica de las aguas termales del “Complejo Turístico Santa Catalina”, ubicado en Papallacta, provincia de Napo. Ecuador* [en línea]. 2021. S.l.: UCE. [Consulta: 24 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24373/1/UCE-FIGEMPA-CANGAHUAMIN%20SILVIA.pdf>.

CANGANILLA, F. y WIEGEL, J., Anaerobic Thermophiles. *Life* [en línea]. 2014. vol. 4, no. 1, pp. 77-104. [Consulta: 20 mayo 2021]. DOI 10.3390/life4010077. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-1729/4/1/77>.

CARRERA, D. y GUEVARA, P., *FUENTES TERMALES DEL ECUADOR* [en línea]. 2017. S.l.: s.n. ISBN 978-9978-301-98-2. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/312610330_FUENTES_TERMALES_DEL_ECUADOR.

CASTILLO, F., *Biotecnología ambiental* [en línea]. 2005. S.l.: Editorial Tebar. ISBN 978-84-7360-211-2. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&pg=PA379&dq=microorganismos+extremofilos&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj0pNCKw67wAhUIKVkFHfawCdQQ6AEwAHoECAAQA#v=onepage&q=microorganismos%20extremofilos&f=false>.

CARRASCO, J., et al., *Identificación de microorganismos.* [en línea]. 2020. S.l.: s.n. [Consulta: 16 junio 2021]. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/67169/NR42415.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

CHAUCALÁ, S., *ESTUDIO DE LA CALIDAD AMBIENTAL DE LAS AGUAS TERMALES DEL BALNEARIO “EL TINGO”* [en línea]. 2018. S.l.: UCE. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16288/1/T-UCE-0012-FIG-030.pdf>.

COCOLIN, L., DOLCI, P. y KALLIOPI, R., Métodos independientes y dependientes de cultivo para estudiar y caracterizar la ecología microbiana en la fermentación vínica. [en línea]. 2010. [Consulta: 1 julio 2021]. Disponible en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/ecologia_microbiana_fermenta_2cienc0810.htm.

CRESPO, C., *Selección, aislamiento e identificación de microorganismos anaerobios termófilos productores de etanol* [en línea]. 2009. Thesis. S.l.: s.n. [Consulta: 20 mayo 2021]. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/bitstream/handle/123456789/781/TM-1756.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

CURTIS, H. y SCHNEK, A., *Curtis. Biología* [en línea]. 2008. Sexta. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-0334-8. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=mGadUVpdTLsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

DELGADILLO, O., et al., *Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales* [en línea]. 2010. Bolivia: Nelson Antequera. ISBN 978-99954-766-2-5. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=1kO2J5aDljQC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

EARL, A., LOSICK, R. y KOLTER, R., Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* [en línea]. 2008. vol. 16, no. 6, pp. 269-275. [Consulta: 9 febrero 2022]. ISSN 0966-842X. DOI 10.1016/j.tim.2008.03.004. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X08000887>.

ESPINAL, G., *Manual de prácticas de microbiología I* [en línea]. 2005. Primera. S.l.: INTEC. ISBN 978-99934-25-59-5. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=q1gALTKvynsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

FARÍAS, M. y CONTRERAS, M., *Extremofilos y Origen de la Vida en Atacama* [en línea]. 2018. Chile: s.n. ISBN 978-956-393-298-0. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326813121_Extremofilos_y_Origen_de_la_Vida_en_Atacama.

FAZ, V., *Aislamiento e identificación de bacterias termófilas provenientes de la fuente geotermal Papallacta ubicada en la provincia de Napo* [en línea]. 2018. S.l.: UDLA. [Consulta: 18 noviembre 2021]. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10618/1/UDLA-EC-TIB-2018-34.pdf>.

GALARZA, M., et al., Diagnóstico molecular de tuberculosis multidrogorresistente en muestras de esputo mediante el análisis de curvas de melting. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [en línea]. 2018. vol. 35, no. 3, pp. 433. [Consulta: 14 febrero 2022]. ISSN 1726-4642, 1726-4634. DOI 10.17843/rpmesp.2018.353.3402. Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/2018.v35n3/433-440>.

GARCÍA, C., *INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA* [en línea]. 2004. Segunda. S.l.: EUNED. ISBN 978-9968-31-358-2. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=K_ETVnqnMZIC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

GARCÍA, J. y SILVA, C., *Manual Del Técnico Superior de Laboratorio de Analisis Clinicos* [en línea]. 2004. Primera. España: MAD-Eduforma. ISBN 978-84-665-1376-0. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=WB3lngLAYjAC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

GARRITY, G., BELL, J. y LILBURN, T., *TAXONOMIC OUTLINE OF THE PROKARYOTES BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* [en línea]. 2004. Segunda. Estados Unidos: s.n. Disponible en: <https://laurieximenez.files.wordpress.com/2012/02/3-taxonomia-de-prokaryotes-bergeys-msb-2004.pdf>.

GOMES, A. y KORF, B., Chapter 5 - Genetic Testing Techniques. *Pediatric Cancer Genetics* [en línea]. 2018. S.l.: Elsevier, pp. 47-64. [Consulta: 24 junio 2021]. ISBN 978-0-323-48555-5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323485555000053>.

GOMEZ, A., *Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento microbiano y perfil de actividad enzimática de dos Geobacillus aislados del volcán "el chichón"* [en línea]. 2017. México: Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. [Consulta: 28 junio 2021]. Disponible en: <https://1library.co/document/qo36w3jq-influencia-crecimiento-microbianoy-actividad-enzimatica-geobacillus-aislados-chichon.html>.

GÓMEZ, F., *Guía introductoria al tema vida en ambientes extremos.pdf* [en línea]. 2016. S.l.: s.n. [Consulta: 14 mayo 2021]. Disponible en: <http://programainvestiga.org/pdf/guias2016-17/Guia%20introductoria%20al%20tema%20vida%20en%20ambientes%20extremos.pdf>.

GONZÁLEZ, M. y LEZANA, J., TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS). [en línea]. 2017. Disponible en: <https://www.seqc.es/download/tema/25/5627/786418279/826284/cms/tema-5-tecnicas-de-secuenciacion-masiva-ngs.pdf/>.

GUALPA, S., *ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES DEL BALNEARIO CUNUNYACU UBICADO EN LAS FALDAS NOROCCIDENTALES DEL CERRO ILALÓ DE LA PARROQUIA TUMBACO PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE PICHINCHA* [en línea]. 2016. S.l.: EPOCH. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6335/1/56T00677.pdf>.

HAKI, G.D. y RAKSHIT, S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* [en línea]. 2003. vol. 89, no. 1, pp. 17-34. [Consulta: 11 junio 2021]. ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/S0960-8524(03)00033-6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852403000336>.

HERNÁNDEZ, S., *Aislamiento, caracterización e identificación molecular de microorganismos productores de lipasas nativos del estado de Sinaloa* [en línea]. 2016. México: Instituto

Politécnica Nacional. Disponible en:
<http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/117/1/Tesis%20Final%20Sandy%20Hern%C3%A1ndez%20231116.pdf>.

JIMÉNEZ, P., *DIAGNÓSTICO DE LA PRESENCIA Y CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO EN EL SUELO Y AGUA DE CONSUMO EN LA PARROQUIA PAPALLACTA* [en línea]. 2018. Quito: EPN. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/19760/1/CD-9167.pdf>.

KALMAN, B., *Los Volcanes de la Tierra* [en línea]. 2009. S.l.: Crabtree Publishing Company. ISBN 978-0-7787-8244-5. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=EiehuWafjxoC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

KONEMAN, E. y ALLEN, S., *Diagnostico Microbiologico* [en línea]. 2008. Sexta. S.l.: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-0895-4. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

KUNST, F., OGASAWARA, N. y MOSZER, I., The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* [en línea]. 1997. vol. 390, no. 6657, pp. 249-256. [Consulta: 9 febrero 2022]. ISSN 1476-4687. DOI 10.1038/36786. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/36786.pdf>.

LABRADOR, C., *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS TERMOFÍLICOS ANAEROBIOS LIPOLÍTICOS, PROTEOLÍTICOS Y AMIOLÍTICOS DE MANANTIALES TERMOMINERALES DE PAIPA E IZA (BOYACÁ)* [en línea]. 2006. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8265/tesis249.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

LAN, K., et al., *Vogesella urethralis* sp. nov., isolated from human urine, and emended descriptions of *Vogesella perlucida* and *Vogesella mureinivorans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea]. 2020. vol. 70, no. 1, pp. 624-630. [Consulta: 24 febrero 2022]. ISSN 1466-5034, DOI 10.1099/ijsem.0.003802. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.003802>.

LOPARDO, H., PREDARI, S. y VAY, C., *MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA* [en línea]. 2016. 1. Buenos Aires: s.n. ISBN 978-987-26716-8-6. Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>.

LÓPEZ, M. del M., *Identificación y caracterización de comunidades microbianas presentes en pinturas sobre lienzo: estudio de su capacidad como agentes de biodeterioro* [en línea]. 2012. Granada: Universidad de Granada. Disponible en: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/19686/20102410.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

LOZANO, J., LOS EXTRAÑOS EXTREMÓFILOS. [en línea]. 1997. [Consulta: 11 junio 2021]. Disponible en: https://www.um.es/lafem/DivulgacionCientifica/CienciaySalud/Portalyblog/cienciaysalud.laverdad.es/8_4_5.html.

MACFADDIN, J., *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* [en línea]. 2003. Tercera. S.l.: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-1572-3. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

MAIER, R. y NEILSON, J., Chapter 7 - Extreme Environments. *Environmental Microbiology (Third Edition)*. [en línea]. 2015. San Diego: Academic Press, pp. 139-153. [Consulta: 20 mayo 2021]. ISBN 978-0-12-394626-3. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123946263000077>.

MARTÍNEZ, J., METAGENÓMICA DE RNA RIBOSOMAL 16S (16S rRNA) COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN MICROBIOLOGÍA: MÉTODOS Y APLICACIONES BASADOS EN NEXT-GENERATION SEQUENCING. [en línea]. 2019. pp. 5. Disponible en: https://www.colmayor.edu.co/wp-content/uploads/2019/10/234_metagenmica_de_rna_ribosom_zj2sl.pdf.

MIRANDA, Á. y JUTGLAR, L., *Técnicas de Calefacción* [en línea]. 2010. S.l.: Marcombo. ISBN 978-84-267-1648-4. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=Rqe8coICvwcC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

MONROE, J., WICANDER, R. y POZO, M., *Geología. Dinámica y evolución de la tierra* [en línea]. 2008. Cuarta. España: Editorial Paraninfo. ISBN 978-84-9732-459-5. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=z54Pu6w_UwAC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

MOREJÓN, L. y PARDO, E., *TEXTO DE MICROBIOLOGIA I* [en línea]. 2008. Nicaragua: Universidad Nacional Agraria. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/35166259.pdf>.

MORENO, M. y RUIZ, E., Staphylococcus epidermidis formador de biofilm en blefaroconjuntivitis. *Rev Med Hosp Gen Mex* [en línea]. 2007. vol. 70, pp. 6. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2007/hg071e.pdf>.

NAQUICHE, A., *Aislamiento e identificación de bacterias termófilas productoras de proteasas provenientes de los geiseres de Calientes, Candarave Tacna – Perú* [en línea]. 2014. Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN. [Consulta: 21 mayo 2021]. Disponible en: <https://1library.co/document/zx5kr9oq-aislamiento-identificacion-bacterias-termofilas-productoras-provenientes-calientes-candarave.html>.

NARANJO, Y., *IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y ALGAS MESÓFILOS Y TERMÓFILOS DE LAS FUENTES GEOTERMALES: EL RIÑÓN-PROVINCIA DEL AZUAY Y GUAPÁN-PROVINCIA DEL CAÑAR* [en línea]. 2017. Quito: ESPE. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/13250/1/T-ESPE-057293.pdf>.

NAVARRETE, S. y SUASNAVAS, B., *Análisis filogenético de quinua silvestre (Chenopodium quinoa Willd) utilizando el gen rpoB en muestras provenientes de las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo* [en línea]. 2015. Quito: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA. [Consulta: 26 febrero 2022]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9408/1/UPS-QT07129.pdf>.

NAVAS, L., et al., Identificación de genes codificantes de enzimas de interés industrial en una cepa de bacteria termofílica aislada de aguas termales de Salta (Argentina). *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias* [en línea]. 2014. vol. 40, no. 1, pp. 46-53. [Consulta: 18 mayo 2021]. ISSN 0325-8718, 1669-2314. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86430499009>.

NAVAS, M., *ESTUDIO DE FACTIBILIDAD PARA LA CREACIÓN DE PISCINAS DE AGUAS TERMALES EN ALUCHÁN, COMUNIDAD DE RUMIQUINCHA, PARROQUIA CUSUBAMBA,*

CANTÓN SALCEDO, PROVINCIA DE COTOPAXI [en línea]. 2010. Quito: UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL. Disponible en: <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/1629>.

NTE-INEN-2169., *AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS.* [en línea]. 2013. S.l.: s.n. [Consulta: 28 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.trabajo.gob.ec/wp-content/uploads/2012/10/NTE-INEN-2169-AGUA.-CALIDAD-DEL-AGUA.-MUESTREO.-MANEJO-Y-CONSERVACI%C3%93N-DE-MUESTRAS.pdf?x42051>.

NTE-INEN-2176., *AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. TÉCNICAS DE MUESTREO.* [en línea]. 2013. S.l.: s.n. [Consulta: 28 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.trabajo.gob.ec/wp-content/uploads/2012/10/NTE-INEN-2176-AGUA.-CALIDAD-DEL-AGUA.-MUESTREO.-T%C3%89CNICAS-DE-MUESTREO.pdf?x42051>.

OLIART, R., MANRESA, Á. y SÁNCHEZ, M., Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT* [en línea]. 2016. vol. 11, no. 1, pp. 79-90. [Consulta: 11 junio 2021]. ISSN 2007-7858. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v11n1/2007-7858-cuat-11-01-00079.pdf>.

OLLIVIER, B., PATEL, B. y GARCIA, J., Anaerobes from Extreme Environments. *Journey to Diverse Microbial Worlds: Adaptation to Exotic Environments* [en línea]. 2000. Dordrecht: Springer Netherlands, Cellular Origin and Life in Extreme Habitats, pp. 73-90. [Consulta: 17 mayo 2021]. ISBN 978-94-011-4269-4. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-94-011-4269-4_6.

OMS, *Guías para la calidad del agua potable* [en línea]. 2006. Tercera. S.l.: s.n. ISBN 92-4-154696-4. Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowsres.pdf.

OVANDO, S., et al., Characterization of Thermophilic Microorganisms in the Geothermal Water Flow of El Chichón Volcano Crater Lake. *Water* [en línea], 2020. vol. 12, no. 8, pp. 2172. [Consulta: 11 mayo 2021]. DOI 10.3390/w12082172. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/8/2172>.

PANDA, A., et al., Chapter 13 - Microbial Diversity of Thermophiles Through the Lens of Next Generation Sequencing. *Microbial Diversity in the Genomic Era* [en línea]. 2019. S.l.: Academic

Press, pp. 217-226. [Consulta: 20 mayo 2021]. ISBN 978-0-12-814849-5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128148495000137>.

PASCUAL, M. del R. y CALDERÓN, V., *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas* [en línea]. 1999. Segunda. España: Ediciones Díaz de Santos. ISBN 978-84-7978-424-9. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=9EIfkks8uxMC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

PEDROSA, A., Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey* [en línea], 1999. vol. 3, no. 2, pp. 0-0. [Consulta: 21 junio 2021]. ISSN 1025-0255. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/amc/v3n2/amc110299.pdf>.

PIMIENTA, J., *La captación de aguas subterráneas* [en línea]. 1980. Segunda. España: Reverte. ISBN 978-84-7146-186-5. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=OPj61eak4ycC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

PINEDO, S. y BALL, E., Secuenciación de nueva generación: utilidad en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana* [en línea]. 2020. vol. 48, no. 1, pp. 47-62. [Consulta: 25 junio 2021]. ISSN 0210-5187. DOI 10.35366/93979. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2020/mc201h.pdf>.

PINKER, Científicos del KIST usan bacterias para producir pigmentos índigo. *Pinker Moda - Noticias del sector Textil/Moda* [en línea]. 2021. [Consulta: 25 febrero 2022]. Disponible en: <https://pinkermoda.com/kist-pigmento-indigo-de-bacterias/>.

PINZÓN, D., et al., Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: Isolation and potential applications. *Environmental technology* [en línea], 2010. vol. 31, pp. 957-66. DOI 10.1080/09593331003758797. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/45387355_Thermophilic_bacteria_from_Mexican_thermal_environments_Isolation_and_potential_applications.

PÍREZ, M. y MOTA, M., Introducción e importancia del tema. [en línea]. 2006. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>.

POSADA, Y., et al., Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa, Boyacá. [en línea], 2004. no. 2, pp. 12. ISSN 0123-3475. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77660212.pdf>.

PUERTA, C. y URUEÑA, C., *Prácticas de biología molecular* [en línea]. 2005. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. ISBN 978-958-683-764-4. Disponible en: https://books.google.com/cu/books?id=pTrKpnFCIZQC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

QUERELLOU, J., Les microorganismes des milieux extrêmes : des grands fonds marins aux applications industrielles. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* [en línea], 2004. vol. 39, no. 6, pp. 397-400. [Consulta: 18 mayo 2021]. ISSN 0007-9960. DOI 10.1016/S0007-9960(04)94479-3. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007996004944793>.

RAMÍREZ, N., SERRANO, J. y SANDOVAL, H., Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea], 2006. vol. 37, no. 3, pp. 56-71. [Consulta: 11 mayo 2021]. ISSN 1870-0195,. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937307>.

REED, C., et al., Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. *Archaea* [en línea], 2013. vol. 2013, pp. e373275. [Consulta: 11 junio 2021]. ISSN 1472-3646. DOI 10.1155/2013/373275. Disponible en: <https://downloads.hindawi.com/journals/archaea/2013/373275.pdf>.

REYES, A., et al., Géneros Bacterianos Extremófilos con Potencial Aplicación Biotecnológica: Caso de Estudio. *JÓVENES EN LA CIENCIA* [en línea], 2020. vol. 8, pp. 1-6. [Consulta: 14 junio 2021]. ISSN 2395-9797. Disponible en: <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3229/2719>.

RINARDO, V., Microorganismos extremófilos. Psicrófilos y sus mecanismos de adaptación. [en línea], 2018. pp. 7. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/235852344.pdf>.

RIVAS, R., *Aislamiento e identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal "Aguas Hediondas", ubicada en la provincia Carchi, cantón Tulcán, Ecuador* [en línea]. 2017. Quito: ESPE. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/12864/1/T-ESPE-057175.pdf>.

RODRÍGUEZ, P. y ARENAS, R., Hans Christian Gram y su tinción. [en línea], 2018. vol. 16, pp. 2. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

ROMERO, Y., et al., Métodos de identificación bacteriana y sus aplicaciones en la investigación odontológica. [en línea], 2010. [Consulta: 21 junio 2021]. Disponible en: https://www.academia.edu/8981131/M%C3%A9todos_de_identificaci%C3%B3n_bacteriana_y_sus_aplicaciones_en_la_investigaci%C3%B3n_odontol%C3%B3gica.

RUIZ, E. y PORRES, N., *Microbiología clínica* [en línea]. 2018. Primera. España: Ediciones Paraninfo, S.A. ISBN 978-84-283-4026-7. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=GNBXDwAAQBAJ&pg=PA85&dq=m%C3%A9todos+de+identificaci%C3%B3n+microbiana&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjivfu6OjzAhVNTTABHU2WackQ6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=m%C3%A9todos%20de%20identificaci%C3%B3n%20microbiana&f=false>.

SALAZAR, F., *Biodecoloración de tintes sintéticos industriales por bacterias termófilas con actividad enzima tipo lacasa* [en línea]. 2017. Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN. [Consulta: 15 diciembre 2021]. Disponible en: http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1969/1229_2017_salazar_torreblanca_fv_faci_biologia%20microbiologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

SALAZAR, I., et al., Selección e identificación de una nueva bacteria productora de pectinasa a partir de fuentes geotermales. *Ciencia & Desarrollo* [en línea], 2020. no. 27, pp. 143-149. [Consulta: 11 mayo 2021]. ISSN 2617-6033. DOI 10.33326/26176033.2020.27.1004. Disponible en: <https://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/cyd/article/view/1004/1127>.

SALWAN, R. y SHARMA, V., Chapter 1 - Overview of extremophiles. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* [en línea]. 2020. S.l.: Academic Press, pp. 3-11. [Consulta: 20 mayo 2021]. ISBN 978-0-12-818322-9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128183229000010>.

SARMIENTO, F., PERALTA, R. y BLAMEY, J., Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [en línea], 2015. vol. 3. [Consulta: 11 junio 2021]. ISSN 2296-4185. DOI 10.3389/fbioe.2015.00148. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4611823/pdf/fbioe-03-00148.pdf>.

SOLÍS, Y., ZÚÑIGA, L. y MORA, D., La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y nacientes de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha* [en línea], 2018. vol. 31, no. 1, pp. 35-46. [Consulta: 17 noviembre 2021]. ISSN 0379-3982. DOI 10.18845/tm.v31i1.3495. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v31n1/0379-3982-tem-31-01-35.pdf>.

STERNER, R. y LIEBL, W., Thermophilic Adaptation of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [en línea], 2001. vol. 36, no. 1, pp. 39-106. [Consulta: 20 mayo 2021]. ISSN 1040-9238. DOI 10.1080/20014091074174. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/20014091074174>.

STETTER, K., Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters* [en línea], 1999. vol. 452, no. 1-2, pp. 22-25. [Consulta: 9 junio 2021]. ISSN 1873-3468. DOI 10.1016/S0014-5793(99)00663-8. Disponible en: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/S0014-5793%2899%2900663-8>.

SUÁREZ, C., et al., La vida a altas temperaturas: adaptación de los microorganismos y aplicación industrial de sus enzimas. [en línea]. 2004. Disponible en: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers19-10/010038178.pdf.

TOLEDO, P., *KiPU 45* [en línea]. 2005. S.l.: Editorial Abya Yala. ISBN 978-9978-22-536-3. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=lptb2tl7hT0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

TORTORA, G., FUNKE, B. y CASE, C., *Introducción a la microbiología* [en línea]. 2007. Novena. S.l.: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-0740-7. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&printsec=frontcover&dq=Introducci%C3%B3n+a+la+microbiolog%C3%ADa&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Introducci%C3%B3n%20a%20la%20microbiolog%C3%ADa&f=false.

TULSMA., [en línea]. 2011. S.l.: s.n. [Consulta: 17 noviembre 2021]. Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112180.pdf>.

TRUQUE, P., ARMONIZACION DE LOS ESTANDARES DE AGUA POTABLE EN LAS AMERICAS. [en línea]. 2012. [Consulta: 19 noviembre 2021]. Disponible en:

<https://fddocuments.ec/document/armonizacion-de-los-estandares-de-agua-potable-en-las-de-los-cuadro-comparativo.html>.

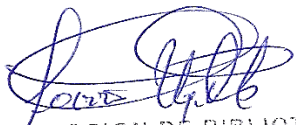
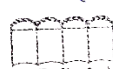
VALDERRUTEN, C., *Aplicaciones biotecnológicas en la industria textil* [en línea]. 2021. S.L.: UNIVERSIDADE DA CORUÑA. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29328/ValderrutenCordero_Clara_TFG_2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y.

VARGAS, T. y KUNO, A., Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga* [en línea], 2014. vol. 49, pp. 2594. [Consulta: 27 octubre 2021]. ISSN 2304-3768. Disponible en: http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequence=1.

VELÁSQUEZ, A., et al., Microorganismos marinos extremófilos con potencial en bioprospección. *Revista de la Facultad de Ciencias* [en línea], 2018. vol. 7, pp. 9-43. DOI 10.15446/rev.fac.cienc.v7n2.67360. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326213266_Microorganismos_marinos_extremofilos_con_potencial_en_bioprospeccion.

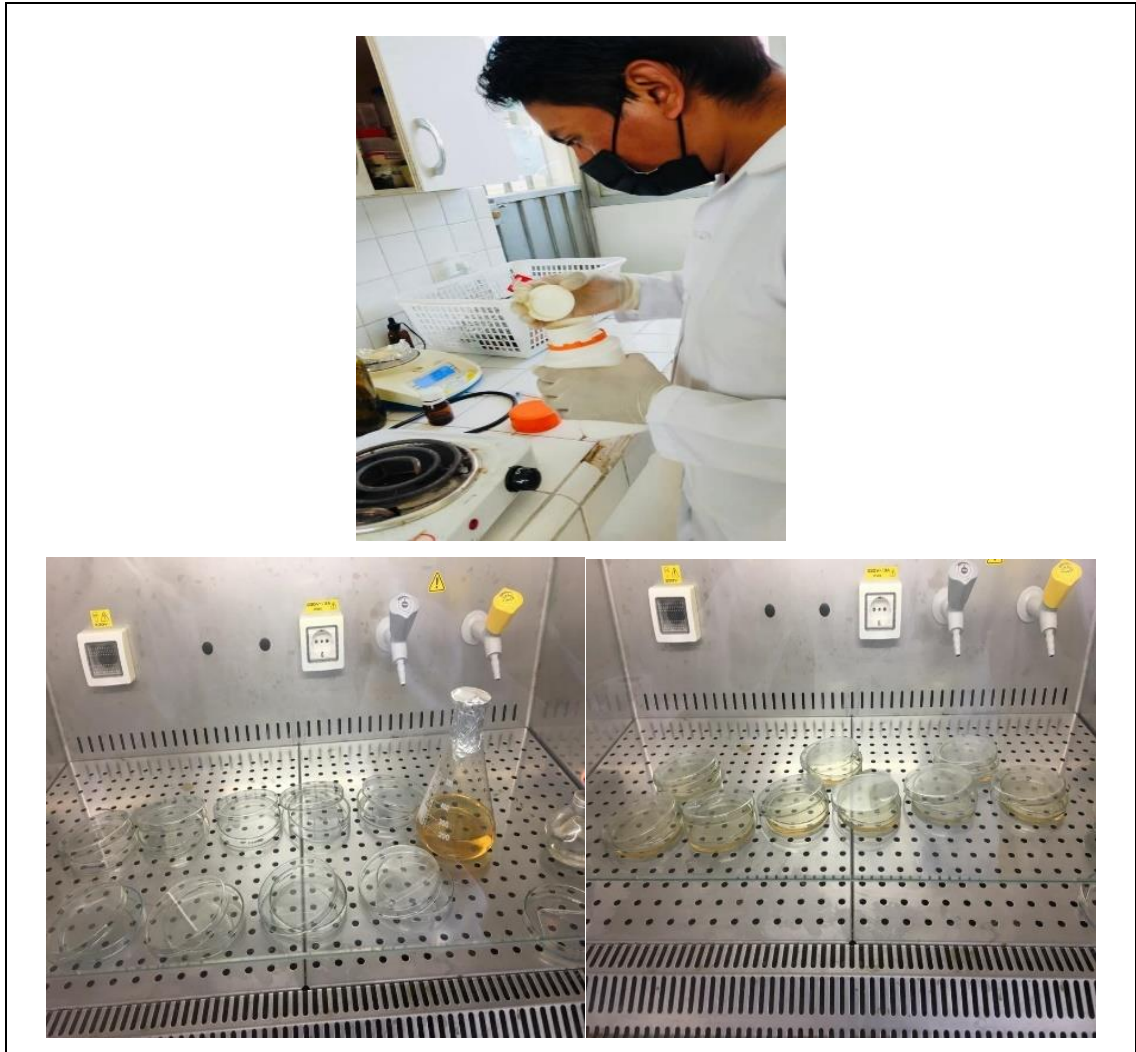
VILLALBA, M., et al., Formation of indigoidine derived-pigments contributes to the adaptation of *Vogesella* sp. strain EB to cold aquatic iron-oxidizing environments. En: Accepted: 2018-02-21T21:23:35Z [en línea], 2017. [Consulta: 24 febrero 2022]. ISSN 0003-6072. DOI 10.1007/s10482-016-0814-2. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/36942>.

YU, Z., et al., *Vogesella* perlucida-induced bacteremia in an advanced-age patient: first case report. *BMC infectious diseases* [en línea], 2020. vol. 20, no. 1, pp. 687. ISSN 1471-2334. DOI 10.1186/s12879-020-05420-w. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32948147/>.


DIRECCION DE BIBLIOTECAS
Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE
Y LA INVESTIGACION
 Ing. Jhonatan Parreno Uquillas MBA
ANALISTA DE BIBLIOTECA 1

ANEXOS

ANEXO A: PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO



ANEXO B: SITIOS DE MUESTREO



ANEXO C: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y MEDICIÓN DE TEMPERATURA Y PH



Para análisis microbiológico



Para análisis fisicoquímico

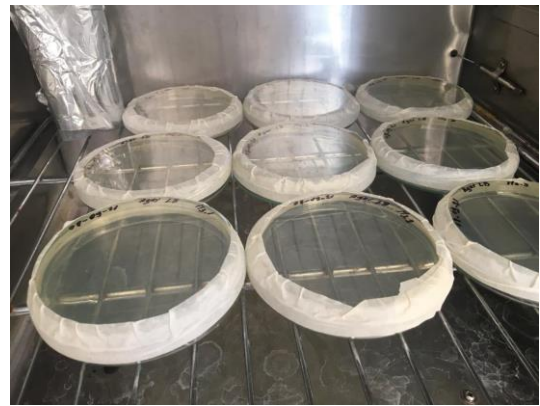


Medición de T° y pH

ANEXO D: SIEMBRA DE LAS MUESTRAS

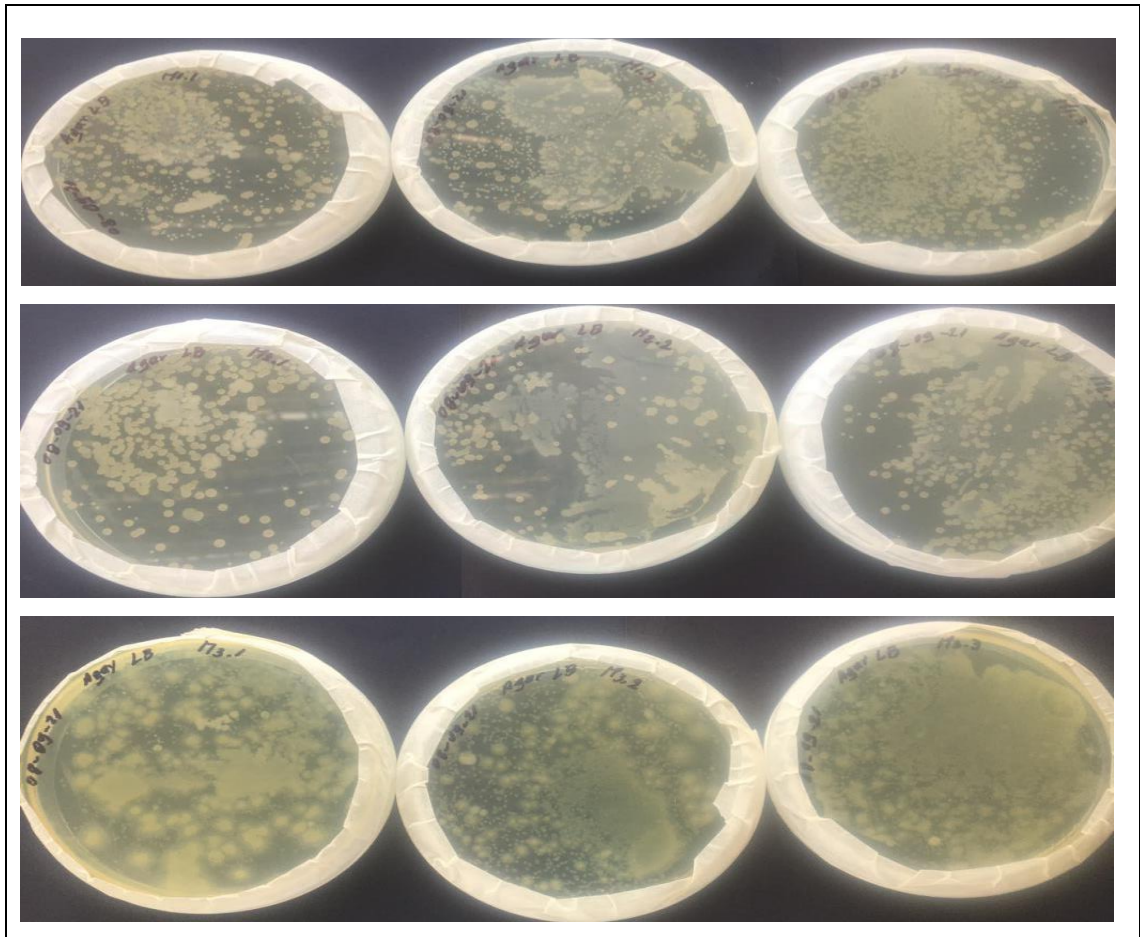


Siembra en superficie



Incubación a 37°C

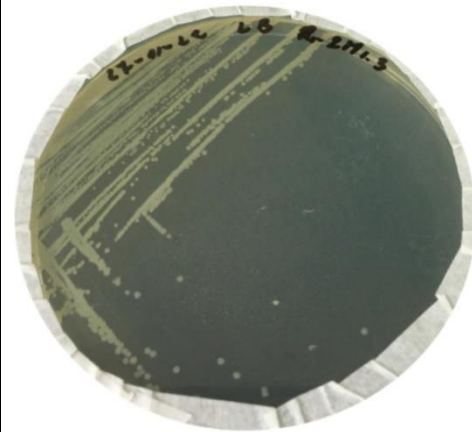
ANEXO E: CRECIMIENTO BACTERIANO



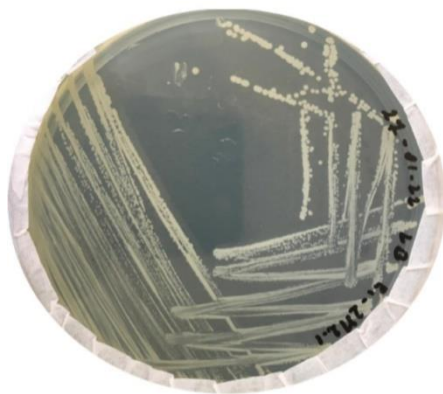
ANEXO F: COLONIAS AISLADAS



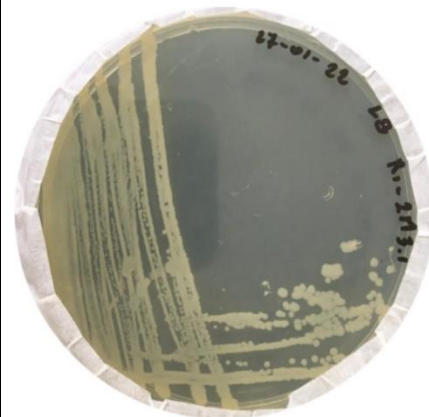
R1_M1.3



R1_2M1.3

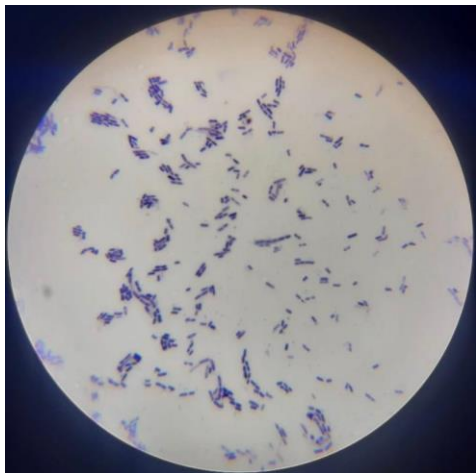


R1_2M2.1

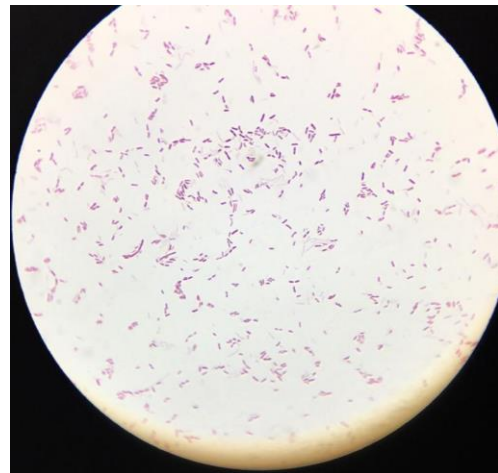


R1_2M3.1

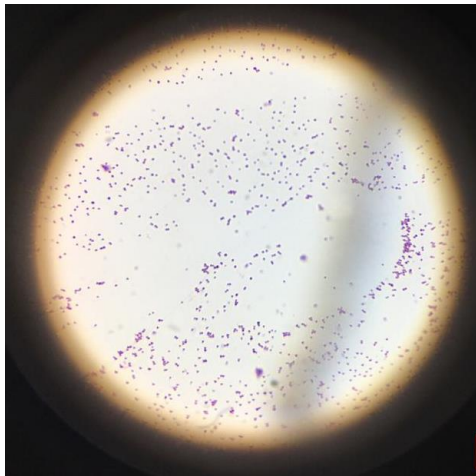
ANEXO G: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA



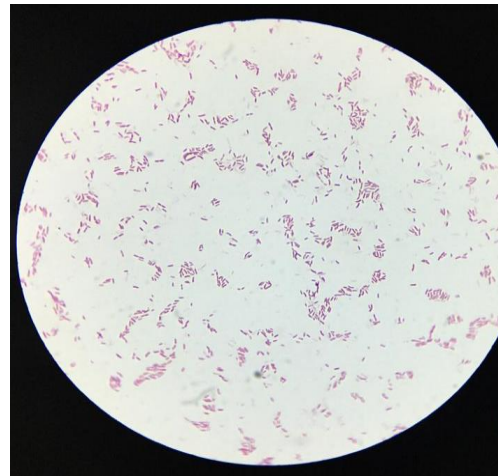
R1_M1.3



R1_2M1.3

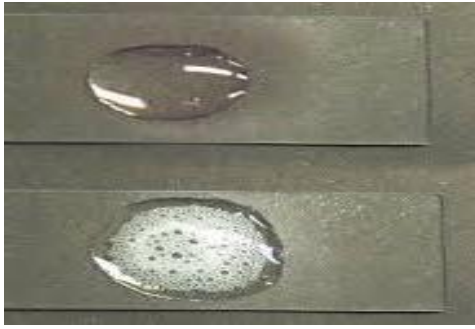


R1_2M2.1

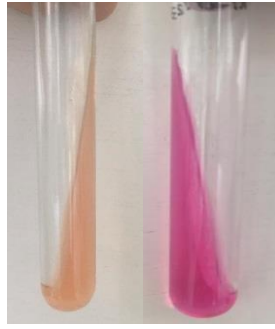


R1_2M3.1

ANEXO H: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA



Prueba de catalasa

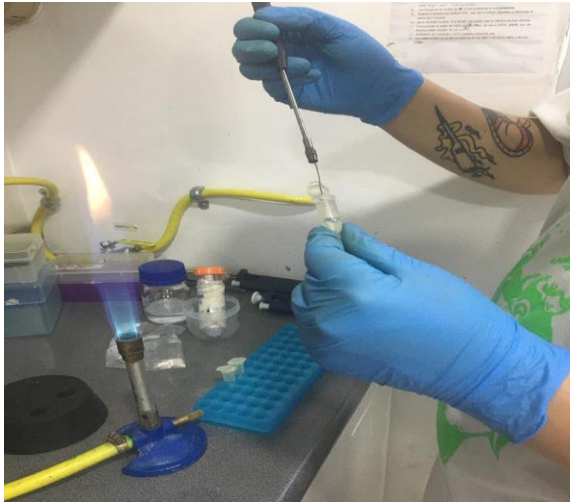


Prueba de ureasa



Prueba de citrato

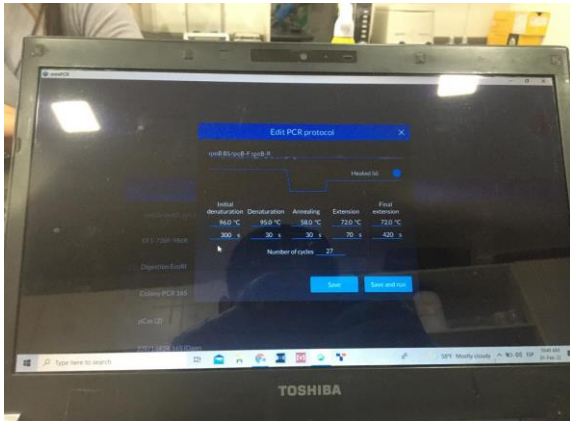
ANEXO I: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR



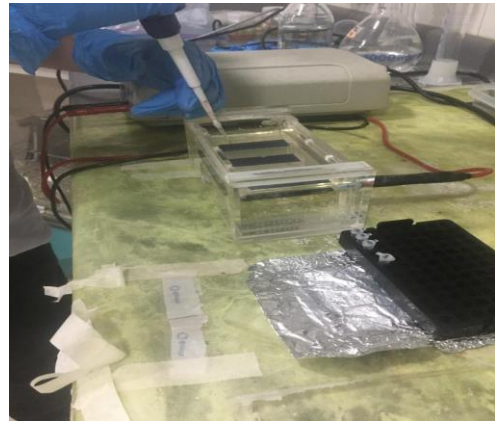
Extracción de AND



Preparación de master mix



Condiciones de la PCR



Electroforesis



epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

*UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL*

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 12 / 05 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Oscar Livardo Umajinga Guanotuña</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Ingeniería en Biotecnología Ambiental</i>
Título a optar: <i>Ingeniero en Biotecnología Ambiental</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>




0913-DBRA-UTP-2022