



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
POLIEXTREMOFILAS EN LA LAGUNA VOLCÁNICA DEL
QUILOTOA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES:

JEAN CARLOS MECIAS HERRERA

CHRISTIAN PAUL SILVA VILLACIS

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
POLIEXTREMOFILAS EN LA LAGUNA VOLCÁNICA DEL
QUILOTOA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES:

JEAN CARLOS MECIAS HERRERA

CHRISTIAN PAUL SILVA VILLACIS

DIRECTOR: DR. IGOR EDUARDO ASTUDILLO SKLIAROVA PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Jean Carlos Mecias Herrera & Christian Paul Silva Villacis

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


Nosotros, Jean Carlos Mecias Herrera, Christian Paul Silva Villacis, declaramos que el presente Trabajo de Integración Curricular 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 autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 09 de agosto del 2023



Jean Carlos Mecias Herrera
060465810-4



Christian Paul Silva Villacis
180533026-1

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

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS POLIEXTREMOFILAS EN LA LAGUNA VOLCÁNICA DEL QUILOTOA** realizado por los señores: **JEAN CARLOS MECIAS HERRERA** y **CHRISTIAN PAUL SILVA VILLACIS**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Mayra Jannet Espinoza Melendres
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



2023-08-09

Dr. Igor Eduardo Astudillo Skliarova
DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-08-09

Dr. Celso Guillermo Recalde Moreno
ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-08-09

DEDICATORIA

Con profundo respeto, dedico este trabajo a mi madre María Herrera, quien ha sido mi sólido pilar y fuente constante de inspiración a lo largo de este camino. A mi abuela Mariana Carpio, cuya determinación forjó mi carácter y me guio hacia la persona que soy hoy. A mi perspicaz hermano, cuya visión única me permitió contemplar la vida desde nuevas perspectivas. A Mónica, quien demostró que los sueños no conocen límites, y que la verdadera limitación yace en la falta de valentía. A Ximena, Germán, Christian y Juan, quienes revelaron que los inicios pueden ser desafiantes, especialmente lejos de casa, pero con determinación y coraje, incluso lo impensable es alcanzable. A Sonia Castillo, cuyos consejos, vivencias y constante motivación me mostraron que la voluntad puede vencer cualquier obstáculo. A Paola, prima convertida en hermana, cuya luz siempre iluminó mis momentos más oscuros. A mis queridos padrinos, Karla y Juan, quienes desde mi juventud me enseñaron a vivir con alegría dentro de límites sensatos. Por último, pero no menos importante, a Christian Silva, compañero de tesis y hermano de vida, gracias por compartir este arduo viaje que superamos juntos. Mi eterna gratitud a todos.

Jean

A mi madre y padrino, por su amor, apoyo y sacrificio en mi educación. A mis amigos y amigas, cómplices en risas, desafíos y triunfos durante estos años. A Jean Mecías, compañero de tesis y hermano de estudio. A mi pareja, Alisson Hernández, por hacer esta travesía más amable. A mis profesores, cuya sabiduría moldeó mi formación. A mis guías en esta tesis por sus herramientas y conocimientos. A la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, con gratitud por el espacio de crecimiento.

Christian

AGRADECIMIENTO

Agradecemos sinceramente a Dios por permitirnos concluir esta etapa académica, una de las muchas que seguirán. Nuestra gratitud se extiende a nuestras familias: madres, abuelas, tíos, primos y amigos, quienes fueron parte esencial en este camino lleno de aprendizaje.

También reconocemos a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en particular a la Facultad de Ciencias y la Escuela de Ciencias Químicas, Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental. Su apoyo nos brindó la oportunidad de desarrollar nuestros conocimientos y potencialidades.

Agradecemos al grupo de investigación de Energías Alternativas y Ambiente, especialmente al Dr. Celso Recalde, por darnos la oportunidad de ser parte de este grupo excepcional. Su orientación enriquecedora fue fundamental para nuestro crecimiento en investigación y aplicación práctica. Nuestro agradecimiento también va al Dr. Igor Astudillo e Ing. Johana Iza, cuya guía en cada fase de esta investigación fue inestimable. Sin su dedicación, este trabajo no habría culminado exitosamente.

En resumen, agradecemos sinceramente a todas las personas e instituciones que contribuyeron de manera significativa a nuestro desarrollo durante este proceso académico.

Jean & Christian

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY / ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 <i>Objetivo general</i>	3
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
1.3 Justificación.....	3
1.3.1 <i>Justificación teórica</i>	3
1.3.2 <i>Justificación metodológica</i>	4
1.3.3 <i>Justificación practica</i>	4
1.4 Hipótesis	5

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Referencias teóricas.....	6
2.1.1 <i>Lagunas de origen volcánico</i>	6
2.1.1.1 <i>Características de las lagunas volcánicas o cratéricas</i>	6
2.1.1.2 <i>Caracterización físico-química de lagos volcánicos</i>	7

2.1.1.3	<i>Biota característica de las lagunas de origen volcánico</i>	7
2.1.1.4	<i>Lagunas volcánicas ecuatorianas</i>	8
2.1.1.5	<i>Laguna Quilotoa</i>	8
2.1.2	<i>Ambientes extremos</i>	9
2.1.3	<i>Organismo extremófilos</i>	9
2.1.4	<i>Arqueas</i>	11
2.1.5	<i>Bacteria</i>	11
2.1.5.1	<i>Adaptación bacteriana a diferentes factores ambientales</i>	12
2.1.5.2	<i>Resistencia bacteriana a metales pesados</i>	13
2.1.5.3	<i>Presión osmótica</i>	15
2.1.5.4	<i>Anaerobiosis bacteriana</i>	16
2.1.5.5	<i>Osmosis celular</i>	18
2.1.6	<i>Medio de cultivo</i>	19
2.1.6.1	<i>Tipos de medios de cultivo</i>	20
2.1.6.2	<i>Tipos de agares</i>	21
2.1.7	<i>Técnicas de cultivo de microorganismo</i>	22
2.1.8	<i>Aislamiento bacteriano</i>	23
2.1.9	<i>Tinción de Gram</i>	25
2.1.10	<i>Técnicas de identificación molecular</i>	26
2.1.10.1	<i>Extracción de ADN bacteriano</i>	27
2.1.10.2	<i>Amplificación de ADN bacteriano</i>	28
2.1.10.3	<i>Electroforesis</i>	28
2.1.10.4	<i>Secuenciación del ADN bacteriano</i>	29
2.1.10.5	<i>Análisis de la secuencia</i>	30

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	32
3.1	Enfoque de investigación	32

3.2	Alcance de la investigación	32
3.3	Diseño de investigación	32
3.3.1	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	32
3.3.2	<i>Según la intervención en el trabajo de campo</i>	33
3.4	Tipo de estudio	33
3.5	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	33
3.5.1	<i>Muestreo de sedimentos</i>	33
3.5.1.1	<i>Muestra compuesta</i>	35
3.5.1.2	<i>Medición fisicoquímica in situ</i>	35
3.5.1.3	<i>Transporte de muestras</i>	35
3.5.1.4	<i>Medición fisicoquímica ex situ</i>	35
3.5.2	<i>Aislamiento bacteriano</i>	36
3.5.2.1	<i>Diluciones seriadas</i>	36
3.5.2.2	<i>Inoculación de cajas Petri</i>	36
3.5.3	<i>Morfología colonial</i>	37
3.5.4	<i>Obtención de cultivos puros</i>	38
3.5.5	<i>Morfología microscópica</i>	38
3.5.5.1	<i>Tinción de Gram</i>	39
3.5.6	<i>Pruebas de resistencia a metales pesados</i>	40
3.5.6.1	<i>Mercurio (Hg)</i>	40
3.5.6.2	<i>Arsénico (As)</i>	40
3.5.7	<i>Prueba de osmosis</i>	41
3.5.8	<i>Prueba de anaerobiosis</i>	41
3.5.9	<i>Identificación molecular de bacterias</i>	42

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	43
4.1	Procesamiento, análisis e interpretación de resultados	43

4.1.1	<i>Medición fisicoquímica in situ y ex situ</i>	43
4.1.2	<i>Aislamiento bacteriano</i>	46
4.1.3	<i>Morfología colonial</i>	47
4.1.4	<i>Morfología microscópica</i>	50
4.1.5	<i>Prueba de resistencia al mercurio (Hg)</i>	52
4.1.6	<i>Prueba de resistencia al arsénico (As)</i>	57
4.1.7	<i>Prueba de osmosis</i>	61
4.1.8	<i>Prueba de anaerobiosis</i>	66
4.1.9	<i>Identificación molecular</i>	69
4.1.9.1	<i>Shewanella báltica</i>	70
4.1.9.2	<i>Pseudomonas spp / Pseudomonas fluorescens</i>	71
4.1.9.3	<i>Stenotrophomonas maltophilia / Stenotrophomonas rhizophila</i>	72
4.1.9.4	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	73
4.1.9.5	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	74
4.2	Discusión	74
4.3	Comprobación de hipótesis	77

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
5.1	Conclusiones	78
5.2	Recomendaciones	78

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

CERTIFICACIÓN DE REVISIÓN DE ESTRUCTURA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Clasificación de organismos extremófilos.....	11
Tabla 2-2: Recomendaciones de las técnicas de identificación molecular bacteriana.	27
Tabla 3-1: Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo	34
Tabla 3-3: Composición del medio fluido tioglicolato	42
Tabla 4-1: Resultados de medición in situ y ex situ	43
Tabla 4-2: Morfología colonial de bacterias aisladas.	49
Tabla 4-3: Resultado Tinción Gram de bacterias aisladas	50
Tabla 4-4: Caracterización microscópica.	51
Tabla 4-5: Pruebas de resistencia con Mercurio (II).....	52
Tabla 4-6: Pruebas de resistencia con Hg (III) en <i>Escherichia coli</i>	55
Tabla 4-7: Pruebas de resistencia con Arsénico (III)	57
Tabla 4-8: Pruebas de resistencia con As (III) en <i>Escherichia coli</i>	59
Tabla 4-9: Pruebas de resistencia con Cloruro de Sodio.....	61
Tabla 4-10: Pruebas de resistencia NaCl en <i>Escherichia coli</i>	65
Tabla 4-11: Resultados obtenidos prueba de anaerobios con tioglicolato	67
Tabla 4-12: Identificación molecular de cepas bacterianas.....	70

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1: Vista aérea laguna volcánica Quilotoa y calderas.....	8
Ilustración 2-2: Condiciones óptimas de crecimiento de bacterias extremófilos	10
Ilustración 2-3: Sistemas microbianos de resistencia a arsenicales.....	15
Ilustración 2-4: Procesos químicos de la digestión anaerobia	17
Ilustración 2-5: Metabolismo microbiano del metano.....	18
Ilustración 2-6: Tipos de medios osmóticos	19
Ilustración 2-7: Técnica A de siembra en estría.....	23
Ilustración 2-8: Técnica B de siembra en estría.....	24
Ilustración 2-9: Siembra con aza de punta.....	24
Ilustración 2-10: Siembra con aza de aro	25
Ilustración 2-11: Coloraciones resultantes de la Tinción de Gram	26
Ilustración 2-12: Esquema del proceso PCR	28
Ilustración 2-13: Electroforesis de ácidos nucleicos	29
Ilustración 2-14: Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.....	31
Ilustración 3-1: Puntos de muestreo en la laguna del Quilotoa.....	34
Ilustración 3-2: Características de la morfología colonial	38
Ilustración 3-3: Características a reportar al describir la morfología microscópica.....	39
Ilustración 4-1: Algunas de las bacterias aisladas: MQC1 10-2 N, MQC1 10-2 N*, MQC3 10-4 TSA, MQC4 10-2 N.....	47
Ilustración 4-2: Observación 100x, Tinción Gram A: Bacilos (+); B: Cocos (-).....	50
Ilustración 4-3: Porcentaje de bacterias según la tinción Gram de aislamiento de sedimentos provenientes de la laguna volcánica Quilotoa.	51
Ilustración 4-4: Prueba de resistencia al mercurio (II) 800 ppm de HgCl ₂ en cepa MQC3 10-2 TSA.....	53
Ilustración 4-5: Prueba de resistencia al mercurio (II) 8000 ppm de HgCl ₂ en <i>Escherichia coli</i>	55

Ilustración 4-6: Pruebas de resistencia de As con concentración de 4000 ppm Muestra MQC3 10 ⁻² TSA.....	58
Ilustración 4-7: Prueba de resistencia de <i>Escherichia coli</i> en TSA con As a concentración 4000 ppm.....	60
Ilustración 4-8: Prueba de resistencia al cloruro de sodio 300000 ppm de NaCl en cepa MQC2 10 ⁻² TSA.....	62
Ilustración 4-9: <i>E.coli.</i> creciendo en un medio solido con 30000 ppm de NaCl (3% de salinidad).	65
Ilustración 4-10: Pruebas con tioglicolato anaerobios estrictos.....	67
Ilustración 4-11: Pruebas con tioglicolato anaerobios facultativos.....	68
Ilustración 4-12: De izquierda a derecha, muestra <i>E. coli</i> y muestra blanco.....	69

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RECONOCIMIENTO DE LA ZONA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

ANEXO B: SOLUCIÓN MADRE Y AISLAMIENTO BACTERIANO

ANEXO C: OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

ANEXO D: PRUEBAS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS POLIEXTREMOFILAS

ANEXO E: CUADRO RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN

ANEXO F: SECUENCIA FASTA DE GENES *arsA*, *arsB* Y *ACR3*

ANEXO G: CUADRO RESUMEN POR MÉTODO IN SILICO

RESUMEN

La laguna volcánica del Quilotoa es una de las lagunas volcánicas en el Ecuador más estudiadas respecto a sus aspectos geomorfológicos, geoquímicos, climatológicos y vulcanológicos, pero no microbiológicos, a pesar de que los mismos tienen un impacto sustancial en la adaptabilidad y la biodiversidad microbiana hacia condiciones extremas, por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue identificar bacterias poliextremófilas en sedimentos de la laguna volcánica Quilotoa. La metodología implementada tuvo un enfoque cualitativo, utilizándose un diseño experimental de tipo transversal debido a que se manipularon las variables descritas para su observación en un periodo de tiempo determinado, con un alcance descriptivo-exploratorio, detallando las características, tolerancias máximas, género y especie de los microorganismos aislados de los sedimentos de la laguna, esto mediante pruebas de resistencia a condiciones extremas como altas concentraciones de metales pesados (Mercurio y Arsenico), altas presiones osmóticas y a la ausencia de oxígeno, para ser identificadas molecularmente por extracción de ADN a nivel de género y especie. Mediante esta metodología se logró identificar siete cepas bacterianas capaces de resistir a las condiciones extremas a las que fueron expuestas, estas cepas fueron *Shewanella baltica*, *Pseudomonas sp.*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Psychrobacter alimentarius* y *Pseudomonas fluorescens*. Estos hallazgos proporcionan información importante para concluir que la diversidad bacteriana en un entorno extremo como la laguna volcánica han proporcionado una capacidad para resistir diferentes condiciones ambientales extremas, contribuye al entendimiento de la microbiota poliextremófila y su adaptación a condiciones adversas, lo que podría tener aplicaciones en áreas como la biotecnología y la biorremediación

Palabras clave: <IDENTIFICACIÓN MOLECULAR>, <BACTERIAS POLIEXTREMÓFILAS>, <ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)>, <METALES PESADOS>, <PRESIÓN OSMÓTICA>.



1713-DBRA-UPT-2023

SUMMARY / ABSTRACT

The Quilotoa volcanic lagoon is one of the most studied volcanic lagoons in Ecuador regarding its geomorphological, geochemical, climatological and volcanological aspects, except the microbiological ones, despite the substantial impact they have on the adaptability and microbial biodiversity to extreme conditions. Consequently, the aim of this research was to identify polyelectrophilic bacteria found in sediments of the Quilotoa volcanic lagoon. The methodology implemented was focused on a qualitative approach, using a cross-sectional experimental design due to the manipulation of the described variables for the observation in a specific period, with a descriptive-exploratory scope, which detailed the characteristics, maximum tolerances, genus and species of the microorganisms isolated from the sediments of the lagoon. These were tested for resistance to extreme conditions such as high concentrations of heavy metals (mercury and arsenic), high osmotic pressures, as well as the absence of oxygen to identify them molecularly through a DNA extraction at a genus and species level. Through this methodology, it was possible to identify seven bacterial strains resilient to extreme conditions to which they were exposed; these strains were *Shewanella baltica*, *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Psychrobacter alimentarius* and *Pseudomonas fluorescens*. These findings provide important information to conclude that bacterial diversity in an extreme environment such as the volcanic lagoon have developed the ability to resist different extreme environmental conditions, this aspect contributes to the understanding of polyelectrophilic microbiota and their adaptation to adverse conditions; thus, it could be applied in areas such as biotechnology and bioremediation.

Keywords: <MOLECULAR IDENTIFICATION>, <POLYEXTREMOPHILIC BACTERIA>, <DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA)>, <HEAVY METALS>, <OSMOTIC PRESSURE>.



Lic. Paul Rolando Armas Pesántez Mgs.

060328987-7

INTRODUCCIÓN

La identificación molecular es uno de los procesos más utilizados para poder generar una base sólida de información acerca de uno o varios organismos que previamente no han sido identificados, los cuales puede ser beneficioso para sus análisis en distintos campos de investigación, la identificación molecular de un organismo se refiere al proceso de identificar una molécula o un conjunto de moléculas basándose en sus propiedades o características específicas a través de su secuencia única de nucleótidos o aminoácidos (Nilsson et al., 2019, pp. 259).

Es bien sabido que los extremófilos son considerados extremos desde el punto de vista humano porque existen en ambientes que son intolerantes para los humanos u otros organismos, no solo no habitan, sino que pueden crecer y reproducirse en condiciones tan extremas. También son capaces de desarrollar muchas adaptaciones y habilidades evolutivas que no se encuentran en organismos pluricelulares, la mayoría son microorganismos procariotas, bacterias y arqueas (Krasimirova, 2020, pp. 1-25), gracias a estos organismos muy particulares empezaron investigaciones para determinar si existen organismos que pueden soportar varios factores simultáneamente. Aquí el término llamado como Poliextremófilo, el cual refiere a los organismos que no solamente pueden tolerar, crecer y habitar en una sola condición extrema sino al contrario pueden sobrevivir y adaptarse a 3 o más condiciones ambientales extremas conjuntamente.

Una de las peculiaridades ya antes mencionadas son que los microorganismos Poliextremófilos toleran varias condiciones extremas al mismo tiempo, en la investigación presentada se seleccionaron tres factores fisicoquímicos tales como, resistencia a metales pesados en este caso se trabajó con (HgCl_2) y (As_2O_3) los cuales se desnaturalizaron para generar iones de Hg(II) y As(III), presión osmótica mediante la utilización de NaCl de grado analítico y resistencia anaerobia por medio de la exposición de las bacterias a una ausencia de oxígeno con el manejo de Tioglicolato, íntegramente con la finalidad de demostrar que las cepas aisladas y seleccionadas pueden crecer y desarrollarse en estos tres ambientes.

La información conocida de las bacterias existentes en la Laguna volcánica del Quilotoa no es muy explícita por tal razón el vigente estudio busca mediante la identificación molecular, dar a conocer que géneros de bacterias están presentes en los sedimentos de las orillas de la laguna, con la finalidad de que sirva como información a futuro para próximas investigaciones y a su vez poder aplicarlos en diferentes áreas de estudio e investigación.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Se tiene conocimiento que los lagos volcánicos poseen una gran variabilidad topográfica y morfológica, los registros de especies encontradas son más abundantes en lagos de baja montaña que de alta montaña o volcánicas (Vázquez-Loureiro et al., 2023,). Con el paso de los años se han venido desarrollando investigaciones en diversas regiones del mundo, las cuales nos permitan determinar las condiciones fisicoquímicas y químicas de estos ambientes y ver como las mismas han tenido impacto en la biodiversidad microbiana que se ha adaptado a estas condiciones adversas a través de milenios, y que hoy pueden ser fuente de sustancias con diversas aplicaciones biotecnológicas y astrobiológicas; en el Ecuador no se ha llevado a cabo una investigación a fondo de estos ambientes extremos, pese a la gran biodiversidad que presenta (BUSTOS y SERRANO, 2016,pp. 103).

A pesar de que el Ecuador es uno de los países mega diversos en paisajes solamente existen alrededor de 4 lagos volcánicos, de los cuales el Quilotoa ha sido el seleccionado para su estudio en este proyecto ya que la información sobre el microbiota existente en esta laguna es muy escasa. Los principales estudios que se han realizado se han enfocado en los aspectos geomorfológicos, geoquímicos, climatológicos y vulcanológicos, mas no han tenido un enfoque microbiológico, hay que tomar en cuenta que la mayoría de los estudios se realizaron ya hace más de 10 años(González et al., 2021,).

Para el estudio geomorfológicos de lagos y lagunas en la mayoría de casos son utilizadas como herramientas las tecnologías de información geográfica y sensores remotos, los cuales no han sido utilizados para una prospección, sirven de base para la interpretación de imágenes satelitales y en análisis espaciales más complejos, respecto a la clasificación de formas y procesos interactuantes, que posteriormente ayudan a diferenciaran regiones (Contreras, 2019,pp. 117-121), mas no se han utilizado análisis biológicos centrados en la biodiversidad que se puede encontrar en estos entornos.

La detección de bacterias poliextremófilas permite determinar el carácter singular del orden ambiental. Las investigaciones alrededor de este tipo de bacterias en el Ecuador son sumamente desaprovechando para su potencial en el campo microbiológico, industrial y biotecnológico. Es imperante analizar la morfología de estas bacterias, destacando la importancia de características de resistencia a distintos factores (González et al., 2021,).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Identificar mediante técnicas microbiológicas y moleculares, bacterias poliextremofilas presentes en la Laguna volcánica del Quilotoa.

1.2.2 Objetivos específicos

- Aislar bacterias poliextremofilas presentes en la Laguna volcánica del Quilotoa.
- Determinar la capacidad de resistencia de las bacterias a diferentes condiciones extremas.
- Caracterizar molecularmente bacterias a nivel de género o especie que muestren mayor capacidad de resistencia de la laguna volcánica del Quilotoa.

1.3 Justificación

1.3.1 Justificación teórica

Los entornos con condiciones fisicoquímicas extremas suelen contener especies raras y endémicas (Maier y Neilson, 2015, p. 20), algunos organismos pueden sobrepasar estos límites y prosperar en condiciones que para la mayoría de los seres vivos no son propias para la vida, entre los organismos que viven en condiciones hostiles (llamados extremófilos) se encuentran las arqueas y bacterias (Maier y Neilson, 2015, p. 1.). Los organismos que habitan en entornos influidos por más de un estrés abiótico son conocidos como poliextremófilos (Maier y Neilson, 2015, p. 18.), son muy interesantes debido a que se han adaptado a vivir y tolerar hábitats donde se involucran varios parámetros fisicoquímicos los cuales alcanzan valores extremos, tales como la temperatura, la radiación, salinidad del sustrato, el oxígeno, el pH, los nutrientes y metales pesados (Maier y Neilson, 2015, p. 20).

El descubrimiento de ambientes extremos habitados y los organismos los cuales se adaptaron a estos ambientes, hace que exista más posibilidades de encontrar vida fuera de la Tierra y generar nuevos caminos en la industria de la biotecnología y en otras industrias, así como de la biología, farmacéutica, alimenticia, etc. Por tal razón el proyecto de Investigación cuenta con respaldo bibliográfico obtenido de las bases de datos suscritas por la Escuela Superior Politécnica de

Chimborazo (ESPOCH), con recursos electrónicos (e-books) de libre acceso, de igual manera se realizó un repositorio de la ESPOCH y otras universidades que han realizado estudios similares en algunas lagunas volcánicas del país.

1.3.2 Justificación metodológica

Las bacterias de ambientes extremos logran desarrollarse en condiciones inhóspitas, siendo difíciles de replicar en el laboratorio y pueden tener requerimientos nutricionales complejos que son desconocidos. Es por ello que el estudio de la biodiversidad extremófila es una tarea complicada, sin embargo, el avance de la microbiología y biología molecular facilita su estudio, ya que provee nuevos métodos y herramientas para detectar y comprender la presencia de los microorganismos en diversos ambientes y llegar a entender la enorme diversidad microbiana existente en nuestro país.

En este Proyecto de Investigación se pretende realizar la caracterización molecular de bacterias poliextremófilas y su capacidad de resistencia a altas concentraciones de Mercurio (Hg) y Arsénico (Ar), elevadas concentraciones de sal (NaCl) y requerimiento de oxígeno presentes en la Laguna Quilotoa, para estas pruebas de resistencia se utilizarán reactivos y materiales accesibles tal como: Agar Tioglicolato líquido (prueba de resistencia ausencia de oxígeno), medio de cultivo líquido TSA (prueba de resistencia a metales pesados y concentraciones halófila NaCl). En cuanto a las técnicas de biología molecular, se utilizará la Secuenciación de Nueva Generación o de alto rendimiento (NGS), la cual realiza secuenciación masiva en paralelo de un gran número de segmentos de ADN en menos tiempo y a un menor costo por base.

1.3.3 Justificación practica

Este proyecto de Investigación forma parte del grupo de Investigación de Energías Alternativas y Ambiente (GEEA) de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por ello, se cuenta con el aval de este grupo quienes brindarán el apoyo en logística, equipos, materiales, recursos humanos, etc. Con respecto a las pruebas de resistencia se realizará en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en la avenida Pedro Vicente Maldonado (Panamericana Sur Km 1^{1/2}), en la Facultad de Ciencias en el laboratorio de Biotecnología, a cargo del Ing. Andrés Mena, además del uso de las instalaciones, también tendremos acceso a los equipos, materiales y reactivos pertinentes para el análisis de las muestras de sedimentos.

En cuanto a la amplificación, purificación, cuantificación y secuenciación de ADN, en las mientras serán procesadas en laboratorios externos ya que la Institución no cuenta con los

reactivos, materiales, ni herramientas bioinformáticas necesarias. Por esta problemática se realizó esta investigación debido a que en la actualidad existen pocos registros del microbiota que existe en las zonas alto andinas, por esta razón los resultados de la presente investigación serán de vital relevancia debido a que la identificación molecular de estas bacterias guiará a futuras investigaciones donde el principal tema será el uso de bacterias como productores de energía en celdas de combustibles microbianas.

1.4 Hipótesis

Las bacterias presentes en la laguna volcánica del Quilotoa son significativamente poliextremófilas a tres o más factores ambientales extremos.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Referencias teóricas

2.1.1 *Lagunas de origen volcánico*

Las lagunas volcánicas se conocen como cráteres u océanos donde el agua se acumula dentro de los cráteres. Al pasar por los filtros, atrapan y disuelven los gases ácidos que arrojan el volcán. Esta formación generalmente es posible cuando el volcán ha estado inactivo durante mucho tiempo o en aquellos volcanes que no han sufrido ningún proceso de erupción.

No existen datos científicos sobre la formación de todas estas lagunas, ya que la mayoría de ellas se formaron hace miles o millones de años. Según algunas teorías estas cuencas lacustres tuvieron origen después de las erupciones volcánicas del Cuaternario. Otros, más recientes no han terminado de evolucionar y adquieren un aspecto más original. Es por esto que existen varias lagunas de origen volcánico cuyas aguas no son aptas para el consumo humano debido a los altos niveles de azufre, calcio, sal y otros minerales (González et al., 2021, pp. 25-33).

2.1.1.1 *Características de las lagunas volcánicas o cratéricas*

La permanencia y formación de los lagos volcánicos está condicionada por los siguientes factores:

- **Formación:** Los lagos volcánicos se forman como resultado de la actividad volcánica, que puede crear cráteres, calderas y otras depresiones que se llenan de agua (Kozlov y Lebedeva, 2019,).
- **Factores medioambientales:** Factores ambientales como la profundidad del lago, el área y la altitud pueden influir en la biomasa y la diversidad de las cianobacterias en los lagos volcánicos (Cordeiro et al., 2020,).
- **Toxicidad:** Las cianobacterias pueden florecer en los lagos volcánicos y producir toxinas como la microcistina, la saxitoxina, la anatoxina-a y la cilindrospermopsina (Cordeiro et al., 2020,).

- **Materia Orgánica:** La formación de materia orgánica en las cuencas lacustres incluidos los lagos volcánicos, puede verse afectada por la actividad volcánica y otros fenómenos geológicos (Wang et al., 2022,).
- **Morfología:** Los lagos volcánicos pueden tener diversas formas de cuenca y un desarrollo dinámico debido a procesos volcánicos activos y postvolcánicos (Kozlov y Lebedeva, 2019,).

2.1.1.2 *Caracterización físico-química de lagos volcánicos*

La caracterización fisicoquímica de los lagos volcánicos es un importante campo de estudio que no ayuda en la aportación de información sobre la actividad volcánica, el impacto ambiental que genera y diversidad de microbiota existente.

Las condiciones ecológicas de los lagos alpinos templados han sido ampliamente estudiadas por su papel como centinelas del cambio global. Sin embargo pocos estudios realizados han analizado los factores que afectan la hidroquímica de los lagos alpinos tropicales en lechos volcánicos (Mosquera et al., 2022, pp. 1522-1536).

Cabassi et al., (2014,) en este estudio investiga los procesos biogeoquímicos que ocurren en dos lagos volcánicos meromíticos en Costa Rica, los autores encontraron que en estos lagos ocurrían procesos biogeoquímicos diferentes, pero ambos estaban regidos por las mismas funciones procariotas, en especialmente en lo que respecta al ciclo CO₂-CH₄. Se encontró que los metanógenos y los oxidantes de metano, así como las bacterias aerobias autótrofas y heterótrofas responsables del ciclo de carbono orgánico, están estrechamente relacionadas con las condiciones quimicofísicas y la disponibilidad del oxígeno, lo que afecta las concentraciones de CO₂-CH₄.

2.1.1.3 *Biota característica de las lagunas de origen volcánico*

El poder de adaptación de los microorganismos que existen en lagos volcánicos es una fuente de interés para los investigadores, por ser endémicas su tapiz microbiano fotosintético de dos lagos endorreicos poco profundos situados en superficies volcánicas de la isla de James Ross, en la Antártida está compuesta por cianobacterias filamentosas y microalgas que se consideran especies endémicas (Elster et al., 2016, pp. 535-549).

Los conjuntos específicos de bacterias y arqueas haloalcalifílicas desempeñan un papel importante en el reciclaje de la biomasa fitoplanctónica y en el funcionamiento biogeoquímico en el lago tropical Dziani Dzaha (Sala et al., 2022, pp. 292-309).

2.1.1.4 Lagunas volcánicas ecuatorianas

Los lagos o lagunas de cráter volcánico son ecosistemas muy singulares ya que presentan características únicas como: altas concentraciones de sales, alta exposición a los rayos UV, bajas temperaturas entre otras, debido a que estos presentan características ambientales, fisicoquímicas y químicas extremas. Se conoce hay alrededor de cuatro lagos de origen volcánico en Ecuador, el Quilotoa, Cuicocha, Chalpatan Amarilla y Mojanda, pero su investigación microbiana ha sido muy escasa (González et al., 2021.).

2.1.1.5 Laguna Quilotoa

El volcán Quilotoa se encuentra a 3914 msnm, ubicada hacia el extremo austral del frente volcánico de la cordillera occidental de Ecuador, ubicado a 83 km al Suroeste de Quito y unos 32 km al Oeste de Latacunga, en una zona montañosa entre las parroquias de Zumbahua a 12.5 km al sur del cráter y Sigchos a 17 km al norte del cráter (González et al., 2021.). Sus últimas erupciones han cubierto gran parte de cuenca superior del rio Toachi con tremendas cantidades de trefa dacítica que constituyen las extensas terrazas y planicies de agricultura (Hall y Mothes, 2009.).

El volcán Quilotoa comprende una caldera sub-circular con una laguna de 3,6 Km² (ver figura 2), que tiene una profundidad de 256 m aproximadamente y un volumen de agua estimado de 0,35 Km³. La caldera se encuentra asentada sobre un viejo edificio volcánico basal de 6 Km de diámetro. Emisiones de CO₂, sobre la superficie del agua, se pueden observar en diferentes zonas lago (Hall y Mothes, 2009.)

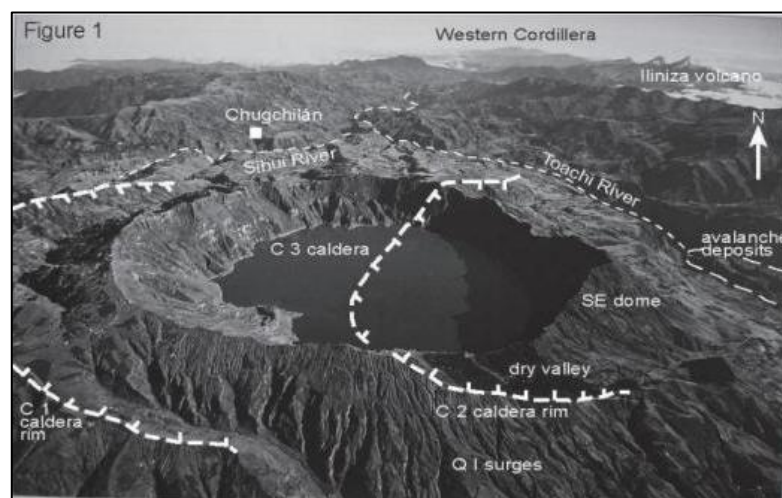


Ilustración 2-1: Vista aérea laguna volcánica Quilotoa y calderas

Fuente: Hall y Mothes, 2009

2.1.2 *Ambientes extremos*

Oarga, (2009,pp. 1-10) nos manifiesta que los hábitats extremos se encuentran fuera del rango de condiciones en las que viven la mayoría de organismos, ya que incluye ambientes físicos como la temperatura, la radiación y presión, al igual que los ambientes geoquímicos como desecación, salinidad, pH, el agotamiento del oxígeno o el potencial redox extremo.

Algunos organismos pueden sobrepasar esos límites y prosperar en condiciones que para la mayoría de los seres vivos son inhóspitas, entre estos organismos que viven en entornos relativamente hostiles se encuentran las arqueas y bacterias los científicos señalan que existe una diferencia entre vivir condiciones extremas y tolerarlas pero ambas situaciones pueden ayudarnos a comprender como afectan a la vida los entornos extremos (Maier y Neilson, 2015,pp. 139-153).

2.1.3 *Organismo extremófilos*

Existe un grupo de microorganismo que son resistentes y/o tolerantes a condiciones ambientales extremas, estos son denominados como poliextremófilos, por su capacidad de hacer frente a varios factores estresantes concurrentes. El término “extremófilo” es antropocéntrico. Y describe a cualquier organismo capaz de crecer de forma óptima bajo condiciones ambientales (temperatura, pH, radiación, etc.) extremas, es decir, condiciones consideradas hostiles, desde una perspectiva humana, para nosotros y la gran mayoría de organismos vivos que conocemos (Krasimirova, 2020,pp. 1-25). Los microorganismos extremófilos tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban demasiado hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos. Se clasifican en base a la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan: termófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 45 °C) (Oliart-Ros, Manresa-Presas y Sánchez-Otero, 2016,pp. 79-90). Los hábitats donde viven los extremófilos incluyen manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos; lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, sea ácido (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia, en zonas que combinan dos o más factores extremos, como alta temperatura y condiciones ácidas, en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos (Oliart-Ros, Manresa-Presas y Sánchez-Otero, 2016,pp. 79-90).

Los organismos extremófilos son principalmente procariotas (arqueas y bacterias), con pocos ejemplos de eucariotas. Los organismos extremófilos se definen por las condiciones ambientales

en las que crecen de forma óptima. Los organismos pueden describirse como acidófilos (crecimiento óptimo entre pH 1 y pH 5); alcalifílicos (crecimiento óptimo por encima de pH 9); halófilos (crecimiento óptimo en entornos con altas concentraciones de sal); termófilos (crecimiento óptimo entre 60 y 80 °C); hipertermófilos (crecimiento óptimo por encima de 80 °C); psicrófilos (crecimiento óptimo a 15 °C o menos, con una temperatura máxima tolerante de 20 °C y un crecimiento mínimo a 0 °C o por debajo de esta temperatura); piezófilos o barofílicos (crecimiento óptimo a alta presión hidrostática); oligotróficos (crecimiento en entornos nutricionalmente limitados); endolíticos (crecimiento en el interior de rocas o en los poros de granos minerales); y xerófilos (crecimiento en condiciones secas, con baja disponibilidad de agua) (Gupta et al., 2014, pp. 371).

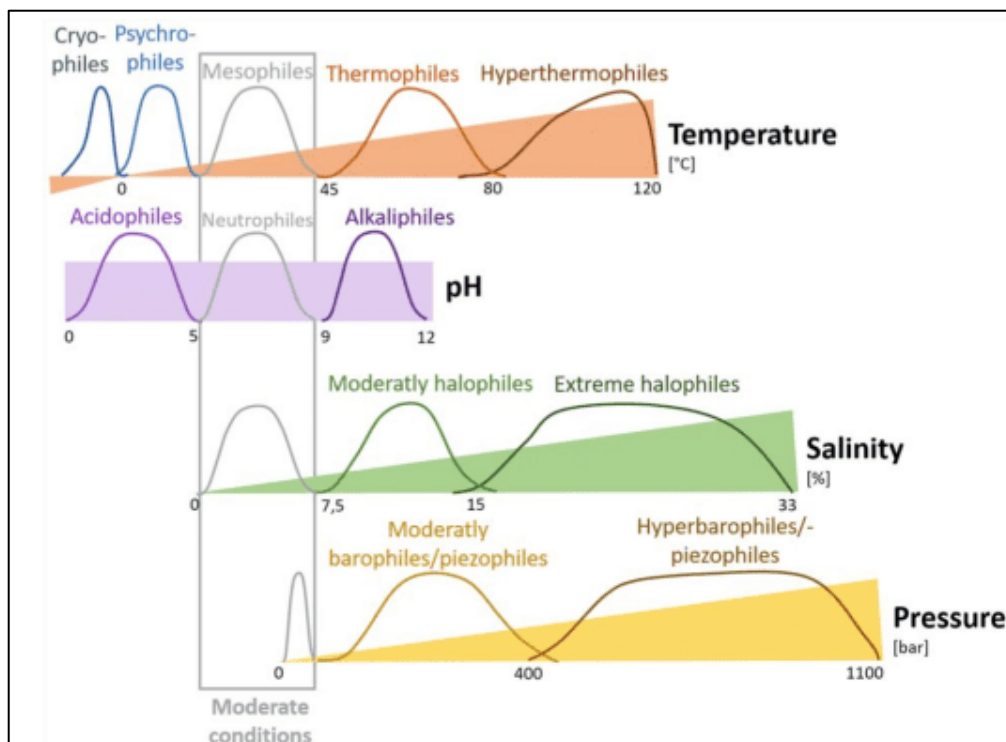


Ilustración 2-2: Condiciones óptimas de crecimiento de bacterias extremófilos

Fuente: Krasimirova, 2020, pp. 1-25

Tabla 2-1: Clasificación de organismos extremófilos

Clasificación	Características
Termófilos	Temperatura óptima de crecimiento superior a 45 °C; dentro de éstos se encuentran los Hipertermófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 80 °C)
Psicrófilos	Temperatura óptima de crecimiento por abajo de 10 °C
Acidófilos	pH óptimo de crecimiento por abajo de 5
Alcalófilos	pH óptimo de crecimiento por arriba de 8
Halófilos	Habitan en medios hipersalinos, de 5 % a 30 % de sal
Osmófilos	Viven a altas presiones osmóticas
Radiófilos	Resisten altos niveles de radiación
Metalófilos	Toleran altas concentraciones de metales pesados
Piezófilos	Antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm

Fuente: (Krasimirova, 2020, pp. 1-25)

2.1.4 Arqueas

Las arqueas son un grupo distinto a las bacterias y los eucariotas, fueron descubiertas por primera vez en 1970 e inicialmente se clasificaron como bacterias, pero más tarde se reconocieron como un grupo aparte por sus características genéticas y bioquímicas únicas. Son organismos unicelulares que pueden encontrarse en una gran variedad de entornos, incluidos los más extremos como fuentes termales, y los respiraderos hidrotermales de las profundidades marinas, las arqueas son importantes por varias razones, desempeñan un papel crucial en el ciclo global del carbono y algunas especies participan en la producción y el consumo del metano.

En la actualidad no existe una forma inequívoca de delimitar los géneros utilizando únicamente índices de parentesco genómico estándar, pero habido propuestas para utilizar la identidad nucleotídica media y la fracción de alineación del genoma para delimitar los géneros. Estas propuestas se han puesto a prueba en miles de genomas que representan cepas tipo de especies de cientos de géneros de linajes bacterianos o arqueanos (Barco et al., 2020.).

2.1.5 Bacteria

Las bacterias son microorganismos unicelulares, procariotas los cuales pueden encontrarse en una gran variedad de entornos, como suelo, agua, parásitos, simbioses, patógenos del hombre y en otros organismos vivos. Son increíblemente diversos y pueden tener formas muy variadas como,

esféricas, en formas de bastón o espirales. La taxonomía de estos microorganismos y por tanto la designación de géneros se han basado en gran medida en el uso de un único gen ribosómico, el Gen 16S *ARNr* utilizado como marcador taxonómico (Barco et al., 2020).

2.1.5.1 *Adaptación bacteriana a diferentes factores ambientales*

- **Fluidez de la membrana citoplasmática:** Las bacterias pueden adaptarse a factores de estrés ambiental como los bifenilos policlorados (PCB) y el ácido 3-clorobenzoico cambiando la fluidez de su membrana citoplasmática. La presencia de PCB provoca una rigidificación controlada de la membrana citoplasmática de las bacterias. Las bacterias que son suficientemente resistentes a los compuestos tóxicos de su entorno pueden utilizarse para el proceso de biodegradación eficiente con el fin de eliminar la contaminación generalizada por PCB. Se estudiaron los cambios en la composición de ácidos grasos en los lípidos totales y en el principal fosfolípido de membrana, la fosfatidiletanolamina, para evaluar los efectos de los productos químicos en la membrana citoplasmática (Murínová et al., 2014, pp. 428-434).
- **Primocane fructificación de plantas de frambuesa:** Las cepas de *Bacillus* pueden ayudar a las plantas de frambuesa de fruto primocano a adaptarse a los factores ambientales. El tratamiento previo a la plantación con las cepas bacterianas aumentó el número de nuevas cañas de frambueso y el número de órganos generativos de la planta, así como la productividad del cultivo, en comparación con el control. Además, estos bacilos actuaron como abono húmico estándar. Factores ambientales variables como la temperatura del aire, la humedad relativa y las heladas de invierno y primavera influyeron seriamente en los parámetros biológicos de la planta y en la productividad del cultivo de las plantas de control. Al mismo tiempo, el tratamiento de las raíces de fructificación de las primocañas antes de la plantación con cepas de *Bacillus* redujo los efectos negativos del estrés abiótico sobre las plantas en todos los años de la investigación (Belyaev et al., 2017, pp. 7016-7022).
- **Biofilm:** La capacidad de los microorganismos de convivir en conjunto en comunidades organizadas y complejas es denominada biofilm o biopelícula, estos microorganismos están ordenados en el interior de una matriz extracelular adherida a una superficie ya sea viva o muerta, esta matriz proporciona de una protección a diferentes factores generadores de estrés, creando un ambiente rico en nutrientes permitiendo la proliferación. Las bacterias que se desarrollan en biopelículas pueden evadir la respuesta inmune del huésped y llegando a ser menos sensibles a los antibióticos o biocidas a diferencia de las bacterias en estado planctónico, llegando hasta el punto de presentar diferentes fenotipos, determinando el

impacto en la expresión genética que tiene la formación de una biopelícula (Ortega-Peña y Hernández-Zamora, 2018, pp. 79-88).

- Quorum sensing: Se refiere a un proceso de señales químicas coordinadas que permite la comunicación entre bacterias para percibir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad poblacional y la respuesta a condiciones cambiantes mediante moléculas señalizadoras denominadas auto-inductores, en Gram negativas siendo las más comunes las acil-homoserina-lactonas, mientras que en Gram positivas prevalecen los oligopéptidos modificados. Las bacterias además poseen un receptor para detectar el auto inductor específico, que al unirse al receptor transcribe determinados genes, algunos necesarios para sintetizar el inductor (Loera Muro, Barraza y Caamal Chan, 2019, pp. 24-39). Unos de los primeros microorganismos en los cuales se identificó este proceso fueron en especies de *Myxobacterias* y *Streptomyces*, sin embargo el más conocido es el *Vibrio fischeri* una bacteria bioluminiscente en simbiosis con el órgano generador de luz del calamar hawaiano, que al momento de estar en estado planctónico su auto inductor se encuentra en baja concentración careciendo de luminiscencia, mientras que en el órgano luminoso del calamar al estar mayormente se lleva a cabo mayor transcripción enzimática, generándose bioluminiscencia (Castillo, 2018, pp. 3-50).

2.1.5.2 Resistencia bacteriana a metales pesados

Las bacterias tienen sistemas específicos de resistencia a los metales que se activan cuando un metal atraviesa la membrana citoplasmática para llegar al citoplasma (Roosa et al., 2014, pp. 143-151). La resistencia a los metales en las bacterias es heterogénea tanto desde el punto de vista genético como bioquímico y puede estar codificada por cromosomas, plásmidos o transposones, a nivel bioquímico al menos 6 mecanismos diferentes son los responsables de la resistencia los cuales pueden darse por separado o combinados, para un metal específico pueden darse diferentes mecanismos de resistencia en una misma especie (Rouch, Lee y Morby, 1995, pp. 132-141). En investigaciones recientes se ha comprobado que existen grupos de bacterias que pueden ser expuestas a metales pesados como (Pb, Cr, Cd) en suelos agrícolas, estas bacterias también generaron una defensa a antibióticos entre las bacterias que se identificaron están las del género *Micrococos*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria* (Zhong et al., 2021.), un gran ejemplo de una bacteria resistente a un metal en específico es *Pseudomonas aeruginosa* RW9 es un candidato prometedor para la biorremediación de la contaminación por cromo hexavalente (Cr (VI)), ya que resiste una alta concentración de hasta 60 mg/L de Cr (VI). La cepa desarrolló un complejo mecanismo de adaptación al Cr (VI), basado en la fijación superficial, la acumulación intracelular y el secuestro extracelular, que representó el 85% de la

eficiencia de eliminación. El secuestro extracelular podría atribuirse a la producción de metabolitos, como el biosurfactante ramnolípido (Arisah et al., 2021.).

- Mercurio: El mercurio es un elemento químico de número atómico 80 y símbolo Hg. Es un metal pesado, de color blanco plateado y líquido a temperatura ambiente. El mercurio puede ser muy tóxico para los seres humanos y los ecosistemas, y su forma química determina su comportamiento, transporte y toxicidad potencial (Favilli et al., 2022.). El mercurio es uno de los contaminantes ambientales más peligrosos, y su uso en diversos sectores industriales ha provocado una importante contaminación ambiental y episodios de intoxicación humana (Zaichick, 2021, pp. 130-146). El mecanismo de resistencia de bacterias al mercurio y a la bioacumulación sigue siendo un poco desconocido, sin embargo, se sabe que algunos genes como merT, merP y merA están implicadas en la resistencia al Hg²⁺ y la bioacumulación en algunas bacterias (Zhang et al., 2020.).

Varias cepas de *E. coli* presentan resistencia al mercurio, mostrando también resistencia a los antibióticos. Los mayores niveles de resistencia al mercurio se encontraron en aislamientos de la bahía de Callao, esto debido probablemente a la proximidad a la desembocadura del río Rímac y Chillón que transportan aguas residuales de origen urbano e industrial, principalmente de las mineras. Las cepas resistentes al mercurio mostraron resistencia a ampicilina, tetraciclina, amoxicilina y sulfametoxazol-trimetoprim, se reportó que en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de agua de alcantarilla y de mar (Acevedo Barrios y Severiche Sierra, 2013, pp. 73-79).

- Arsénico: El arsénico es un elemento químico de la tabla periódica que pertenece al grupo de los metaloides, también llamados semimetales; se puede encontrar de diversas formas, aunque, raramente, se encuentra en estado sólido. A presión atmosférica, el arsénico sublima a 613 °C. Es un elemento esencial para la vida y su deficiencia puede dar lugar a diversas complicaciones; sin embargo, no se conoce con precisión la función biológica. La ingesta diaria de 12 a 15 µg puede consumirse sin problemas en la dieta diaria de carnes, pescados, vegetales y cereales, siendo los peces y crustáceos los que más contenido de arsénico presentan es un elemento químico de la tabla periódica cuyo símbolo es As y el número atómico es 33 (Organización Mundial De La Salud, 2018.).

Según Metaloides, (2010.), el arsénico se conoce que es un elemento tóxico, el cual es distribuido ampliamente en la naturaleza, de igual manera en sistemas acuáticos, en la naturaleza las formas inorgánicas de arsénico que predominan son el As(III) y el As(V), siendo la primera la especie más tóxica y móvil del metaloide. Si bien el ciclo biogeoquímico del arsénico está

influenciado por factores físico-químicos, uno de los más importantes lo constituye la transformación bacteriana, la cual interviene en la movilidad, distribución y biodisponibilidad de las distintas especies de arsénico en el ambiente.

Los sistemas microbianos de resistencia a arsénico más estudiados son los relacionados con los derivados inorgánicos del metaloide, dentro de los cuales resaltan los codificados en los operones *ars*. Sin embargo, recientemente se han identificado varios sistemas microbianos de tolerancia dirigidos a los derivados orgánicos del arsénico los cuales incluyen tanto enzimas *arsm*, *arsh* y *arsi*, como el transportador *arsp*, todos ellos capaces de detoxificar a los organoarsenicales. La acción concertada de estos sistemas constituye una estrategia microbiana eficiente para la tolerancia a los derivados orgánicos del arsénico. Las estructuras tridimensionales de *arsm*, *arsh* y *arsi* mostradas en la Fig. 2-2 enfatizan el nivel de estudio al que han sido sometidas dichas enzimas (Cervantes, 2019,pp. 67-71).

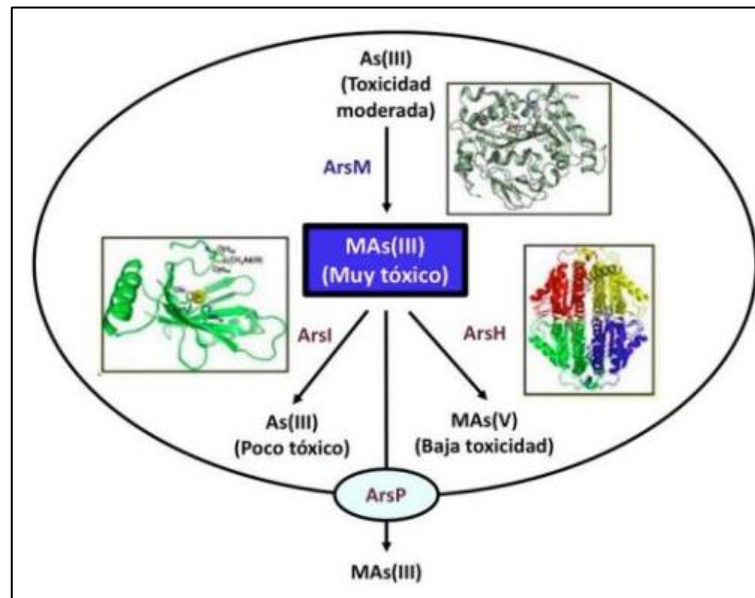


Ilustración 2-3: Sistemas microbianos de resistencia a arsenicales

Fuente: Cervantes, 2019,pp. 67-71

2.1.5.3 Presión osmótica

Por estrés osmótico se entiende un aumento o disminución de la osmótica del entorno de un organismo y se define como regulación osmótica u osmorregulación a los procesos activos llevados *a cabo* por los organismos para hacer frente al estrés osmótico (Csonka, 1989,pp. 121-147). Las células responden a las variaciones de la presión osmótica externa acumulando o liberando solutos, atenuando así los flujos de agua. Estos solutos incluyen iones inorgánicos (a menudo K⁺) y moléculas orgánicas denominadas "osmolitos" (Wood, 2015,pp. 381-388).

Un aspecto crucial del ajuste microbiano a las osmolalidades ambientales fluctuantes es la capacidad de la célula para escalar los flujos de agua y dirigirlos a través de la membrana citoplasmática semipermeable para evitar la deshidratación (con una osmolalidad externa alta) y la ruptura (con una osmolalidad externa baja). La síntesis, importación y liberación de solutos compatibles ocupan un lugar central en estos procesos (Bremer y Krämer, 2019, pp. 313-334).

En un estudio realizado por Wood, (2015, pp. 381), dice que *ProP* de *E. coli*, *BetP* de *C. glutamicum* y *OpuA* de *Lactococcus lactis* sirven como paradigmas para el estudio de la osmosensación. Representan diferentes grupos filogenéticos y mecanismos de acoplamiento energético. *ProP* es un importador de protones y miembro de la superfamilia de facilitadores principales, *BetP* es un importador de Na⁺ y miembro de la familia de transportadores de betaína-colina-carnitina, y *OpuA* es un transportador de casetes de unión a ATP (ABC) que hidroliza ATP. Los datos disponibles sugieren que cada uno de ellos es similar en estructura y mecanismo de transporte a sus parálogos que no son osmosensores.

2.1.5.4 Anaerobiosis bacteriana

Las bacterias anaerobias se definen como aquellos microorganismos que para crecer en una superficie necesitan de una atmósfera sin oxígeno, ya que puede llegar a ser tóxico para ellas en mayor o menor medida, igualmente generando su energía por la metabolización de sustancias carentes de moléculas oxígeno, mayormente por fermentación, aunque en grietas hidrotermales en el lecho marino llevan a cabo reacciones empleando compuestos químicos inorgánicos. El proceso fermentativo mencionado comprende pasos que interactúan entre sí y hacen parte importante de los ciclos biogeoquímicos del carbono, azufre y nitrógeno, entre otros, estos pasos se han dividido en tres etapas principales (Núñez, 2017).

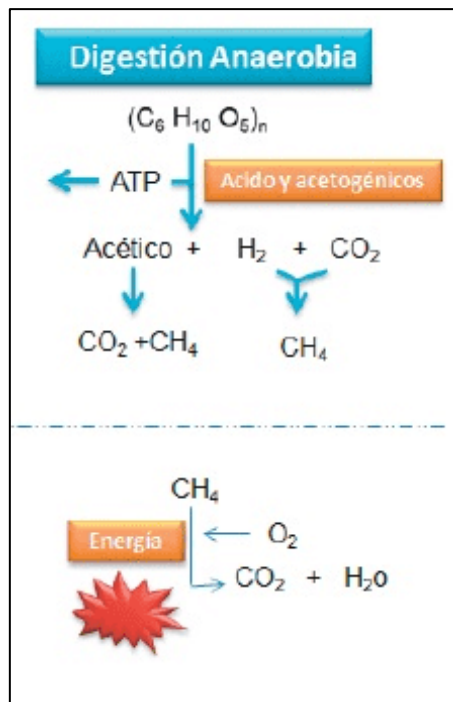


Ilustración 2-4: Procesos químicos de la digestión anaerobia

Fuente: Corredor Vargas et al., 2015, pp. 55-81

- Hidrolisis y fermentación: Es la primera etapa del proceso involucrando la hidrolisis de sólidos insolubles o partículas orgánicas bien sea celulosa o hemicelulosa, y coloides orgánicos, transformándolos en compuestos solubles simples que son fácilmente absorbidos por medio de la pared celular para ser catalizadas por bacterias fermentativas en alcoholes y ácidos grasos produciendo hidrogeno y dióxido de carbono (Núñez, 2017.).
- Acetogénesis: Dentro de esta fase se aceleran los procesos metabólicos bacterianos mediante transformación enzimática de lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos en compuestos que serán utilizados para una transformación a carbono celular o usados como fuente de energía (Núñez, 2017.).
- Metanogénesis: Siendo el paso final de la digestión anaerobia corresponde a la formación de metano a partir de dos rutas, la primera corresponde a la acetoclastica en la cual los microorganismos crecen en sustratos como hidrogeno y dióxido de carbono, su metabolismo se caracteriza por utilizar las vías biosintéticas y bioenergéticas para la producción de ATP, adicionalmente ante la ausencia de hidrogeno, oxidan compuestos para obtener electrones, resultando como producto final metano. Pero, por otra parte, las bacterias metanogénicas son consideradas como las más relevante dentro del grupo de microorganismo anaerobios pues

tienen la capacidad de producir gas metano convirtiendo sustratos con un solo carbono o con átomos de carbono (Núñez, 2017).

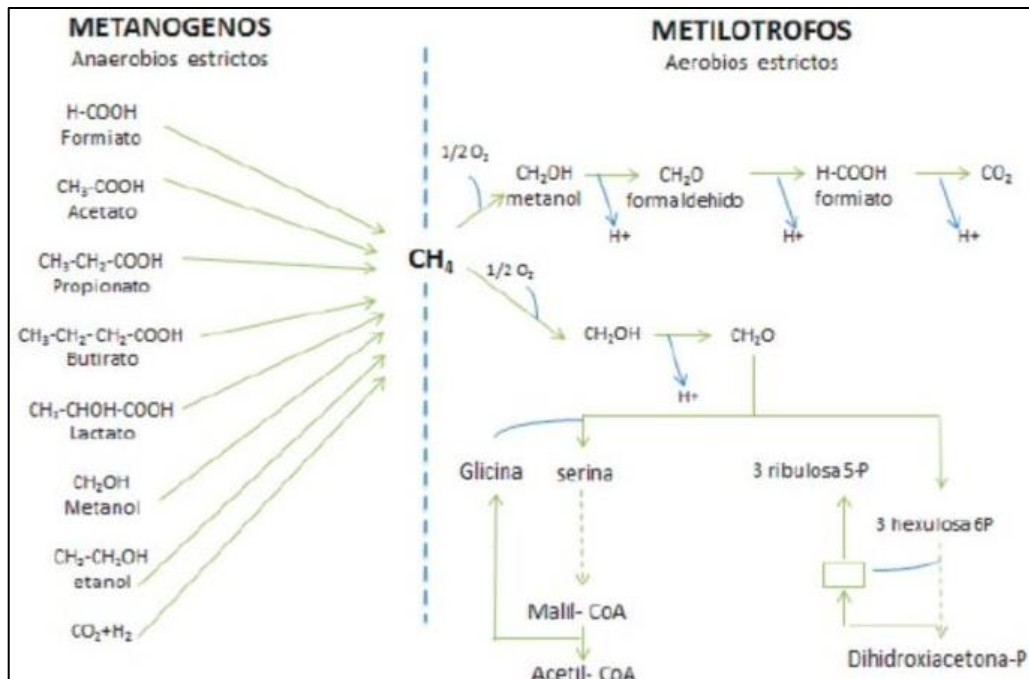


Ilustración 2-5: Metabolismo microbiano del metano

Fuente: Corredor Vargas et al., 2015, pp. 55-81

2.1.5.5 Osmosis celular

La ósmosis en microorganismos se refiere a un transporte celular pasivo de agua a través de la membrana plasmática. La dirección de este transporte depende de la concentración de solutos dentro y fuera de la célula, así como de los orgánulos y sus respectivas membranas plasmáticas. Si el medio extracelular contiene una mayor concentración de solutos que el citoplasma, las moléculas de agua saldrán de la célula debido a la ósmosis, lo que se denomina medio hipertónico. Por otro lado, en un medio hipotónico, las moléculas de agua pueden entrar en las células e incluso hacer que las células se hinchen. Si la célula carece de pared celular, la membrana plasmática de la célula se rompe, lo que se denomina citólisis. En un ambiente isotónico, la concentración de solutos es la misma dentro y fuera de la célula (Cardona Serrate, 2020, p. 7).

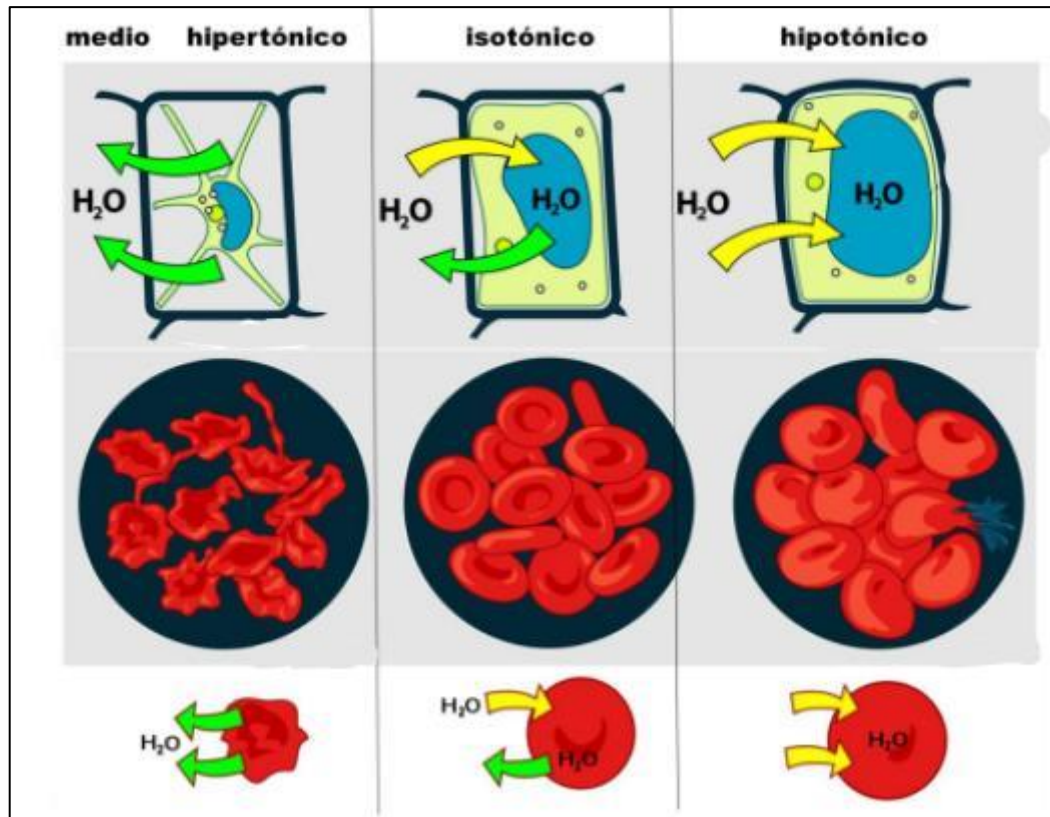


Ilustración 2-6: Tipos de medios osmóticos

Fuente: Cardona Serrate, 2020, pp. 7

2.1.6 Medio de cultivo

Un medio de cultivo es una estrategia utilizada en el laboratorio con el propósito de fomentar el crecimiento de microorganismos, células o tejidos. Este medio contiene nutrientes y se configura con condiciones fisicoquímicas ideales para el desarrollo de lo que se cultiva en él. Comúnmente, se emplean cajas de Petri que contienen un agar específico para el crecimiento de microorganismos particulares. Además de las cajas de Petri, también existen medios de cultivo en forma de tubo (FONTALVO, 2018, pp. 23-28).

Por lo general, un medio de cultivo se compone de los siguientes elementos:

- Una fuente de carbono: Por lo general, se utilizan azúcares (como lactosa o fructosa), aunque algunos organismos también pueden utilizar dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono.
- Una fuente de nitrógeno: Se emplean proteínas hidrolizadas, como peptonas, como fuente de nitrógeno.

- Amortiguadores de pH: También conocidos como buffers o soluciones tampón, son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango óptimo para el crecimiento de microorganismos. Entre los amortiguadores de pH comunes se encuentran los fosfatos disódicos (Na_2HPO_4) o monosódicos (NaH_2PO_4).
- Otros componentes: Esto puede incluir iones como Na^+ y K^+ , así como vitaminas y otros nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos (Rodríguez y Zhurbenko, 2018, pp. 183).

2.1.6.1 Tipos de medios de cultivo

En función de la proporción de agar, se pueden distinguir diferentes tipos de medios de cultivo:

- Líquidos (caldos): Estos medios carecen de agente gelificante, lo que permite que los microorganismos crezcan rápidamente en todo el medio. La naturaleza líquida del medio facilita la movilidad de los microorganismos para acceder a los nutrientes de manera más eficiente.
- Sólidos: Estos medios contienen aproximadamente un 1,5 % de agar, lo que les confiere una consistencia sólida. Esto permite el crecimiento de los microorganismos únicamente en la superficie del medio. Estos medios se suelen colocar en cajas de Petri o tubos de ensayo.
- Semisólidos: Estos medios contienen una proporción menor de agar, alrededor del 0,5 %. Son utilizados principalmente en pruebas de bioquímica y movilidad de los microorganismos.

En microbiología, existen cuatro tipos de medios de cultivo según su función:

- Medios nutritivos: Estos medios son adecuados para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Algunos ejemplos de estos medios son la peptona y el caldo de tripticasa-soja.
- Medios de enriquecimiento: Estos medios contienen componentes adicionales que permiten el crecimiento de microorganismos exigentes.

- Medios selectivos: Estos medios contienen componentes que inhiben el crecimiento de microorganismos no deseados. Un ejemplo de este tipo de medio es el agar MacConkey, que contiene cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas.
- Medios diferenciales: Estos medios contienen compuestos que revelan alguna característica particular de una especie o grupo de microorganismos (Rodríguez y Zhurbenko, 2018, pp. 183).

2.1.6.2 Tipos de agares

- Agar BCYE: Es un medio selectivo para *Legionella* y *Nocardia* que impide el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Contiene agar tamponado con extracto de levadura y carbón, y se complementa con L-cistina y pirofosfato férrico.
- Agar BHI: Se trata de una infusión de cerebro y corazón utilizada como caldo o medio sólido. Puede contener sangre adicional o no. Permite el crecimiento de tejidos animales mediante la adición de peptona, tampón fosfato y una concentración mínima de glucosa.
- Agar chocolate: Este medio utiliza una base similar al agar sangre, pero se le añaden suplementos como hemoglobina y otros nutrientes presentes en los lisados de los glóbulos rojos.
- Agar HE: Es un medio selectivo y diferencial conocido como agar entérico de Hektoen. No requiere esterilización debido a que muy pocos microorganismos pueden crecer en él. Contiene altas concentraciones de sales biliares, azul de bromotimol y fucsina ácida, así como lactosa, sacarosa y salicina como elementos diferenciadores.
- Agar salino manitol: Es un medio selectivo para estafilococos que contiene una alta concentración de cloruro sódico (75 g/L). La mayoría de los microorganismos no pueden crecer a esta concentración de sal, mientras que los estafilococos, incluyendo *Staphylococcus aureus*, sí pueden hacerlo. Además, incorpora manitol como fuente de carbono y rojo fenol como indicador, lo que permite establecer un diagnóstico presuntivo basado en la capacidad fermentadora del manitol por parte de los estafilococos.
- Agar sangre: Este medio es muy nutritivo y permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos de importancia clínica, a excepción de los más exigentes. Se prepara añadiendo un 5% de sangre desfibrilada de diferentes animales a un agar base rico, como el

agar Columbia. Además de su función como medio de cultivo, también se utiliza para evaluar la capacidad hemolítica de los microorganismos, por lo que se considera un medio diferencial (Rodríguez y Zhurbenko, 2018, pp. 183).

- Caldo de tioglicolato: Es ampliamente utilizado en microbiología clínica. Promueve el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos, incluyendo anaerobios, aerobios, microaerófilos y microorganismos exigentes. Para evitar la entrada de oxígeno atmosférico al caldo, se añade un 0,075% de agar que impide las corrientes de convección. El ácido tioglicólico actúa como agente reductor, reduciendo aún más el potencial de óxido-reducción del medio. Además, el medio contiene nutrientes como caseína, extractos de levadura y de carne, vitaminas y otros, lo cual favorece el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas (FONTALVO, 2018, pp. 23-28).
- Medio de Kligler: Conocido por la prueba de Kligler, es una prueba múltiple que se utiliza para determinar si una bacteria en particular (originalmente diseñada para identificar enterobacterias) produce ácidos y gases a partir de la glucosa, lactosa o ambos. También permite investigar su capacidad para producir sulfuro de hidrógeno. El medio contiene glucosa y lactosa en una proporción de 1:10 respectivamente, así como una fuente de azufre (tiosulfato sódico) y una fuente de hierro (sulfato ferroso). Se añade rojo fenol como indicador ácido-base, el cual se vuelve amarillo en un pH ácido y rojo en un pH neutro (FONTALVO, 2018, pp. 23-28).

2.1.7 Técnicas de cultivo de microorganismo

- Siembra por inmersión: Este método implica colocar el inóculo en una placa o caja de Petri y verter sobre él el medio de cultivo previamente fundido. Se utiliza principalmente para el crecimiento de microorganismos aerobios.
- Siembra en doble capa: En este caso, se sigue el mismo procedimiento que en la siembra por inmersión. Una vez que el medio se ha solidificado, se agrega una capa adicional de medio para cubrir la capa anterior (generalmente alrededor de 10 ml). Este método se utiliza para el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos y microaerófilos.
- Siembra en superficie: Se vierte el medio de cultivo fundido en una placa de Petri, se permite que solidifique y luego se coloca el inóculo sobre la superficie. Utilizando una espátula de Drigalsky, se extiende el inóculo hasta que sea completamente absorbido por el medio de

cultivo. Esta técnica de siembra se recomienda para el crecimiento de microorganismos aerobios estrictos.

- Siembra en estría: Se vierte el medio de cultivo fundido en una placa de Petri y se permite que se solidifique (Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017, pp. 1-8).

2.1.8 *Aislamiento bacteriano*

El aislamiento bacteriano es un proceso mediante el cual se identifican y se cultivan bacterias a partir de una muestra biológica, como la piel, la sangre, etc. Este proceso es importante para determinar específicamente el tipo de bacterias que están presentes en una muestra y preparar tratamientos para la misma en caso de ser necesario, el aislamiento bacteriano se realiza mediante técnicas de cultivo microbiológico, como el hisopado o el estriado (Gallego Rodríguez, Ruiz Jaramillo y Ruiz Buitrago, 2020, pp. 13-21). El estriado consiste en un proceso de extender una muestra bacteriana en un medio de cultivo sólido formando líneas y así obtener cepas aisladas de una sola especie, hay varias técnicas para realizar este procedimiento, por ejemplo:

- Técnica A: Consiste en cargar el asa con la muestra y realizar estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa. Luego, se quema el asa, se enfría y se gira la placa 90 grados para hacer estrías adicionales, tocando 3 o 4 veces el área inicialmente sembrada y cubriendo otro cuarto de la placa. Finalmente, sin quemar el asa, se continúa haciendo estrías en el resto de la superficie sin sembrar (Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017, pp. 1-8) (Cataño Morales, Gallego Rodríguez y Buitrago Mejía, 2022, pp. 7-8).

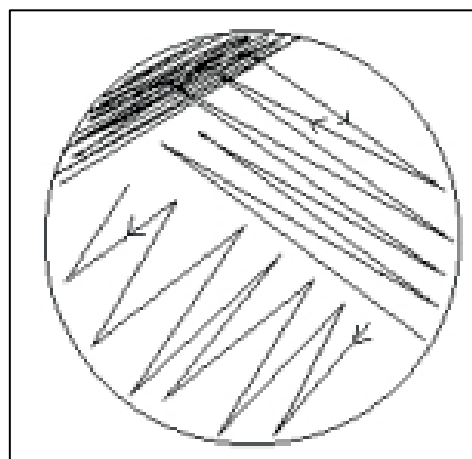


Ilustración 2-7: Técnica A de siembra en estría

Fuente: Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017, pp. 1-8

- Técnica B: Con el asa cargada, se realizan 3 o 4 estrías en la placa. Luego, se quema el asa, se hacen 3 o 4 estrías perpendiculares a las anteriores. Se repite este procedimiento quemando el asa después de cada serie de estrías, hasta cubrir toda la superficie de la placa (Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017,pp. 1-8).

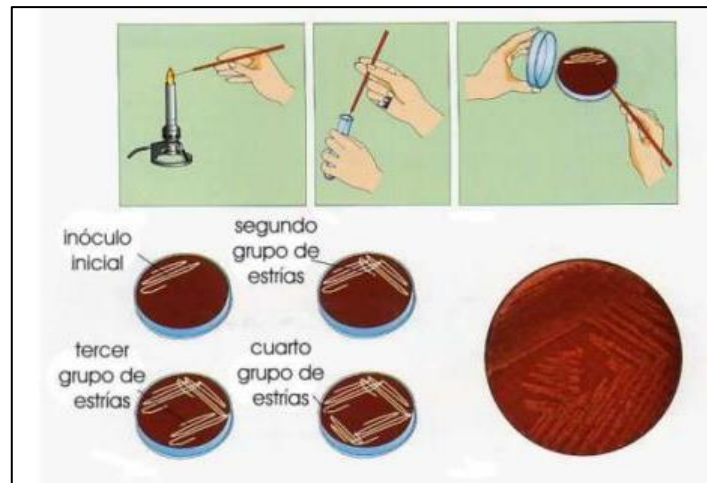


Ilustración 2-8: Técnica B de siembra en estría

Fuente: Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017,pp. 1-8

Existe otro método de siembra la cual se lo realiza en tubos existen dos técnicas:

- En profundidad: Para este método se utiliza una aza en punta, con la aza se pica el cultivo se va a sembrar y mediante punción introducimos en el medio el contenido directamente en la parte inferior del tubo (Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017,pp. 1-8).

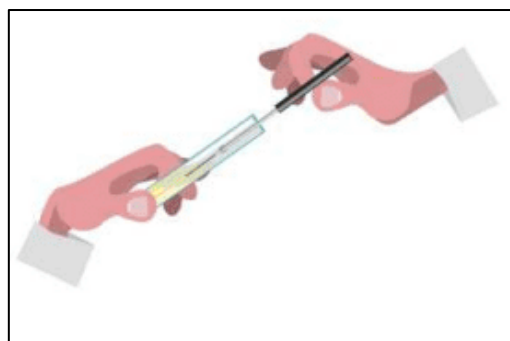


Ilustración 2-9: Siembra con aza de punta

Fuente: (Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017,pp. 1-8)

- En superficie: Para este método se utiliza una aza de aro, con el asa se toma el cultivo a sembrar y posteriormente se esparce el mismo sobre la superficie en bisel en forma de zigzag (Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017,pp. 1-8).

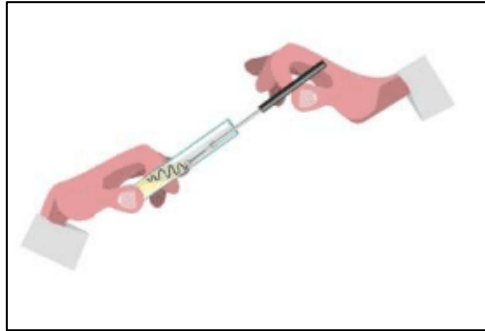


Ilustración 2-10: Siembra con aza de aro

Fuente: (Garibaldi, Santambrosio y Ortega, 2017, pp. 1-8)

2.1.9 Tinción de Gram

El método de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología es la tinción de Gram, que nos permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos taxonómicos: Gram positivas y Gram negativas, según su comportamiento frente a la tinción. Se cree que la diferencia en la coloración que presentan estos dos grupos se debe a las características químicas distintivas de su pared celular. Las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa de mureína o peptidoglicano en su pared celular, con un espesor que varía de 20 a 80 nm. Por otro lado, las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano más delgada, con un espesor de alrededor de 2 nm, y una capa externa adicional compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y lípidos (Sandle, 2021, pp. 1-15; Prayekti y Sumarsono, 2021, pp. 12-75).

El proceso de tinción de Gram implica el uso de cuatro soluciones diferentes. En primer lugar, se utiliza un colorante básico, como el cristal violeta, que se aplica a las bacterias en la muestra. Luego se añade un mordiente, que aumenta la afinidad entre las células bacterianas y el colorante. A continuación, se emplea un decolorante, generalmente alcohol o etanol, que elimina el colorante de las bacterias teñidas. La característica fundamental de la tinción de Gram es que las bacterias Gram negativas pierden el colorante durante el proceso de decoloración, mientras que las bacterias Gram positivas retienen el colorante y permanecen teñidas de azul. Para visualizar las bacterias Gram negativas, se utiliza un segundo colorante de contraste, como la safranina, que les da un color diferente al azul de las bacterias Gram positivas. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano (Esaú López-Jácome et al., 2014.).

Es importante destacar que la tinción de Gram no solo permite la clasificación de las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, sino que también proporciona información relevante sobre su

estructura y características celulares. Además, esta técnica de tinción es un paso fundamental en el proceso de identificación y diagnóstico bacteriano en microbiología clínica (Gram, 2019, pp. 13).

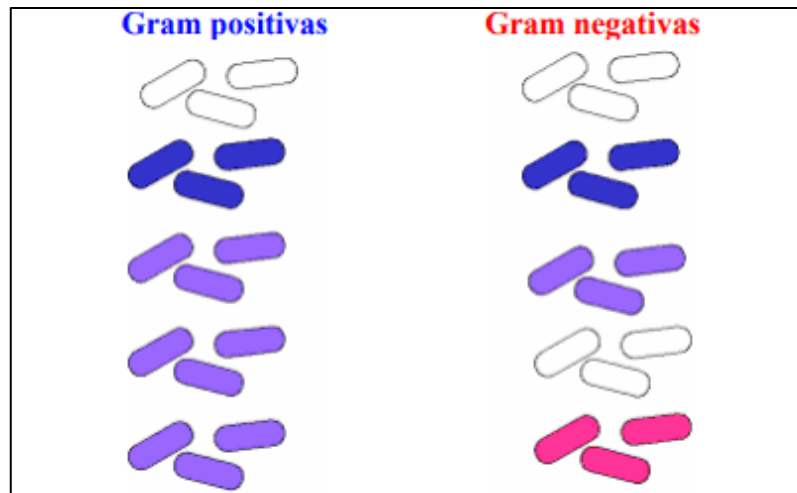


Ilustración 2-11: Coloraciones resultantes de la Tinción de Gram

Fuente: Gram, 2019, pp. 13

2.1.10 Técnicas de identificación molecular

La tesis realizada por Palomino Camargo y González Muñoz, (2014, pp. 535-546) aborda las técnicas de identificación molecular de bacterias, las cuales consisten en diferentes metodologías con el objetivo común de determinar el tipo de bacteria presente en una muestra. El procedimiento comienza con la extracción del ADN bacteriano, seguido de la amplificación mediante PCR, donde se replican genes específicos del ADN bacteriano. Posteriormente, se lleva a cabo la secuenciación utilizando bases de datos, como la del Centro Nacional de Biotecnología.

Dentro de las técnicas más precisas para la identificación molecular de bacterias se encuentra el análisis del *ARNr* 16S. Este análisis se considera como un cronómetro molecular altamente conservado genéticamente, ya que es un polirribonucleótido codificado por el ADN ribosomal presente en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Con un tamaño aproximado de 1500 pb, este análisis proporciona un polimorfismo interespecífico necesario para validar la identificación. Otra técnica auxiliar útil con fines filogenéticos y taxonómicos es el análisis del *ARNr* 23S. Dependiendo de las necesidades en la identificación molecular de bacterias, se recomienda el uso del análisis del *ARNr* 16S específicamente para el género *Bacillus* (Palomino Camargo y González Muñoz, 2014, pp. 535-546).

Tabla 2-2: Recomendaciones de las técnicas de identificación molecular bacteriana.

Categoría	Recomendaciones
Cepas por secuenciar	Cepas con escasa descripción Cepas con baja frecuencia de aislamiento Cepas con fenotipos atípicos Cepas de difícil identificación fenotípica Cepas de crecimiento lento o fastidioso Nuevos patógenos Bacterias de difícil cultivo
Análisis del ARNr 16S	Mínimo: > 98,5% similitud Ideal: 1.300 a 1.500 pb secuenciadas < 1% posiciones ambiguas
Criterio para la identificación de especie	Mínimo: > 98,5% similitud Ideal: > 99% similitud Comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia que posee estudios de homología de ADN. Para diferencias < 0,5% a la especie más cercana, considerar otras propiedades (fenotipo)
Criterio para la identificación de género	Rango de similitud 95-100%
Criterio para la asignación de familia	Similitud < 95%
Análisis retrospectivo de la identificación fenotípica	Morfología de la colonia Tinción Gram Catalasa/oxidasa Perfil bioquímico Requerimientos nutricionales

Fuente: (Jiménez, Evelyn, 2021)

2.1.10.1 Extracción de ADN bacteriano

La aplicación de estas técnicas puede variar según la velocidad de diagnóstico y/o la dificultad en el crecimiento del patógeno (por ejemplo, bajo inóculo, crecimiento lento, necesidad de medios sintéticos complejos, etc.). Esto permite la aplicación directa de estas técnicas en muestras clínicas o en cultivos bacterianos. La extracción del ADN genómico se realiza a partir de las células totales utilizando diversos métodos estándar o sistemas comerciales, los cuales son versátiles en términos del tipo de muestra clínica o matriz, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental. Además, se pueden aplicar modificaciones específicas según el tipo de bacteria para simplificar u optimizar la extracción cromosómica (García Cuan y Miranda Cárdenas, 2018, pp. 17-23; Forero Pineda et al., 2021, pp. 36-45).

2.1.10.2 Amplificación de ADN bacteriano

En un termociclador, se emplea el ADN como plantilla para llevar a cabo la amplificación de una secuencia de ARNr 16S mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta secuencia tiene un tamaño aproximado de 500 a 1.500 pares de bases, aunque puede variar si se están analizando otros genes. Utilizando cebadores universales o de amplio espectro que se complementan con regiones conservadas, teóricamente se puede amplificar el gen del ARNr 16S en todas las bacterias. Sin embargo, hasta el momento, ninguno de los cebadores utilizados se considera completamente universal, por lo que no es posible hacer una recomendación específica que garantice la amplificación en todos los procariontas (Bou et al., 2011.).

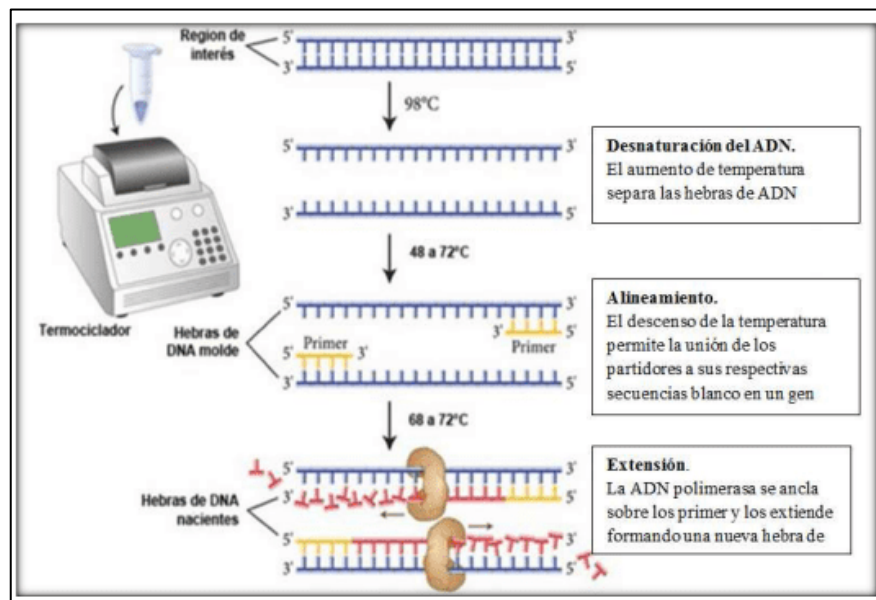


Ilustración 2-12: Esquema del proceso PCR

Fuente: (ESTRELLA HÉCTOR, 2017, pp. 1-55)

2.1.10.3 Electroforesis

La electroforesis es una técnica para separar biomoléculas basada en la movilidad y propiedades (normalmente ácidos nucleicos o proteínas) en un campo eléctrico sobre un sustrato poroso, cuya composición depende de la biomolécula a analizar. Para la separación de ácidos nucleicos se utiliza una matriz de agarosa, y para la separación de proteínas se utiliza una matriz de poliacrilamida. Esta técnica representa una herramienta fundamental para el análisis cuantitativo en diversos campos de las ciencias biológicas como la biología molecular, la bioquímica o la proteómica (Montalvo y Lugo, 2019, pp. 48-54).

La electroforesis es la migración de partículas cargadas o cargadas en un campo eléctrico. Esto ocurre cuando las sustancias están en solución acuosa. La velocidad de migración depende de la intensidad del campo y de las cargas de las moléculas. Así moléculas con cargas diferentes formarán zonas individuales mientras migran. Para reducir al mínimo la difusión de las zonas, la electroforesis se realiza en un medio electroforesis se lleva a cabo en un medio como viscoso o una matriz de gel. Por lo tanto, la velocidad de migración también depende del tamaño de las moléculas. De este fraccionamiento de una mezcla de sustancias con alta resolución (Westermeyer, 2005,pp. 1-6)

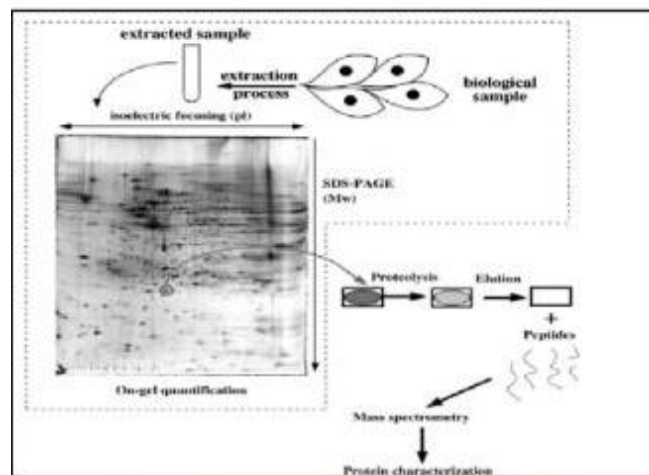


Ilustración 2-13: Electroforesis de ácidos nucleicos

Fuente: (Montalvo y Lugo, 2019,pp. 48-54)

2.1.10.4 Secuenciación del ADN bacteriano

Los avances significativos en los métodos de secuenciación han permitido obtener un vasto conocimiento de secuencias de manera más rápida y con mayor calidad. La secuenciación es un proceso similar a la PCR, donde se utiliza el ADN como plantilla, pero los cebadores de sentido directo y reverso actúan de manera independiente en reacciones separadas. Estos cebadores pueden ser los mismos utilizados en la amplificación o pueden diseñarse específicamente para esta etapa del ensayo. A diferencia de la PCR, en la secuenciación no se genera una nueva plantilla, sino que se reutiliza en ciclos programados (generalmente entre 25 y 35 ciclos). Se añaden bases marcadas con fluorocromos o terminadores, así como bases no marcadas, que se incorporan de manera aleatoria durante la síntesis. Los terminadores detienen la síntesis de la secuencia, lo que resulta en una mezcla de productos de ADN de diferentes longitudes al finalizar el proceso. Cada base se marca con un fluorocromo que absorbe a una longitud de onda específica, y posteriormente se detecta. Los terminadores no incorporados se eliminan mediante purificación del producto, y el tamaño de cada fragmento se determina mediante electroforesis capilar. A

medida que se conoce el tamaño y el terminador de cada fragmento (ya sea mediante separación en gel o elución), se determina la secuencia de bases, representada por colores diferentes, y se realiza la edición manual o automática. Las cadenas de ADN se secuencian de forma independiente, generando una secuencia directa y su complementaria (secuencia reversa). Dependiendo del modelo del secuenciador, el tipo de capilar utilizado y las variables del proceso de secuenciación, es posible simplificar el procedimiento, reducir el tiempo y los costos del ensayo, y aumentar el tamaño de la secuencia a analizar (generalmente entre 500 y 900 bases) (Bou et al., 2011.).

2.1.10.5 Análisis de la secuencia

Es el *último* proceso que se realiza en la identificación molecular tiene como objetivo el reconocimiento de la cepa de interés mediante una comparación con otras secuenciaciones inscritas en diferentes bases de datos. En la actualidad según Rodicio y Mendoza (2004, pp. 238-245) nos mencionan que en la actualidad existen algunas bases de datos con acceso libre como GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms) y también bases de datos privadas como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System), RDP es la base de datos de secuencias de ADNr (16S, 23S de procariontes, y 18S y 28S de eucariotas).

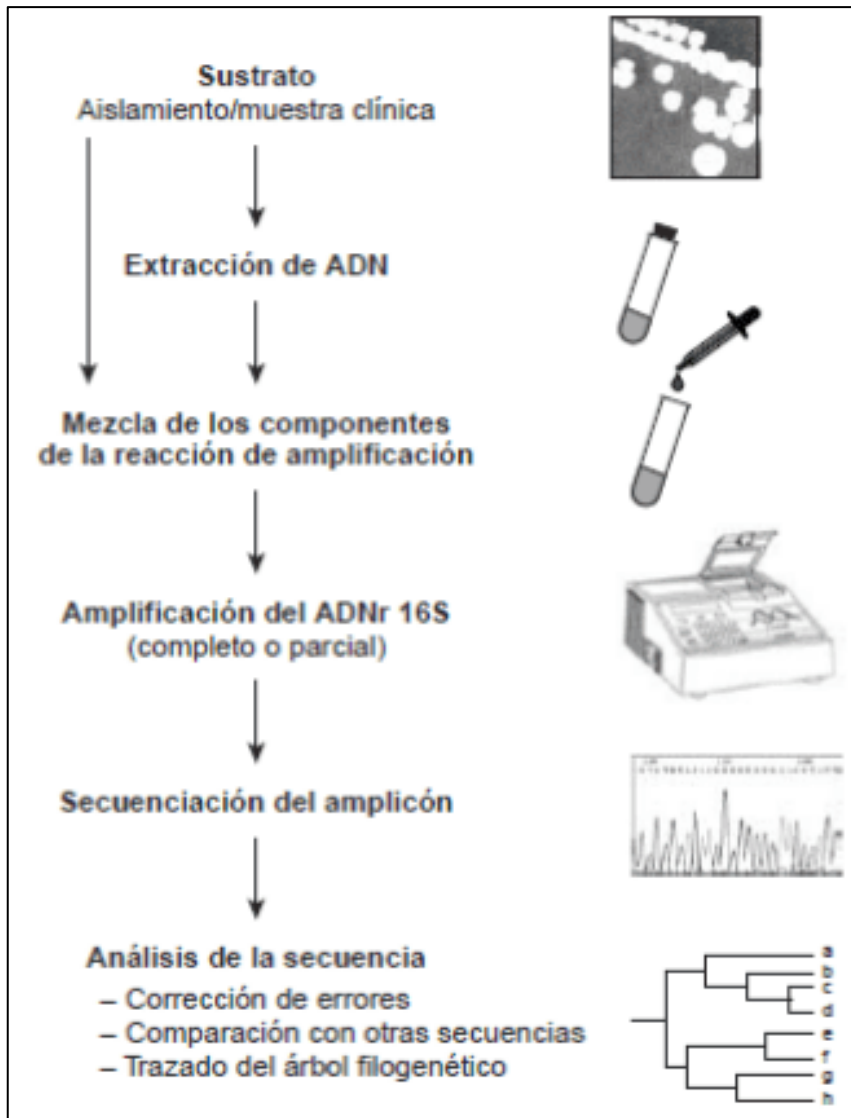


Ilustración 2-14: Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S

Fuente: Bou et al., 2011

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque de investigación

El presente trabajo de investigación corresponde a un enfoque cualitativo ya que se utiliza datos no numéricos que son interpretados subjetivamente por el investigador, e implica preparar y analizar muestras, realizar pruebas, recopilar datos y analizar repetidamente los mismos para identificar patrones y características comunes dentro de la población que experimenta dichos fenómenos (Bradshaw, Atkinson y Doody, 2017,; Abedini et al., 2018,pp. 80-93).

3.2 Alcance de la investigación

Esta investigación tiene un alcance descriptivo-exploratorio, descriptivo pues se pretende detallar las características, el género y la especie de las bacterias resistentes a ambientes extremos que se pueden encontrar en los sedimentos de la laguna del Quilotoa, al igual que algunos de los ambientes extremos que pueden soportar este tipo de bacterias; y exploratorio debido a que estas bacterias al resistir dos o más factores ambientales extremos serian consideradas poliextremofilas, un tipo de bacterias que no ha sido extensamente analizado en lagunas volcánicas, especialmente del Ecuador.

3.3 Diseño de investigación

3.3.1 *Según la manipulación o no de la variable independiente*

El diseño de la investigación corresponde a un diseño experimental ya que se toma decisiones sobre las variables que se manipularan (variables independientes) para observar el efecto que tiene esta manipulación sobre una variable dependiente, que corresponde al crecimiento bacteriano condicionado a las siguientes variables independientes: concentración de metales pesados arsénico y mercurio (As y Hg), presión osmótica (concentración de NaCl) y ausencia de oxígeno, las cuales permiten identificar cepas bacterianas que pueden crecer en diferentes ambientes extremos.

3.3.2 *Según la intervención en el trabajo de campo*

Este trabajo de investigación responde a un estudio transversal ya que la recolección de muestras se realizó en la Laguna del Quilotoa en un momento específico para su posterior análisis en laboratorio, brindando una vista general de las muestras.

3.4 Tipo de estudio

Este proyecto de investigación corresponde a una investigación de campo al implicar la recopilación de datos en un entorno natural, que reflejan con precisión el entorno natural de crecimiento bacteriano, y permiten probar hipótesis.

3.5 Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.5.1 *Muestreo de sedimentos*

Mediante las coordenadas especificadas y un método de muestreo aleatorio están definidos 4 puntos con localizaciones exactas que incluyen regiones cerca de la costa y lejos de afluentes y corrientes principales de agua para que haya mayor acumulación de sedimentos de textura fina en los que la presencia bacteriana aumenta gracias a la relación superficie/volumen que representan las partículas de menor tamaño y que pueden contener más agua, nutrientes y brindar mayor refugio a colonias microbianas (Plante y Busby, 2011, pp. 377-393).

Debido a la naturaleza de la investigación se debe utilizar un muestreo aleatorio para garantizar que la muestra sea representativa de toda la población, reduzca el sesgo y aumente la precisión de los resultados generales, teniendo en cuenta la accesibilidad para tomar la muestra (debido a la naturaleza del sitio de muestreo), las condiciones climáticas y el equipo requerido para tomar la misma (Nguyen et al., 2021, pp. 665-710). Estableciendo 4 puntos de muestreo con sus respectivas coordenadas en la Tabla 3-1:

Tabla 3-1: Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo

Punto	Código	Coordenadas UTM	
		X	Y
1	MQC1	732305.00 m E	9904706.00 m S
2	MQC2	732216.00 m E	9904920.00 m S
3	MQC3	732238.00 m E	9905044.00 m S
4	MQC4	732756.00 m E	9904535.00 m S

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

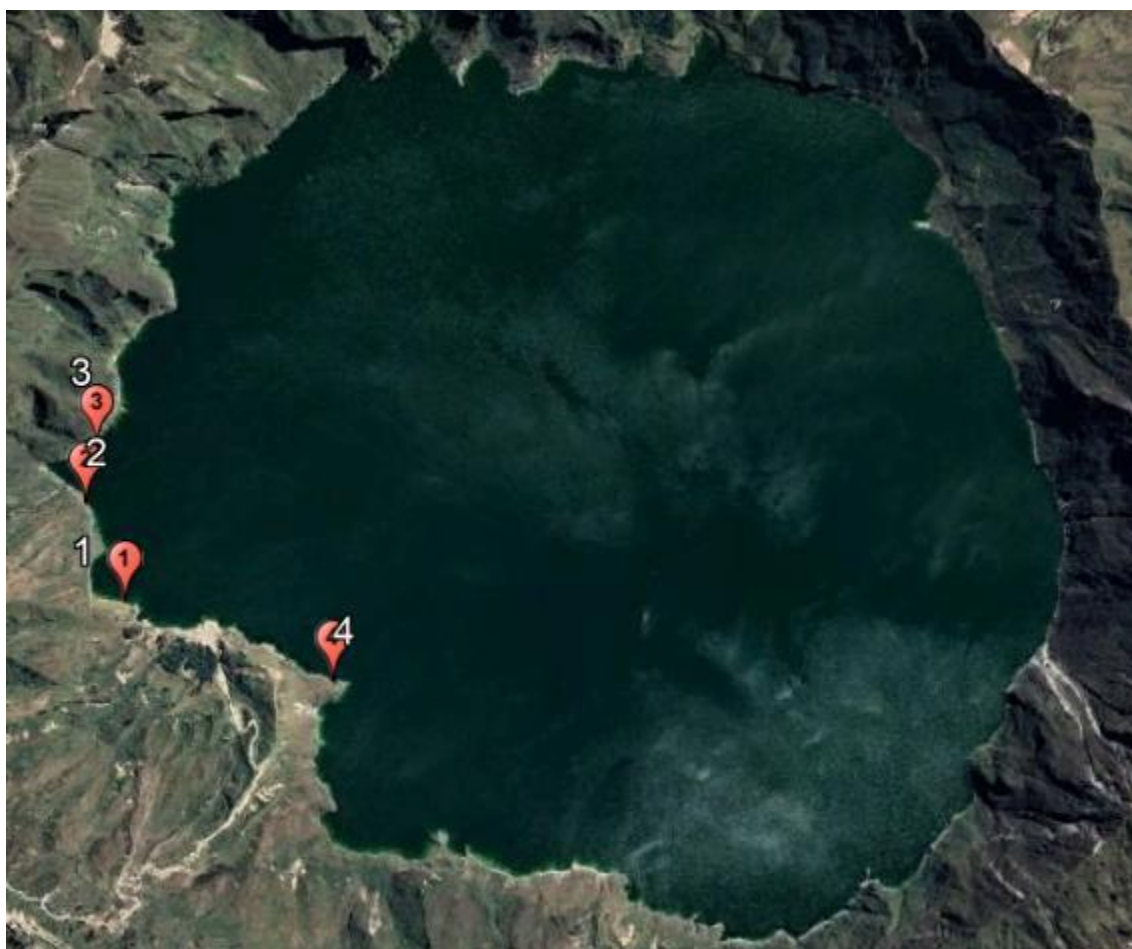


Ilustración 3-1: Puntos de muestreo en la laguna del Quilotoa

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

El primer muestreo ha de comenzar a 30 cm de profundidad a partir de la superficie del sedimento para obtener una capa acuosa poco profunda del mismo y continuando con una muestra de 50 y 70 cm de profundidad a partir de la superficie del sedimento y colocar cada muestra de cada profundidad en un respectivo tubo falcon de 50 mL (Getz, 2016,) mediante el uso de una pala de recolección cilíndrica, limpiando esta antes de la toma de muestras y entre las mismas

enjuagándola con agua destilada y si es posible con una esponja o cepillo estéril para retirar cualquier material adherido (Simmons, 2023,pp. 17).

3.5.1.1 Muestra compuesta

Al tomarse 3 muestras de un solo punto de muestreo de la Laguna del Quilotoa resulta necesario un muestreo compuesto para combinar cada una, reducir la variabilidad de datos y así obtener una muestra representativa que refleje las características generales del punto de muestreo en sus 3 profundidades, homogeneizando la muestra y almacenándola en fundas ziploc (Pacheco et al., 2022,pp. 960-967; Cervantes, Beier y Paez, 2017,).

3.5.1.2 Medición fisicoquímica in situ

Mediante el uso de un multiparámetro YIERYI 4in1 se miden los parámetros fisicoquímicos correspondientes a temperatura y pH de las muestras compuestas de los 4 puntos muestreados, al preparar una disolución de 20 gr de sedimento homogeneizado con 20 ml de agua destilada en un recipiente estéril reposando por un tiempo de 2 a 3 minutos e introduciendo el multiparámetro en el sobrenadante hasta 3 centímetros sobre la superficie del líquido, observar y registrar los datos, repetir el proceso para cada muestra compuesta, enjuagando el multiparámetro entre cada muestra.

3.5.1.3 Transporte de muestras

Las muestras se deben almacenar en un contenedor que mantenga la temperatura necesitada, el contenedor a utilizar será un cooler de espuma de poli estireno que puede mantener el umbral de temperatura más tiempo que los demás tipos de contenedores en conjunto con un refrigerante que baje la temperatura hasta 4 °C, el refrigerante a utilizar fue el hielo seco por su capacidad de mantenerse en estado sólido por más tiempo que el hielo normal (Lowe et al., 2020,).

3.5.1.4 Medición fisicoquímica ex situ

Luego del transporte y almacenamiento de las muestras se miden los parámetros físico químicos de las cuatro muestras compuestas de sedimento de la laguna del Quilotoa con los equipos del laboratorio, correspondiendo a la conductividad eléctrica y la salinidad de los sedimentos preparando una solución de 20 gr de la muestra compuesta con 20 ml de agua destilada, mezclando la solución y dejando reposar de cuatro a cinco minutos para que precipite la mayor parte de partículas sólidas, luego de que precipite la mayor parte de partículas se introduce en la

solución el electrodo hasta 3 cm de profundidad, y se registra los datos medidos luego de que la medición este estable. Este proceso se repite para las cuatro muestras compuestas enjuagando cuidadosamente el electrodo con agua destilada entre mediciones.

3.5.2 Aislamiento bacteriano

El proceso para realizar un aislamiento bacteriano y obtener un cultivo puro de bacterias a partir de una muestra mixta se realiza para identificar y caracterizar las bacterias de interés, mediante diferentes técnicas: biorreactores microfluidicos, prueba de susceptibilidad antimicrobiana y diluciones seriadas, técnica utilizada en esta investigación debido afinidad con la microbiología ambiental (Zdor, 2016,pp. 294-296).

3.5.2.1 Diluciones seriadas

Para identificar las bacterias presentes en el sedimento de la laguna del Quilotoa se procede a utilizar una dilución seriada que consiste en minimizar la densidad bacteriana presente en una muestra. El procedimiento estándar se basa en utilizar un factor de dilución 1/10, partiendo con una solución madre que contendrá 10 gr de la muestra compuesta 90 ml de un diluyente estéril, peptona al 1% la cual aportara con aminoácidos, péptidos y proteínas necesarias para el cultivo de microorganismos (Zhurbenko et al., 2015,pp. 531), al mezclar completamente el sedimento y el diluyente se toma 1 ml de la solución y se coloca en 9 ml de peptona al 1%, obteniéndose la dilución inicial 10^{-1} , para la siguiente dilución 10^{-2} se procede a tomar 1 ml de la dilución inicial 10^{-1} y colocarlo en un tubo que ya contenga 9 ml de diluyente, de igual manera se requiere mezclar completamente la dilución. Repetir el proceso anterior hasta llegar a la dilución que se requiere, dilución 10^{-4} (Carlina et al., 2021,pp.18).

3.5.2.2 Inoculación de cajas Petri

Realizadas las diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-4} se procede a transferir 1 μ l de cada dilución al centro de un medio de cultivo en una caja Petri, tanto con agar TSA y agar Nutritivo, preparados y esterilizados a 121 °C por 15 minutos, y extender la muestra completamente sobre la superficie mediante el uso de un asa de Drigalsky, etiquetar y sellar correctamente la caja Petri con para film (Carlina et al., 2021,pp.20; Matheus, Araque y Belandria, 2016,pp. 48-50).

Tabla 3-2: Composición de caldos y medios de cultivos

Caldo/Medio de cultivo	Composición	Concentración en el medio (g/L)
Agua de peptona 1%	Peptona de carne	10.0
	Cloruro de sodio	5.0
Agar TSA	Digerido pancreático de caseína	15.0
	Digerido papaínico de soya	5.0
	Cloruro sódico	5.0
	Agar	15.0
Agar Nutritivo	Digerido pancreático de gelatina	5.0
	Extracto de carne bovina	3.0
	agar	15.0

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

3.5.3 *Morfología colonial*

A las 24, 48 y 72 horas siguientes a la inoculación de las cajas Petri se describirá la morfología colonial de los organismos inoculados mediante la apariencia física de las colonias para realizar un cribado primario de las mismas y estudiar la evolución de los organismos coloniales (Awad, Mowafy y Osman, 2020, pp. 390-396; Schwaha, Ostrovsky y Wanninger, 2020, pp. 696-729). Se ha de tomar en cuenta el tamaño, la forma, los bordes, la transparencia, el brillo, el color, la textura, la elevación y la consistencia, identificando la consistencia con usa tocando la colonia, la elevación observando la colonia con la caja Petri horizontalmente mientras que las demás se observan con la caja Petri en una posición vertical (Guillen-Nepita, 2020, pp. 60).

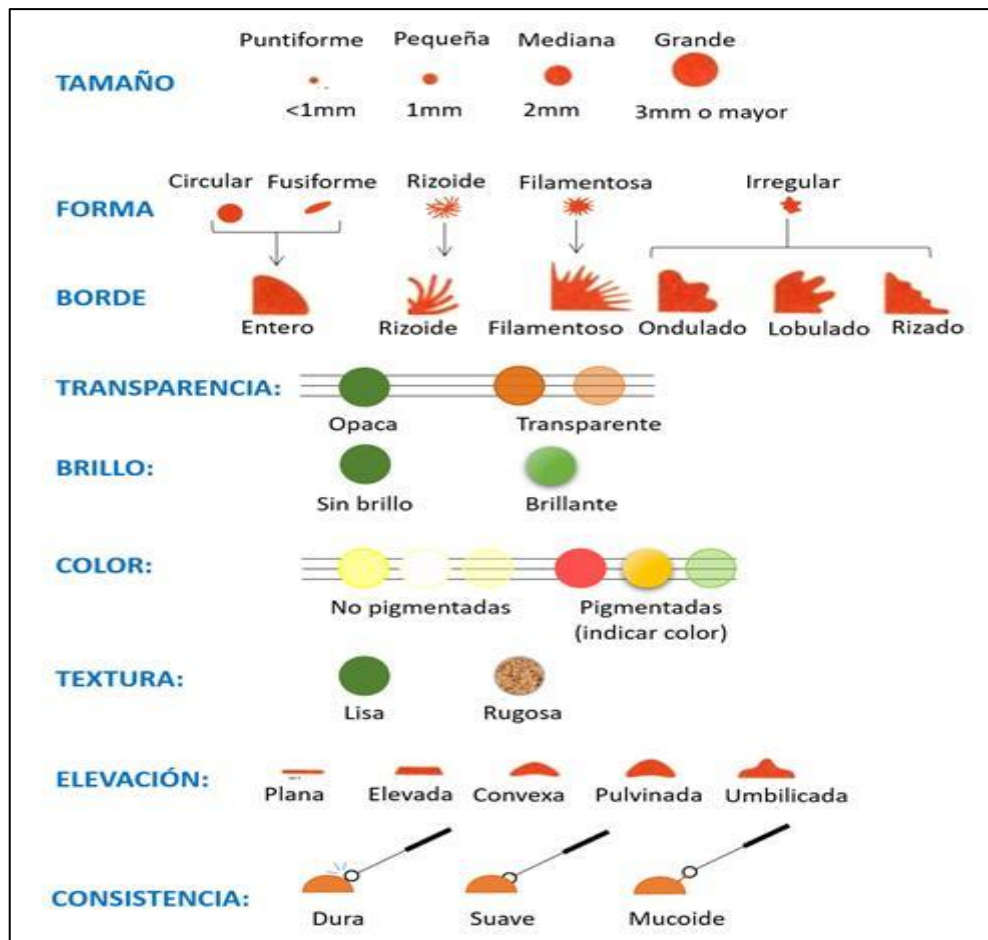


Ilustración 3-2: Características de la morfología colonial

Fuente: Guillen-Nepita, 2020, pp. 60

3.5.4 Obtención de cultivos puros

Luego de las 72 horas y de describir la morfología colonial de los cultivos se debe seleccionar las colonias que muestren mayor interés y proceder a tomar una pequeña porción de las mismas rozando ligeramente el asa sobre su superficie e inoculándolas en un medio de cultivo en caja Petri TSA o Nutritivo según corresponda su procedencia de crecimiento, y correctamente etiquetándolas (Carlina et al., 2021, pp.21).

3.5.5 Morfología microscópica

Luego de obtener los cultivos puros de bacterias se debe evaluar las mismas mediante su morfología microscópica, observando las bacterias teñidas con el microscopio con el lente 100x, observando sus formas y agrupaciones (Kushkevych et al., 2021,).

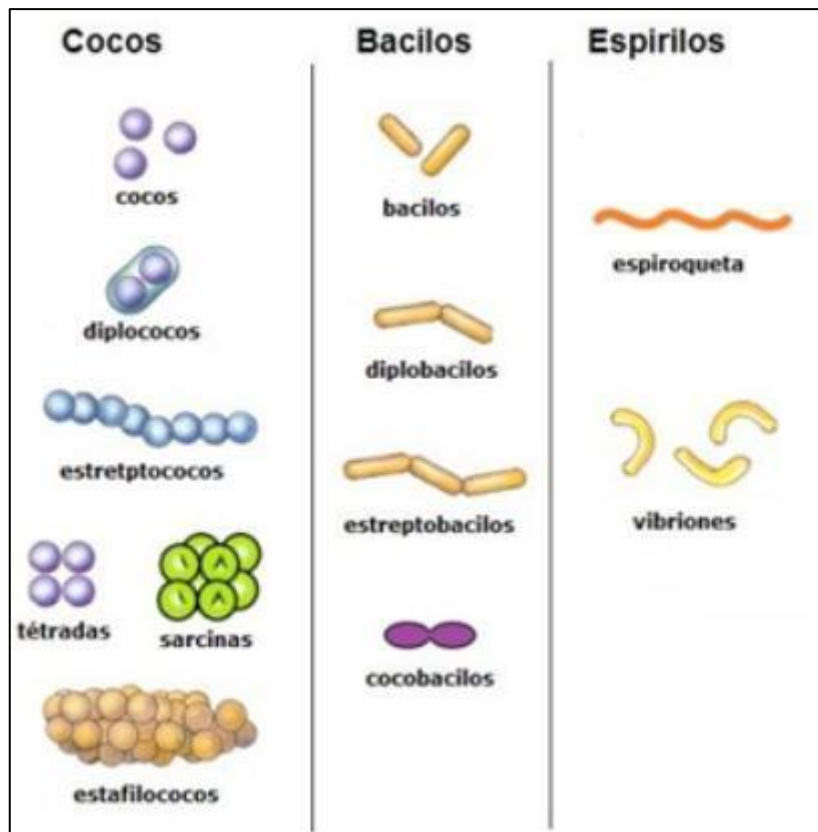


Ilustración 3-3: Características a reportar al describir la morfología microscópica

Fuente: Guillen-Nepita, 2020, pp. 60

3.5.5.1 Tinción de Gram

El método de tinción de Gram nos permite diferenciar bacterias en dos grupos: Gram negativas y Gram positivas, las primeras con una pared celular delgada constituida por peptidoglucanos y una bicapa lipoproteica que se deshace al decolorarse, y las segundas con una pared gruesa constituida por peptidoglucanos y polímeros e impermeable, siendo resistente a la decoloración (Rodríguez y Arenas, 2018, pp. 166-167).

Primero se debe tomar una muestra de la bacteria con el asa de cultivo y esparcirla por una placa porta objetos, fijando la misma al pasarla por la flama de un mechero, y colocar una gota de cristal de violeta sobre la muestra fijada, dejar reposar por cinco minutos para luego enjuagar la placa con agua destilada, colocar una gota de lugol sobre la misma y de igual manera esperar un minuto y enjuagar, continuar colocando una gota de alcohol acetona sobre la placa y esperar de 10 a 15 segundos para luego enjuagar la placa, por último colocar una gota de safranina sobre la placa esperando 40 segundos para colocar la placa cubre objetos sobre la muestra y observar al microscopio donde se observaran las bacterias Gram positivas de color púrpura o azul, mientras

que las bacterias Gram negativas aparecerán de color rosa o rojo (Kim et al., 2020,; Ogawa et al., 2018,pp. 79-84).

3.5.6 Pruebas de resistencia a metales pesados

3.5.6.1 Mercurio (Hg)

Bacterias como la *Escherichia coli* aisladas del litoral de Lima-Perú, específicamente en desembocaduras de ríos que transportan aguas residuales de origen urbano e industrial contaminadas con mercurio, presentaron un nivel de resistencia al cloruro de mercurio II (HgCl_2) treinta veces mayor ($300\mu\text{M}=81,45$ ppm) que bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Brevibacterium* ($>10\mu\text{M}=2,7$ ppm) de diversos ambientes contaminados (Sulca López y Alvarado Iparraquirre, 2018,pp. 445-452).

Con 10 mL de una primera dilución de concentración de 80000 ppm de HgCl_2 se preparó un medio de cultivo con 10 mL de medio de cultivo TSA o Nutritivo según corresponda para cada cepa pura a inocular colocando los 20 ml de cada solución en una caja Petri, este proceso se repitió para cada concentración de HgCl_2 (8000, 800 y 80 ppm) y se procedió a cultivar cada cepa pura en su respectivo medio de cultivo con cada concentración de HgCl_2 e incubar a 20 °C por 72 horas.

3.5.6.2 Arsénico (As)

Cepas bacterianas caracterizadas del río Camarones en Chile, que supera en 100 veces más el límite permitido de arsénico por la OMS presentaron un alto grado de tolerancia al arsenito entre 10 y 20 mM (4000 ppm de As_2O_3) por lo cual se investigó la presencia de genes involucrados en la expulsión de arsenito fuera del citoplasma mediante una bomba específica de eflujo (ATpasa) como sistema de supervivencia (Mellado, Víctor y Mondaca, 2011,pp. 131-137).

Con este antecedente se preparó una dilución de óxido de arsénico (III) (As_2O_3) con una concentración de 40000 ppm, para tomar 10 mL de la solución mezclándola con 10 mL de medio de cultivo TSA o Nutritivo según corresponde para cada cepa pura y colocar los 20 mL de solución y medio de cultivo en cajas Petri. Repetir este proceso para cada concentración de As_2O_3 (4000, 400 y 40 ppm) para cultivar cada cepa pura en una caja Petri con su respectivo medio de cultivo y cada concentración de As_2O_3 e incubar durante 72 horas a 20 °C.

3.5.7 Prueba de osmosis

Las halófilas extremas prosperan en concentraciones de 3,4 a 5,1 M de NaCl (20-30%), siendo el principal problema para su sobrevivencia la alta presión osmótica ejercida por las altas concentraciones de sal, estas bacterias están protegidas por una membrana semipermeable y solutos compatibles (estrategia salt-out) que se acumulan en el citoplasma para evitar la desecación mediante el movimiento osmótico del agua fuera de la membrana citoplasmática (Costa y Cerletti, 2021,; Kindzierski et al., 2017,; Siglioccolo et al., 2011,pp. 1-12).

Al basarse en la concentración máxima de sal 5,1 M (298044 ppm) que soportan microorganismo halófilos extremos se procede a preparar una dilución de 300000 ppm de NaCl, al tomar 10 ml de esta dilución y mezclarlos con 10 ml de medio de cultivo TSA o Nutritivo según corresponda para cada cepa pura, e inocularla, repetir este proceso mediante una dilución seriada en placa con cada cepa pura y mezclarlos bien en una caja Petri, repitiendo este proceso para cada concentración de NaCl (3000, 300, 30 y 3 ppm) para cultivar cada cepa pura en una caja Petri con su respectivo medio de cultivo y cada concentración de NaCl e incubar durante 72 horas a 20 °C.

3.5.8 Prueba de anaerobiosis

Se procedió a utilizar el medio fluido tioglicolato que se utiliza para el enriquecimiento y el cultivo de microorganismos anaerobios facultativos, anaerobios estrictos y microaerofilos ya que el tioglicolato es un agente reductor que consume el oxígeno en el medio. Colocando 29 gr del medio en un litro de agua calentando y agitando el agua hasta diluir completamente la misma y esterilizarla a 121 °C por 15 min y colocar 10 mL del medio en tubos con tapa.

Al enfriar completamente se inocula el medio con cada cepa pura usando un asa redonda y un asa recta para colocar el inoculo en la mitad del medio de cultivo, tapando el tubo e incubando sin presencia de luz a 20 °C hasta observar el crecimiento de organismos.

Al observar los crecimientos de microorganismos en la parte superior del tubo se concentrarán microorganismos aerobios, en mitad del tubo se concentrarán microorganismos anaerobios facultativos y en el fondo del tubo se concentrarán microorganismos anaerobios estrictos.

Tabla 3-3: Composición del medio fluido tioglicolato

Composición	Concentración en el medio (g/L)
Digerido pancreático de caseína	15.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	5.5
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5
L-cistina	0.5
Resazurina	0.001
Agar	0.75
Digerido pancreático de caseína	15.0

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

3.5.9 Identificación molecular de bacterias

La extracción de ADN se realizó por métodos convencionales, utilizando aproximadamente 100 mg de muestra de biomasa y evaluando la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de micro volúmenes y visualización en gel de agarosa.

El ADN obtenido fue enviado para la secuenciación de alto rendimiento posterior a la preparación de librerías de amplicón, utilizando los primers universales 16S: 27F/1492R y siendo ensambladas con herramientas bioinformáticas para finalmente comparar las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI para su identificación taxonómica.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Procesamiento, análisis e interpretación de resultados

4.1.1 Medición fisicoquímica in situ y ex situ

Los resultados de la medición de parámetros fisicoquímicos de las muestras compuestas de sedimentos de la laguna volcánica del Quilotoa están resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 4-1: Resultados de medición in situ y ex situ

Muestra	Medición in situ		Medición ex situ		
	Temp. (°C)	pH	pH	Cond. (µS/cm)	Sali. (ppt)
MQC1	16,16	7,59	7,77	29,1	1,44
MQC2	16,8	7,76	7,91	22,7	1,14
MQC3	16,8	7,8	8,02	15,4	0,87
MQC4	16,9	7,57	7,49	17,8	0,77
Promedio	16,665	7,68	7,7975	21,25	1,055

Realizado por: Mecías J., Silva C., 2023

La medición in situ de parámetros fisicoquímicos de la laguna del Quilotoa mostro que la temperatura no varía significativamente siendo la menor temperatura del punto 1 cerca del muelle con 16,16 °C y la mayor temperatura de 16,9 °C en el punto 4 promediando una temperatura de 16,67 °C, estas temperaturas fueron medidas al medio día en la época seca en el Ecuador y con presencia de lluvias leves en la región de la laguna del Quilotoa.

Cabe mencionar que los lagos de alta montaña son muy frágiles y cambiantes respecto a la época del año debido a que el mínimo cambio en su climatología afecta el agua de la laguna de manera que al estar en zonas geográficamente altas las temperaturas oscilantes son muy bajas y al mínimo cambio afecta la actividad y dinámica trófica de las comunidades planctónicas que habitan estas lagunas, de igual manera las precipitaciones afectan la temperatura al aumentar la cantidad de agua que se posa en la superficie de la laguna disminuyendo la temperatura gradualmente (Carrillo Espinoza, 2022,pp. 20-37). Adicionalmente según Solas, (2018, p. 35) la cantidad de radiación solar que llega a la superficie del agua de lagunas de alta montaña suele ser mayor debido a la menor cantidad de atmosfera que absorbe la radiación en estas altitudes calentando la superficie del agua

y pudiendo calentar el fondo de la laguna afectando tanto la temperatura en la superficie como a los microorganismos que habitan en sus aguas. Al igual que la temperatura depende de la época del año también se puede ver afectada por su ubicación geográfica, los cambios antropogénicos e incluso su propio pH (González et al., 2021, pp. 27-33).

Dentro de los cambios antropogénicos que afectan la temperatura del agua se menciona que los cambios en la cobertura vegetal circundante a las lagunas aumentan la cantidad de radiación solar que llega a la superficie y aumenta la temperatura del agua al igual que los cambios en el uso de suelo como agricultura, ganadería o urbanización alterando el ciclo del agua al igual que la cantidad y calidad de la misma que puede llegar a la laguna por precipitaciones (Morales-Ruiz y Díaz-López, 2020, pp. 377-385).

En la investigación “Evaluación limnológica y microbiológica de la Laguna del Quilotoa, provincia de Cotopaxi – Ecuador” realizada por Acuña Almachi, (2021, pp. 58-59) se indican valores de temperatura entre 11,2 °C y 16,9 °C, coincidiendo la temperatura mayor con la medida para esta investigación pero variando en la temperatura mínima por 4,96 °C, esto debido a que la temperatura menor fue tomada en horas tempranas del día, mientras que en esta investigación fue tomada en horas del mediodía. En otras investigaciones afines a la laguna del Quilotoa se han reportado temperaturas entre 12,10 °C y 14,9 °C durante los meses de noviembre y diciembre, meses finales de la estación húmeda e inicios de la estación seca en el Ecuador (González et al., 2020a, pp. 71-83).

Algunas lagunas volcánicas como la laguna de Bourakè en Nueva Caledonia mantienen una temperatura fluctuante entre 17,5 °C y 33,8 °C evitando una pérdida excesiva de masa debido a la temperatura gracias a respiraderos termales que liberan agua caliente lo cual aumenta la temperatura y evita evaporaciones (Tanvet et al., 2022, pp. 83), adicionalmente la profundidad de la laguna y la composición química del agua desempeñan un papel importante en la capacidad de retener agua y resistir a la evaporación (Carmona et al., 2019, pp. 1-14).

Los valores de pH en la Laguna del Quilotoa medidos in situ y ex situ variaron vagamente entre sí reportando un valor mínimo de 7,49 en el punto 4 y un valor máximo de 8,02 en el punto 3 denotando un pH ligeramente alcalino. Estos valores se asemejan a los obtenidos en un estudio en la laguna de alta montaña Sausacocha en Perú, teniendo un pH de entre 6,7 y 8,4, al igual que en la laguna Puna en Argentina con un pH entre 6,3 y 8,5, ambas lagunas por sobre los 3250 metros sobre el nivel del mar (Esparza Tacanga, 2019, pp. 110). Contrastando los datos antes citados, el pH de lagunas volcánicas alrededor del mundo varían considerablemente yendo desde lagunas completamente ácidas como las aguas del sistema volcánico Copahue-Río Agrío en Argentina

con un pH entre 0,3 y 0,8 o del lago volcánico Taal en Filipinas con un pH ácido de entre 2 y 3 atribuido al aumento de emisiones de CO₂ el cual acidifica las aguas al estar disuelto en las mismas y generar ácido carbónico por la actividad sísmica y volcánica de la zona (Bedogni et al., 2020, pp. 8-10), hasta lagunas neutras o ligeramente alcalinas como es el caso de la laguna de Limpiopungo en Ecuador con un pH que va desde 8,11 a 8,84 demostrando la capacidad de conservar un pH a pesar de recibir soluciones ácidas o alcalinas correspondientes a carbonatos, bicarbonatos o hidróxidos, al igual que la laguna de Colta con un pH promedio de 8.87 (Guangasis Toapanta et al., 2023, pp. 5-9).

Según Caudron, Ohba y Capaccioni, (2017, pp. 6) las lagunas volcánicas están clasificadas según su actividad volcánica en seis tipos, el primer grupo corresponde a lagunas volcánicas en erupción, el segundo corresponde a lagunas con actividad máxima, el tercero corresponde a lagunas con alta actividad subdividiéndose en dos subgrupos, ambos teniendo aguas ácidas, el primero con aguas calientes se caracteriza por temperaturas entre 35 y 45 °C con un total de sólidos disueltos (TDS) entre 150 y 250 g/l, el segundo con aguas frescas se encuentra con temperaturas entre 20 y 35 °C y entre 40 y 150 g/l de TDS, el cuarto grupo pertenece a lagunas con actividad media siendo menos ácidas y estando a menudo oxidadas o siendo ácido-salinas reducidas, el quinto grupo corresponde a lagos de baja actividad siendo lagunas calentadas por vapor o CO₂ el cual mayormente llega a la superficie pero puede quedar atrapado en las profundidades generando un lago estratificado, y finalmente el sexto grupo corresponde a lagos volcánicos sin actividad, grupo en el cual se encuentra la laguna del Quilotoa por la inactividad del volcán desde hace 800 años aproximadamente.

El siguiente parámetro medido fue la conductividad eléctrica de las muestras de la laguna del Quilotoa, con una conductividad entre 15,4 a 29,1 µS/cm, una conductividad sumamente baja que contrasta con varias investigaciones en la misma laguna del Quilotoa que han medido conductividades eléctricas de entre 16320 a 16560 µS/cm (González et al., 2020b, pp. 71-83), lo cual indica que hay una excesiva mineralización en las aguas de la laguna del Quilotoa.

Si bien según Quevedo Beltrán, Bazán Tapia y Rojas Rojas, (2020, pp. 136-151) y Ortiz y Jaquelina, (2017, pp. 127-132), una baja conductividad eléctrica como la obtenida en esta investigación puede indicar una menor actividad microbiana debido a que los microorganismos como bacterias y hongos producen ácidos orgánicos que disuelven minerales del suelo y liberan iones que son capaces de conducir la electricidad cabe mencionar que el estudio se centró en los sedimentos de la laguna del Quilotoa y no directamente en sus aguas, por lo que los iones que conducen la electricidad se encontraban ya esparcidos en el agua de la laguna y al mezclar el sedimento con agua destilada para su

medición de parámetros físico-químicos, se midió una conductividad considerablemente menor, pero sin afectar la microbiota presente en los sedimentos.

Dentro de la investigación “ Evaluación y seguimiento del cambio global en tres lagos de alta montaña de Parques Nacionales” en la cual se estudia datos históricos obtenidos de los sedimentos, la geomorfología y la red de drenaje comparándolos con datos medidos recientemente se menciona que para el lago de Marboré a 2590 metros de altitud muestreando sedimentos de la laguna se midió una conductividad eléctrica de 74 $\mu\text{S}/\text{cm}$, medida que es ligeramente comparable con la conductividad eléctrica del sedimento de la laguna del Quilotoa (Mata Campo et al., 2015, pp. 287-306).

Finalmente, el último factor físico-químico medido fue la salinidad de los sedimentos teniendo como resultado una salinidad entre 0,77 y 1,44 ppt equivalentes a una salinidad media de 1,05 ppt (1,05%), un porcentaje sumamente bajo comparado con el resultante de la medición en la investigación de Acuña Almachi, (2021,58) realizada en la laguna del Quilotoa que mostro salinidades de entre 9,6 y 9,9 ppt (9,9%) debido a que en la presente investigación se midió la salinidad de los sedimentos en solución con agua destilada por lo que los minerales capaces de mostrar la salinidad del agua se esparcieron en la laguna previo a la toma de muestras, razón por la que la salinidad y la conductividad eléctrica resultaron tan bajas. En contraste en algunas lagunas volcánicas como las lagunas de Lillo la salinidad alcanza un máximo de 350000 ppm o en las lagunas de Coca-Olmedo que contienen una salinidad máxima de 26000 ppm (Cabestrero, 2018, pp. 34-38) variabilidad debida a varios factores como su ubicación, sus características físicas, las acciones antropogénicas, la época del año e incluso el nivel de actividad volcánica de la laguna.

4.1.2 Aislamiento bacteriano

Para el aislamiento de bacterias se seleccionaron colonias caracterizadas a partir de las inoculaciones en cajas Petri de las diluciones seriadas, seleccionándose de acuerdo a su morfología colonial 10 cepas bacterianas aislando las mismas por estriado en cuatro cuadrantes y realizando 3 repiques para obtener cultivos puros.

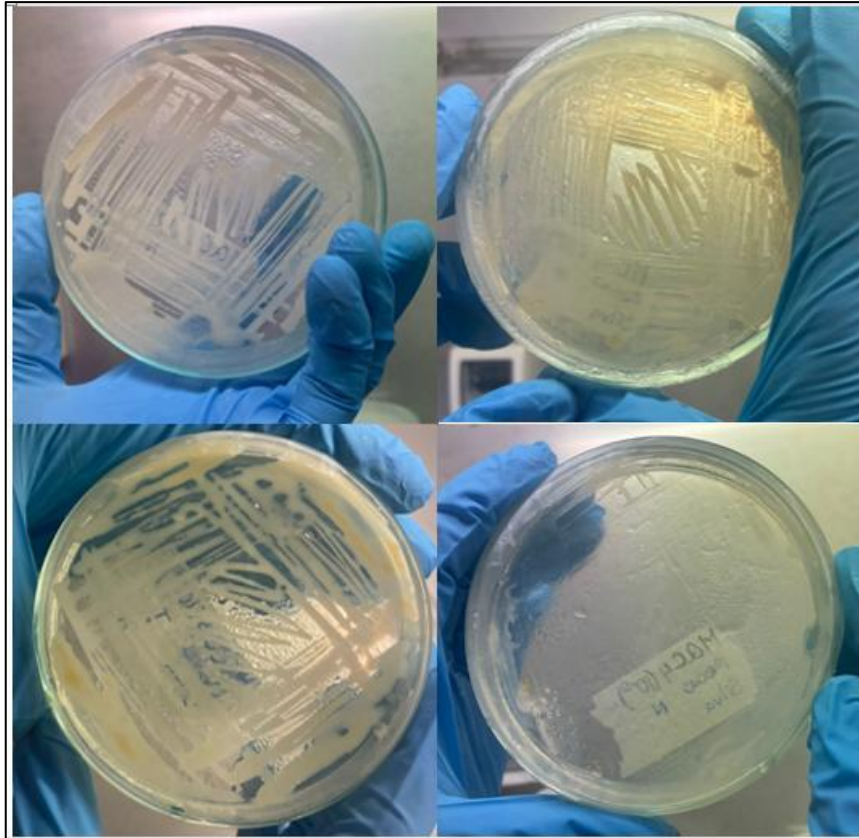


Ilustración 4-1: Algunas de las bacterias aisladas: MQC1 10-2 N, MQC1 10-2 N*, MQC3 10-4 TSA, MQC4 10-2 N

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

4.1.3 *Morfología colonial*

La caracterización morfológica de las colonias bacterianas se realizó teniendo en cuenta nueve características coloniales las cuales fueron: tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación y consistencia, el tamaño más común de las colonias fue mediano de entre 1,5 y 2,5 mm de diámetro destacando dos colonias grandes de más de 3 mm de diámetro, la mayoría con una forma irregular y bordes ondulados y siendo opacas a la vista y sin brillo, con tres colores visualizados: crema, amarillo y naranja, destacando una colonia bacteriana transparente e incolora en la mayor parte del área de cultivo, esta colonia igualmente presento una consistencia suave a diferencia de la consistencia mucoide de las demás colonias, todas con una elevación plana y una textura lisa excepto una colonia con textura rugosa. Si bien el color puede caracterizar a algunas bacterias que resultarán distintivas, no todas las de un mismo género producirán el mismo color de colonia e incluso algunas no producirán pigmentos visibles en absoluto, al igual que las texturas rugosas, arrugadas o granulares de las colonias pueden deberse a la producción de exopolisacáridos, formación de biofilms o la producción de enzimas que degradan el medio de

cultivo proporcionando pistas preliminares sobre el tipo de bacteria presente pero no es suficiente para determinar con certeza la identidad de la bacteria (Landa-Salgado et al., 2019, pp. 68-83).

Estas características si bien son información útil para poder acercarse a identificar ciertos géneros o especies bacterianas no son características definitivas para lograrlo pues el crecimiento y todos los aspectos mencionados variarán y dependerán de ciertos factores como pueden ser la especie bacteriana, las condiciones de crecimiento, el medio de cultivo utilizado o las propiedades bioquímicas específicas de la propia bacteria. A pesar de esto para la identificación de bacterias con capacidades reductoras de ciertos elementos es posible utilizar medios específicos en conjunto con otros compuestos para evaluar su capacidad reductora y muy posiblemente su género, como por ejemplo en la investigación “Identificación de bacterias con capacidad degradadora de poliuretanos aisladas del Golfo de México” en la cual se utilizó un medio marino ONR7a y el poliéster de poliuretano Polycrylica para denotar la formación de halos alrededor de las colonias bacterianas para determinar su capacidad de degradar poliuretano (Martín-DelCampo, 2018,).

Tabla 4-2: Morfología colonial de bacterias aisladas.

Cepa	Dilución	Medio de cultivo	Tamaño				Forma					Borde					Transpar.		Brillo		Color		Textura		Elevación		Consistencia		
			Puntiforme	Pequeña	Mediana	Grande	Circular	Fusiforme	Rizoide	Filamentosa	Irregular	Entero	Rizoide	Filamentoso	Ondulado	Lobulado	Rizado	Opaca	Transparente	Sin brillo	Brillante	No pigmentadas	Pigmentadas	Lisa	Rugosa	Plana	Elevada	Dura	Suave
MQC1	10 ⁻²	Nutritivo		x		x						x			x		x			Crema		x		x					x
MQC1*	10 ⁻²	Nutritivo	x						x				x			x	x				Amarillento	x	x						x
MQC2	10 ⁻²	TSA		x		x				x					x		x			Crema		x		x					x
MQC2	10 ⁻⁴	Nutritivo		x		x				x					x		x			Crema		x		x					x
MQC3	10 ⁻¹	TSA				x						x			x		x			Crema		x		x					x
MQC3	10 ⁻²	TSA		x		x				x						x	x				Amarillento	x		x					x
MQC3	10 ⁻⁴	TSA	x							x				x	x		x			Crema		x		x					x
MQC4	10 ⁻²	TSA	x									x			x		x				Naranja	x		x					x
MQC4	10 ⁻²	Nutritivo		x						x			x			x	x			Incoloro		x		x			x		
MQC4	10 ⁻⁴	TSA				x						x				x	x				Amarillento	x		x					x

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

4.1.4 Morfología microscópica

Mediante el proceso de tinción de Gram se pudo efectuar la caracterización microscópica de las cepas aisladas con el propósito de describir la morfología de cada una de ellas. De las cepas aisladas se diferenciaron 8 cepas que se tintaron de color rojizo las cuales ingresan en la categoría de Gram negativas y 2 tintaron de color violeta o morado las cuales son Gram positivas (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Resultado Tinción Gram de bacterias aisladas

Cepa	Dilución	Medio de cultivo	Morfología Microscópica	Tipo de Gram
MQC1	10 ⁻²	Nutritivo	Bacilos	Negativa
MQC1	10 ⁻²	Nutritivo ⁻¹	Bacilos	Negativa
MQC2	10 ⁻²	TSA	Bacilos	Negativa
MQC2	10 ⁻⁴	Nutritivo	Bacilos	Positiva
MQC3	10 ⁻¹	TSA	Bacilos	Negativa
MQC3	10 ⁻²	TSA	Bacilos	Negativa
MQC3	10 ⁻⁴	TSA	Bacilos	Positiva
MQC4	10 ⁻²	TSA	Bacilos	Negativa
MQC4	10 ⁻²	Nutritivo	Bacilos	Negativa
MQC4	10 ⁻⁴	TSA	Cocos	Negativa

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

En la figura 2-4 A, mediante la coloración de Gram efectuada proveniente de la muestra MQC3 10⁻⁴, se observó un grupo de bacterias Gram positivas, rectas y bacilares. Mientras que en la Figura 4-4 B, perteneciente a MQC4 10⁻⁴, observo un grupo de bacterias Gram negativas, redondas.

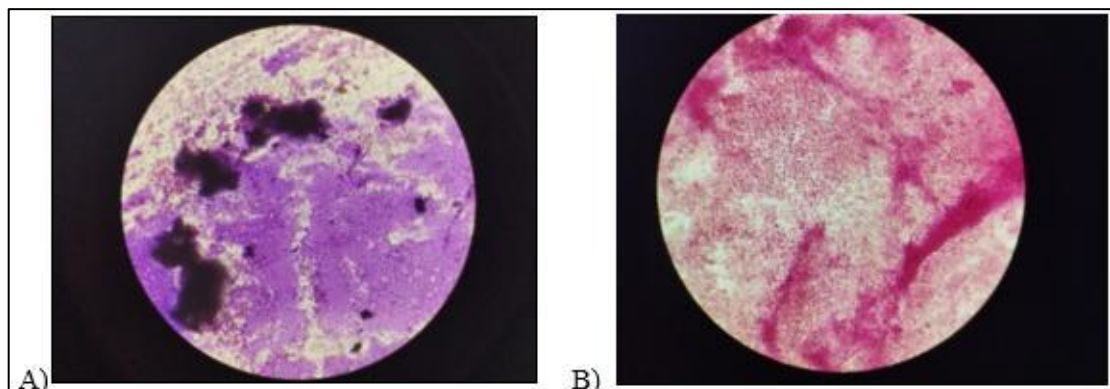


Ilustración 4-2: Observación 100x, Tinción Gram A: Bacilos (+); B: Cocos (-)

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Tabla 4-4: Caracterización microscópica.

Tinción Gram	Morfología		Porcentaje (%) Total
	Bacilos	Cocos	
Positivas	2	-	2
Negativas	7	1	8
TOTAL	9	1	10

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

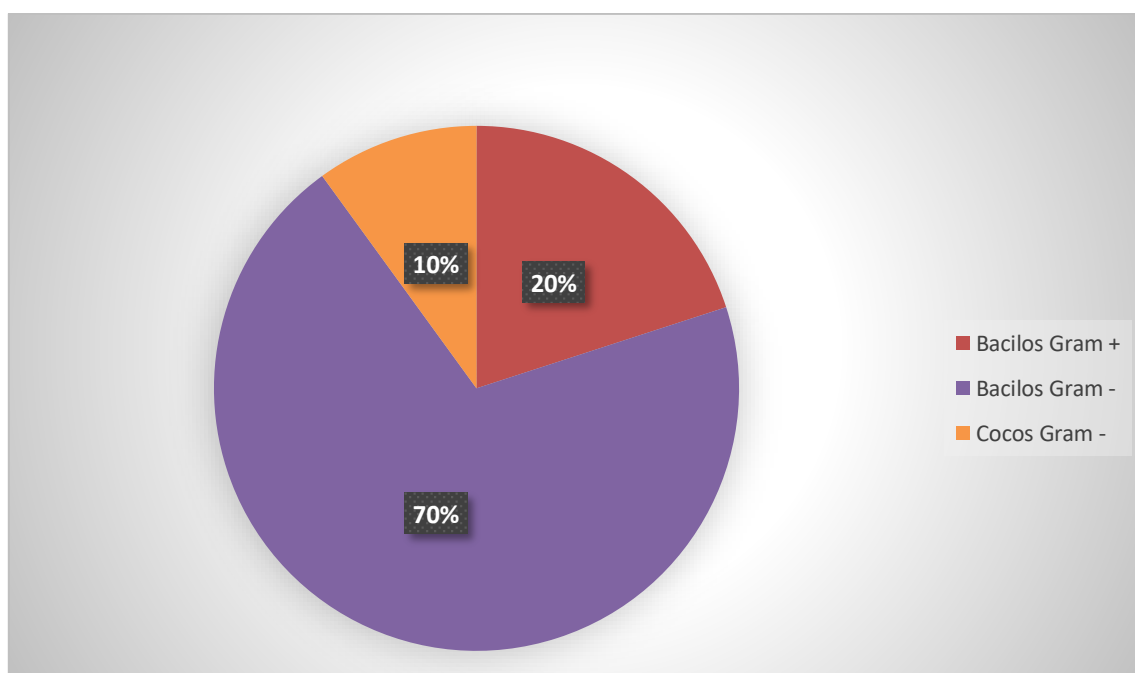


Ilustración 4-3: Porcentaje de bacterias según la tinción Gram de aislamiento de sedimentos provenientes de la laguna volcánica Quilotoa.

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

En el gráfico 1-4 se observa que las cepas previamente aisladas de la laguna Quilotoa un 70% fueron bacilos Gram negativos, un 20% bacilos Gram positivos y 10% cocos Gram negativos. De acuerdo al estudio realizado por Escobar (2019, p. 64) realizada en la misma laguna nos reporta resultados muy similares, el cual identificó un 38% bacilos Gram negativos, 17% bacilos Gram positivos y 26% cocos Gram negativos. Mientras que en otro estudio realizado por Acuña (2021, p.100) en la laguna del Quilotoa de igual manera tiene una similitud con los resultados obtenidos ya que se encontró 9% bacilos Gram positivos, 73% bacilos Gram negativos y 18% cocos Gram negativos. Corroborando con la información en un estudio llamado “Bacterioplancton de tres humedales altoandinos de la cordillera Oriental de Colombia” realizado por Meneses y Herrera

(2015,pp. 1-10) se encontró bacilos Gram negativos en un 74%, bacilos Gram positivos en un 17% y un 9% de cocos y cocobacilos Gram positivos.

4.1.5 Prueba de resistencia al mercurio (Hg)

La resistencia bacteriana al mercurio se realizó cultivando las cepas puras en 4 diferentes concentraciones de cloruro de mercurio II (HgCl₂), realizando esta prueba por triplicado para conseguir una certeza de resultados, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4-5: Pruebas de resistencia con Mercurio (II)

Cepa	Dilución	Medio	Concentración(ppm)			
			80	800	8000	80000
MQC1	10 ⁻²	Nutritivo	X	X	X	X
MQC1*	10 ⁻²	Nutritivo	X	X	X	X
MQC2	10 ⁻²	TSA	X	X	X	X
MQC2	10 ⁻⁴	Nutritivo	X	X	X	X
MQC3	10 ⁻¹	TSA	X	X	X	X
MQC3	10 ⁻²	TSA	X	X	X	X
MQC3	10 ⁻⁴	TSA	X	X	-	-
MQC4	10 ⁻²	Nutritivo	X	X	X	-
MQC4	10 ⁻²	TSA	X	X	X	X
MQC4	10 ⁻⁴	TSA	X	X	X	X

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Las pruebas de resistencia determinaron que solo dos cepas no fueron resistentes a altas concentraciones de mercurio siendo la cepa MQC4 10⁻² N que no resistió la mayor concentración de 80000 ppm de HgCl₂ y la cepa MQC3 10⁻¹ TSA que no resistió la concentración de 8000 ppm de HgCl₂, mientras que todas las demás cepas resistieron hasta la máxima concentración de 80000 ppm, siendo las cepas: MQC1 10⁻² N, MQC1* 10⁻² N, MQC2 10⁻² TSA, MQC2 10⁻⁴ N, MQC3 10⁻⁴ TSA, MQC3 10⁻² TSA, MQC4 10⁻² TSA y MQC4 10⁻⁴ TSA.



Ilustración 4-4: Prueba de resistencia al mercurio (II) 800 ppm de HgCl₂ en cepa MQC3 10-2 TSA.

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

En la investigación realizada por Sulca López y Alvarado Iparraguirre, (2018, pp. 445-452) se usaron cepas de *Escherichia coli* aisladas de la bahía del Callao en Perú entre 1999 y 2000 que presentaron una resistencia máxima al cloruro de mercurio II hasta una concentración de 81,45 ppm posiblemente debido a la cercanía entre los puntos de muestreo con el río Rímac y Chillón que funcionaban a modo de transporte de residuos urbanos, industriales e incluso mineros, esta resistencia al mercurio en cepas de *E. coli* estaba presente en plásmidos de resistencia los cuales pueden ser transferidos entre bacterias permitiendo colonizar ambientes más extremos conforme se transfieren y así facilitar la diseminación horizontal de genes (Páez Angarita, 2021, pp. 2-15). En base a estos datos y a que la resistencia al mercurio de cepas bacterianas pudo haber aumentado considerablemente a lo largo de 20 años se optó por tomar para la presente investigación una concentración mínima de 80 ppm de HgCl₂ para realizar las pruebas de resistencia al mercurio, hasta una concentración máxima de 80000 ppm obteniendo que ocho cepas bacterianas de la laguna del Quilotoa resistieran hasta 1000 veces más concentración de mercurio II que las cepas de *E. coli* aisladas en Perú.

De igual manera y con resultados similares a la de las cepas de *E. coli* en Perú, en la investigación “Aislamiento e identificación de bacterias resistentes al mercurio en sedimentos de la ciénaga de Mallorquín, Atlántico, Colombia” se menciona la identificación de bacterias resistentes a concentraciones de 0,5 mM (135,76 ppm) de cloruro de mercurio I (HgCl) por parte de dos cepas

de bacterias las cuales fueron *Micrococcus aloeverae* y *Halobacillus dabanensis*, aun siendo superadas por las bacterias de la laguna del Quilotoa por 600 veces más concentración de mercurio aproximadamente (Bravo Ortiz et al., 2022,).

En la tesis doctoral realizada por Rodriguez Rojas,(2017,) se mencionan varias cepas bacterianas con resistencia a concentraciones de mercurio II, Telurito (TeO_3) y a condiciones extremas de frio, tratándose una de ellas perteneciente al género *Pseudomonas* y posiblemente siendo una bacteria poliextremófila al resistir 200 μM (40,12 ppm) de Hg^{2+} y 200 μM de Telurito en presencia de Hg^{2+} , bacteria a la cual al realizarle una secuenciación de ARN mostro que la exposición a los compuestos mencionados podía influir la transcripción de genes de transporte, traducción, transcripción, estrés oxidativo, estrés por metales, oxidorreductasas y metabolismo de azufre.

Con el propósito de mitigar la contaminación por Hg en ecosistemas naturales Paternina, Perez y Vitola, (2017,pp. 301-310) aislaron bacterias rizosféricas de zonas aledañas a la mina Santa Cruz en Colombia, mina conocida por la explotación artesanal de oro, mediante el uso de altas concentraciones de mercurio, por lo que la microbiota tenía predisposición a sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de mercurio, y por lo tanto a mitigar este elemento, adicionalmente resistiendo un ambiente extremadamente ácido y salino debido a estas características en el suelo en el que se llevó a cabo el aislamiento. La cepa aislada con mayor tolerancia al mercurio fue la bacteria *Pseudomonas luteola* resistiendo hasta 200 ppm de mercurio en forma de cloruro de mercurio II (HgCl_2), siendo 400 veces menor a la reportada en esta investigación.

En un estudio similar en sedimentos de ríos, se encontró varias cepas bacterianas resistentes a mercurio y plomo, debido a que el rio del estudio fue el rio Ramis en Perú, en el cual se depositan tanto aguas servidas como desechos mineros de zonas aledañas, de estas cepas bacterianas las que mostraron mayor resistencia a mercurio y plomo, específicamente a cloruro de mercurio II (HgCl_2) fueron cepas de *Serratia* y *Escherichia* resistiendo concentraciones de 2000 ppm, siendo la concentración más cercana a la registrada en la presente investigación con cepas bacterianas aisladas de la laguna del Quilotoa. Estas bacterias descritas del rio Ramis en Perú llevan a cabo una biotransformación del mercurio a formas menos toxicas, en específico bacterias gramnegativas que resisten al mercurio cuentan con una enzima denominada mercúrico-reductasa ligada a NADPH que reduce el Hg^{2+} a Hg^0 el cual es volátil pero no es toxico para humanos ni microorganismos (Quispe Machaca, 2017,pp. 202-212). Otro método para resistir altas concentraciones de metales pesados como el mercurio viene descrito por Malavet-Luna, (2020,pp. 1-60) en su investigación con *Staphylococcus aureus* donde demuestra una prevalencia alta de genes *merA* y

merB, el primero codificando una reductasa mercúrica para reducir dicho elemento, el segundo gen codifica una liasa órgano mercurial la cual rompe los enlaces carbono-mercurio para detoxificar en conjunto con la reductasa mercúrica.

En esta investigación para garantizar la calidad y precisión de los resultados de los análisis microbiológicos se estableció un control de viabilidad al cultivar cada cepa bacteriana pura en su medio (TSA o Nutritivo) sin ninguna concentración de mercurio ni ninguna otra variabilidad al mismo tiempo que se realizaba la prueba de resistencia al mercurio con las mismas cepas puras y una cepa de *Escherichia coli* como muestra control. Cultivando la misma en medio TSA con cada concentración de cloruro de mercurio II utilizada en las cepas aisladas de la laguna del Quilotoa, reportándose que esta bacteria no creció bajo ninguna concentración de $HgCl_2$ siendo inhibida totalmente por el mercurio.

Tabla 4-6: Pruebas de resistencia con Hg (III) en *Escherichia coli*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)			
		80	800	8000	80000
<i>Escherichia coli</i>	TSA	-	-	-	-

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

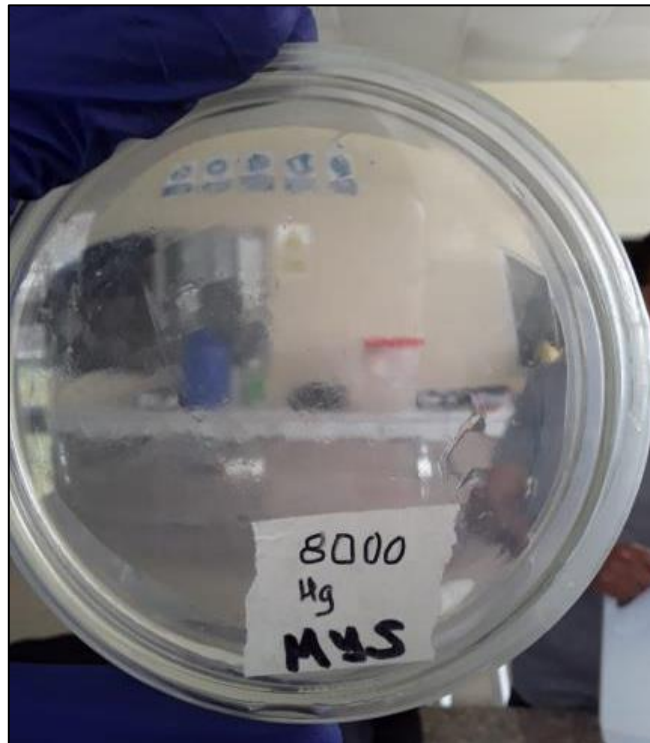


Ilustración 4-5: Prueba de resistencia al mercurio (II) 8000 ppm de $HgCl_2$ en *Escherichia coli*.

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Hay varias investigaciones en las cuales se han encontrado con cepas de *E. coli* resistentes a mercurio y otros metales pesados como en la investigación “El papel del gen *merA* de *Escherichia coli* resistente al mercurio del río Kahayan, Kalimantan Central, Indonesia, en la resistencia emergente a los antibióticos” que encontró en las aguas muy contaminadas del río Kahayan cepas de *E. coli* que contaban con el gen *merA* el cual codifica la enzima mercúrica reductasa que reduce el Hg^{2+} a Hg^0 (Martani et al., 2022, pp. 6629-6634), de igual manera según Mollocondo, (2020, pp. 64) en el río Coata se lograron aislar bacterias resistentes tanto a mercurio y plomo, siendo el *E. coli* resistente a bajas concentraciones de mercurio pero a altas concentraciones de plomo de hasta 10000 ppm. Con el hecho de que cepas de *E. coli* sobrevivan en ambientes con altas concentraciones de mercurio se puede implicar que las mismas puedan desarrollar la capacidad de bioadsorber el Hg, como se analiza en la investigación de Espinoza Salazar y Manziny Lazo, (2019, pp. 1-119) en la cual se utilizó cepas de *E. coli* para adsorber aproximadamente 7,83 ppm de Hg de un suelo contaminado de Ascensión, Huancavelica, en un tiempo óptimo de 90 minutos, utilizando biomasa de *E. coli* con 20 horas de crecimiento aproximadamente, pero acidificando el suelo, pues los análisis mostraron una disminución de pH de 7,49 a 5,35 luego de utilizar las cepas de *E. coli* debido a la transformación de ciertas estructuras de nitrógeno.

Si bien las investigaciones antes mencionadas trabajan con cepas de *E. coli* que previamente estuvieron en contacto con mercurio ya sea en líquidos o sólidos hay investigaciones las cuales han trabajado para estudiar la adaptabilidad que presentan estas cepas, como se menciona en “The Effect of Mercury Exposure to *Escherichia Coli* Bacteria Resistant to Mercury and *Escherichia Coli Esbl* in Vitro” en la cual se intentó demostrar que la exposición repetida al mercurio podría cambiar una cepa normal de *E. coli* a una cepa resistente al mercurio, exponiendo las cepas durante un día in vitro a concentraciones de mercurio desde 0,02 ppm hasta 0,2 ppm de $HgCl_2$, resultando en que de las 27 cepas expuestas 9 desarrollaron una resistencia a la máxima concentración de mercurio en tan solo un día (Retno Kusumawati, 2021, pp. 72-80). Esto explica la razón de que las cepas de *E. coli* utilizadas en la presente investigación no hayan tenido ningún crecimiento a ninguna concentración de $HgCl_2$, pues se puede establecer una relación entre la exposición a un contaminante y el desarrollo de una resistencia específica al mismo, por lo que es posible suponer que las cepas utilizadas no han sido expuestas anteriormente a mercurio II.

Adicionalmente en las investigaciones realizadas por Retno Kusumawati, (2021, pp. 72-80); Martani et al., (2022, pp. 6629-6634); y Sulca López y Alvarado Iparraguirre, (2018, pp. 445-452) se establece una relación entre la resistencia al mercurio en cepas de *E. coli* y la resistencia de la misma a diversos antibióticos lo que provoca un peligro de salubridad pues gracias a la contaminación por mercurio

causada por diferentes fuentes antropogénicas la resistencia bacteriana está aumentando gradualmente y podría aumentar exponencialmente si se diera el caso de que esta resistencia estuviera codificada en plásmidos los cuales pudieran ser transferidos a otras bacterias.

4.1.6 Prueba de resistencia al arsénico (As)

Para determinar la resistencia de bacterias al arsénico, se realizó cultivando las cepas puras en 4 diferentes concentraciones de óxido de arsénico III (As_2O_3), realizando esta prueba por triplicado para conseguir una veracidad de resultados, los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 4-7: Pruebas de resistencia con Arsénico (III)

Cepa	Dilución	Medio	Concentración(ppm)			
			40	400	4000	40000
MQC1	10^{-2}	Nutritivo	X	X	X	X
MQC1*	10^{-2}	Nutritivo	X	X	X	-
MQC2	10^{-2}	TSA	X	X	X	X
MQC2	10^{-4}	Nutritivo	X	X	X	-
MQC3	10^{-1}	TSA	X	X	X	X
MQC3	10^{-2}	TSA	X	X	X	X
MQC3	10^{-4}	TSA	X	X	X	-
MQC4	10^{-2}	Nutritivo	X	X	X	X
MQC4	10^{-2}	TSA	X	X	X	-
MQC4	10^{-4}	TSA	X	X	X	X

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Las pruebas de resistencia determinaron que cuatro cepas no fueron resistentes a altas concentraciones de arsénico siendo las cepas MQC1* 10^{-2} N, MQC2 10^{-4} N, MQC3 10^{-1} TSA, MQC4 10^{-2} TSA las cuales no resistieron a la mayor concentración de 40000 ppm de As_2O_3 , mientras que todas las cepas restantes resistieron hasta la máxima concentración de 40000 ppm, siendo las cepas: MQC1 10^{-2} N, MQC2 10^{-2} TSA, MQC3 10^{-4} TSA, MQC3 10^{-2} TSA, MQC4 10^{-2} N y MQC4 10^{-4} TSA.

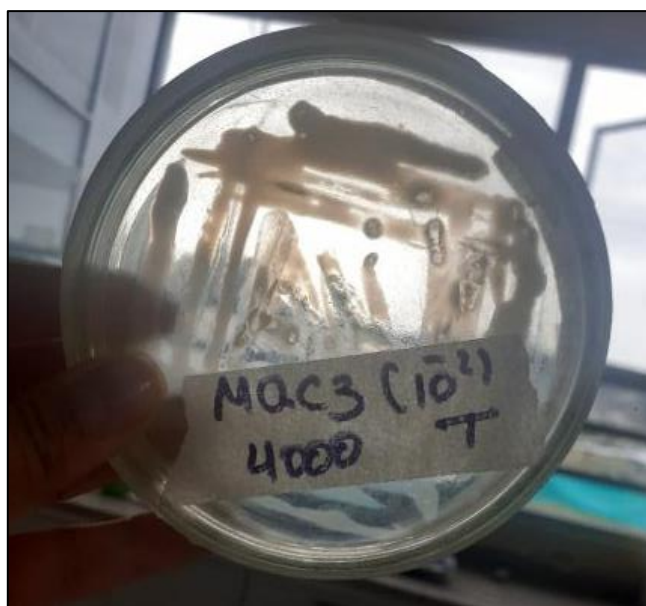


Ilustración 4-6: Pruebas de resistencia de As con concentración de 4000 ppm Muestra MQC3 10-2 TSA.

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación con respecto a la resistencia de bacterias al As tienen una similitud con los datos generados por Arredondo et al. (2018, pp. 23-27) en un estudio de identificación de bacterias y hongos de importancia biotecnológica en la resistencia a arsénico, la cual trabajaron con concentraciones desde 15 hasta 30ppm, mientras que en este trabajo se observó una mayor resistencia presentada ya que se llegó hasta una concentración de 40000 ppm. La resistencia bacteriana observada podría atribuirse a una oxido- reducción de arsénico presentada en el compuesto As_2O_3 .

En otro trabajo de investigación realizado por Burbano y López. (2022, pp. 50-51) la cual trabajaron con Bacterias resistentes a As y Cr de la microcuenca del río Gala, pusieron a resistencia cepas bacterianas contra trióxido de arsénico la mayoría de cepas soportaron concentraciones de 100 ppm, las cuales en este proyecto las cepas trabajadas resistieron 300 veces más que en el trabajo anteriormente mencionado.

Según Guevara, et al. (2017, pp. 1-7), laboraron con muestras de suelo en la cual pusieron a resistencia a bacterias a concentraciones de 15, 19, 25 y 29 ppm. Trabajaron con un aislamiento seriado de suelo en dos diluciones, se verificó la resistencia in vitro al Arsénico de estos organismos dando como resultado que bacterias del género *Bacillus pasteurri*, *Vibrio sp*, *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *Sphaericus*, *Sporobolomyce sp*. Similitud que se tienen con los resultados de esta

investigación a diferencia que se trabajó con concentración de 40 hasta 40000 demostrando las cepas seleccionas que tienen una mayor tolerancia al As.

Al comparar resultados de tolerancia de bacterias hacia As tenemos el estudio reportado por Uddin, Hossain y Uddin. (2022,pp. 93-97), en donde trabajaron con cinco cepas como: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa*, *Listeria murrayi*, *Moraxella urethalis* y *Planococcus citreus*, todas estas cepas fueron capaces de tolerar hasta 100 ppm (mg/l) de arsénico (III), según Laha et al. (2021,pp. 144-148) trabajaron con bacterias que aislaron de un suelo contaminado con As en Bengala occidental en la India en donde la cepa bacteriana LAR- presento una concentración inhibitoria mínima frente a As (V) y As (III) tolerando hasta 300 ppm. En los dos estudios los valores son inferiores basados con los resultados obtenidos en este proyecto de investigación.

Las diferencias entre el nivel de tolerancia pueden verse afectados por distintos factores los mismo que tienen relación con las condiciones ambientales en las que habitan como: pH, temperatura, concentración del meta, presión osmótica, etc., ya que estos factores son los que confieren características únicas a cada bacteria.

En esta investigación como control de viabilidad del medio se inoculo en medio TSA y nutritivo sin suplementación de As (III). Por otra parte, también se realizó pruebas de resistencia hacia el As (III) con bacterias ya reconocidas, mediante estudios previos de modo que fueron utilizadas como muestras de control.

Como control o punto blanco se trabajó con *Escherichia Coli* en medio TSA suplementado con As (III) bajo las mismas condiciones, obteniendo un crecimiento a concentración de 40 hasta 4000 ppm en 40000 no existió crecimiento (Tabla 4-8) (Ilustración 4-7). De acuerdo con Letek, Ramos y Mateos. (2005,pp. 2) demostró que *Escherichia coli* presento una menor resistencia al As (III) en concentraciones de (0,04- 4 ppm) y As (V) en concentraciones de (10 – 100 ppm)

Tabla 4-8: Pruebas de resistencia con As (III) en *Escherichia coli*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)			
		40	400	4000	40000
<i>Escherichia coli</i>	TSA	X	X	X	-

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023



Ilustración 4-7: Prueba de resistencia de *Escherichia coli* en TSA con As a concentración 4000 ppm.

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Estos resultados concuerdan con los de Ordóñez, et al. (2003, pp. 2) en su investigación se aislaron 4 cepas de *E. coli* provenientes de aguas residuales, se demostró que son tolerantes a concentraciones de arsenito As (III) de entre (3-5 ppm) y resistentes a As (V) de entre (7-9 ppm). En comparación con el estudio realizado por Rodarte Gómez (2017, pp. 10) la cual trabajo con *E. coli* y puso a resistencia a metales como (As, Pb, Zn y Cd) en donde se demostró la tolerancia que estas bacterias pueden tener a estos distintos metales, para el arsénico se trabajó con As (V) en concentraciones (5, 10 y 50 mM) en donde en cada concentración hubo respuesta de crecimiento. En la investigación realizada por Valenzuela. (2012) realizado con muestras de aguas con contaminación alta de arsénico, se trabajó con *E. coli* pmv132- arsRABS ante diferentes concentraciones de As (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ M). Otro estudio realizado por Mellado, Víctor y Mondaca. (2011, pp. 131-137), los experimentos de medición de los niveles de tolerancia a arsenito y arseniato realizados en las cepas estudiadas mostraron que la cepa del río Camarones era capaz de tolerar (10-20 mM) de arseniato y (>100 mM) de arseniato, aunque la cepa del río Lauca (área utilizada como un control debido a la detección de bajas concentraciones de arsénico) fue capaz de tolerar arsenito (8-10 mM) y cuando se clasificó como resistente fue capaz de crecer en medios con concentraciones de arsenito (> 7 mM) y concentraciones de arseniato (> 20 mM), el 100% de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio correspondieron a cepas de alta resistencia horizontal.

Trabajos adicionales efectuados por Rivera T. et al. (2006,pp. 110-113) sobre *Enterobacteriaceae* aisladas de agua contaminada mostraron que estos microorganismos son tolerantes al cobre, plata, cobalto, cromo, cadmio, mercurio, plomo, estaño y zinc, y los mismos plásmidos (>20 kb), que sirven como posibles factores que confieren viabilidad. en medios hostiles. También se ha determinado que cepas de *E. coli* resistentes al arsénico aisladas de diferentes ríos contaminados presentan los genes *arsA*, *arsB* y *arsC*, que se cree son los responsables de su resistencia al arsénico y sus derivados. En el estudio realizado por Martínez et al. (2010,pp. 1-10) nos explica que la tolerancia a metales en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas puede estar determinada por diferentes mecanismos celulares. Estos incluyen aquellos que usan transportadores de membrana para excretar iones metálicos en el ambiente, aquellos que usan modificaciones enzimáticas para alterar el estado redox de estos elementos químicos y aquellos que incorporan iones metálicos en las células. La manifestación de estos mecanismos puede ser el resultado de la fuerte presión que ejerce el ambiente contaminado, capaz de seleccionar y modificar los organismos habitados en contacto con los metales pesados.

4.1.7 Prueba de osmosis

Para someter a las bacterias aisladas a una prueba de osmosis se cultivaron en medios con concentraciones altas de cloruro de sodio NaCl, para que mediante osmosis puedan igualar los niveles de soluto dentro y fuera de su membrana citoplasmática, la concentración máxima elegida fue de 300000 ppm, concentración a la que prosperan organismos halófilos extremos.

Tabla 4-9: Pruebas de resistencia con Cloruro de Sodio

Cepa	Dilución	Medio	Concentración(ppm)				
			30	300	3000	30000	300000
MQC1	10 ⁻²	Nutritivo	X	X	X	X	X
MQC1*	10 ⁻²	Nutritivo	X	X	X	X	X
MQC2	10 ⁻²	TSA	X	X	X	X	X
MQC2	10 ⁻⁴	Nutritivo	X	X	X	X	-
MQC3	10 ⁻¹	TSA	X	X	X	X	-
MQC3	10 ⁻²	TSA	X	X	X	X	X
MQC3	10 ⁻⁴	TSA	X	X	X	X	-
MQC4	10 ⁻²	Nutritivo	X	X	X	X	X
MQC4	10 ⁻²	TSA	X	X	X	X	-
MQC4	10 ⁻⁴	TSA	X	X	X	X	X

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

De las 10 cepas sometidas a la prueba con altas concentraciones de NaCl 4 cepas (MQC3 10^{-1} TSA, MQC3 10^{-4} TSA, MQC2 10^{-4} N, MQC4 10^{-2} TSA), demostraron soportar hasta concentraciones de 30000 ppm resultando ser halófilas moderadas sobreviviendo en ambientes con 3% de salinidad hasta posiblemente 15% de salinidad, las 6 cepas restantes (MQC1 10^{-2} N, MQC1* 10^{-2} N, MQC2 10^{-2} TSA, MQC3 10^{-2} TSA, MQC4 10^{-2} N, MQC4 10^{-4} TSA), resultaron resistir hasta 300000 ppm de NaCl, una salinidad de 30%, llegando hasta la mayor concentración soportada por halófilos extremos (Rothschuch Osorio, 2023, pp. 1-3).



Ilustración 4-8: Prueba de resistencia al cloruro de sodio 300000 ppm de NaCl en cepa MQC2 10^{-2} TSA.

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

En la investigación “Efectos negativos de los microorganismos halotolerantes y/o halófilos en alimentos con conservas salinas” se describe la clasificación de organismo halófilos y halotolerantes de acuerdo a la siguiente manera; no halófilos resistentes a menos de 1% p/v de NaCl, halófilos leves entre 1-3%, halófilos moderados entre 3-15%, halófilos extremos entre 15-30%, y halotolerantes resisten de 0 a 1 M de NaCl, siendo los dos primeros mayoritariamente organismos del dominio eucarya, los halófilos moderados son mayoritariamente bacteria y los halófilos extremos son mayoritariamente archaea (Liliana y Rocha, 2020,). En un estudio del 2021 se evaluó la capacidad de sobrevivencia de bacterias halófilas en salmueras enriquecidas con metales pesados en Túnez, estas bacterias fueron de los géneros, *halomonas*, *cobetia*, *idiomarina*, *marinobacter* y *salivibrio*, las cuales resistieron una salinidad de 50 g/L de NaCl, o 5% de

salinidad (50000 ppm), y hasta 1,57 ppm de zinc y 0,034 ppm de cadmio, siendo las cepas más resistentes a los 3 factores *Halomonas sp.* y *Salinivibrio costila* siendo bacterias halófilas moderadas comparándose con las cepas MQC3 10^{-1} TSA, MQC4 10^{-2} TSA, MQC2 10^{-4} N, MQC4 10^{-2} N dentro del presente estudio que soportaron hasta en 3% de salinidad (30000 ppm) (Baati et al., 2022, pp. 341-351). De igual manera fueron aisladas bacterias halófilas del lago salado de Khara en Irán para evaluar su capacidad de biorremediar metales pesados, estas bacterias fueron identificadas como *Oceanobacillus sp.* y *Salinicoccus sp.* y se les sometió a crecer en medios de cultivo con hasta 6,7 mM (1388,24 ppm) de plomo y 4,1 mM (240,63 ppm) de níquel, resistiendo estas concentraciones de metales y hasta biorremediando el 98,8% de plomo y 73,5% de níquel. Sintetizando nano partículas de plomo y níquel (Diba et al., 2021, pp. 3893-3903).

Este tipo de bacterias halófilas moderadas y extremas son capaces de recuperar suelos salinos como lo demuestra la investigación realizada por Aristizabal et al., (2019, pp. 621-632), en la cual se aislaron cepas bacterianas capaces de sobrevivir a salinidades hasta de 12 % (120000 ppm) para inocularlas en bolsas con 3 gramos de suelos salinos con hasta 5,2 ds/m de conductividad eléctrica debido a las sales presentes, esta conductividad fue disminuida gracias a los inóculos hasta 2 ds/m, demostrando el gran potencial para capturar y movilizar el sodio en suelos salinos.

En el manantial alcalino “Las Salinas” en Chiapas México se extrajeron sedimentos y agua para un análisis físico químico y aislación de bacterias halófilas especialmente en el sedimento, donde se identificaron cepas de *Halonomas axialensis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas knackmussii* y *Agromyces indicus*, las cuales eran bacterias halófilas extremas pues crecieron en altas concentraciones de NaCl, de hasta 25% (250000 ppm), estas cepas presentaron el gen *nifH* demostrando la capacidad de fijar nitrógeno en ambientes salinos, dando bases para estudiar la fijación de nitrógeno en las cepas bacterianas resistentes a altas concentraciones de sal obtenidas en la presente investigación (Ruiz Rios, 2020, pp. 57-79).

En la investigación realizada por Magaña Tzuc, (2021,) se muestreo dos puntos de los suelos salinos en la Reserva de la Biosfera de los Petenes, en el sureste del golfo de México en busca de bacterias poliextremofilas, el primer punto era un suelo considerado perturbado a causa de las actividades de restauración del manglar y el segundo punto fue considerado conservado por ser una zona de difícil acceso sin actividad antropogénica, para clasificar las cepas aisladas en halófilas se utilizó agar TSA en conjunto con 3 concentraciones diferentes de NaCl, siendo la mayor concentración usada de 3 M o 17,5% (175000 ppm) de salinidad entrando en el rango de halófilos extremos descrito por Liliana y Rocha, (2020,), del total de 64 cepas aisladas del primer punto, 23 resultaron ser halotolerantes creciendo hasta 0,5 M (2,92% o 29220 ppm) de NaCl, 10 fueron halófilos moderados, creciendo en 2 M (11,18% o 116880 ppm), y 31 fueron halófilos extremos creciendo

en hasta 3 M (17,5% o 175320 ppm) de NaCl, mientras que de 15 cepas aisladas del segundo sitio, 3 fueron halotolerantes, 4 fueron halófilos moderados y 8 fueron halófilos extremos, mostrando una prevalencia de halófilos extremos en ambos puntos, indicando una gran cantidad de cepas de *Bacillus sp.* las cuales pueden soportar rangos extremos de pH, temperatura, salinidad y estrés por humedad, además de especies bacterianas como *Priestia sp.*, *Agrobacterium pusense*, *Gracilibacillus phocaeensis*, *Inquilinus sp.*, *Saphylococcus sp.*, *Streptomyces caeruleatus*, *Virgibacillus sp.* y *Gracilibacillus sp.* en ambos puntos. Este estudio muestra cierta relación con la presente investigación, pues el mayor número de bacterias fueron halófilas extremas, la diferencia radica en el número de cepas aisladas debido a la cantidad de muestra que se extrajo en el estudio de Magaña Tzuc, (2021.), pues fue realizado en suelo tanto afectado por actividades antropogénicas como no afectado.

De esta misma investigación y para el estudio “Efecto de la inoculación de bacterias halófilas sobre el crecimiento vegetal de *Zea mays* (maíz) bajo condiciones de estrés por salinidad.”, se seleccionaron 3 cepas bacterianas de *Bacillus sp.*, *Bacillus stratosphericus* y *Neobacillus drentensis*, las cuales demostraron una mayor actividad promotora para el crecimiento vegetal y se preparó un inoculante bacteriano el cual posterior al crecimiento de las plantas de maíz a evaluar en concentraciones máximas de salinidad de 200 mM (1,18% o 11688 ppm), se volvieron a inocular colocando 1 ml de cada cepa bacteriana en el sistema radical pegado al tallo de las plantas, y al evaluar su desarrollo se pudo constatar que presentaron un efecto positivo, aumentando la altura de las plantas, el diámetro del tallo, etc., en comparación con los tratamientos con fertilizantes, además disminuyendo la conductividad eléctrica del suelo traduciéndose en una disminución directa de la salinidad del mismo, mostrando que las cepas bacterias halófilas extremas pueden tener un potencial enorme para su aplicación en el crecimiento de vegetales sometidos a estrés salino o en suelos salinos (Ayil Chan, 2023.).

Finalmente para garantizar la precisión de los resultados expuestos se estableció un control de viabilidad cultivando cada cepa bacteriana en su respectivo medio de cultivo (TSA o Nutritivo) sin ningún compuesto adicional y al mismo tiempo se cultivó una cepa de *E.coli* en medio TSA con cada una de las concentraciones de NaCl a las que se expuso cada cepa aislada. Mostrando el *E. coli* un crecimiento en concentraciones de hasta 30000 ppm o 3% de salinidad como se muestra en la Figura 4-9.

Tabla 4-10: Pruebas de resistencia NaCl en *Escherichia coli*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)				
		30	300	3000	30000	300000
<i>Escherichia coli</i>	TSA	X	X	X	X	-

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023



Ilustración 4-9: *E.coli*. creciendo en un medio solido con 30000 ppm de NaCl (3% de salinidad).

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Estos resultados fueron similares a los presentados por Stahl et al., (2018,pp. 56-61) en el cual se creó un microcosmos simulando una zona de playa oceánica, en el cual se examinó la persistencia de *E. coli* a diferentes niveles salinos (0-6%), encontrando que hay una relación inversa entre el aumento de la salinidad y el número de UFC de *E. coli*, lo cual muestra que está siendo inhibida por el aumento de salinidad, pero hasta cierto punto, ya que el *E. coli* persistió en niveles de salinidad superiores a 4%, salinidad normal presentada en océanos, en conjunto con los resultados que presentamos, esto implica que después de varias generaciones el *E. coli* puede desarrollar una mayor tolerancia a la salinidad al estar expuesto persistentemente a salinidades mayores.

En relación con lo mencionado, Li et al., (2021,pp. 7-56) presentan que el estrés osmótico puede tener influencias negativas en el crecimiento de *E. coli* ya que su concentración óptima de salinidad es de 0,5%, pero pudiendo adaptarse gradualmente hasta una concentración del 11% de salinidad, entrando en el rango de halófilos leves, pero no siendo considerada una bacteria de este tipo, de

igual manera presenta que el *E. coli* es capaz de presentar una biopelícula hasta concentraciones salinas de 1%, pero esta capacidad se inhibía completamente en concentraciones del 5%, finalmente mencionan que pueden suceder cambios fenotípicos a largo plazo en las cepas de *E. coli* que estén expuestas a altas concentraciones ya sean salinas u de otro elemento inhibitorio, los cuales les permitirán adaptarse a muchos más ambientes y harán posible su propagación con mayor facilidad.

DeVilbiss et al., (2021, pp. 11-68) concluye que gracias a que anteriormente se pensaba que el aumento de la salinidad en sistemas acuíferos disminuía radicalmente la supervivencia de *E. coli*, hoy en día se observan mayores tasas de supervivencia de la misma bacteria en gradientes de salinidad incluso mayores, lo cual está reduciendo cada vez más la capacidad humana para predecir los riesgos derivados de la exposición a patógenos transmitidos por el agua, ya que esta bacteria ha demostrado una gran adaptabilidad frente a altas concentraciones de contaminantes.

Dentro del estudio “Distribución y concentración de coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* y enterococos en el agua y sedimento en el estero salado (tramos b, d, e y g).” llevado a cabo por Baños Cruz, (2021, pp. 1-12) se nombran valores de salinidad entre 12 y 27%, debido a la renovación de agua a consecuencia de la marea, en estas aguas y específicamente en los sedimentos se pudo hallar alta concentración microbiana, pero en específico una baja concentración de *E. coli*, de igual manera corroborando esto en un estudio en el estuario Chulluype en Santa Elena se relacionó la salinidad y la presencia de *E. coli* de manera que a mayor salinidad menor presencia de *E. coli* habrá pero aumentará la presencia de coliformes (Plúas-Chiquito et al., 2020, pp. 61-70).

4.1.8 Prueba de anaerobiosis

Para realizar la prueba de requerimiento de oxígeno (condiciones anaerobias) se efectuó en medio fluido Tioglicolato, los resultados obtenidos son expresados en la siguiente tabla:

Tabla 4-11: Resultados obtenidos prueba de anaerobios con tioglicolato

Cepa	Dilución	Medio de cultivo	Resultado generado (turbidez)	Tipo de microorganismos
MQC1	10 ⁻²	Nutritivo	+++	Microaerofílicos
MQC1*	10 ⁻²	Nutritivo	++++	Anaerobio facultativo
MQC2	10 ⁻²	TSA	++++	Anaerobio facultativo
MQC2	10 ⁻⁴	Nutritivo	++++	Anaerobio facultativo
MQC3	10 ⁻¹	TSA	++	Anaerobio estricto
MQC3	10 ⁻²	TSA	++++	Anaerobio facultativo
MQC3	10 ⁻⁴	TSA	+++	Anaerobio facultativo
MQC4	10 ⁻²	Nutritivo	++	Anaerobio facultativo
MQC4	10 ⁻²	TSA	+++	Microaerofílicos
MQC4	10 ⁻⁴	TSA	+++	Anaerobio facultativo

• +++++ = **denso, opaco** ++++= **denso, opalescente** ++= **opalescente** += **leve crecimiento**

Realizado por: Mecias, J; Silva, C, 2023

Según los resultados generados en la mayoría de las cepas se observó turbidez a lo largo del tubo (Ilustración 4-11), es decir son anaerobios facultativos ya que pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno, sin embargo, un tubo creció de manera abundante en el fondo del tubo (anaerobios estrictos) (Ilustración 4-10)., y finalmente en dos tubos el crecimiento fue cercano a la superficie de contacto con el oxígeno (microaerofilos)



Ilustración 4-10: Pruebas con tioglicolato anaerobios estrictos

Realizado por: Mecias, J; Silva, C, 2023



Ilustración 4-11: Pruebas con tioglicolato anaerobios facultativos

Realizado por: Mecias, J; Silva, C, 2023

Para obtener un contraste de los resultados obtenidos se realizaron ensayos con *Escherichia coli* en las mismas condiciones que las bacterias aisladas en la laguna volcánica Quilotoa. En la Figura 8-4 podemos observar un crecimiento de *E. coli* en todo medio indicando que se trata de una bacteria anaerobia facultativa, por su crecimiento en todo el medio. Tanto Hernandez, Dominguez y Gonzaga Gutierrez. (2018,pp. 13) como Rodríguez-Angeles. (2002,pp. 464-475) nos manifiestan que *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo lo cual le da la cualidad de que puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno, de la familia Enterobacteriaceae el cual goza de una sola cadena en espiral de ADN, se mueve mediante flagelos peritricos.

E. coli es el organismo más estudiado por el ser humano, fue descubierta en el año 1885 por el pediatra Theodor Escherich, quien aisló esta bacteria de las heces de sus pacientes por su facilidad de reproducirse en ambientes cotidianos para el hombre y animales tales como: tierra, agua y plantas, además su temperatura optima de crecimiento es de 37°C, valores de pH extremos (inferiores a 3,8 o superiores a 9,5) y valores de aw inferiores a 0,94 por lo que pertenece al grupo de mesófilos (Hernandez, Dominguez y Gonzaga Gutierrez, 2018,pp. 13).



Ilustración 4-12: De izquierda a derecha, muestra *E. coli* y muestra blanco

Realizado por: Mecias, J; Silva, C, 2023

4.1.9 Identificación molecular

Realizadas cada una de las pruebas de resistencia, se eligió 8 de las 10 cepas bacterianas sometidas a cada prueba para su identificación molecular mediante la amplificación de la región 16s, ensamblando las secuencias y comparándose las mismas con la base de datos de GenBank del NCBI, asegurando en un 100 % la identidad de 6 de las 8 cepas analizadas, que resultaron ser MQC1* 10^{-2} Nutritivo, MQC2 10^{-2} TSA, MQC2 10^{-4} Nutritivo, MQC3 10^{-4} TSA, MQC4 10^{-2} Nutritivo y MQC4 10^{-4} TSA, adicionalmente se pudo asegurar en un 94% la identidad de las cepas MQC1 10^{-2} Nutritivo y MQC3 10^{-2} TSA, estas dos últimas cepas con un porcentaje de identidad menor al 99% fueron identificadas por la mayor similitud con secuencias en el GenBank, pero cabe la posibilidad de tratarse de especies no descritas o de las cuales no hay referencias en las bases de datos.

Tabla 4-12: Identificación molecular de cepas bacterianas

Cepa	Dilución	Medio	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
MQC1	10 ⁻²	Nutritivo	<i>Shewanella baltica</i>	16s	94.59	OX461117.1
MQC1*	10 ⁻²	Nutritivo	<i>Pseudomonas spp.</i>	16s	100	MK940859.1
MQC2	10 ⁻²	TSA	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	16s	100	MN753976.1
MQC2	10 ⁻⁴	Nutritivo	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	16s	100	CP073713.1
MQC3	10 ⁻²	TSA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16s	94.80	EF620462.1
MQC3	10 ⁻⁴	TSA	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	16s	100	CP073713.1
MQC4	10 ⁻²	Nutritivo	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	16s	100	CP014945.1
MQC4	10 ⁻⁴	TSA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16s	100	LC507955.1

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

Estas cepas bacterianas pueden ser denominadas poliextremofilas al resistir las condiciones ambientales extremas a las que se les sometieron en la presente investigación.

4.1.9.1 *Shewanella báltica*

La comparación secuencial indica que la cepa MQC1 10⁻² Nutritivo puede corresponder a una cepa bacteriana de *Shewanella báltica*, genero de gram- negativas pertenecientes a las gamma - proteobacterias, el cual engloba mayoritariamente bacterias marinas y de agua dulce, que pueden contener aguas muy frías, e incluso chimeneas hidrotermales, dando un indicio de la razón de encontrarla en los sedimentos de la alguna volcánica del Quilotoa, sus mayores representantes son anaerobios facultativos utilizando aceptores de electrones extracelulares para su respiración anaerobia, misma característica que las permite convertir metales pesados en productos menos tóxicos utilizándolos como aceptores de electrones, entre estos contaminantes utilizados están el hierro, el sulfuro y el uranio (Cid y Sierra, 2014,).

Dentro de la investigación “Adaptation of the Marine Bacterium *Shewanella baltica* to Low Temperature Stress” por Kloska et al., (2020,pp. 1-22) se menciona que la cepa *Shewanella báltica* tiene una papel importante dentro de la desnitrificación y biorremediación del ambiente marino, pero tambien afecta perjudicialmente al almacenamiento de mariscos en hielo pues se la ha

identificado como la bacteria responsable de su deterioro y putrefacción, esta cepa ante la falta de nutrientes, choques térmicos y daños en su ADN puede inducir una respuesta global al estrés, especialmente al frío, adicionalmente Odeyemi et al., (2018,pp. 415-425) describe como cepas de *Shewanella báltica* aisladas de mejillones vivos fueron resistentes a salinidades moderadas de entre 0 y 6% de NaCl

4.1.9.2 *Pseudomonas spp* / *Pseudomonas fluorescens*

Las cepa bacteriana MQC1* 10^{-2} Nutritivo correspondió a una cepa de *Pseudomonas spp* en un 100% al igual que la cepa MQC4* 10^{-4} TSA, que correspondió a la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, este género corresponde a bacterias gram negativas que tienden a tener forma de bacilos y necesitan oxígeno para su metabolismo energético, pero pueden utilizar nitrato para realizar la respiración, por lo que pueden encontrarse en cualquier parte del medio ambiente, principalmente en restos orgánicos, aunque por su poca necesidad de nutrientes se encuentran también en agua, plantas y animales, pero siempre prefiriendo los ambientes húmedos (Bush M y Vazquez-Pertejo T, 2021,pp. 1-3; Vargas y Montes, 2019,pp. 1-3). Actualmente se han identificado más de 200 especies de *Pseudomonas spp*. Entre las cepas más conocidas están la *Pseudomonas aeruginosa*, considerada un patógeno muy frecuente en seres humanos, o las especies *P. putida*, *P. stutzeri* y *P. alcaligenes* que han sido estudiadas por sus funciones en biorremediación del suelo (Lupo, Haenni y Madec, 2018,pp. 1-16).

Chlebek et al., (2022,pp. 1-28) mencionan a varias cepas de *Pseudomonas spp.*, como la cepa *P. qingdaonensis* de la rizosfera de *Zea mays* creciente en suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados, que llegaron a degradar en hasta un 76,52 % del contenido de hidrocarburos presentes y resistiendo 5 Mm de Cd, 15 Mm de Zn y 10 Mm de Cu, de igual manera la cepa *P. putida* que contaba con el gen *arsH* que confería una resistencia a derivados de metil As(III), o el gen *merE* que codifica un transportador de mercurio que media el transporte de Hg^{2+} y $CH_3Hg(I)$ a través de las membranas citoplasmáticas. Otra cepa estudiada con aplicaciones en la biorremediación es la *P. fluorescens*, la cual produjo un biofloculante constituido por un 76,67% de polisacáridos y un 15,8% de proteína, remojando 80,13 mg/g de cromo (VI) y 45,93 mg/g de arsénico (III) (He, He y Ning, 2020,pp. 64-79). Según Imron, Kurniawan y Abdullah, (2021,pp. 1-13) una cepa de *P. fluorescens* aislada de lixiviados no activos de rellenos sanitarios resistió hasta 5 mg/l de Hg, del mismo lugar una cepa de *P. aeruginosa* eliminó el 99,7% de Hg en un ambiente salino al 10%, concluyendo que el ambiente salino favorece hasta cierto punto la capacidad de eliminar metales pesados.

4.1.9.3 *Stenotrophomonas maltophilia* / *Stenotrophomonas rhizophila*

La cepa MQC3 10^{-2} TSA fue identificada en un 94,8% como una cepa de *S. maltophilia* corresponde a una cepa bacteriana con morfología de bacilo gram negativa no fermentadora, comúnmente encontrada en agua, suelo, ambientes relacionados con plantas, y tejidos animales y humanos, e incluso ambientes extremos como lagunas de sosa, superficies metálicas corroídas y salmueras de aceite, jugando un papel importante en los ciclos biogeoquímicos, especialmente en el ciclo del azufre y del nitrógeno, de igual manera es considerado un patógeno ambiental, ya que puede colonizar organismos vegetales al igual que humanos, gracias a características como la capacidad de formar biopelículas, la resistencia a estrés osmótico y oxidativo (Mojica et al., 2022, pp. 1-12; Pinski et al., 2020, pp. 1-20). El medio de infección en el agua de esta bacteria es a través de las amebas las cuales las albergan a modo de reservorio y medio de transmisión a humanos, permitiendo que la bacteria se replique en su interior, de igual manera se replica en el interior de amebas en el suelo. Esta bacteria ha sido estudiada continuamente y siguiendo bajo vigilancia ya que puede afectar gravemente a pacientes inmunocomprometidos y su resistencia a antibióticos ha seguido aumentando durante décadas ya que las estrategias utilizadas para inhibir la bacteria en donde hay mayor peligro de contraerla han sido mayormente inútiles, de igual manera la capacidad bacteriana de desarrollar una biopelícula ayuda a defenderse de compuestos antimicrobianos (Brooke, 2021, pp. 1-61).

De igual manera la cepa MQC2 10^{-2} TSA fue identificada al 100% como una cepa de *Stenotrophomonas rhizophila* especie bacteriana no patógena que está asociada a diversas plantas constituyendo como parte de la microbiota de sus raíces, puede crecer prolíficamente a temperaturas de 4° C, pero no a temperaturas mayores de 37° C, razón por la que no tiene la capacidad de infectar a humanos, de igual manera cuenta con una menor tolerancia a la presión osmótica que la *S. maltophilia*, diferenciándose con la ausencia del *smeDgen* que se encarga de codificar parte de la bomba de salida de múltiples fármacos, posiblemente siendo esta la razón de que no hayan sido secuenciadas tantas cepas de esta especie (Pinski et al., 2020, pp. 1-20). Entre las investigaciones a las que ha sido sometida la cepa *S. rhizophila* se encuentra la realizada por Reyes-Perez et al., (2019, pp. 4992-4999) en la cual se evaluó la capacidad de biocontrol sobre la antracnosis del mango, reduciendo en un 95% la incidencia de la enfermedad en la fruta y disminuyendo en un 85% el diámetro de la lesión causada, mostrando una mayor protección que la otorgada por fungicidas sintéticos, de igual manera esta cepa bacteriana en conjunto con una levadura marina llamada *Debaryomyces hansenii* aplicadas de manera in vitro en melón, redujeron en un 56% la incidencia y en un 78% el diámetro de la lesión provocada por el hongo *Fusarium proliferatum* en la fruta, debido posiblemente a varias causas, como pueden ser el

parasitismo directo, la competencia por nutrientes, enzimas líticas, y/o COV's (Rivas-Garcia et al., 2019, pp. 61-67).

El análisis del genoma completo de una cepa de *S. rhizophila* reveló varios genes involucrados en la degradación de alcohol polivinílico (PVA) y un gen se identificó como una PVA oxidasa lo cual le da a esta cepa bacteriana una aplicación potencial en la biorremediación de PVA, cuya aplicación está generalizada globalmente, contaminando ambientes acuáticos y provocando toxicidad crónica en los organismos que allí se encuentran (Wei et al., 2018, pp. 1898-1915), esta capacidad para reducir compuestos inorgánicos también se puede ver sustentada por varias investigaciones más, como la llevada a cabo por Gao et al., (2020, pp. 11-22) en la cual se menciona que esta cepa pudo resistir a concentraciones de 1000 mg/l de Cr (VI) y reducir completamente 50 mg/l de Cr (VI) en Cr (III) en un tiempo de 28 horas en un ambiente óptimo, de igual manera como mencionan Sun et al., (2021, pp. 2699-2709) y Sun et al., (2022, pp. 45380-45395), varias cepas aisladas de *S. rhizophila* fueron capaces de reducir el contenido de diversos metales pesados como, Pb²⁺, Cu²⁺ y Cr⁶⁺, en porcentajes de 76,9%, 83,4% y 89,3% respectivamente, mediante proteínas de transporte/desintoxicación de metales pesados.

4.1.9.4 *Lysinibacillus parviboronicapiens*

La cepa MQC3 10⁻⁴ TSA fue identificada en un 100% como la bacteria *Lysinibacillus parviboronicapiens*, el género *Lysinibacillus* corresponde a bacterias grampositivas con células móviles con forma de vacuola, caracterizadas por la formación de endosporas las cuales permiten que las bacterias resistan tensiones mecánicas y químicas (Gaur et al., 2019, pp. 19-25), por lo que se ha estudiado la viabilidad de usar su capacidad de tensión-deformación en la auto curación y la resistencia del hormigón, pues según Vashisht et al., (2018, pp. 226-231) la actividad de la ureasa microbiana de estos aislados resultan en el refinamiento de los poros del hormigón, aumentando su resistencia, y la formación de esporas por parte de las bacterias del género *Lysinibacillus* habilita la curación de grietas conforme aire y agua ingresen al hormigón. de igual manera según O'Grady et al., (2020, pp. 1-56) cepas de este género son capaces de producir un biosurfactante lipídico, compuesto inhibitorio de biopelículas por parte de bacterias patógenas, o cepas con el potencial de mejorar el crecimiento de cultivos de trigo e incluso usándose en sitios contaminados con metales pesados para su remediación. Las cepas de este género cuentan con lisina y aspartato como subunidad peptídica del peptidoglicano de la pared celular. La cepa *Lysinibacillus parviboronicapiens* fue aislada de un suelo en el cual tolera concentraciones de 6% de NaCl y de 50 Mm de boro, con temperaturas oscilantes entre 10 Y 37 °C Y pH de entre 6 y 8, en colonias con bordes enteros, opacas y de color cremoso, con tamaños de entre 2 y 5 mm de diámetro,

mostrando similitud con la morfología reportada en la presente investigación (Miwa et al., 2009, pp. 1427-1432).

4.1.9.5 *Psychrobacter alimentarius*

La cepa bacteriana MQC4 10⁻² Nutritivo fue identificada en un 100% como una cepa de *Psychrobacter alimentarius*, género de clase *Gammaproteobacteria* y orden *Pseudomonadales*, que cuenta con 37 especies aisladas de diferentes entornos ambientales, encontrándose en su mayoría en ambientes fríos con baja actividad de agua, pero también pudiendo encontrarlas en aguas profundas del mar, permafrost, hielo glaciar antártico y sedimentos (Dias et al., 2018, pp. 731-741), entre sus mecanismos de adaptación a estas bajas temperaturas se encuentra una mayor eficiencia catalítica enzimática, producción de ácidos grasos insaturados para dotar de fluidez a la membrana y la captación de solutos para mantener un equilibrio osmótico, algunas cepas incluso han presentado genes que ayudan en la resistencia a los antibióticos y a elementos químicos como el cobalto, el zinc y el cadmio, de igual manera se encontraron genes que proporcionan una tolerancia al cobre, y en algunas cepas que desintoxican mercurio se encontró una reductasa de mercurio, además de proteínas reguladoras (*merT* y *merC*) y de transporte de mercurio (*merC*), estas características brindan a este género bacteriano de un potencial biotecnológico y biodegradativo de varios contaminantes ambientales (Lasa y Romalde, 2017, pp. 7-10).

En específico la cepa *Psychrobacter alimentarius* se pudo aislar en un calamar fermentado originario de las costas de Corea del Sur, a partir de las cuales se las identificó como bacterias Gram negativas, que no forma esporas y que crecieron de manera óptima en concentraciones de entre 2 y 3% de NaCl, considerándose halófilas moderadas, de igual manera pudieron crecer a temperaturas de 30 °C. Cepas de esta misma especie fueron utilizadas en un estudio para medir el grado de influencia del Cr en la degradación bacteriana de colorantes azoicos, demostrando que el cromo puede llegar a inhibir esta degradación (Khalid et al., 2015, pp. 1260-1264).

4.2 Discusión

En esta investigación se obtuvieron 8 cepas bacterianas aisladas de la laguna del Quilotoa que se pudieron clasificar como bacterias poliextremófilas, pues resultaron ser resistentes a varios factores ambientales extremos, los factores considerados fueron: la concentración de mercurio, la concentración de arsénico, la presión osmótica y la ausencia de oxígeno, estas cepas bacterianas poliextremófilas fueron identificadas molecularmente al 100% como cepas de, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas rhizophila*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Psychrobacter*

alimentarius, *Pseudomonas fluorescens*, a excepción de las dos cepas de *Shewanella báltica* y *Stenotrophomonas maltophilia*, que fueron identificadas en un 94,59% y 94,8% de coincidencia, por lo que cabe la posibilidad de que estas cepas no hayan sido identificadas anteriormente o no se encuentren entre las bases de datos de GenBank de NCBI.

La concentración máxima de mercurio (cloruro de mercurio II) a las que se expusieron las cepas bacterianas identificadas fue de 80000 ppm, una concentración sumamente elevada en comparación con estudios previos, pues según menciona Bravo Ortiz et al., (2022,) cepas de *E. coli* aisladas en Mallorquín Colombia pudieron resistir una concentración de mercurio aproximada de 135,76 ppm, una concentración sumamente baja comparada a la resistida por las cepas identificadas en esta investigación, de igual manera en otra investigación con cepas bacterianas a concentraciones mayores de mercurio, Quispe Machaca, (2017, pp. 202-212) identificó cepas de *Serratia* y *Escherichia* aisladas del río Ramis en Perú, un río que sirve en un punto de su corriente como depósito de desechos mineros de la zona, este hecho puede explicar que estas cepas bacterianas resistan hasta 2000 ppm de mercurio (HgCl_2), una concentración más cercana a la alcanzada dentro de esta investigación, esta variación en la resistencia no solo está condicionada por el género y la especie de la cepa, sino también en la exposición de las mismas ante contaminantes ambientales, esto se sustenta con la gran variabilidad de resistencia que presentan cepas de *E. coli*, pues en varios estudios han demostrado que estas cepas resisten desde concentraciones de 0,02 ppm hasta 0,2 ppm (Retno Kusumawati, 2021, pp. 72-80), y como se mencionó hasta 2000 ppm, lo cual permite teorizar que las cepas aisladas de la laguna del Quilotoa han sido expuestas constantemente a concentraciones altas de mercurio.

En cuanto a la concentración máxima de arsénico (óxido de arsénico III) a las cuales fueron sometidas las cepas bacterianas aisladas tuvo un valor de 40000ppm, una concentración sumamente elevada en comparación de estudios realizados previamente, dado que Burbano y López. (2022, pp. 50-51) en un estudio previo realizado con bacterias resistentes a As y Cr, pero la cantidad máxima de concentración que soportaron este tipo de bacterias fue de 100 ppm, un valor relativamente bajo relacionado con el estudio realizado en esta investigación, según Letek, Ramos y Mateos. (2005, pp. 2) en una prueba de resistencia utilizando *E. coli* demostró que presentó una menor resistencia al As (III) en concentraciones de (0.04 a 4 ppm) y soportando al As (V) en concentraciones de (10 a 100 ppm), de igual manera (Ordóñez, et al. (2003, pp. 2) en una investigación realizada trabajo con 4 cepas diferentes de *E. coli* provenientes de aguas residuales, las cuales fueron tolerantes a concentraciones de (3 a 5 ppm) de As (III) evidenciando que son concentraciones inferiores de resistencia realizada en nuestra investigación, otro estudio realizado por Mellado, Víctor y Mondaca. (2011, pp. 131-137), nos habla que los experimentos de medición de los

niveles de tolerancia a arsenito y arseniato realizados en las cepas estudiadas mostraron que la cepa del río Camarones era capaz de tolerar (10-20 mM) de arseniato. Pero el estudio realizado por, Uddin, Hossain y Uddin. (2022,pp. 93-97), en donde trabajaron con cinco cepas como: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa*, *Listeria murrayi*, *Moraxella urethalis* y *Planococcus citreus*, mostro que todas estas cepas fueron capaces de tolerar hasta 100 ppm (mg l⁻¹) de arsénico (III), toda esta información nos da a entender que las cepas aisladas de la laguna del Quilotoa han sido expuestas constantemente a concentraciones altas de arsénico.

Para la prueba de resistencia a la presión osmótica se utilizó NaCl a modo de soluto las bacterias identificadas, pues cantidades excesivas de soluto en el medio de crecimiento ponen a prueba la capacidad osmótica de las células y por tanto de los microorganismos, en el caso de esta investigación 6 de las 8 cepas bacterianas identificadas lograron sobrevivir en niveles del 30% de salinidad o 300000 ppm de NaCl, catalogándolas como halófilas extremas, siendo estas las cepas *Shewanella báltica*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Psychrobacter alimentarius* y *Pseudomonas fluorescens* y las dos cepas restantes fueron resistentes a 30000 ppm de NaCl o 3% de salinidad en el medio, y ambas fueron identificadas como *Lysinibacillus parviboronicapiens*, entrando en el rango de bacterias halófilas moderadas. Estos niveles de resistencia a la salinidad han sido mencionados en varias investigaciones, como la realizada por Magaña Tzuc, (2021,) en la cual cepas de *E.coli* reportaron resistencias de entre 12 a 27% de salinidad, específicamente en aguas del Estero Salado en Ecuador. De igual manera en sedimentos del manantial “Las Salinas” en Chiapas México se menciona la presencia de cepas bacterianas de *Halonomas axialensis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas knackmussii* y *Agromyces indicus*, que crecieron en concentraciones máximas de 250000 ppm de NaCl o 25% de salinidad (Ruiz Rios, 2020,pp. 57-79). Todas estas cepas bacterianas fueron aisladas tanto de sedimentos como de aguas de zonas acuáticas documentadamente salinas, presentando una relación directa entre sí, al igual que las cepas aisladas en esta investigación, pues los sedimentos de la laguna del Quilotoa reportaron una salinidad promedio de 1,05% (10500 ppm de NaCl), determinando que las cepas aisladas sean halófilas moderadas o halófilas extremas.

Con respecto a nuestras de resistencia anaerobias nos dio como resultado que tenemos siete bacterias anaerobias facultativas, dos bacterias anaerobias estrictas y una bacteria microaerófila. Según (Curtis, 2007,) nos manifestó que existen cinco clases de organismo anaerobios tales como estrictos que crecen en ausencia completa de O₂, aerotolerantes los cuales crecen en ausencia de O₂ pero toleran más que los anteriores su presencia, anaerobios facultativos son capaces de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, aerobios obligados ellos requieren oxígeno para su desarrollo, microaerófilos crecen mejor con tensiones de oxígeno bajas (3%- 5%), las

concentraciones elevadas (21%) tienen efecto inhibitorio, por otro lado tanto Hernandez, Dominguez y Gonzaga Gutierrez. (2018, pp. 13) como Rodríguez-Angeles. (2002, pp. 464-475) nos manifiestan que *Escherichia coli* es una de las bacterias que más son utilizadas para interpretar la reacción de crecimiento de un organismo en ausencia de oxígeno ya que *E. coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo lo cual le da la cualidad de que puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno.

Debido a que los métodos de resistencia al arsénico (As) que presentan las bacterias identificadas son de gran interés en esta investigación se recurrió al uso de la herramienta BLASTP del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para determinar si la secuencia de los genes *arsA*, *arsB* y *ACR3* están involucrados en los genomas del proceso de tolerancia a este metal. En la investigación realizada para las bacterias Gram negativas *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Psychrobacter alimentarius*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella báltica* y *Stenotrophomonas maltophilia* se tomó como referencia para la secuenciación de *arsA* presente en la cepa *Pseudomonas aeruginosa*, para *arsB* se utilizó la cepa *Pseudomonas putida* BIRD-1, y *ACR3* en *Pseudomonas aeruginosa* dándonos como resultados con la base de datos una similitud con un puntaje de alineación desde 80 hasta >200 para todos los genes, a excepción de la cepa *Psychrobacter alimentarius* que según la comparación con *Pseudomonas aeruginosa* determina que el gen *ACR3* no está presente en la secuencia de ninguna cepa de *Psychrobacter alimentarius*. Respecto a la única bacteria Gram positiva que es *Lysinibacillus parviboronicapiens* para *arsA* se tomó como referencia *Staphylococcus* generando un resultado >200, al igual que para *arsB* se utilizó *Staphylococcus aureus* obteniendo resultado de >200 y finalmente para *ACR3* *Staphylococcus* resultando desde 80 hasta 200. Demostrando que si dos de estos genes están presentes en la secuenciación bacteriana de todas las cepas mencionadas pueden generar una tolerancia al arsénico.

4.3 Comprobación de hipótesis

Mediante las pruebas de resistencia a metales pesados (Hg y As), a altas presiones osmóticas y a ambientes con ausencia de oxígeno se comprobó la hipótesis basada en que las bacterias presentes en la laguna volcánica del Quilotoa son significativamente poliextremófilas a tres o más factores ambientales extremos como se muestra en el Anexo E.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- De los sedimentos de los cuatro puntos de muestreo se aislaron varias cepas bacterianas pertenecientes a diferentes géneros y especies, de la microbiota resultante en las que se encuentran bacterias patógenas, psicrófilas, rizobacterias, descomponedoras, entre otros géneros y especies variadas que en referencia a estudios realizados a muestras de agua provenientes de la misma laguna se encontraron como, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter Cloacae*, *Firmicutes*, *Beta-Proteobacteria*, y principalmente del género *Pseudomonas*, concluyendo con una similitud al estudio establecido.
- Por razón de los limitados estudios realizados referentes a bacterias poliextremófilas que establezcan información base se realizó el cultivo aislado de 8 cepas bacterianas resistentes a tres factores fisicoquímicos extremos las cuales pueden servir a modo de reseña para futuras investigaciones en distintos campos aplicativos en los cuales pudieran ser dispensables.
- Mediante el proceso de caracterización molecular se identificaron 8 cepas bacterianas tolerantes a todas las pruebas de resistencia seleccionadas, de las cuales 6 pertenecen a géneros que según la base de datos mundial son 100% confiables, mientras que dos cepas bacterianas tienen un porcentaje de reconocimiento no muy esclarecido, demostrando que no han sido previamente estudiadas y que podrían ser nuevas especies bacterianas con la diferencia que no solamente se describe una característica morfológica, sino al contrario se tiene una información molecular y genética establecida.

5.2 Recomendaciones

- Se sugiere ahondar en el estudio de los distintos microorganismos identificados en el presente proyecto de investigación para su posible aplicación en el desarrollo de cepas microbianas con la intención de producir bioelectricidad.
- Se propone realizar una investigación alterna sobre la cepa bacteriana *Stenotrophomonas rhizophilia* como potencial control biológico gracias a sus capacidades para promover el crecimiento vegetal y proteger las raíces de las plantas contra el estrés biótico y abiótico.

- Se recomienda investigar la resistencia de los microorganismos identificados en este trabajo para su resistencia en condiciones fisicoquímicas alternas a las expuestas en esta investigación.
- Se propone realizar una indagación centrada en cuales son los genes que interviene en el método de resistencia o tolerancia que generan las bacterias identificadas.

BIBLIOGRAFÍA

ABEDINI, S., KHANI, K., NAJAFI ASL, M., MORABBI, H. y KARMOSTAJI, A., 2018,pp. 80-93. Experiences of the Clerkship Challenges of Laboratory Sciences in the Students and the Faculty Respective Opinion: A Qualitative Research. *Journal of Development Strategies in Medical Education* [en línea], vol. 5, no. 1. [Consulta: 31 mayo 2023]. Disponible en: <https://dsme.hums.ac.ir/article-1-175-en.html>.

ACEVEDO BARRIOS, R.L. y SEVERICHE SIERRA, C.A., 2013,pp. 73-79. Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias , caribe colombiano. *AVANCES Investigación en Ingeniería*, vol. 10, no. 2.

ACUÑA ALMACHI, J.N., 2021,. *Evaluación limnológica y microbiológica de la Laguna del Quilotoa, provincia de Cotopaxi – Ecuador*. S.l.: Universidad Central Del Ecuador.

ARISAH, F.M., AMIR, A.F., RAMLI, N., ARIFFIN, H., MAEDA, T., HASSAN, M.A. y YUSOFF, M.Z.M., 2021,. Bacterial Resistance against Heavy Metals in Pseudomonas aeruginosa RW9 Involving Hexavalent Chromium Removal. *Sustainability*, vol. 13, no. 17. ISSN 20711050. DOI 10.3390/SU13179797.

ARISTIZABAL, R., CAROLINA, N., MORA, H., WILSON, D. y CORREDOR, S., 2019,pp. 621-632. Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacá, Colombia. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN* [en línea], vol. 67, no. 3. [Consulta: 20 junio 2023]. ISSN 0034-7744. DOI 10.15517/RBT.V67I3.32942. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442019000300621&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

ARREDONDO, R., NAYELI, A., PÉREZ, L., ELENA, M., CASTRO, D.R., DE, P., CIENCIAS, D. De, VIDA, D. y IRAPUATO-SALAMANCA, C., 2018,pp. 23-27. Identificación de bacterias y hongos de importancia biotecnológica en la resistencia a arsénico. *Jovenes en la ciencia*, vol. 4, no. 1.

AWAD, M.M., MOWAFY, A.M. y OSMAN, Y.A., 2020,pp. 390-396. Characterization and Differentiation of some Clinical Isolates from Urine. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*, vol. 23, no. 1. ISSN 2509-0119. DOI 10.52155/IJPSAT.V23.1.2267.

AYIL CHAN, G.A., 2023., EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL DE *Zea mays* BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR SALINIDAD CAMPUS CAMPECHE. S.l.: Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.

BAATI, H., BAHLOUL, M., AMDOUNI, R. y AZRI, C., 2022,pp. 341-351. Behavior Assessment of Moderately Halophilic Bacteria in Brines Highly Enriched with Heavy Metals: Sfax solar saltern (Tunisia), A Case Study. *Geomicrobiology Journal* [en línea], vol. 39, no. 3-5. [Consulta: 20 junio 2023]. ISSN 15210529. DOI 10.1080/01490451.2021.2008548. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2021.2008548>.

BAÑOS CRUZ, G., 2021,pp. 1-12. Distribución y concentración de coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Enterococos* en el agua y sedimento en el Estero Salado. *Revista Científica de Ciencias Naturales y Ambientales* [en línea], vol. 7, no. 1. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/810>.

BARCO, R.A., GARRITY, G.M., SCOTT, J.J., AMEND, J.P., NEALSON, K.H. y EMERSON, D., 2020., A Genus Definition for Bacteria and Archaea Based on a Standard Genome Relatedness Index. *mBio*, vol. 11, no. 1. ISSN 21507511. DOI 10.1128/MBIO.02475-19.

BEDOGNI, G.L., MASSELLO, F.L., GIAVENO, A., DONATI, E.R. y URBIETA, M.S., 2020,pp. 8-10. A deeper look into the biodiversity of the extremely acidic copahue volcano-río agrio system in Neuquén, Argentina. *Microorganisms* [en línea], vol. 8, no. 1. [Consulta: 14 junio 2023]. ISSN 20762607. DOI 10.3390/microorganisms8010058. Disponible en: www.mdpi.com/journal/microorganisms.

BELYAEV, A.A., SHTERNISH, M. V., CHECHENINA, N.S., SHPATOVA, T. V. y LELYAK, A.A., 2017,pp. 7016-7022. Adaptation of primocane fruiting raspberry plants to environmental factors under the influence of *Bacillus* strains in Western Siberia. *Environmental science and pollution research international*, vol. 24, no. 8. ISSN 1614-7499. DOI 10.1007/S11356-017-8427-5.

BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J.A. y VALDEZATE, S., 2011., *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.* S.l.: s.n. ISBN 9788461479320.

BRADSHAW, C., ATKINSON, S. y DOODY, O., 2017., Employing a Qualitative Description Approach in Health Care Research. *Global Qualitative Nursing Research* [en línea], vol. 4. [Consulta: 31 mayo 2023]. ISSN 23333936. DOI 10.1177/2333393617742282. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5703087/](https://pmc/articles/PMC5703087/).

BRAVO ORTIZ, V., CAROLINA, N., PADILLA, C., MEZA, A.R., ELENA, Z., VARELA, S. y FREYLE, M.P., 2022., AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES AL MERCURIO EN SEDIMENTOS DE LA CIÉNAGA DE MALLORQUÍN, ATLÁNTICO, COLOMBIA. S.l.: Universidad Simon Bolivar.

BREMER, E. y KRÄMER, R., 2019,pp. 313-334. Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annual Review of Microbiology*, vol. 73. ISSN 15453251. DOI 10.1146/annurev-micro-020518-115504.

BROOKE, J.S., 2021,pp. 1-61. Advances in the microbiology of stentrophomonas maltophilia. *Clinical Microbiology Reviews* [en línea], vol. 34, no. 3. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 10986618. DOI 10.1128/CMR.00030-19. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00030-19>.

BURBANO, G.G. y LÓPEZ, G.C., 2022., Identificación Molecular de bacterias resistentes al Arsénico (As) y al Cromo (Cr) de la Microcuenca del Río Gala del Cantón Camilo Ponce Enríquez. S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

BUSH M, L. y VAZQUEZ-PERTEJO T, M., 2021,pp. 1-3. Infecciones por Pseudomonas y patógenos relacionados. *Manual Msd* [en línea]. [Consulta: 25 junio 2023]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos>.

BUSTOS, E. y SERRANO, N., 2016,pp. 103. Departamento de ciencias de la tierra y la construcción. ,

CABASSI, J., TASSI, F., MAPELLI, F., BORIN, S., CALABRESE, S., ROUWET, D., CHIODINI, G., MARASCO, R., CHOUAIA, B., AVINO, R., VASELLI, O., PECORAINO, G., CAPECCHIACCI, F., BIOCOCCHI, G., CALIRO, S., RAMIREZ, C. y MORA-AMADOR, R., 2014., Geosphere-Biosphere Interactions in Bio-Activity Volcanic Lakes: Evidences from Hule and Río Cuarto (Costa Rica). *PLoS ONE*, vol. 9, no. 7. ISSN 19326203. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0102456.

CABESTRERO, O., 2018,pp. 34-38. Mineralogénesis , procesos geobiológicos y evolución sedimentaria en lagunas salinas del centro peninsular (Cuenca del Duero y Guadiana)
PRESENTADA POR Óscar Cabestrero Aranda Directora : # *Thesis*,

CARDONA SERRATE, F., 2020,pp. 7. Ósmosis y presión osmótica. Implicaciones en química, biología y tecnología de alimentos. *Universidad Politécnica de Valencia* [en línea], Disponible en:
<https://riunet.upv.es:443/handle/10251/140064>
<https://riunet.upv.es/handle/10251/140064>.

CARLINA, S., ZUÑIGAS, R., INÉS, C. y ARISTIZÁBLA, G., 2021,. Manual práctico de microbiología básica - Sandra Carlina, Rivas Zúñiga, Clara Inés, Giraldo Aristizábal - Google Libros. [en línea]. [Consulta: 9 mayo 2023]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=ZkxhEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA7&dq=diluciones+seriadas+microbiologia&ots=GkqGMH3fNh&sig=MYrF5xofce-4Nnvykyk13oo0awY&redir_esc=y#v=onepage&q=diluciones+seriadas+microbiologia&f=false.

CARMONA, F., RIVAS, R., FARAMIÑÁN, A.M.G., MANCINO, C., BAYALA, M. y PEREZ, W., 2019,pp. 1-14. Evaporation process study through in situ and remote sensing data at tres quebradas salt flat. *Revista de Teledeteccion* [en línea], vol. 2019, no. 54. [Consulta: 14 junio 2023]. ISSN 19888740. DOI 10.4995/raet.2019.12264. Disponible en:
<https://doi.org/10.4995/raet.2019.12264>.

CARRILLO ESPINOZA, J.I., 2022,pp. 20-37. Análisis de las variables climatológicas sobre la laguna Parón en el periodo 2003 al 2020, Ancash, Perú. *Revista Científica: BIOTECH AND ENGINEERING*, vol. 2, no. 02. ISSN 2788-4295. DOI 10.52248/eb.vol2iss02.53.

CASTILLO, O., 2018,pp. 3-50. Establecimiento y modelado de un cultivo bacteriano bioluminiscente como fuente de iluminación alternativa. *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C* [en línea], Disponible en:
https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1450/1/PCER_M_Tesis_2018_Odette_Castillo_Gomez.pdf.

CATAÑO MORALES, W.G., GALLEGO RODRÍGUEZ, R.S. y BUITRAGO MEJÍA, J.A., 2022,pp. 7-8. Frecuencia del aislamiento bacteriano y patrones de resistencia en muestras de piel de caninos en Medellín: estudio retrospectivo 2014-2017. *Revista de Medicina Veterinaria* [en línea], vol. 1, no. 45. [Consulta: 17 junio 2023]. ISSN 01229354. DOI 10.19052/mv.vol1.iss45.4. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv/vol1/iss45/4>.

CAUDRON, C., OHBA, T. y CAPACCIONI, B., 2017,pp. 6. Geochemistry and geophysics of active volcanic lakes: An introduction. *Geological Society Special Publication* [en línea], vol. 437, no. 1. [Consulta: 14 junio 2023]. ISSN 03058719. DOI 10.1144/SP437.18. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316316012_Geochemistry_and_geophysics_of_active_volcanic_lakes_An_introduction.

CERVANTES, C., 2019,pp. 67-71. RESISTENCIA MICROBIANA A LOS A RSENICALES. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*, vol. 38, no. 3.

CERVANTES, H.H., BEIER, E. y PAEZ, E., 2017,. Red de Monitoreo Ambiental para el estudio de la variabilidad Océano-Atmósfera en la Bahía de La Paz, B.C.S, México. *Recursos Naturales y Sociedad*, DOI 10.18846/renaysoc.2017.03.03.02.0003.

CHLEBEK, D., PŁOCINICZAK, T., GOBETTI, S., KUMOR, A., HUPERT-KOCUREK, K. y PACWA-PŁOCINICZAK, M., 2022,pp. 1-28. Analysis of the genome of the heavy metal resistant and hydrocarbon-degrading rhizospheric pseudomonas qingdaonensis zcr6 strain and assessment of its plant-growth-promoting traits. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], vol. 23, no. 1. [Consulta: 25 junio 2023]. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms23010214. Disponible en: [/pmc/articles/PMC8745256/](https://pmc/articles/PMC8745256/).

CID, C. y SIERRA, M.D.E.L.A., 2014,. *Estrategias de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica*. S.l.: Universidad Complutense de Madrid.

CONTRERAS, I.F., 2019,pp. 117-121. Las lagunas y sus dinámicas geomorfológicas en la transformación de los paisajes de lomadas arenosas de la Provincia de Corrientes (Argentina). *Huellas*, vol. 23, no. 1.

CORDEIRO, R., LUZ, R., VILAVERDE, J., VASCONCELOS, V., FONSECA, A. y GONÇALVES, V., 2020,. Distribution of Toxic Cyanobacteria in Volcanic Lakes of the Azores Islands. *Water*, vol. 12, no. 12. ISSN 20734441. DOI 10.3390/W12123385.

CORREDOR VARGAS, A.M., CORRALES, L.C., ANTOLINEZ ROMERO, D.M. y BOHÓRQUEZ MACÍAS, J.A., 2015,pp. 55-81. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova* [en línea], vol. 13, no. 1794-2470. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200007.

COSTA, M. y CERLETTI, M., 2021., Halófilos: la vida en la sal. ,

CSONKA, L.N., 1989,pp. 121-147. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, vol. 53, no. 1. ISSN 01460749. DOI 10.1128/mmbr.53.1.121-147.1989.

CURTIS, B., 2007., Infecciones Por Bacterias Anaerobias Uba Microbiologia Catedra Ii. ,

DEVILBISS, S.E., STEELE, M.K., KROMETIS, L.A.H. y BADGLEY, B.D., 2021,pp. 11-68. Freshwater salinization increases survival of *Escherichia coli* and risk of bacterial impairment. *Water Research*, vol. 191. ISSN 18792448. DOI 10.1016/j.watres.2021.116812.

DIAS, L.M., FOLADOR, A.R.C., OLIVEIRA, A.M., RAMOS, R.T.J., SILVA, A. y BARAÚNA, R.A., 2018,pp. 731-741. Genomic architecture of the two cold-adapted genera *Exiguobacterium* and *Psychrobacter*: Evidence of functional reduction in the *Exiguobacterium antarcticum* B7 genome. *Genome Biology and Evolution* [en línea], vol. 10, no. 3. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 17596653. DOI 10.1093/gbe/evy029. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/gbe/evy029>.

DIBA, H., COHAN, R.A., SALIMIAN, M., MIRJANI, R., SOLEIMANI, M. y KHODABAKHSH, F., 2021,pp. 3893-3903. Isolation and characterization of halophilic bacteria with the ability of heavy metal bioremediation and nanoparticle synthesis from Khara salt lake in Iran. *Archives of Microbiology* [en línea], vol. 203, no. 7. [Consulta: 20 junio 2023]. ISSN 1432072X. DOI 10.1007/s00203-021-02380-w. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34008070/>.

ELSTER, J., NEDBALOVÁ, L., VODRÁŽKA, R., LÁSKA, K., HALODA, J. y KOMÁREK, J., 2016,pp. 535-549. Unusual biogenic calcite structures in two shallow lakes, James Ross Island, Antarctica. *Biogeosciences*, vol. 13, no. 2. ISSN 17264189. DOI 10.5194/bg-13-535-2016.

ESAÚ LÓPEZ-JÁCOME, L., HERNÁNDEZ-DURÁN, M., COLÍN-CASTRO, C.A., ORTEGA-PEÑA, S., CERÓN-GONZÁLEZ, G. y FRANCO-CENDEJAS, R., 2014., Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. , vol. 3.

ESCOBAR, J., 2019,pp. 64. Estudio de la Biodiversidad Microbiana en las aguas de la Laguna del Quilotoa, Provincia Cotopaxi-Ecuador. *UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR*,

ESPARZA TACANGA, S.A., 2019,pp. 110. Dinámica limnológica de la laguna Sausacocha de Alta Montaña, Huamachuco, Agosto a Diciembre 2018. ,

ESPINOZA SALAZAR, L.E. y MANZINY LAZO, Y.E., 2019,pp. 1-119. “Bioadsorción con *Escherichia coli* en suelos contaminados por mercurio en el distrito de Ascensión, Huancavelica – 2019”. *Repositorio Institucional - UCV* [en línea], [Consulta: 18 junio 2023]. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/46307>.

ESTRELLA HÉCTOR, 2017,pp. 1-55. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. *Tesis*,

FAVILLI, L., GIACOMINO, A., MALANDRINO, M., INAUDI, P., DIANA, A. y ABOLLINO, O., 2022,. Strategies for mercury speciation with single and multi-element approaches by HPLC-ICP-MS. *Frontiers in Chemistry*, vol. 10. ISSN 22962646. DOI 10.3389/FCHEM.2022.1082956.

FONTALVO, J.L., 2018,pp. 23-28. Preparación De Medios De Cultivos. *Manual de practicas de laboratorio de Microbiología*, DOI 10.2307/j.ctt1zk0mfb.6.

FORERO PINEDA, N., MARÍN - SUÁREZ, J., FORERO- ULLOA, F.E. y GÓMEZ-PALACIO, A., 2021,pp. 36-45. Extracción de ADN bacteriano a partir de cuerpos de agua de uso agrícola. *Ciencia y Agricultura* [en línea], vol. 18, no. 1. [Consulta: 16 junio 2023]. ISSN 0122-8420. DOI 10.19053/01228420.v18.n1.2021.11703. Disponible en: <https://doi.org/10.19053/01228420.v18.n1.2021.11703>.

GALLEGO RODRÍGUEZ, R.S., RUIZ JARAMILLO, A.F. y RUIZ BUITRAGO, J.D., 2020,pp. 13-21. Frecuencia del aislamiento bacteriano y patrones de sensibilidad en yeguas criollas colombianas diagnosticadas con endometritis. *Revista de Medicina Veterinaria*, vol. 1, no. 41. ISSN 01229354. DOI 10.19052/mv.vol1.iss41.2.

GAO, J., WU, Shimin, LIU, Y., WU, Shanghua, JIANG, C., LI, X., WANG, R., BAI, Z., ZHUANG, G. y ZHUANG, X., 2020,pp. 11-22. Characterization and transcriptomic analysis of a highly Cr(VI)-resistant and -reductive plant-growth-promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Environmental Pollution*, vol. 263. ISSN 18736424. DOI 10.1016/j.envpol.2020.114622.

GARCÍA CUAN, A. y MIRANDA CÁRDENAS, A., 2018,pp. 17-23. Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección

por *Helicobacter pylori*. *Biociencias* [en línea], vol. 13, no. 2. [Consulta: 16 junio 2023]. ISSN 0124-0110. DOI 10.18041/2390-0512/biociencias.2.4996. Disponible en: <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/4996>.

GARIBALDI, P., SANTAMBROSIO, E. y ORTEGA, M., 2017,pp. 1-8. Siembra y recuento de microorganismos. *Universidad Tecnológica Nacional* [en línea], Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf.

GAUR, V.K., BAJAJ, A., REGAR, R.K., KAMTHAN, M., JHA, R.R., SRIVASTAVA, J.K. y MANICKAM, N., 2019,pp. 19-25. Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides. *Bioresource Technology*, vol. 272. ISSN 18732976. DOI 10.1016/j.biortech.2018.09.144.

GETZ, T., 2016,. Sediment Sampling #2016. ,

GONZÁLEZ, M., ACUÑA, J., ESCOBAR, J., ESCOBAR, S., ARAQUE, J. y ANDUEZA, F., 2021,. Calidad microbiológica del agua del lago volcánico Quilotoa. Cotopaxi-Ecuador. *Rev.Cs.Farm. y Bioq*, vol. 9, no. 1.

GONZÁLEZ, M., ACUÑA, J., ESCOBAR, J., VITERI, F., VILLACIS, L., PARRA, Y., ARAUJO, L., ARAQUE, J. y ANDUEZA, F., 2020a,pp. 71-83. Physicochemical quality of the water of the Quilotoa volcanic crateric lake. Cotopaxi. Ecuador. *Perspectiva* [en línea], vol. 21, no. March. [Consulta: 14 junio 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/350131491_Physicochemical_quality_of_the_water_of_the_Quilotoa_volcanic_crateric_lake_Cotopaxi_Ecuador.

GONZÁLEZ, M., ACUÑA, J., ESCOBAR, J., VITERI, F., VILLACIS, L., PARRA, Y., ARAUJO, L., ARAQUE, J. y ANDUEZA, F., 2020b,pp. 71-83. Physicochemical quality of the water of the Quilotoa volcanic crateric lake. Cotopaxi. Ecuador. *Perspectiva* [en línea], vol. 21, no. March. [Consulta: 15 junio 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/350131491_Physicochemical_quality_of_the_water_of_the_Quilotoa_volcanic_crateric_lake_Cotopaxi_Ecuador.

GONZÁLEZ, M., ALARCÓN, D., ARAQUE, J., VITERI, F., VILLACIS, L., ESCOBAR, S., ARAUJO, L., MEDINA, G. y ANDUEZA, F., 2021,pp. 25-33. Microbiología del agua perteneciente al lago cratérico volcánico Cuicocha. Imbabura. Ecuador: Estudio inicial. *Revista de la Facultad de Farmacia*, vol. 63, no. 1. DOI 10.53766/refa/2021.63.01.03.

GONZÁLEZ, M., VÁSQUEZ, P., ALARCÓN, D., ARAQUE, J., VITERI, F., VILLACIS, L., PINTO, G., ESCOBAR, S., MEDINA, G. y ANDUEZA, F., 2021,pp. 27-33. Calidad fisicoquímica de los lagos Colta y Cuicocha ubicados en la alta montaña del Ecuador. *Revista de la Facultad de Farmacia*, vol. 63, no. 2. DOI 10.53766/refa/2021.63.02.04.

GRAM, T. De, 2019,pp. 13. TINCIÓN DE GRAM Tinción de Gram. [en línea], Disponible en: <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2016/11/Tincion-de-Gram.pdf>.

GUANGASIG TOAPANTA, V., JARAMILLO RUALES, E., TABARES ROSERO, L., BRITO GALARZA, G., OÑA RODRIGUEZ, J. y GALARRAGA PEREZ, E., 2023,pp. 5-9. Calidad fisicoquímica del agua de la laguna Limpiopungo del parque nacional Cotopaxi – Ecuador. *Revista Sanitaria de Investigacion* [en línea]. [Consulta: 14 junio 2023]. Disponible en: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/calidad-fisicoquimica-del-agua-de-la-laguna-limpiopungo-del-parque-nacional-cotopaxi-ecuador/>.

GUEVARA, LIZDEY; HUERTAS, DIANA; PINZÓN, A., 2017,pp. 1-7. *IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE UN SUELO PACHIC MELADUNANDS RESISTENTES AL ARSENICO COMO CANDIDATAS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACION.* 2017. S.l.: s.n.

GUILLEN-NEPITA, A.L., 2020,pp. 60. Morfología colonial – ding! Microbiología. [en línea]. [Consulta: 8 junio 2023]. Disponible en: <https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>.

GUPTA, G.N., SRIVASTAVA, S., KHARE, S.K. y PRAKASH, V., 2014,pp. 371. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, vol. 7, no. 2. ISSN 0974-1712. DOI 10.5958/2230-732x.2014.00258.7.

HALL, M.L. y MOTHE, P.A., 2009,. Volcán quilotoa -- ecuador: volcanismo dacítico joven en una laguna cratérica. *Instituto Geofísico, Escuela Politécnica Nacional, mhall@igepn.edu.ec*, no. 1.

HE, N., HE y NING, 2020,pp. 64-79. A novel bioflocculant for chromium (VI) and arsenic (III) removal: Extracellular polymeric substance (EPS) of *Pseudomonas fluorescens*. *EGUGA* [en línea], [Consulta: 25 junio 2023]. DOI 10.5194/EGUSPHERE-EGU2020-7964. Disponible en: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2020EGUGA..22.7964H/abstract>.

HERNANDEZ, S.J., DOMINGUEZ, E.L. y GONZAGA GUTIERREZ, L., 2018,pp. 13. Influencia de campos magnéticos en el crecimiento de *E. coli* y *S. cerevisiae* y la capacidad de solubilizar fósforo en *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp de uso industrial. *Revista de Ciencias*, vol. 19, no. 1. ISSN 0121-1935. DOI 10.25100/rc.v19i1.6088.

IMRON, M.F., KURNIAWAN, S.B. y ABDULLAH, S.R.S., 2021,pp. 1-13. Resistance of bacteria isolated from leachate to heavy metals and the removal of Hg by *Pseudomonas aeruginosa* strain FZ-2 at different salinity levels in a batch biosorption system. *Sustainable Environment Research* [en línea], vol. 31, no. 1. [Consulta: 25 junio 2023]. ISSN 24682039. DOI 10.1186/s42834-021-00088-6. Disponible en: <https://sustainenvironres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42834-021-00088-6>.

KHALID, A., ARSHAD, J., MAHMOOD, S., AZIZ, I. y ARSHAD, M., 2015,pp. 1260-1264. Effect of chromium forms on the biodegradation of reactive black-5 azo dye by *Psychrobacter* and *Klebsiella* species. *International Journal of Agriculture and Biology* [en línea]. [Consulta: 26 junio 2023]. Disponible en: <https://web.p.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=15608530&AN=111670243&h=R6PhqIdgNvSs3izKM%2Bx1toX%2Bre9%2Fr0iTjFAjQDou6XtrJ8kp7crOMfHSpM9yuyFQJZrTRESCyZZb0%2B7H5vYIQ%3D%3D&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&result>.

KIM, H., GANSLANDT, T., MIETHKE, T., NEUMAIER, M. y KITTEL, M., 2020,. Deep learning frameworks for rapid gram stain image data interpretation: Protocol for a retrospective data analysis. *JMIR Research Protocols* [en línea], vol. 9, no. 7. [Consulta: 9 junio 2023]. ISSN 19290748. DOI 10.2196/16843. Disponible en: <http://www.researchprotocols.org/2020/7/e16843/>.

KINDZIERSKI, V., RASCHKE, S., KNABE, N., SIEDLER, F., SCHEFFER, B., GERGRAU, K.P., PFEIFFER, F., OESTERHELT, D., MARIN-SANGUINO, A. y KUNTE, H.J., 2017,. Osmoregulation in the Halophilic Bacterium *Halomonas elongata*: A Case Study for Integrative Systems Biology. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 1. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0168818.

KLOSKA, A., CECH, G.M., SADOWSKA, M., KRAUSE, K., SZALEWSKA-PALASZ, A. y OLSZEWSKI, P., 2020,pp. 1-22. Adaptation of the marine bacterium *Shewanella baltica* to low temperature stress. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], vol. 21, no. 12.

[Consulta: 25 junio 2023]. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms21124338. Disponible en: [/pmc/articles/PMC7352654/](#).

KOZLOV, D.N. y LEBEDEVA, E. V., 2019,. New data on the morphology and development of volcanic lakes of the Kuril-Kamchatka region. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 324, no. 1. ISSN 17551315. DOI 10.1088/1755-1315/324/1/012022.

KRASIMIROVA, L., 2020,pp. 1-25. Los microorganismos extremófilos y sus aplicaciones biotecnológicas Extremophiles microorganisms and their biotechnological applications. ,

KUSHKEVYCH, I., HÝŽOVÁ, B., VÍŤEZOVÁ, M. y RITTMANN, S.K.M.R., 2021,. Microscopic methods for identification of sulfate-reducing bacteria from various habitats. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], vol. 22, no. 8. [Consulta: 8 junio 2023]. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms22084007. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms22084007>.

LAHA, A., BHATTACHARYYA, S., SENGUPTA, S., BHATTACHARYYA, K. y GUHARROY, S., 2021,pp. 144-148. Study on Burkholderia sp: Arsenic Resistant Bacteria Isolated from Contaminated Soil. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, vol. 9, no. 2. ISSN 2328-3912. DOI 10.12691/AEES-9-2-4.

LANDA-SALGADO, P., CABALLERO-CERVANTES, Y., RAMÍREZ-BRIBIESCA, E., HERNÁNDEZ-ANGUIANO, A.M., RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, L.M., ESPINOSA-VICTORIA, D. y HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, D., 2019,pp. 68-83. Isolation and identification of potentially probiotic lactic acid bacteria for Holstein calves in the Mexican Plateau. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* [en línea], vol. 10, no. 1. [Consulta: 17 junio 2023]. ISSN 20071124. DOI 10.22319/rmcp.v10i1.4512. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4512>.

LASA, A. y ROMALDE, J.L., 2017,pp. 7-10. Genome sequence of three Psychrobacter sp. strains with potential applications in bioremediation. *Genomics Data*, vol. 12. ISSN 22135960. DOI 10.1016/j.gdata.2017.01.005.

LETEK, M., RAMOS, A. y MATEOS, J.A.G.L.M., 2005,pp. 2. Resistencia a arsénico en corinebacterias . , vol. 1.

LI, F., XIONG, X.S., YANG, Y.Y., WANG, J.J., WANG, M.M., TANG, J.W., LIU, Q.H., WANG, L. y GU, B., 2021, pp. 7-56. Effects of NaCl Concentrations on Growth Patterns, Phenotypes Associated With Virulence, and Energy Metabolism in *Escherichia coli* BW25113. *Frontiers in Microbiology*.

LILIANA, M. y ROCHA, M., 2020,. Efectos negativos de los microorganismos halotolerantes y/o halófilos en alimentos con conservas salinas. [en línea]. S.l.: [Consulta: 20 junio 2023]. Disponible en: [epositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/78777/Efectos negativos de los microorganismos halotolerantes y o halófilos en alimentos con conservas salinas. %281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://positorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/78777/Efectos%20negativos%20de%20los%20microorganismos%20halotolerantes%20y%20o%20halofilos%20en%20alimentos%20con%20conservas%20salinas.%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

LOERA MURO, A., BARRAZA, A. y CAAMAL CHAN, M.G., 2019, pp. 24-39. Diálogo entre bacterias ¿cómo se comunican las bacterias? *Recursos naturales y sociedad* [en línea], vol. 5, no. 1. Disponible en: https://www.cibnor.gob.mx/revistas-rns/pdfs/vol5num1/3_DIALOGO_BACTERIAS.pdf.

LOWE, D.E., PELLEGRINI, G., LEMASTERS, E., CARTER, A.J. y WEINER, Z.P., 2020,. Analysis and modeling of coolants and coolers for specimen transportation. *PLoS ONE* [en línea], vol. 15, no. 4. [Consulta: 7 junio 2023]. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0231093. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231093>.

LUPO, A., HAENNI, M. y MADEC, J.-Y., 2018, pp. 1-16. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiology Spectrum* [en línea], vol. 6, no. 3. [Consulta: 25 junio 2023]. ISSN 21650497. DOI 10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017>.

MAGAÑA TZUC, M.C., 2021,. *Potencial Biofertilizante de Bacteria Halófilas aisladas de suelos salinos obtenidos de la reserva de la biósfera de los Petenes*. S.l.: Institucion de enseñanza e investigacion en Ciencias Agrícolas.

MAIER, R.M. y NEILSON, J.W., 2015, pp. 139-153. Extreme Environments. *Environmental Microbiology: Third Edition*, DOI 10.1016/B978-0-12-394626-3.00007-7.

MALAVET-LUNA, T.A., 2020, pp. 1-60. Caracterización de resistencia a metales pesados (Mercurio y Cobre) en aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (MRSA) provenientes de hospitales en Colombia y Ecuador. *Universidad El Bosque* [en línea], [Consulta: 18 junio 2023]. Disponible en:

https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/6401/Malavet_Luna_Thomas_Alejandro_2021.pdf?sequence=1.

MARTANI, N.S., NOTOBROTO, H.B., WASITO, E.B. y JABAL, A.R., 2022, pp. 6629-6634. The role of merA gene of mercury-resistant *Escherichia coli* from Kahayan River, Central Kalimantan, Indonesia in emerging antibiotic resistance. *Biodiversitas* [en línea], vol. 23, no. 12. [Consulta: 18 junio 2023]. ISSN 20854722. DOI 10.13057/biodiv/d231261. Disponible en: <https://scholar.unair.ac.id/en/publications/the-role-of-mera-gene-of-mercury-resistant-escherichia-coli-from->.

MARTÍN-DELCAMPO, A.A., 2018,. Identificación de bacterias con capacidad degradadora de poliuretanos aisladas del Golfo de México. [en línea], [Consulta: 17 junio 2023]. Disponible en: <https://rei.iteso.mx/handle/11117/5477>.

MARTÍNEZ, A., CRUZ, M., VERANES, O., CARBALLO, M.E., SALGADO, I., OLIVARES, S., LIMA, L. y RODRÍGUEZ, D., 2010, pp. 1-10. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares Antibiotic and metals resistance in bacteria isolates from Almendares river . Facultad de Biología , Universidad de la Habana . Calle 25 # 455 entre J e I , Vedado , L. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 41.

MATA CAMPO, M.P., SANCHEZ ESPAÑA, J., VEGAS SALAMANCA, J., RODRIGUEZ GARCIA, J.E., MORELLON MARTELES, M., SALAZAR RINCON, A.E., NAVAS IZQUIERDO, A., LOPEZ-VICENTE, M. y VALERO GARCES, B., 2015, pp. 287-306. Evaluación y seguimiento del cambio global en tres lagos de alta montaña de Parques Nacionales (Enol, Marboré y La Caldera): indicadores biológicos. *Organismo Autónomo Parques Nacionales*, no. April 2018.

MATHEUS, P., ARAQUE, J. y BELANDRIA, O., 2016, pp. 44-59. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR ULTRAVIOLETA COMO UNA HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS ATCC 25922 Y ATCC 35218 DE *ESCHERICHIA COLI* MICROBIAL BIODIVERSITY AND BIOTECHNOLOGICAL BIOPROSPECTION OF ECUADOR ANDEAN VOLCANIC LAKES Vi. *Acta Bioclínica* [en línea], vol. 6, no. 11. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/301543765>.

MELLADO, C., VÍCTOR, C. y MONDACA, M.A., 2011, pp. 131-137. Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana*, vol. 75, no. 2. ISSN 07176538. DOI 10.4067/S0717-65382011000200001.

MENESES, LUZ; HERRERA, Y., 2015, pp. 1-10. Bacterioplancton de tres humedales altoandinos de la cordillera Oriental de Colombia. *Biota Colombiana*, vol. 16, no. 1. ISSN 0124-5376.

METALOIDE, D.E.L., 2010,. BACTERIAS AISLADAS DESDE SEDIMENTOS DEL PRESEWNTAN CONCENTRACIONES VARIABLES Universidad de Concepción. ,

MIWA, H., AHMED, I., YOKOTA, A. y FUJIWARA, T., 2009, pp. 1427-1432. Lysinibacillus parviboronicapiens sp. nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 59, no. 6. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.65455-0. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.65455-0>.

MOJICA, M.F., HUMPHRIES, R., LIPUMA, J.J., MATHERS, A.J., RAO, G.G., SHELBURNE, S.A., FOUTS, D.E., VAN DUIN, D. y BONOMO, R.A., 2022, pp. 1-12. Clinical challenges treating *Stenotrophomonas maltophilia* infections: An update. *JAC-Antimicrobial Resistance* [en línea], vol. 4, no. 3. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 26321823. DOI 10.1093/jacamr/dlac040. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/jacamr/dlac040>.

MOLLOCONDO, M.R., 2020, pp. 64. Tolerancia in vitro de enterobacterias a mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol aisladas del río Coata, Puno. *Universidad Nacional del Altiplano* [en línea], [Consulta: 18 junio 2023]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13735/Mollocondo_Vilca_Moises_Ricardo.pdf?sequence=3&isAllowed=y.

MONTALVO NAVARRO, C.A. y LUGO FLORES, M.A., 2019, pp. 48-54. Electroforésis: Fundamentos, Avances Y Aplicaciones. *Epistemus*, vol. 13, no. 26. ISSN 2007-4530. DOI 10.36790/epistemus.v13i26.96.

MORALES-RUIZ, A. y DÍAZ-LÓPEZ, E., 2020, pp. 377-385. Influence of Temperature, Precipitation and Solar Radiation on Maize Yield in the Valley of Toluca México. *Agrociencia*, vol. 54, no. 3. ISSN 14053195. DOI 10.47163/AGROCIENCIA.V54I3.1933.

MOSQUERA, P. V., HAMPEL, H., VÁZQUEZ, R.F. y CATALAN, J., 2022,pp. 1522-1536. Water chemistry variation in tropical high-mountain lakes on old volcanic bedrocks. *Limnology and Oceanography*, vol. 67, no. 7. ISSN 19395590. DOI 10.1002/LNO.12099.

MURÍNOVÁ, S., DERCOVÁ, K., ČERTÍK, M. y LÁSZLOVÁ, K., 2014,pp. 428-434. The adaptation responses of bacterial cytoplasmic membrane fluidity in the presence of environmental stress factors — polychlorinated biphenyls and 3-chlorobenzoic acid. *Biologia*, vol. 69, no. 4. ISSN 00063088. DOI 10.2478/S11756-014-0337-0.

National Center for Biotechnology Information. [en línea], 2019,pp. 1723-1723. [Consulta: 4 julio 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

NGUYEN, T.D., SHIH, M.H., SRIVASTAVA, D., TIRTHAPURA, S. y XU, B., 2021,pp. 665-710. Stratified random sampling from streaming and stored data. *Distributed and Parallel Databases*, vol. 39, no. 3. ISSN 15737578. DOI 10.1007/s10619-020-07315-w.

NILSSON, R.H., LARSSON, K.H., TAYLOR, A.F.S., BENGTSSON-PALME, J., JEPPESEN, T.S., SCHIGEL, D., KENNEDY, P., PICARD, K., GLÖCKNER, F.O., TEDERSOO, L., SAAR, I., KÕLJALG, U. y ABARENKOV, K., 2019,pp. D259. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, vol. 47, no. Database issue. ISSN 13624962. DOI 10.1093/NAR/GKY1022.

NÚÑEZ, L., 2017., Modelamiento y control de proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás a partir de residuos orgánicos y/o aguas residuales. *Universidad de Piura* [en línea], Disponible en: <https://pirhua.udep.edu.pe/handle/11042/2986>.

O'GRADY, J., CRONIN, U., TIERNEY, J., PITERINA, A. V., O'MEARA, E. y WILKINSON, M.G., 2020,pp. 1-56. Gaps in the assortment of rapid assays for microorganisms of interest to the dairy industry. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 113. ISSN 00652164. DOI 10.1016/bs.aambs.2020.07.001.

OARGA, A., 2009,pp. 1-10. Life in extreme environments. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, vol. 9.

ODEYEMI, O.A., BURKE, C.M., BOLCH, C.J.S. y STANLEY, R., 2018,pp. 415-425. Evaluation of spoilage potential and volatile metabolites production by *Shewanella baltica* isolated from modified atmosphere packaged live mussels. *Food Research International*, vol. 103. ISSN 18737145. DOI 10.1016/j.foodres.2017.10.068.

OGAWA, H., KITSIOS, G.D., IWATA, M. y TERASAWA, T., 2018,pp. 79-84. Sputum Gram stain for diagnosing causative bacterial pathogens and guiding antimicrobial therapies in community-acquired pneumonia : a systematic review and meta-analysis protocol. [en línea], [Consulta: 9 junio 2023]. DOI 10.20407/fmj.2018-019. Disponible en: <https://doi.org/10.20407/fmj.2018-019>.

OLIART-ROS, R., MANRESA-PRESAS, Á. y SÁNCHEZ-OTERO, M., 2016,pp. 79-90. Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development. *CienciaUAT*, vol. 11, no. 1. ISSN 2007-7858.

ORDÓÑEZ, E; VALBUENA, N; LETEK, M; RAMOS, A; GIL, J; MATEOS, L., 2003,pp. 24071. Mecanismos De Resistencia a. ,

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 2018,. *Arsénico* [en línea]. 2018. S.l.: s.n. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic?fbclid=IwAR3PzGAjFsYvMac9_soJwqjBNdl0jcwRXIfOJhzK3C70CGX4hy5fbzaTjl0.

ORTEGA-PEÑA, S. y HERNÁNDEZ-ZAMORA, E., 2018,pp. 79-88. Microbial biofilms and their impact on medical areas: Physiopathology, diagnosis and treatment. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, vol. 75, no. 2. ISSN 16651146. DOI 10.24875/BMHIM.M18000012.

ORTIZ, P.P.R. y JAQUELINA, G.C., 2017,pp. 127-132. Caracterización fisicoquímica y abundancia microbiana de suelos agrícolas con baja productividad en el noreste de guanajuato. *Divulgación Científica*, vol. 3, no. 2.

PACHECO, J.M.A., SINCHE-CRISPÍN, F.V., MATOS-VILA, G.S., ARIAS-VALENZUELA, E.N. y LAPA-ZÁRATE, C.L., 2022,pp. 960-967. Environmental monitoring of air conditioning systems in residential buildings and their relationship with respiratory mycoses. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, vol. 62, no. 5. ISSN 16904648. DOI 10.52808/bmsa.7e6.625.010.

PÁEZ ANGARITA, L.D., 2021,pp. 2-15. Determinación de la movilidad del plásmido de resistencia a la ceftriaxona en agua residual y extracción del plásmido de crispr. [en línea], [Consulta: 18 junio 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/55676>.

PALOMINO CAMARGO, C. y GONZÁLEZ MUÑOZ, Y., 2014,pp. 535-546. Artículo de Revisión IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS : IDENTIFICATION OF PATHOGENS IN FOOD : ADVANTAGES AND LIMITATIONS. *Salud Pública*, vol. 31.

PATERNINA, R., PEREZ, A. y VITOLA, D., 2017,pp. 301-310. Presencia de bacterias rizosféricas resistentes a mercurio en suelos del sur de Bolívar, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, vol. 9, no. 2.

PINSKI, A., ZUR, J., HASTEROK, R. y HUPERT-KOCUREK, K., 2020,pp. 1-20. Comparative genomics of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Stenotrophomonas rhizophila* revealed characteristic features of both species. *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], vol. 21, no. 14. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms21144922. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/14/4922/htm>.

PLANTE, C.J. y BUSBY, T., 2011,pp. 377-393. Influence of the facultative deposit feeder *Mesochaetopterus taylori* on microbial community structure of sediments. *Bulletin of Marine Science*, vol. 87, no. 3. ISSN 15536955. DOI 10.5343/bms.2010.1069.

PLÚAS-CHIQUITO, A.L., POZO-CAJAS, M., LAJONES-TAPIA, C., CARREÑO-ROSARIO, H. y ARÉVALO-CASTRO, O., 2020,pp. 61-70. Determinación de Coliformes Totales y *Escherichia Coli* en el Estuario Chullupe del Cantón Santa Elena Provincia de Santa Elena. *Investigatio*, no. 14. ISSN 13906399. DOI 10.31095/investigatio.2020.14.6.

PRAYEKTI, E. y SUMARSONO, T., 2021,pp. 12-75. Variations in the incubation time of the *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp and *Escherichia coli* cultures on the results of the gram stain visualization. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [en línea], vol. 819, no. 1. [Consulta: 16 junio 2023]. ISSN 17551315. DOI 10.1088/1755-1315/819/1/012075. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/819/1/012075>.

QUEVEDO BELTRÁN, M.A., BAZÁN TAPIA, L.R. y ROJAS ROJAS, V.L., 2020,pp. 136-151. Evaluación de la aireación sobre la actividad microbiana del proceso de compostaje de residuos vegetales de mercado. *Anales Científicos* [en línea]. [Consulta: 15 junio 2023]. Disponible en: https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/1585/pdf_260.

QUISPE MACHACA, E.D., 2017,pp. 202-212. Resistencia in Vitro Al Plomo Y Mercurio Por La Comunidad Bacteriana De Las Aguas Del Río Ramis – Puno, Perú. *Revista de Investigaciones* [en línea]. [Consulta: 18 junio 2023]. Disponible en: <http://revistas.unap.edu.pe/epg/index.php/investigaciones/article/view/109/96>.

RETNO KUSUMAWATI, D., 2021,pp. 72-80. The Effect of Mercury Exposure to Escherichia Coli Bacteria Resistant to Mercury and Escherichia Coli Esbl in Vitro. *International Islamic Medical Journal* [en línea], vol. 2, no. 2. [Consulta: 18 junio 2023]. ISSN 2716-2370. DOI 10.33086/iimj.v2i2.2139. Disponible en: <https://journal2.unusa.ac.id/index.php/IIMJ/article/view/2139>.

REYES-PEREZ, J.J., HERNANDEZ-MONTIEL, L.G., VERO, S., NOA-CARRAZANA, J.C., QUIÑONES-AGUILAR, E.E. y RINCÓN-ENRÍQUEZ, G., 2019,pp. 4992-4999. Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. *Journal of Food Science and Technology* [en línea], vol. 56, no. 11. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 09758402. DOI 10.1007/s13197-019-03971-8. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-019-03971-8>.

RIVAS-GARCIA, T., MURILLO-AMADOR, B., NIETO-GARIBAY, A., RINCON-ENRIQUEZ, G., CHIQUITO-CONTRERAS, R.G. y HERNANDEZ-MONTIEL, L.G., 2019,pp. 61-67. Enhanced biocontrol of fruit rot on muskmelon by combination treatment with marine *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* and their potential modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 151. ISSN 09255214. DOI 10.1016/j.postharvbio.2019.01.013.

RIVERA T., A., CHÁVEZ B., E., RENDÓN A., G. y GIONO C., S., 2006,pp. 110-113. VIABILIDAD DE *Escherichia coli* EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONTAMINANTES. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 23, no. 2. ISSN 17264634.

RODARTE GÓMEZ, L.A., 2017,pp. 10. Bioprospección de microorganismos con resistencia a metales de sitios contaminados con arsénico. , vol. 79.

RODICIO, M. del R. y MENDOZA, M. del C., 2004,pp. 238-245. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento , metodología y aplicaciones en microbiología clínica. , vol. 22, no. 4.

RODRÍGUEZ-ANGELES, M.G., 2002,pp. 464-475. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, vol. 44, no. 5. ISSN 00363634. DOI 10.1590/s0036-36342002000500011.

RODRÍGUEZ, C. y ZHURBENKO, R., 2018,pp. 183. Manual de medios de cultivo. *BioCen* [en línea], vol. 4. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>.

RODRÍGUEZ, P.A. y ARENAS, R., 2018,pp. 166-167. Tinción Gram. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica* [en línea], vol. 16, no. 2. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

RODRIGUEZ ROJAS, F.J., 2017,. *Rol de los mecanismos de resistencia a mercurio en la resistencia cruzada a telurito en bacterias psicrotolerantes aisladas del territorio Antártico Chileno*. S.l.: Universidad de Santiago de Chile.

ROOSA, S., WATTIEZ, R., PRYGIEL, E., LESVEN, L., BILLON, G. y GILLAN, D.C., 2014,pp. 143-151. Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, vol. 189. ISSN 1873-6424. DOI 10.1016/J.ENVPOL.2014.02.031.

ROTHSCHUCH OSORIO, U., 2023,pp. 1-3. Bacterias halófilas: ejemplos, definición y características. *Ecología Verde* [en línea]. [Consulta: 20 junio 2023]. Disponible en: <https://www.ecologiaverde.com/bacterias-halofilas-ejemplos-y-caracteristicas-3905.html>.

ROUCH, D.A., LEE, B.T.O. y MORBY, A.P., 1995,pp. 132-141. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of industrial microbiology*, vol. 14, no. 2. ISSN 0169-4146. DOI 10.1007/BF01569895.

RUIZ RIOS, L., 2020,pp. 57-79. Bacterias halófilas como una fuente de recursos bióticos: una visión de lo evolutivo a lo biotecnológico. *Exploraciones, intercambios y relaciones entre el diseño y la tecnología* [en línea], [Consulta: 20 junio 2023]. DOI 10.16/CSS/JQUERY.DATATABLES.MIN.CSS. Disponible en: <https://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12753/1975>.

SALA, D., GROSSI, V., AGOGUÉ, H., LÉBOULANGER, C., JÉZÉQUEL, D., SARAZIN, G., ANTHEAUME, I., BERNARD, C., ADER, M. y HUGONI, M., 2022,pp. 292-309.

Influence of aphotic haloclines and euxinia on organic biomarkers and microbial communities in a thalassohaline and alkaline volcanic crater lake. *Geobiology*, vol. 20, no. 2. ISSN 1472-4669. DOI 10.1111/GBI.12477.

SANDLE, T., 2021,pp. 1-15. Study of contact plates recovery from pharmaceutical cleanroom surfaces across three-time ranges. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, vol. 25, no. 3. ISSN 17406277. DOI 10.37521/ejpps25301.

SCHWAHA, T.F., OSTROVSKY, A.N. y WANNINGER, A., 2020,pp. 696-729. Key novelties in the evolution of the aquatic colonial phylum Bryozoa: evidence from soft body morphology. *Biological Reviews*, vol. 95, no. 3. ISSN 1469185X. DOI 10.1111/brv.12583.

SIGLIOCCOLO, A., PAIARDINI, A., PISCITELLI, M. y PASCARELLA, S., 2011,pp. 1-12. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology* [en línea], vol. 11, no. 1. [Consulta: 9 junio 2023]. ISSN 14726807. DOI 10.1186/1472-6807-11-50. Disponible en: <https://bmcstructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-11-50>.

SIMMONS, K., 2023,pp. 17. Operating Procedure Title: Sediment Sampling ID: LSASDPROC-200-R5 Issuing Authority: Field Services Branch Supervisor. *U.S. Environmental Protection Agency*, no. Sediment Sampling.

SOLAS, E.S., 2018,. Tesis doctoral efecto de la radiación solar concentrada en el envejecimiento a tiempos largos de receptores solares de alta concentración. ,

STAHL, L., FROST, V., HEARD, M., STAHL, L.; y FROST, V., 2018,pp. 56-61. Creating a microcosm to examine salinity tolerance of *Escherichia coli* in beach sand Recommended Citation. *The Winthrop McNair Research Bulletin* [en línea], vol. 2. [Consulta: 21 junio 2023]. Disponible en: <https://digitalcommons.winthrop.edu/wmrb/vol2/iss1/11>.

SULCA LÓPEZ, M.A. y ALVARADO IPARRAGUIRRE, D.E., 2018,pp. 445-452. Association of mercury resistance with resistance to antibiotics in *Escherichia coli* isolated from the coast of Lima, Peru. *Revista Peruana de Biología*, vol. 25, no. 4. ISSN 17279933. DOI 10.15381/rpb.v25i4.14312.

SUN, S., ZHANG, K., WU, Y., ZHU, N., WANG, Y., CHEN, J. y LENG, F., 2022,pp. 45380-45395. Transporter drives the biosorption of heavy metals by *Stenotrophomonas rhizophila* JC1.

Environmental Science and Pollution Research [en línea], vol. 29, no. 30. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 16147499. DOI 10.1007/s11356-022-18900-0. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-022-18900-0>.

SUN, S.C., CHEN, J.X., WANG, Y.G., LENG, F.F., ZHAO, J., CHEN, K. y ZHANG, Q.C., 2021,pp. 2699-2709. Molecular mechanisms of heavy metals resistance of *Stenotrophomonas rhizophila* JC1 by whole genome sequencing. *Archives of Microbiology* [en línea], vol. 203, no. 5. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 1432072X. DOI 10.1007/s00203-021-02271-0. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-021-02271-0>.

TANVET, C., BENZONI, F., PEIGNON, C., THOUZEAU, G. y RODOLFO-METALPA, R., 2022,pp. 83. High Coral Recruitment Despite Coralline Algal Loss Under Extreme Environmental Conditions. *Frontiers in Marine Science*, vol. 9. ISSN 22967745. DOI 10.3389/fmars.2022.837877.

UDDIN, M.N., HOSSAIN, S.J. y UDDIN, S.N., 2022,pp. 93-97. CHARACTERIZATION OF ARSENIC RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM THE SOIL OF KHULNA SHIPYARD. *Khulna University Studies*, ISSN 1563-0897. DOI 10.53808/KUS.2007.8.1.0612-L.

VALENZUELA, O., 2012,. Evaluación de la concentración de arsénico en agua empleando biosensores microbianos. ,

VARGAS, P. y MONTES, Z., 2019,pp. 1-3. ¿Qué son Pseudomonas? *Revista - Aqua free ES/es* [en línea]. [Consulta: 25 junio 2023]. Disponible en: <https://www.aqua-free.com/es/revista/que-son-pseudomonas>.

VASHISHT, R., ATTRI, S., SHARMA, D., SHUKLA, A. y GOEL, G., 2018,pp. 226-231. Monitoring biocalcification potential of *Lysinibacillus* sp. isolated from alluvial soils for improved compressive strength of concrete. *Microbiological Research*, vol. 207. ISSN 09445013. DOI 10.1016/j.micres.2017.12.010.

VÁZQUEZ-LOUREIRO, D., SÁEZ, A., GONÇALVES, V., BUCHACA, T., HERNÁNDEZ, A., RAPOSEIRO, P.M., DE BOER, E.J., MASQUÉ, P., GIRALT, S. y BAO, R., 2023,. Recent global warming induces the coupling of dissimilar long-term sedimentary signatures in two adjacent volcanic lakes (Azores Archipelago, Portugal). *Quaternary Science Reviews*, vol. 303. ISSN 02773791. DOI 10.1016/j.quascirev.2023.107968.

WANG, X., GAO, J., ZHONG, L., HE, W., JIN, Z., ZHU, R., LIANG, X., LIU, K. y ZHANG, W., 2022,. The Volcanic Impacts on the Formation of Organic-Rich Shales From the Freshwater to Saline Lakes: Cases Study in the Ordos and the Junggar Basins. *Frontiers in Earth Science*, vol. 10. ISSN 22966463. DOI 10.3389/FEART.2022.918391/PDF.

WEI, Y., FU, J., WU, J., JIA, X., ZHOU, Y., LI, C., DONG, M., WANG, S., ZHANG, J. y CHEN, F., 2018,pp. 1898-1915. Bioinformatics analysis and characterization of highly efficient polyvinyl alcohol (PVA)- degrading enzymes from the novel PVA degrader *Stenotrophomonas rhizophila* QL-P4. *Applied and Environmental Microbiology* [en línea], vol. 84, no. 1. [Consulta: 26 junio 2023]. ISSN 10985336. DOI 10.1128/AEM.01898-17. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01898-17>.

WESTERMEIER, R., 2005,pp. 1-6. Gel Electrophoresis. *eLS*, DOI 10.1038/npg.els.0005335.
WOOD, J.M., 2015,pp. 381-388. Bacterial responses to osmotic challenges. *Journal of General Physiology*, vol. 145, no. 5. ISSN 15407748. DOI 10.1085/jgp.201411296.

ZAICHICK, V., 2021,pp. 130-146. Determination of twenty chemical element contents in normal and goitrous thyroid using X-ray fluorescent and neutron activation analysis. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, vol. 11, no. 2. DOI 10.30574/WJARR.2021.11.2.0352.

ZDOR, R.E., 2016,pp. 294-296. Brewing Bokashi: Strengthening Student Skills in Dilution Theory through Fermentation Analysis. *Journal of Microbiology & Biology Education*, vol. 17, no. 2. ISSN 1935-7877. DOI 10.1128/jmbe.v17i2.1080.

ZHANG, J., ZENG, Y., LIU, B. y DENG, X., 2020,. MerP/MerT-mediated mechanism: A different approach to mercury resistance and bioaccumulation by marine bacteria. *Journal of hazardous materials*, vol. 388. ISSN 1873-3336. DOI 10.1016/J.JHAZMAT.2020.122062.

ZHONG, Q., CRUZ-PAREDES, C., ZHANG, S. y ROUSK, J., 2021,. Can heavy metal pollution induce bacterial resistance to heavy metals and antibiotics in soils from an ancient landmine? *Journal of hazardous materials*, vol. 411. ISSN 1873-3336. DOI 10.1016/J.JHAZMAT.2020.124962.

ZHURBENKO, R., RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, C., LOBAINA RODRÍGUEZ, T., LÓPEZ HERNÁNDEZ, O.D. y VIERA ORAMAS, D.R., 2015,pp. 531-535. Peptona papaínica de

corazón de vaca como fuente de nutrientes para los microorganismos. *Salud(i)ciencia (Impresa)*,
vol. 21, no. i.



ANEXOS

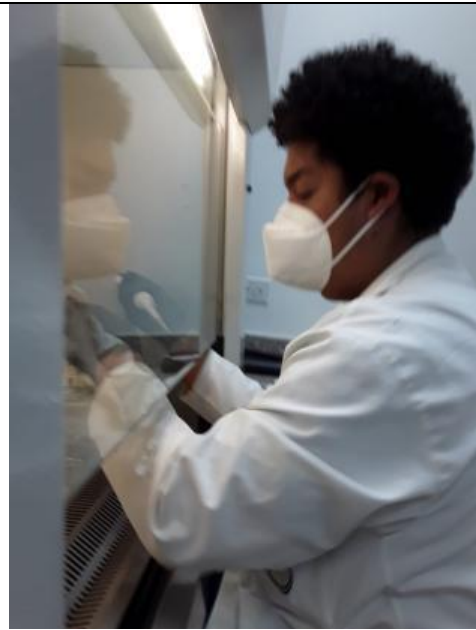
ANEXO A: RECONOCIMIENTO DE LA ZONA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

 A wide-angle photograph of Laguna Quilotoa, a large, greenish-grey lake nestled in a high-altitude valley. The surrounding mountains are rugged and partially covered in snow or light-colored rock. The sky is overcast with grey clouds.	 A close-up view of the water in Laguna Quilotoa, showing ripples and reflections on the surface. The water has a slightly greenish tint. In the background, a steep, rocky mountain slope is visible.
<p>Reconocimiento del área de estudio (Laguna Quilotoa)</p>	<p>Inspección de puntos seleccionados mediante GPS</p>
 A person wearing a white lab coat is bent over, using a long-handled tool to collect sediment from the rocky shore of the lake. A white cooler with a red strap is visible in the foreground.	 A person in a white lab coat is kneeling on a rocky shore, working with a white cooler. Another person is partially visible next to them. The scene is outdoors near the water's edge.
<p>Toma de sedimentos a diferente profundidad (30, 50, 70 cm)</p>	<p>Protocolo de bioseguridad para el transporte de muestras.</p>

ANEXO B: SOLUCIÓN MADRE Y AISLAMIENTO BACTERIANO



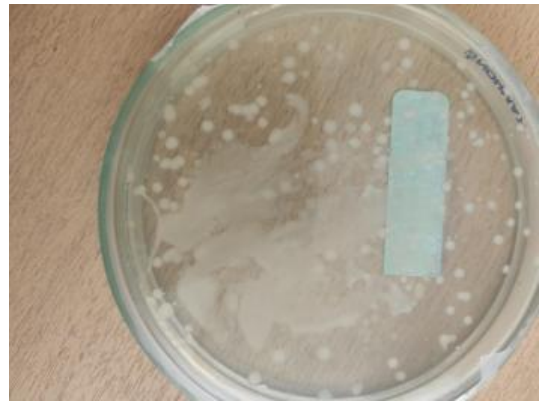
Solución madre de los cuatro puntos seleccionados.



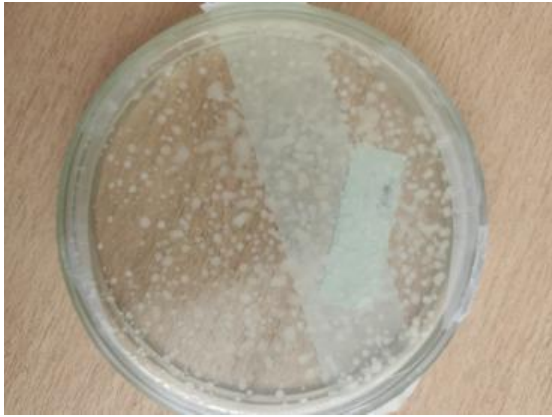
Diluciones seriadas



Siembra de inóculos en medio de cultivo Nutritivo y TSA



Primeras cepas generadas de muestras madres

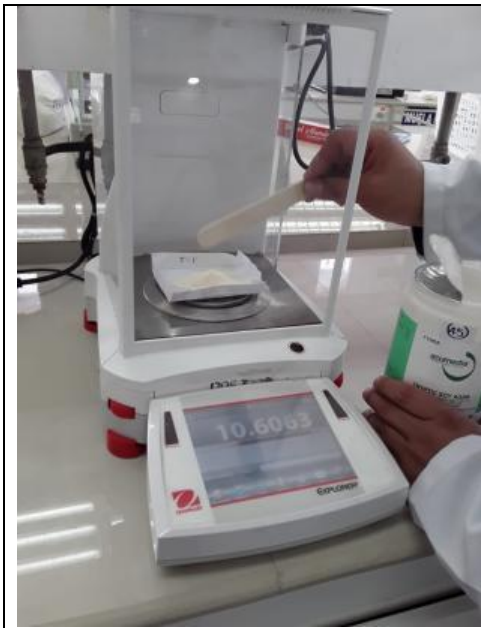


Primeras cepas generadas de muestras madres



Conteo de bacteriano para determinar su población total

ANEXO C: OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA



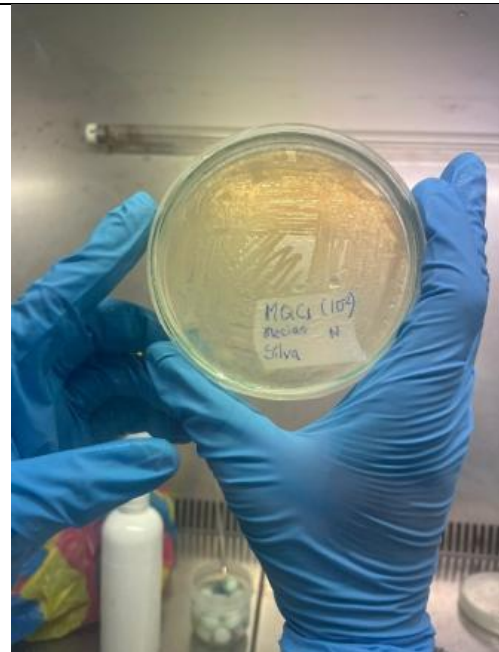
Pesaje de medio de cultivo utilizado (TSA).



Aislamiento de cepas bacterianas



Resultado cepa pura



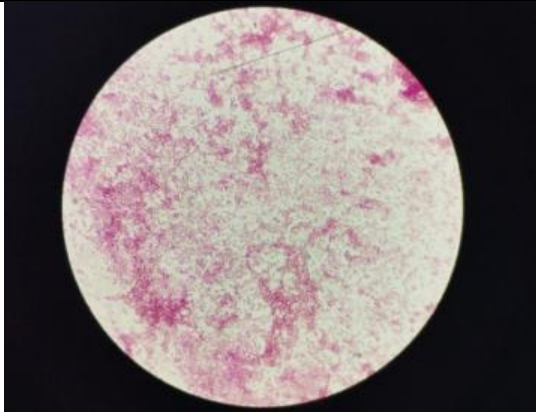
Resultado cepa pura



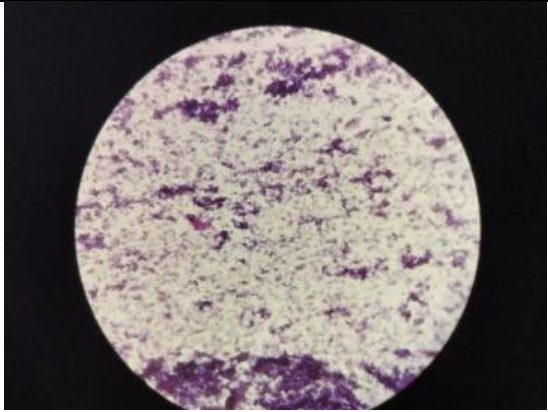
Reactivos utilizados para tinción Gram



Procedimiento de tinción Gram



Resultado de tinción Gram negativas



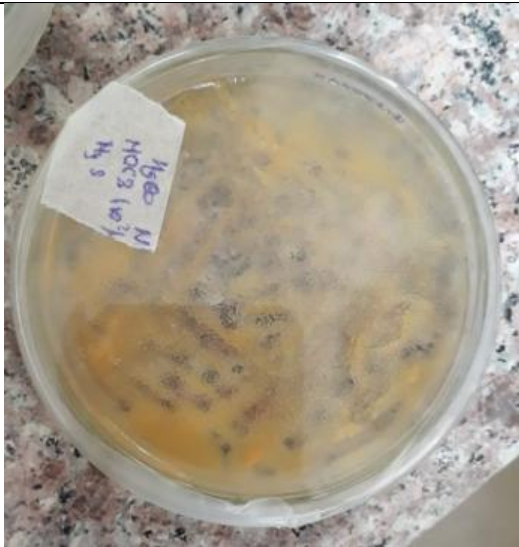
Resultado de tinción Gram positivas

ANEXO D: PRUEBAS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS POLIEXTREMOFILAS



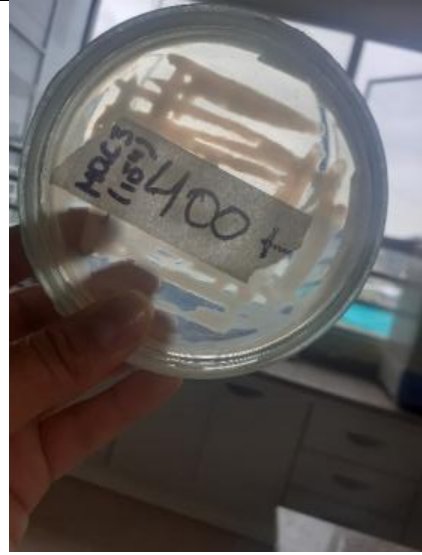
Cultivo por triplicado para pruebas de resistencia (Hg, As, sal)

Prueba de resistencia al mercurio mediante el compuesto (HgCl₂)



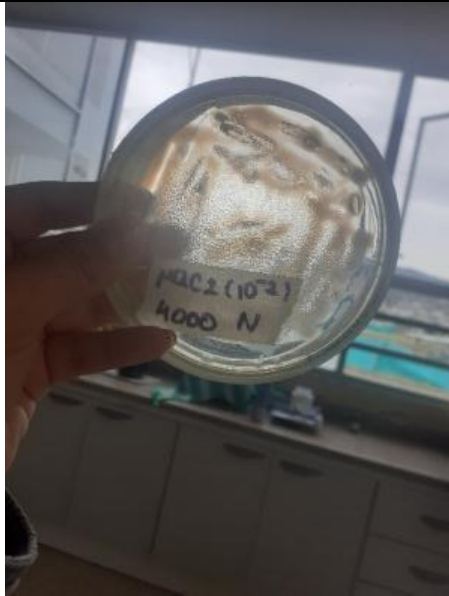
Resultado a prueba de resistencia en concentración 80ppm de Hg

Resultado a prueba de resistencia en concentración 800ppm de Hg

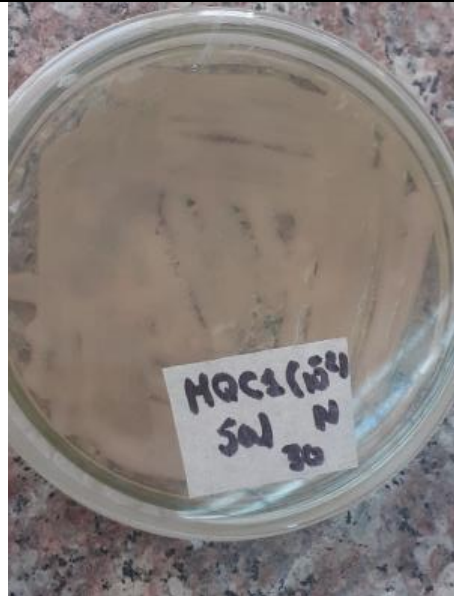


Prueba de resistencia al arsénico mediante el compuesto (As_2O_3)

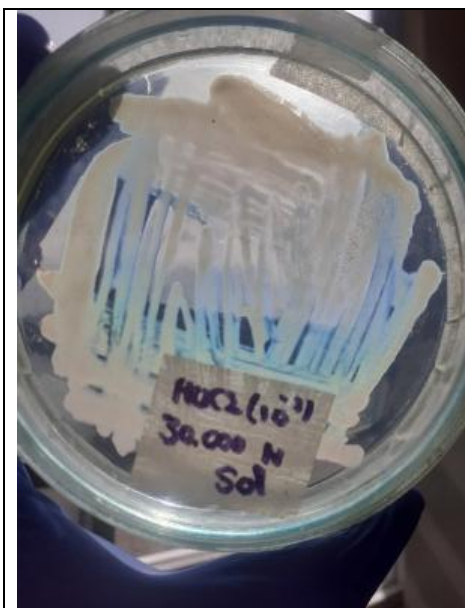
Resultado a prueba de resistencia en concentración 400ppm de As



Resultado a prueba de resistencia en concentración 4000ppm de As



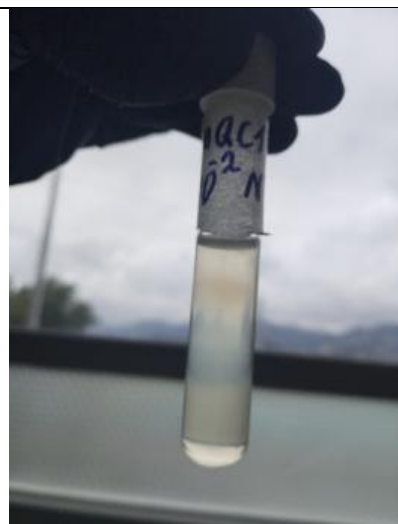
Resultado a prueba de resistencia en concentración 30ppm de NaCl



Resultado a prueba de resistencia en concentración 30000ppm de NaCl



Prueba de resistencia anaerobia utilizando Tioglicolato



Resultado a prueba de resistencia anaerobia con tioglicolato



Resultado a prueba de resistencia anaerobia con tioglicolato

ANEXO E: CUADRO RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN

Código	Dilu..	Agar	Morfología colonial	Morfología microscópica (tinción de Gram)	R. al mercurio (ppm)	R. al arsénico (ppm)	R. a la presión osmótica (ppm)	A. de oxígeno	Organismo	% de identidad
MQC1	10 ⁻²	Nutr.	Circular, borde ondulado, opaca, no pigmentada (Crema), textura lisa.	Negativa	80000	40000	300000	Microaerofilicos	<i>Shewanella baltica</i>	94.59
MQC1*	10 ⁻²	Nutr.	Irregular, borde lobulado, transparente, pigmentada (amarillo), textura rugosa.	Negativa	80000	4000	300000	Anaerobio facultativo	<i>Pseudomonas spp.</i>	100
MQC2	10 ⁻²	TSA	Circular, borde entero, opaca, no pigmentada (Crema), textura lisa.	Negativa	80000	40000	300000	Anaerobio facultativo	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100
MQC2	10 ⁻⁴	Nutr.	Circular, borde entero, opaca, no pigmentada (Crema), textura lisa.	Positiva	80000	4000	30000	Anaerobio facultativo	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	100
MQC3	10 ⁻²	TSA	Circular, borde entero, transparente, pigmentada (amarillo), textura lisa.	Negativa	80000	40000	300000	Anaerobio facultativo	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	94.80
MQC3	10 ⁻⁴	TSA	Irregular, borde rizado, opaca, no pigmentada (Crema), textura lisa.	Positiva	8000	4000	30000	Anaerobio facultativo	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	100

MQC4	10 ⁻²	Nutr.	Irregular, borde ondulado, transparente, no pigmentada (incolora), textura lisa.	Negativa	8000	40000	300000	Anaerobio facultativo	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	100
MQC4	10 ⁻⁴	TSA	Irregular, borde ondulado, transparente, pigmentada (amarillo), textura lisa.	Negativa	80000	40000	300000	Anaerobio facultativo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023

ANEXO F: SECUENCIA FASTA DE GENES ARSA, ARSB Y ACR3

Organismo portador	Gen	Secuencia fasta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arsA</i>	MHFLTQPPRFLFFTGKGGVGKTSIACAAAVQLAAQGKRVL LVSTDPASNVGQVFERIGNRITAIAAVNLWALEIDPQAAA QAYRDRIVGPVRGVL PDTVVDGIEESLSGACTTEIAAFDEF TALLTDTALTQDYEHVIFDTAPTGHTIRLLQLPGAWSGFLE AGKGDASCLGPLAGLEKQRSQYKAAVEALANPLRTRLVL VARAQR TTLREAARTHEELAAIGLSQQHLVINGVFPASEA KNDTLAAAIHERERATLAAIP SALQALPRDQIALKPFNLVG LEALRHLLVDTDATHSADAIELPEQINAPDLSALVDEIAAD GHGLIMVMGKGGVGKTTLAAAIAVELAGRGLPVQLTTS PAAHLADTLEGLPSLALSRI DPQEATARYRQHVM DTKGA ALDAEGRALLEEDLRSPCTEEIAVFQAFSRAIREGGRKFVV MDTAPTGH TLLLLDATGAYHRDIVRQMGETDVHFTTPMM QLQDPKQTKVLIVTLAETTPVLEAANLQDDLRRAGIEPWA WVVNNSVAAAHPHSPLLRQRARNELREIDAVATRHAQRY AVVPLLTEEPVGVVERLRALANWKMS
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>arsB</i>	MLPAIAVFVFTLILVIWQPKGLGVGWSAALGAIIALATGVV SLHDIPAVWAIWVNATATFIAVIIIISLLLDEAGFFEW AALHV ARWANGSGYRLF AFCVLLGAAVSALFANDGAALILTPIVM SMLLALRFSPAATLAFVMAAGFIADTASLPLVVSNLVNIVS ADYFGLGFAEYASVMVPVNIASVAATLLVLFLYFRRDIPK QYALDA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ACR3</i>	MSVGTQTAGRVPAAPTMSVFERYLSVWVLLCIVAGIALGQ FAPGVFQAIGRTEVAQVNLPVGLLIWVM IIPMLLKVDFGAL GQVKQHWRGIGVTLFINWAVKPF SMALLAWIFIRQVFAQ WLPADQLDSYVAGLILLAAAPCTAMVFVWSRLTGGDPVF TLSQVALNDTIMVFAFAPIVGLLLGLSSITVPWATLLVSVG LYIVIPVILAQFWRRALLSKGQA AFDRALERIGPLSIAALLL TLVLLFAFQGEAIRQPLVIAMLA VPILIQVFFNSGLAYWLN RKAGEQH SIACPSALIGASNFFELAVAAAISLFGFQSGAAL ATVVGVLIEVPVMLLVVRIVNQSKGWYECGPNPARG
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>arsA</i>	MEMDAVKYLNKLNLDNIELTKYLFFTGKGGVGKTTISSFI ALNLAENGGKVALVSTDPASNLDQVDFQMELSNKLT KYQPI PNLSIANFDPIVAADDYKAQSIEPYEGILPEVVLSEMKEQLS

		<p>GSCTVEVAAFNEFTNFLSDKTLEQEFDFIIFDTAPTGHILRM LELPSAWTDYLNNTSNDASCLGQLSGLDENRDKYNLALAK LRNPKDITMMLIARPNSHSIYEIQRAQKELQQLSISKFKVII NNYIEESYGLISSQMKLEQDKNINHFTWLNHNNHAYVVPY KKQKEEGIENLSNLLNDDNLIENDDFIVEDHPQFNELIEEIE NSKVQYLFTMGKGGVGTTVATQLATALSNKGYRVLLAT TDPTKEINVETTSNLNTAYIDEEQALEKYKKEVLATVND TPQDDIDYIMEDLKSPCTEEIAFFKAFSDIMENQEDMDYVI VDTAPTGHITLLLDSSENHHKELKKKSTQTTSNVETLLPKI QNQDLTQMIIVTLAEKTPYLESKRLVEDLNRANIGHNWWW VNQSLVTLNQRDDLFSNKKKEDESIWINKIKNESLNYYFVIP YGGLEY</p>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>arsB</i>	<p>MMTTLATLIFLVTLFVLWQPKGLDIGFTALAGAIAMITG VVSLTDVFEVTGIVWNATLTFVSVILISLILDKIGFFEWSAIH MLHASKGNGLKMFVYIILLGAVVAFFANDGSALITPIVL AMVKNIGFSKRAIFPFIIASGFIADTTSLPLIVSNLVNIISADY FNISFSQYLSRMIIPNLFSLGSLVLWLYFRKAIPKSFAN HIKKPKDAINDLKLKISWIVLVILLFGYLISEFTKIPVSIFTG IIAFIFLMLARKSNAVNIKQVIKQAPWNIVLFSIGMYIVVFG LRNAGITLILAKILEYISNYGLFSTILGMGFISAFSSIMNM PTVLIDAIVIGQSNVHGMLKEGLIYANVIGSDLGPKITPIGSL ATLLWLHVLTQKDVKISWGTYFKTGITITIPVLFITLLGLYL TLIIF</p>
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>ACR 3</i>	<p>MVCRKVHLIKNFKWKRGAFIGILEKFQTLIILLAVGSGILLG QIGVIERYAETLVVPFLFLMLYGLFLTIPLHQLKKAFLNIRF LGSSTIINFIWTPVLAWGLGAIFLSDHPALWIGFIMLMVTPC TDWYLAFTGIAKGNVSLSTSILPINLILQVVLLPIYLLLFAGS IETIPLPTLIESILIVLIFPFVLAHLTRFLLRRKEPVLSNIVIPFF SNAQIFFLSFAIMAMFASQGSYLLDHLEVIYILIIPIFFIINY VLGRLVGRLKFSYEDTVSLSLTIARNSPVALAIAVTAFFPN QPLIATLVIGPLIELPILAIVSQVLLFTKMSGK</p>

Fuente: («National Center for Biotechnology Information» 2019,pp. 1723-1723)

ANEXO G: CUADRO RESUMEN POR MÉTODO IN SILICO

Bacteria identificada	Bacteria resistente al arsénico	Gen	Porcentaje de cobertura (%)	Porcentaje de identidad (%)	Puntuación de alineación
<i>Shewanella baltica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arsA</i>	99	65,03	
<i>Shewanella baltica</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>arsB</i>	98	72,51	
<i>Shewanella baltica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ACR3</i>	93	54,01	
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arsA</i>	100	94,56	
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>arsB</i>	97	91,85	
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ACR3</i>	95	90,96	
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arsA</i>	99	44,22	
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>arsB</i>	100	81,26	

<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ACR3</i>	96	32,41	
<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>arsA</i>	95	41,68	
<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>arsB</i>	96	58,21	
<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>ACR3</i>	88	28,04	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arsA</i>	100	100	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>arsB</i>	99	61,16	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ACR3</i>	100	99,72	
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arsA</i>	50	30,36	
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>arsB</i>	95	60,48	
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ACR3</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arsA</i>	99	74,66	

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>arsB</i>	97	86,57	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ACR3</i>	94	90,32	

Realizado por: Mecias J., Silva C., 2023



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: 31/ 10 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTORA/A (S)
Nombres – Apellidos: Jean Carlos Mecias Herrera Christian Paul Silva Villacis
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniero en Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo



1713-DBRA-UPT-2023