



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
POLIEXTREMÓFILAS PRESENTES EN LA LAGUNA
VOLCÁNICA: CUICOCHA”**

Trabajo de Titulación Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES:

CAMILA STEFANÍA MOSQUERA CHICHANDE

DAVID ARMANDO SAMANIEGO SÁNCHEZ

Riobamba-Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
POLIEXTREMÓFILAS PRESENTES EN LA LAGUNA
VOLCÁNICA: CUICOCHA”**

Trabajo de Titulación Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES: CAMILA STEFANÍA MOSQUERA CHICHANDE

DAVID ARMANDO SAMANIEGO SÁNCHEZ

DIRECTOR: IGOR EDUARDO ASTUDILLO SKLIAROVA, MSc, PhD

Riobamba-Ecuador

2023

© 2023, Camila Stefanía Mosquera Chichande & David Armando Samaniego Sánchez

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, Camila Stefanía Mosquera Chichande y David Armando Samaniego Sánchez, declaramos que el presente Trabajo de Titulación Curricular es de nuestra autoría y los resultados de este 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 Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 03 de Julio del 2023



Camila Stefanía Mosquera Chichande
085079960-2



David Armando Samaniego Sánchez
060397642-4

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS POLIEXTREMÓFILAS PRESENTES EN LA LAGUNA VOLCÁNICA: CUICOCHA**”, realizado por los señores: **CAMILA STEFANÍA MOSQUERA CHICHANDE** y **DAVID ARMANDO SAMANIEGO SÁNCHEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, los mismo que cumplen con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. María Alexandra Procel Silva PRESIDENTE DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CURRICULAR	 _____	2023-07-03
Ing. Igor Eduardo Astudillo Skliarova, MSc DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CURRICULAR	 _____	2023-07-03
Dr. Celso Guillermo Recalde Moreno, MSc. ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CURRICULAR	 _____	2023-07-03

DEDICATORIA

Con profunda admiración y respeto a mis padres, Toti y Walter, deseo expresar mi agradecimiento por su ejemplo y enseñanza. Gracias a ellos, he aprendido a luchar por mis sueños y a defender mis ideales, sin rendirme. Su paciencia y amor han sido un soporte fundamental en mi vida, motivándome a superar todos los obstáculos que se han presentado. A mis abuelos quienes siempre me han bendecido y han sabido brindarme protección y apoyo. A mi hija Alicia Camila quien es mi motor de vida y mi ancla a tierra. Su presencia en mi vida me ha dado la fuerza necesaria para seguir adelante. A mis hermanas, Jenniffer y Emily, quienes han sido una de mis mayores motivaciones y han caminado a mi lado en la vida. A mi sobrino Gabriel, quien es mi guerrero y ha sido una luz en mi vida. Su batalla diaria me impulsa a seguir luchando con fuerza para ser mejor cada día. A David S., por su respaldo y amor incondicional en todo momento. Él ha estado a mi lado durante este arduo camino, siendo parte de este logro. También agradezco a mis amigas Tahiri T., Jéssica C., y Melany V., quienes han sido incondicionales y siempre estuvieron pendientes de mí.

Camila

A mis padres, Ximena y Armando por formarme con valores y principios, por su amor, trabajo, sacrificio y apoyo incondicional durante mi vida universitaria. A mis abuelos, Piedad y Reynaldo quienes siempre con su bendición me impulsaron a llegar a mi meta. A mis hermanas, Katty y Evelyn por formar parte de este proceso y por su apoyo. A mi sobrino, Paulo Soria quien me enseñó a luchar y ver las adversidades como oportunidades para ser mejor. A todos mis seres queridos porque me han enseñado el valor de la unidad familiar y por su apoyo en los obstáculos a lo largo de mi vida universitaria y personal. A Camila M, quien me enseñó que el amor verdadero sí existe y ha sido un pilar fundamental en la culminación de mi carrera universitaria, siendo mi apoyo incondicional para formar el mejor equipo. A mis queridos amigos Adriana P., Josephe M., Dennys S., Ronaldo V. y Pamela P., por siempre haber estado ahí para mí brindándome su apoyo durante esta etapa de mi vida. A mi amigo Timmy en el cielo por ser ese loco soñador.

David

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por su guía y bendiciones durante toda nuestra etapa académica y permitiéndonos alcanzar la anhelada meta de convertirnos en profesionales.

A nuestros padres quienes han sido el pilar fundamental en nuestra vida. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, en particular a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, por los valiosos conocimientos impartidos por cada uno de los docentes. Su calidad humana y profesional han sido fundamentales en nuestra formación tanto a nivel profesional como personal.

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento al Dr. Igor Eduardo Astudillo Skliarova, nuestro tutor, por sus valiosos aportes y su guía en cada etapa del proyecto. Su apoyo incondicional ha sido de gran importancia para nosotros.

A la Dra. Maritza Yáñez e Ing. Andrés Mena, les agradecemos por abrirnos las puertas del laboratorio de Biotecnología, depositar su confianza en nosotros y permitirnos utilizar las instalaciones sin limitaciones. Su paciencia, entrega y predisposición han sido fundamentales para llevar a cabo esta investigación.

Extendemos nuestro agradecimiento al Ing. Benjamín Román y Ing. Joana Iza por su valiosa ayuda y aportes durante la etapa experimental de la investigación.

Al Dr. Celso Recalde le agradecemos por brindarnos la oportunidad de formar parte del Grupo de Energías Alternativas y Ambiente, su disposición constante para ayudarnos en este trayecto ha sido invaluable.

A nuestros amigos Tahiri T., Jéssica C., Adriana P., Josephe M., Dennys S., Ronaldo V. y Pamela P., queremos reconocer su importante papel en nuestras vidas.

Camila & David

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
1.1.	Planteamiento del problema	2
1.2.	Limitaciones y delimitaciones	3
1.3.	Problema General de Investigación	3
1.3.1.	<i>Problemas Específicos de Investigación</i>	3
1.4.	Objetivos	3
1.4.1.	<i>Objetivo General</i>	3
1.4.2.	<i>Objetivos Específicos</i>	4
1.5.	Justificación	4
1.5.1.	<i>Justificación Teórica</i>	4
1.5.2.	<i>Justificación Metodológica</i>	5
1.5.3.	<i>Justificación Práctica</i>	5
1.6.	Hipótesis	6

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO	7
2.1.	Antecedentes de investigación	7
2.2.	Referencias Teóricas	9
2.2.1.	<i>Bioprospección</i>	9
2.2.1.1.	<i>Bioprospección en ambientes extremos</i>	9
2.2.2.	<i>Técnicas actuales de Bioprospección</i>	9
2.2.2.1.	<i>La tecnología de Microarrays de ADN</i>	9
2.2.2.2.	<i>Metagenómica mediante NGS</i>	10
2.2.2.3.	<i>Metagenómica basada en el gen 16S ARNr</i>	12

2.2.2.4.	<i>FISH</i>	12
2.2.3.	Aplicaciones de la bioprospección	13
2.2.4.	Técnicas de identificación molecular	13
2.2.4.1.	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	13
2.2.4.2.	<i>Componentes de la PCR</i>	14
2.2.5.	Ambientes extremos	16
2.2.6.	Lagos Cratéricos	16
2.2.6.1.	<i>Microbiología de los lagos cratéricos</i>	16
2.2.6.2.	<i>Lagos cratéricos del Ecuador</i>	17
2.2.7.	Microorganismos extremófilos	19
2.2.8.	Resistencia de los microorganismos a condiciones ambientales extremas	20
2.2.8.1.	<i>Factores físicos</i>	20
2.2.8.2.	<i>Factores químicos</i>	24
2.2.9.	Mecanismo de resistencia bacteriana a metales pesados	26
2.3.	Requerimiento de oxígeno	28
2.3.1.	Ausencia de oxígeno (microorganismos anaeróbicos)	28
2.3.2.	Tipos de poliextremófilos	29
2.3.3.	Aplicación biotecnológica de microorganismos extremófilos	30
2.3.4.	Medios de cultivo	31
2.3.4.1.	<i>Componentes de un medio de cultivo</i>	31
2.3.4.2.	<i>Características de los medios de cultivo</i>	32
2.3.4.3.	<i>Tipos de medios de cultivo</i>	32
2.3.4.4.	<i>Tipos de agares y caldos</i>	32
2.3.5.	Morfología microscópica y macroscópica	33
2.3.5.1.	<i>Morfología microscópica</i>	33
2.3.5.2.	<i>Morfología macroscópica</i>	33
2.3.6.	Identificación microbiana	34
2.3.6.1.	<i>Tinción diferencial de Gram</i>	34
2.3.6.2.	<i>Pared celular de bacterias gram positivas y gram negativas</i>	34
2.3.7.	Métodos moleculares de identificación bacteriana	34
2.3.7.1.	<i>Extracción del ADN cromosómico</i>	35
2.3.7.2.	<i>Amplificación del gen</i>	35
2.3.7.3.	<i>Electroforesis</i>	36
2.3.7.4.	<i>Determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón</i>	37
2.3.7.5.	<i>Análisis de la secuencia</i>	38

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	39
3.1.	Enfoque de investigación	39
3.2.	Nivel de Investigación	39
3.3.	Diseño de investigación	39
3.3.1.	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	39
3.3.2.	<i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i>	40
3.4.	Tipo de estudio	40
3.5.	Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra	40
3.5.1.	<i>Población</i>	40
3.5.2.	<i>Selección y cálculo del tamaño de la muestra</i>	40
3.6.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	41
3.6.1.	<i>Método de muestreo</i>	41
3.6.2.	<i>Muestreo</i>	42
3.6.2.1.	<i>Muestra compuesta</i>	42
3.6.2.2.	<i>Rotulado de las muestras</i>	42
3.6.2.3.	<i>Medición de parámetros físicos in situ</i>	42
3.6.2.4.	<i>Almacenamiento y transporte de muestras</i>	43
3.6.3.	<i>Medición de parámetros físicos en laboratorio</i>	44
3.6.4.	<i>Aislamiento bacteriano</i>	44
3.6.4.1.	<i>Diluciones seriadas</i>	44
3.6.4.2.	<i>Preparación de medios de cultivo</i>	45
3.6.4.3.	<i>Inoculación de las muestras</i>	46
3.6.4.4.	<i>Incubación de inóculos</i>	46
3.6.5.	<i>Obtención de cultivos puros</i>	46
3.6.6.	<i>Caracterización bacteriana</i>	47
3.6.6.1.	<i>Caracterización macroscópica</i>	47
3.6.6.2.	<i>Caracterización microscópica</i>	47
3.6.7.	<i>Pruebas de resistencia</i>	47
3.6.7.1.	<i>Prueba de resistencia a metales pesados Cromo VI y Cadmio</i>	47
3.6.7.2.	<i>Prueba de resistencia a concentraciones halófilas</i>	48
3.6.7.3.	<i>Pruebas de resistencia a condiciones anaerobias</i>	48
3.6.8.	<i>Caracterización molecular de bacterias</i>	49
3.6.8.1.	<i>Extracción y purificación de ADN bacteriano</i>	49
3.6.8.2.	<i>Amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR convencional</i>	52
3.6.8.3.	<i>Secuenciación molecular e identificación bacteriana</i>	53

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	54
4.1.	Medición de parámetros físicos in situ y en laboratorio	54
4.2.	Aislamiento bacteriano	57
4.3.	Caracterización bacteriana	59
4.3.1.	<i>Caracterización macroscópica</i>	59
4.3.2.	<i>Caracterización microscópica</i>	61
4.4.	Pruebas de resistencia a metales pesados	64
4.4.1.	<i>Cromo</i>	64
4.4.2.	<i>Cadmio</i>	71
4.5.	Prueba de resistencia a concentraciones halófilas	77
4.6.	Prueba de resistencia a condiciones anaerobias	84
4.7.	Caracterización molecular	88
4.7.1.	<i>Extracción y purificación de ADN</i>	88
4.7.2.	<i>Amplificación del gen 16ARNs mediante PCR convencional</i>	90
4.7.3.	<i>Secuenciación molecular e identificación bacteriana</i>	91
4.7.3.1.	<i>Pseudomonas fildesensis / Pseudomonas veronii / Pseudomonas sp.</i>	92
4.7.3.2.	<i>Trichococcus patagoniensis</i>	93
4.7.3.3.	<i>Janthinobacterium sp.</i>	94
4.7.3.4.	<i>Exiguobacterium undae</i>	95
4.7.3.5.	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	96
4.7.3.6.	<i>Aeromonas salmonicida</i>	97
	CONCLUSIONES	96
	RECOMENDACIONES	97

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1:	Fases de la tecnología PCR	15
Tabla 2-2:	Clasificación de microorganismos extremófilos	19
Tabla 2-3:	Microorganismos psicrófilos	22
Tabla 2-4:	Microorganismos anaerobios encontrados en diferentes rangos de pH.....	23
Tabla 2-5:	Factores genéticos que influyen en la resistencia a metales en bacterias.	27
Tabla 2-6:	Clasificación de poliextremófilos	29
Tabla 3-1:	Coordenadas de los puntos de muestreo.....	41
Tabla 3-2:	Composición de Agua de peptona.....	45
Tabla 3-3:	Composición de TSA	45
Tabla 3-4:	Composición de PCA	45
Tabla 3-5:	Concentraciones de Cromo y Cadmio.....	48
Tabla 3-6:	Concentraciones de NaCl	48
Tabla 3-7:	Composición de Medio Fluido Tioglicolato.....	49
Tabla 3-8:	Primers universales para el gen 16S	53
Tabla 3-9:	Condiciones de la PCR.....	53
Tabla 4-1:	Parámetros físicos en campo y en laboratorio.....	54
Tabla 4-2:	Características macroscópicas de cepas aisladas.....	60
Tabla 4-3:	Resultado Tinción Gram de bacterias aisladas	61
Tabla 4-4:	Caracterización microscópica y macroscópica.....	62
Tabla 4-5:	Pruebas de resistencia con cromo (VI).....	64
Tabla 4-6:	Bacterias resistentes a altas concentraciones de cromo (VI).....	65
Tabla 4-7:	Pruebas de resistencia con Cr (VI) en Escherichia coli	67
Tabla 4-8:	Pruebas de resistencia con Cr (VI) en Pseudomona aeruginosa.....	69
Tabla 4-9:	Pruebas de resistencia con cadmio	71
Tabla 4-10:	Bacterias resistentes a altas concentraciones de cadmio	72
Tabla 4-11:	Pruebas de resistencia con Cd en Escherichia coli	73
Tabla 4-12:	Pruebas de resistencia con Cd en Pseudomona aeruginosa	75
Tabla 4-13:	Pruebas de resistencia a concentraciones halófilas.....	77
Tabla 4-14:	Pruebas de resistencia con NaCl en Escherichia coli	80
Tabla 4-15:	Pruebas de resistencia con NaCl en Pseudomona aeruginosa	83
Tabla 4-16:	Resultado pruebas con tioglicolato.....	85
Tabla 4-17:	Valores indicativos de pureza en muestras de ADN	89
Tabla 4-18:	Valores de la pureza del ácido nucleico extraído	89
Tabla 4-19:	Caracterización molecular de microorganismos aislados.....	92

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Tecnología de microarreglos (microarrays).....	10
Ilustración 2-2:	Método de amplificación en puente.....	11
Ilustración 2-3:	Técnica de PCR en emulsión.....	11
Ilustración 2-4:	Estructura secundaria del ARNr 16S	12
Ilustración 2-5:	Hibridación Fluorescente In Situ (FISH).....	13
Ilustración 2-6:	Acumulación de producto en la amplificación exponencial de ADN por PCR	14
Ilustración 2-7:	Localización de la Laguna de Cuicocha	18
Ilustración 2-8:	Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia de los cromatos en Células bacterianas.....	28
Ilustración 2-9:	La aplicación de microorganismos extremófilos en biotecnología, medicina	31
Ilustración 2-10:	Esquema convencional de un PCR.....	36
Ilustración 2-11:	Electroforesis de ácidos nucleicos.....	37
Ilustración 2-12:	Secuenciación automatizada.....	37
Ilustración 2-13:	Etapas de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S.	38
Ilustración 3-1:	Mapa de ubicación de puntos de muestreo.....	41
Ilustración 3-2:	Muestreo. A: Toma de muestra compuesta B: Preparación de la muestra C: Medición de parámetros.....	43
Ilustración 3-3:	Almacenamiento de las muestras.....	43
Ilustración 3-4:	Determinación de pH y temperatura en laboratorio.....	44
Ilustración 3-5:	Solución madre de cada punto de muestreo.....	45
Ilustración 3-6:	Aislamiento bacteriano A: Diluciones seriadas B: Siembra de superficie en placa C: Preparación con medios de cultivo	46
Ilustración 3-7:	Reactivos utilizados en Tinción Gram.....	47
Ilustración 3-8:	Extracción de ADN A: Adición de reactivos en tubos eppendorf con perlas B: Toma del asilado bacteriano.....	50
Ilustración 3-9:	Purificación de ADN A: Centrifugación de muestras B: Extracción del sobrenadante.....	51
Ilustración 3-10:	Purificación de ADN A: Centrifugación de muestras B: Resuspensión del pellet de ADN en agua libre de nucleasas.....	52
Ilustración 3-11:	Valoración de pureza de ADN.....	52

Ilustración 4-1:	Bacterias seleccionadas para aislamiento	58
Ilustración 4-2:	Bacterias aisladas.....	59
Ilustración 4-3:	Observación 100x, Tinción Gram A: Cocos (+); B: Bacilos (-).	62
Ilustración 4-4:	Porcentaje de bacterias según la tinción Gram aisladas del sedimento de la laguna de Cuicocha.	63
Ilustración 4-5:	Pruebas de resistencia con Cr a concentración de 50000 ppm Muestra MC12_R1_C1	65
Ilustración 4-6:	Pruebas de resistencia con Cr a concentración de 100 y 1000 ppm A: E. coli en TSA; B: E. coli en PCA.....	67
Ilustración 4-7:	Pruebas de resistencia con Cr a concentración de 1000 y 100 ppm A: Pseudomona aeruginosa en TSA; B: Pseudomona aeruginosa en PCA.....	69
Ilustración 4-8:	Pruebas de resistencia con Cd concentración de 50000 ppm muestra MC16_R2_C7	71
Ilustración 4-9:	Pruebas de resistencia con Cd a concentración de 100 ppm A: E. coli en TSA; B: E. coli en PCA	74
Ilustración 4-10:	Pruebas de resistencia con Cd a concentración de 100 ppm A: Pseudomona aeruginosa en TSA; B: Pseudomona aeruginosa en PCA	75
Ilustración 4-11:	Pruebas de resistencia a NaCl concentración de 100000 ppm muestra MC12_R2_C4	78
Ilustración 4-12:	Pruebas de resistencia a NaCl con E. coli a concentración de 10000 ppm... 81	
Ilustración 4-13:	Pruebas de resistencia a NaCl con Pseudomona aeruginosa a concentración de 100000 ppm.....	83
Ilustración 4-14:	Pruebas con tioglicolato A: Bacterias asiladas en medio TSA B: Bacterias aisladas en medio PCA.....	86
Ilustración 4-15:	Bacterias con crecimiento en el fondo del tubo	86
Ilustración 4-16:	De izquierda a derecha, muestra de E. coli y Blanco.....	87
Ilustración 4-17:	De izquierda a derecha, muestra de P. aeruginosa en TSA y PCA; Blanco. 88	
Ilustración 4-18:	Valoración de la pureza del ácido nucleico extraído A: muestra Blanco; B: Muestra MC12_R1_C1	90
Ilustración 4-19:	Electroforesis en gel de agarosa.....	91

RESUMEN

En la Laguna Cuicocha, se han descubierto bacterias poliextremófilas, muchas de las cuales son especies nuevas y apenas han sido estudiadas. Hasta ahora, las investigaciones realizadas en esta laguna se han centrado en la microbiología del agua y microbiota presente. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios sobre bacterias resistentes a múltiples factores ambientales. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue caracterizar molecularmente las bacterias poliextremófilas presentes en muestras de sedimentos de la Laguna Cuicocha. La metodología empleada en este estudio tuvo un enfoque mixto y se utilizó un diseño experimental transversal, ya que se manipularon variables y se llevó a cabo en un período de tiempo determinado. La población de estudio fueron las muestras de sedimentos de la Laguna Cuicocha, y fue necesario realizar una investigación documental y de campo para obtener la información necesaria mediante métodos, técnicas e instrumentos, como el muestreo no probabilístico, las pruebas de resistencia a metales pesados, cloruro de sodio y la falta de oxígeno, así como la identificación mediante la técnica molecular de la PCR convencional. A través de esta metodología, se descubrió que 6 cepas eran resistentes al cromo en forma de cromato de potasio, en concentraciones que iban desde 10 ppm hasta 50000 ppm. Asimismo, se encontró que 5 cepas eran resistentes al cadmio en forma de cloruro de cadmio, en las mismas concentraciones mencionadas. Además, se demostró que todas las cepas eran resistentes a altas concentraciones de sal y, en cuanto a la falta de oxígeno, se determinó que la mayoría eran anaerobias facultativas. En conclusión, las bacterias poliextremófilas presentes en la Laguna Cuicocha corresponden a 8 especies bacterianas: *Pseudomonas fildesensis* y *Pseudomonas veronii* (99,43%); *Trichococcus patagoniensis* (96,86%); *Janthinobacterium sp.* (100%); *Pseudomonas sp.* (100%); *Exiguobacterium undae* (99,87%); *Psychrobacter alimentarius* (99,79%); *Pseudomonas sp.* (99,93%); *Aeromonas salmonicida* (100%).

Palabras claves: <CARACTERIZACIÓN MOLECULAR>; <BACTERIAS POLIEXTREMÓFILAS>; <ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)>; <METALES PESADOS>; <HALOTOLERANTES>

1266-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

In the Cuicocha Lagoon, polyextremophilic bacteria have been discovered, many of which are new species and have barely been studied. Until now, the investigations carried out in this lagoon have focused on the microbiology of the water and the microbiota present. However, studies on bacteria resistant to multiple environmental factors have yet to be conducted. This research aimed to molecularly characterize the polyextremophilic bacteria present in sediment samples from Laguna Cuicocha. The methodology used in this study had a mixed approach. A cross-sectional experimental design was used since variables were manipulated and carried out in a determined period. The study population consisted of sediment samples from Laguna Cuicocha. It was necessary to carry out a documentary and field investigation to obtain the necessary information through methods, techniques, and instruments, such as non-probabilistic sampling, heavy metal resistance tests, sodium chloride and lack of oxygen, and identification using the conventional PCR molecular technique. This methodology found six strains resistant to chromium in potassium chromate at concentrations ranging from 10 ppm to 50,000 ppm. Likewise, it was found that five strains were resistant to cadmium in the form of cadmium chloride in the same concentrations mentioned. In addition, it was shown that all the strains were resistant to high salt concentrations, and regarding the lack of oxygen, it was determined that the majority were facultative anaerobes. In conclusion, the polyextremophilic bacteria present in the Cuicocha Lagoon correspond to 8 bacterial species: *Pseudomonas fildesensis* and *Pseudomonas veronii* (99,43%); *Trichococcus patagoniensis* (96,86%); *Janthinobacterium sp.* (100%); *Pseudomonas sp.* (100%); *Exiguobacterium undae* (99,87%); *Psychrobacter alimentarius* (99,79%); *Pseudomonas sp.* (99,93%); *Aeromonas salmonicida* (100%).

Keywords: MOLECULAR CHARACTERIZATION>; <POLYEXTREMOPHILE BACTERIA>; <DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA)>; <HEAVY METALS>; <HALOTOLERANTS>.



Ing. Paul Obregón. Mgs

0601927122

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, se encuentran diversos sistemas lacustres, incluyendo las lagunas volcánicas que forman parte importante de su patrimonio natural. Sin embargo, existe un conocimiento limitado sobre las características de los microorganismos que habitan en estos ecosistemas acuáticos extremos en el país. La escasa investigación ha dado lugar a una falta de comprensión de los procesos metabólicos de estos microorganismos, así como de su potencial utilidad en áreas como la biotecnología, la farmacología, la ecología y la salud (González, et al., 2021, p. 33).

Según González et al. (2021, p.26) las lagunas volcánicas son cuerpos de agua que se forman en los cráteres de antiguos volcanes, producto de la actividad volcánica pasada. En el caso de la laguna Cuicocha, su origen volcánico y las características únicas de su entorno han permitido el desarrollo de microorganismos adaptados a estas condiciones extremas.

Cuicocha es conocida no solo por su belleza escénica, sino también por albergar microorganismos extremófilos y poliextremófilos en sus aguas. Los microorganismos extremófilos son organismos capaces de sobrevivir y prosperar en condiciones ambientales extremas que son consideradas inhóspitas para la mayoría de las formas de vida (Demirjian, Morís-Varas, and Cassidy, 2001, p.144) mientras que los poliextremófilos son aquellos extremófilos que pueden soportar múltiples factores en condiciones adversas (Sharma, Mathur, y Singh, 2016, pp. 807-811).

En la laguna Cuicocha se encuentran bacterias poliextremófilas, muchas de las cuales son especies desconocidas y poco investigadas, por ello el objetivo de este Proyecto de Investigación es caracterizar molecularmente bacterias poliextremófilas de muestras de sedimentos provenientes de la Laguna Cuicocha. Puesto que, su investigación contribuye al entendimiento de los procesos celulares y los mecanismos moleculares que hacen que los extremófilos sean resistentes.

Esta investigación es relevante para la ESPOCH y el Grupo de Energías Alternativas y Ambiente (GEAA) ya que los resultados de esta investigación científica contribuyen como herramienta para procesos de biorremediación de ambientes con presencia de metales pesados (Cr y Cd). La caracterización molecular de estas bacterias será una guía para posibles aplicaciones en celdas microbianas, con el propósito de generar bioelectricidad y promover la producción de energías alternativas, renovables y limpias. Además, sentará las bases para investigaciones futuras relacionadas con el uso de estos microorganismos o sus enzimas termoestables en posibles aplicaciones industriales y biotecnológicas.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La Laguna Cuicocha se sitúa a 3.072 msnm, es una laguna de origen volcánico ubicada en la cordillera occidental de los andes ecuatorianos, cerca de la población de Otavalo. Esta laguna forma parte de la reserva ecológica Cotacachi-Cayapas, la cual se encuentra en las provincias de Esmeraldas e Imbabura, al noroccidente del Ecuador. Además, constituye una de las 35 áreas naturales que conforman el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Gunkel, et al., 2009, p.700).

Cuicocha es un lago volcánico joven de unos cientos de años en las cordilleras occidentales de los Andes ecuatorianos, con algunas actividades post volcánicas, como emisión de gases volcánicos y entrada de agua hidrotermal (Gunkel, et al., 2009, p.700).

Los sistemas lacustres de alta montaña están caracterizados por resistir condiciones inhóspitas que les otorgan especial interés. En estos ecosistemas se alcanzan valores extremos de ciertos factores tales como: pH, temperatura, salinidad, metales pesados, oxígeno, sulfatos y fosfatos, etc., por ende, estos lagos y lagunas acortan el período de crecimiento de las poblaciones que los habitan, reducen la producción primaria y provocan una importante simplificación comunitaria (Morales, 1985, p. 1).

La Laguna de Cuicocha está constituida en su interior por dos islas: José María Jerovi (0.26 km²) y Theodoro Wolf (0.41 km²), la cual se destaca por poseer la cúpula más alta, alrededor de 300 metros sobre la superficie del cráter y actualmente sumergido (Gunkel, et al., 2009).

Este tipo de hábitats son considerados ambientes extremos, según varios autores Wang, Wang, y Li (2007, p. 444) los entornos extremos se caracterizan por presentar condiciones físicas y/o químicas distintivas, tales como temperaturas altas o bajas, acidez elevada o reducida, presiones elevadas y niveles significativos de radiación, así como también bajos niveles de oxígeno. En la Laguna Cuicocha existen bacterias poliextremófilas, muchas de las cuales constituyen especies nuevas, por ende, poco estudiadas, siendo esta la principal razón para su estudio ya que contribuyen al conocimiento de los procesos que se desarrollan a nivel celular; además, permiten comprender los mecanismos moleculares que hacen resistentes a los extremófilos y entender cómo participan en los ciclos biogeoquímicos del ambiente. Adicionalmente, a nivel industrial podrían ser usados para desarrollar nuevos procesos biotecnológicos u optimizar los ya existentes.

1.2. Limitaciones y delimitaciones

- El muestreo se realizará únicamente en un periodo de tiempo determinado, de modo que solo se considerará la época seca, sin embargo, la composición, características de sedimento pueden verse afectadas en la época lluviosa por lo que se pueden obtener resultados diferentes.
- Los resultados obtenidos en este documento no aplicarán a otras lagunas volcánicas del país, sin embargo, pueden coincidir al ser ecosistemas similares.
- Este Proyecto de Investigación se limitará al estudio de bacterias poliextremófilas solo en sedimentos más no en muestras de agua.
- Previo a la toma de muestras se tenían definidos los puntos de muestreo, sin embargo, por la geografía de la laguna, la accesibilidad a estos no fue posible, de manera que se consideraron otros puntos de muestreo en el sitio.
- Durante el muestreo en la Laguna Cuicocha se utilizó un multiparámetro marca YIERYI 4in1 que sólo permitió medir pH y temperatura.
- La identificación molecular de aislados bacterianos se realizó en laboratorios externos dado que la Universidad está en proceso de adquisición de reactivos y materiales necesarios para el montaje del laboratorio de Biología Molecular y Genética.

1.3. Problema general de investigación

¿En los sedimentos de la laguna volcánica Cuicocha, ubicada en la provincia de Imbabura, cantón Cotacachi, existen bacterias poliextremófilas?

1.3.1. Problemas específicos de investigación

- ¿Cuáles son las características morfológicas de bacterias poliextremófilas existentes en la Laguna volcánica Cuicocha?
- ¿Cómo influyen las condiciones extremas (ausencia de oxígeno, altas concentraciones de Cr, Cd y NaCl) en las bacterias?
- ¿Cuáles son las cepas bacterianas poliextremófilas en la Laguna volcánica Cuicocha?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente bacterias poliextremófilas presentes en la Laguna volcánica Cuicocha.

1.4.2. *Objetivos específicos*

- Determinar las características morfológicas de bacterias poliextremófilas existentes en la Laguna Cuicocha.
- Evaluar las condiciones extremas (ausencia de oxígeno, altas concentraciones de Cr, Cd y NaCl) de las bacterias mediante pruebas de resistencia.
- Identificar cepas bacterianas poliextremófilas mediante la técnica molecular de la PCR convencional.

1.5. *Justificación*

1.5.1. *Justificación teórica*

Los ambientes extremos se presentan en distintas partes del mundo y abarcan una amplia variedad de ecosistemas, como fuentes termales, lagunas de aguas ácidas, desiertos, salinas, ríos con agua oscura y zonas de alta montaña, entre otros (Velásquez, et al., 2018, p. 10). A nivel mundial hay algunos ambientes que destacan por ser conocidos y estudiados tales como: el Parque Nacional Yellowstone (altas temperaturas), Desierto de Atacama (aridez y niveles de UV), Los valles secos de McMurdo en la Antártida (bajas temperaturas). (Maier, y Neilson, 2015, pp. 140-144).

La biodiversidad de estos ambientes constituye un patrimonio que debe conocerse y valorarse, sin embargo, el Ecuador a pesar de ser un país megadiverso y con una alta diversidad microbiana existe información limitada con respecto al uso de microorganismos, siendo los extremófilos poco estudiados ya que en un inicio se consideraron como zonas exentas de vida. Sin embargo, en la actualidad diferentes autores Demirjian, Morís-Varas, y Cassidy (2001, pp.144-145), consideran que las bacterias poliextremófilas son de gran interés debido a sus enzimas, las cuales les confieren estabilidad térmica y velocidades de reacción que no es posible con enzimas químicas, razón por la cual existen un sinnúmero de publicaciones (libros, artículos de revisión, artículos científicos, etc.) referentes a microorganismos poliextremófilos.

Por ello, este Proyecto de Investigación cuenta con respaldo bibliográfico obtenido de las bases de datos suscritas por la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), de igual manera recursos electrónicos (e-books) de libre acceso. Por otro lado, también se hace uso del repositorio de la ESPOCH, y de otras universidades que han realizado estudios similares en lagunas volcánicas.

De igual manera se tiene la aplicación de buscadores académicos que permiten la búsqueda de

materiales y documentos de investigación o académicos, de descarga fácil, rápida y gratuita.

1.5.2. Justificación metodológica

Las bacterias de ambientes extremos logran desarrollarse en condiciones inhóspitas, siendo difíciles de replicar en el laboratorio y pueden tener requerimientos nutricionales que son desconocidos. Es por ello que el estudio de la biodiversidad extremófila es una tarea compleja, 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 propone caracterizar bacterias con capacidad de resistencia a elevadas concentraciones de Cromo (Cr) y Cadmio (Cd), altas concentraciones de Sal (NaCl) y requerimiento de oxígeno (condiciones anaerobias), por ello se ha considerado como área de estudio a la Laguna Cuicocha.

Para las pruebas de resistencia se utilizarán reactivos y materiales accesibles tal como: Medio de Tioglicolato líquido (prueba de resistencia ausencia de oxígeno), medio de cultivo TSA y PCA (prueba de resistencia a metales pesados y concentraciones halófilas NaCl).

Por otro lado, se harán uso de técnicas de biología molecular, como la NGS Secuenciación de Nueva Generación o de alto rendimiento, 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.

1.5.3. Justificación práctica

Este Proyecto de Investigación forma parte del Grupo de Investigación 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.

Las pruebas de resistencia se realizarán en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en la avenida Pedro Vicente Maldonado (Panamericana Sur Km 1 ½), 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.

Para la amplificación, purificación, cuantificación y secuenciación de ADN, en las muestras serán procesadas en laboratorios externos ya que la Institución no cuenta con los reactivos, materiales, ni herramientas bioinformáticas necesarias.

Esta es una problemática digna de investigación ya que en la actualidad son pocos los registros que se tiene sobre las bacterias presentes en zonas alto andinas, motivo por el cual los resultados de la presente investigación científica serán de vital relevancia puesto que la identificación molecular de estas bacterias guiará futuras investigaciones centradas en el uso de estos microorganismos como productores de energía en celdas de combustibles microbianas.

1.6. Hipótesis

En los sedimentos de la Laguna volcánica Cuicocha, ubicada en la provincia de Imbabura, cantón Cotacachi, existen bacterias poliextremófilas.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

Los microorganismos extremófilos son en gran parte un grupo inexplorado que tienen la capacidad de prosperar en condiciones extremas. Según Arora, y Panosyan (2019, pp. 217-218), algunos de estos microbios representan formas de vida muy antiguas que debieron existir en la Tierra hace miles de millones de años, cuando las condiciones eran muy diferentes.

Se estima que solo se ha identificado alrededor del 1% de los microorganismos que se han aislado, y aún existen hábitats inexplorados donde estos organismos ubicuos pueden ocurrir (Arora, y Panosyan, 2019, pp. 217-218). Hace aproximadamente una década, los extremófilos eran organismos exóticos, explorados solo por unos pocos grupos de investigación en todo el mundo. Ahora, aunque todavía conservan algo de su estado excéntrico, a menudo se utilizan de forma rutinaria como fuentes de nuevas enzimas (Demirjian, Morís-Varas, y Cassidy, 2001, p. 144).

En los últimos años, los científicos e investigadores se han interesado en la vida microbiana presente en estos hábitats extremos, en especial por su diversidad y ecología microbiana, fisiología, sistemas genéticos, interacciones entre microbios y medio ambiente, adaptación y evolución, ciclo de elementos y aplicaciones biotecnológicas de microbios en ecosistemas cambiantes y extremos.

Debido a la gran importancia de la determinación de bacterias en ambientes extremos, en los últimos años en Ecuador se ha potenciado la investigación en diferentes sistemas lacustres, entre ellos se tiene: “Identificación molecular de bacterias resistentes al Arsénico (As) y al Cromo (Cr) de la Microcuenca del Río Gala del Cantón Camilo Ponce Enríquez” (Burbano, y López, 2022, p. 89), en su trabajo de titulación aislaron bacterias en medio PCA e identificaron especies bacterianas pertenecientes a géneros como *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Bacillus sp.*

En el estudio “Caracterización de Cepas Bacterianas de la Laguna Amarilla perteneciente al Nevado El Altar en la provincia de Chimborazo” se lograron aislar e identificar cepas bacterianas psicrófilas y psicrotróficas perteneciente a los géneros *Flavobacterium*, *Shewanella*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* o *Psycrobacter*. Además, se realizaron pruebas bioquímicas y se examinó la resistencia de estas cepas bacterianas a distintos antibióticos (Moreno, 2017, p. 63).

En la investigación de Lema se aislaron microorganismos de la Laguna de Ozogoché para evaluar la tolerancia de microorganismos a metales pesados: cobalto, mercurio y plomo, identificándose géneros de bacterias psicrotolerantes y resistentes a metales pesados *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus spp* y *Pseudomonas spp* (Lema, 2019, p. 48).

En el agua de la Laguna de Quilotoa en la Reserva Ecológica Los Ilinizas, Provincia de Cotopaxi, se demostró que la clase Gamma-Proteobacterias es más abundante que las clases Beta-Proteobacteria y el filo Firmicutes. Entre las bacterias aisladas se identificó a las especies *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas spp*, *Alcaligenes spp*, *Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter iwoffii*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus spp*, *Moraxella spp*, *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus xylosum* (Escobar, 2019, p. 102).

Según Alarcón (2019, p. 72) en su investigación se pudo identificar y cuantificar la microbiota heterótrofa presente en la Laguna Cuicocha. Entre los géneros hallados se tiene *Moraxella spp*, *Pasteurella multocida*, *Hafnia alvei*, *Weeksella virosa*, *Pasteurella haemolytica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Corinebacterium spp*. y *Bacillus sphaericus*.

En el trabajo de titulación “Caracterización de bacterias aisladas de la Laguna Negra en la Provincia de Chimborazo” se concluyó que el agua de la laguna está compuesta principalmente por una microbiota de bacterias psicrófilas, donde se aislaron bacterias de los siguientes géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcaceae* y *Psychrobacter* (Lema, 2019, p. 57).

En la Laguna de Cuicocha se recolectaron muestras de agua provenientes de ocho puntos de muestreos y se cuantificaron bacterias heterótrofas, coliformes, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y hongos viables mediante la técnica de filtración de membrana (González, et al., 2021, p. 85).

Dicho todo esto, todavía hay una gran variedad de microorganismos esperando ser explorados en lagunas cratéricas y de otros hábitats que aún no han sido inspeccionadas por investigadores. Por lo tanto, es imprescindible continuar con investigaciones y estudios de este tipo para descubrir más especies y metabolitos beneficiosos y aplicarlos de forma fiable para mejorar la calidad de vida.

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. *Bioprospección*

La bioprospección es la búsqueda ordenada de componentes naturales y organismos diversos con la finalidad de otorgarles un valor comercial, para el desarrollo de la bioprospección se generan productos que tienen relación con industrias como: la biotecnológica, farmacéutica, agroindustria y la de medicina botánica; entre otras. Para que los procesos de bioprospección se lleven a cabo existen una gama de interacciones que van desde el conocimiento tradicional de las comunidades indígenas, pasando por el conocimiento científico, tecnológico, académicos e investigativo de los países, hasta actividades comerciales de empresas multinacionales (Dionisi, Lozada, y Olivera, 2012, p. 91).

2.2.1.1. *Bioprospección en ambientes extremos*

Existe una amplia clasificación de organismos extremófilos entre los que pueden encontrarse acidófilos, alcalófilos, metalotolerantes, piezófilos, radioresistentes, termófilos y los poliextremófilos, que son aquellos que sobreviven en más de una condición extrema. En la actualidad la bioprospección en ambientes extremos ha llevado a cabo grandes descubrimientos que aportan nuevos compuestos a la industria y a la investigación de nuevos medicamentos (Velásquez, et al., 2018).

2.2.2. *Técnicas actuales de bioprospección*

2.2.2.1. *La tecnología de microarrays de ADN*

los microarreglos de ADN son una matriz de sondas de ADN unidas a una superficie sólida del tamaño de un portaobjetos con una disposición regular y predefinida (Aguado, 2007, pp. 85-87).

La técnica de microarreglos se fundamenta en la hibridación de ácidos nucleicos y en la posterior detección de la señal fluorescente resultante mediante el análisis de imágenes. En algunos otros métodos, la señal fluorescente también puede ser empleada y se obtendrá únicamente en los puntos (genes) presentes donde hubo hibridación; la intensidad de fluorescencia será directamente proporcional al nivel de expresión del gen (Salazar, Sandoval, y Armendáriz, 2013, pp. 67-71) (Ilustración: 2-1).

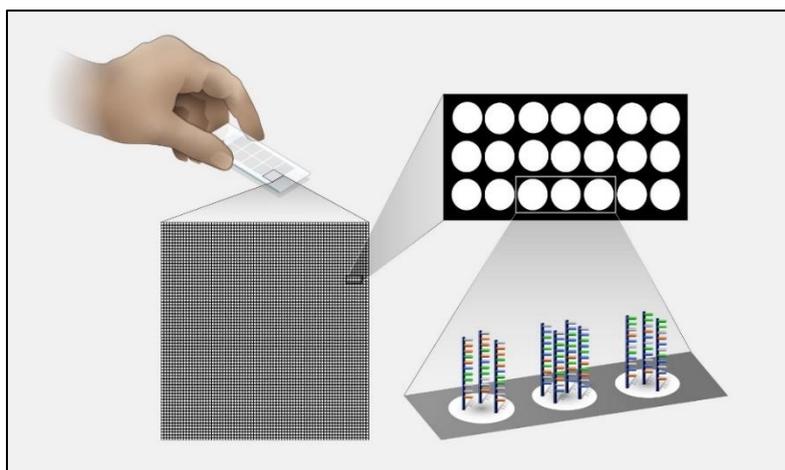


Ilustración 2-1: Tecnología de microarreglos (microarrays)

Fuente: (National Human Genome Research Institute, 2023b).

2.2.2.2. *Metagenómica mediante NGS*

La Next Generation Sequencing (NGS) o metagenómica de nueva generación es un conjunto de tecnologías creadas para secuenciar una gran cantidad de fragmentos de ADN en paralelo y de manera masiva, permitiendo ahorrar tiempo y costos.

Estas técnicas NGS, siguen una metodología similar que se puede resumir en cinco pasos:

- Segmentación del ADN en varios fragmentos.
- Marcaje y detección del ADN por medio de primero.
- Amplificación de los fragmentos de ADN por métodos basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Secuenciación de los fragmentos de ADN.
- Reparación de la secuencia completa a través de secuencias de referencia.

En la actualidad se usan dos métodos de secuenciación Illumina e Ion Torrent (Rubio, et al., 2019, p. 80).

✓ *Secuenciación Illumina*

Se caracteriza por la ejecución de los siguientes procesos:

Amplificación de los fragmentos de ADN para colonias del mismo fragmento (clúster). Se logra a través del método de amplificación en puente (Ilustración 2-2). Los fragmentos de ADN se

disponen en carriles sobre una superficie sólida de vidrio (Rubio, et al., 2019, p. 55).

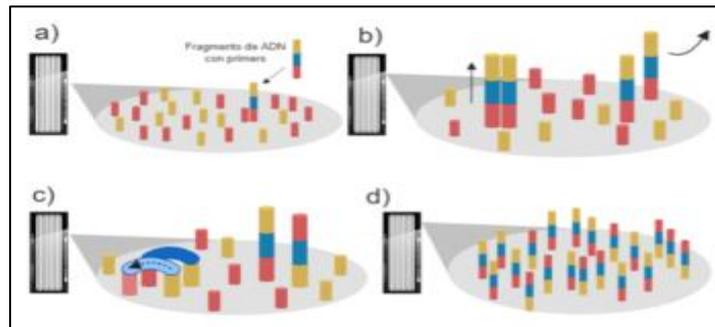


Ilustración 2-2: Método de amplificación en puente
Fuente: (Rubio, et al., 2019)

Detección de bases en la secuenciación. Se introducen nucleótidos modificados con un marcador fluorescente específico. La precisión de la secuencia Illumina depende de la intensidad de la señal y la duración de la lectura (expresada en el número de ciclos realizados). En la actualidad se puede alcanzar una longitud de lectura máxima de 300 pares de bases (Rubio, et al., 2019, p. 52).

✓ *Secuenciación Ion Torrent de Thermo Fisher*

A diferencia de Illumina presenta los siguientes aspectos:

Amplificación de fragmentos de ADN se lleva a cabo aplicando la técnica de PCR de emulsión. Los fragmentos de ADN se encuentran en una emulsión junto con microesferas que han sido recubiertas con adaptadores. A continuación, los fragmentos de ADN se hibridan con adaptadores de microesferas y se amplifican (Rubio, et al., 2019, p. 46).

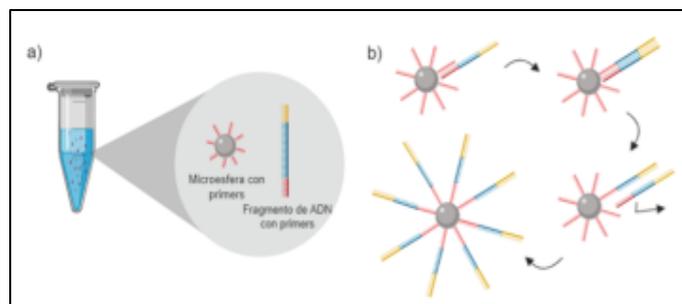


Ilustración 2-3: Técnica de PCR en emulsión
Fuente: (Rubio, et al., 2019).

Detección de las bases en la secuenciación a través de la detección de un ion semiconductor. Según Rubio, et al. (2019, pp. 88-91), la unión de un nucleótido a la cadena que se está secuenciando

da lugar a la formación de un enlace covalente que produce la liberación de iones de hidrógeno con carga positiva.

2.2.2.3. *Metagenómica basada en el gen 16S ARNr*

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nt, codificado por el gen *rrs*, también es conocido como ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, es aplicado en investigaciones de filogenia y taxonomía bacterianas (Rodicio, y Mendoza, 2004, p. 48).

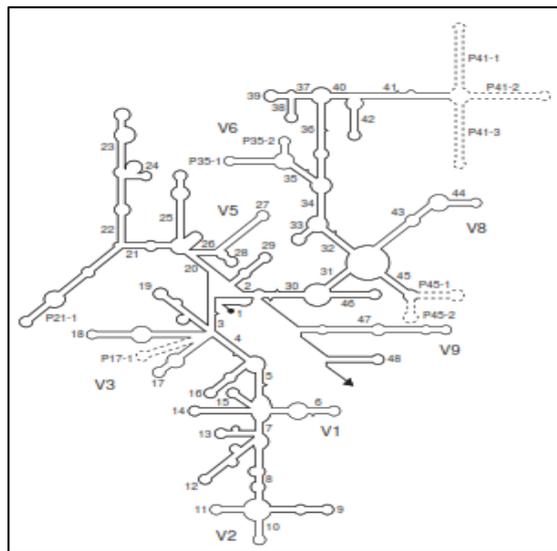


Ilustración 2-4: Estructura secundaria del ARNr 16S

Fuente: (Rodicio & Mendoza, 2004, p. 240).

2.2.2.4. *FISH*

La técnica de FISH incluye 4 pasos, fijación y permeabilización de la muestra, hibridación, lavado y la detección de las células marcadas a través del microscopio de EPI fluorescencia. En la aplicación de esta técnica, es esencial llevar a cabo la fijación y permeabilización de la muestra o tejido que contenga las bacterias. Esto se hace con el propósito de permitir la penetración de la sonda fluorescente dentro de la célula y para proteger el ARN de la degradación causada por ribonucleasas. La hibridación es el procedimiento mediante el cual se agrega la sonda de interés a la muestra desnaturalizada, lo que resulta en la unión de la sonda a la secuencia específica del ARNr preparado. Después de hibridación, se lava con agua destilada las para remover la sonda que no se unió. Finalmente, se visualiza la muestra (Rodríguez, y Suescún, 2013, p. 63).

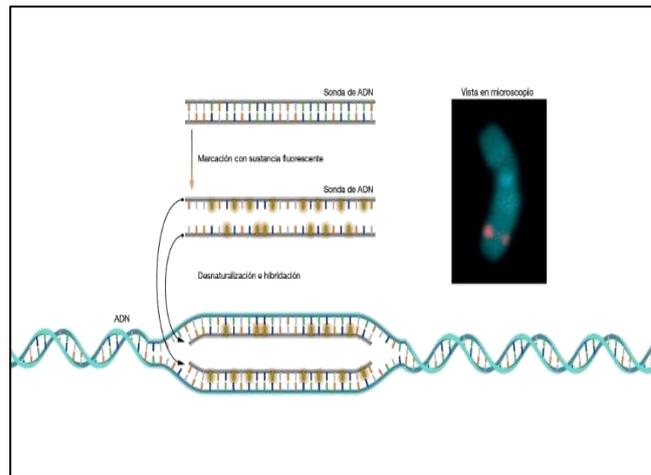


Ilustración 2-5: Hibridación Fluorescente In Situ (FISH)

Fuente: (National Human Genome Research Institute, 2023a).

2.2.3. *Aplicaciones de la bioprospección*

La bioprospección es un enfoque que implica investigar la biodiversidad con fines económicos, y ha surgido como una estrategia valiosa para los países biodiversos y en vías de desarrollo, ya que puede mejorar su capacidad interna para emprender actividades, incluyendo la colaboración con otras naciones más tecnológicamente avanzadas (Torres, y Velho, 2009, p. 58).

Las técnicas de mejoramiento de cultivos han hecho uso frecuente de la bioprospección en su exploración de información genética. Hasta hace poco tiempo, los insumos genéticos eran considerados un bien propio de la humanidad, y por tanto la exportación de su lugar de origen, casi sin excepción en los países en desarrollo. Así por ejemplo se han incorporado genes de resistencia a las heladas en variedades de papa; se ha introducido también un gen, proveniente de bacterias para la producción de un agente insecticida en el maíz; y se ha propuesto incorporar resistencia a la salinidad por medio de la importación de un gen de mangle a varias especies de plantas para el consumo (Madrigal, Morán, y Méndez, 2014, pp. 78-79).

2.2.4. *Técnicas de identificación molecular*

2.2.4.1. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

La tecnología PCR se fundamenta en el principio fundamental de la amplificación de un fragmento específico de ADN a través de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial (Harris, 1998, p. 80).

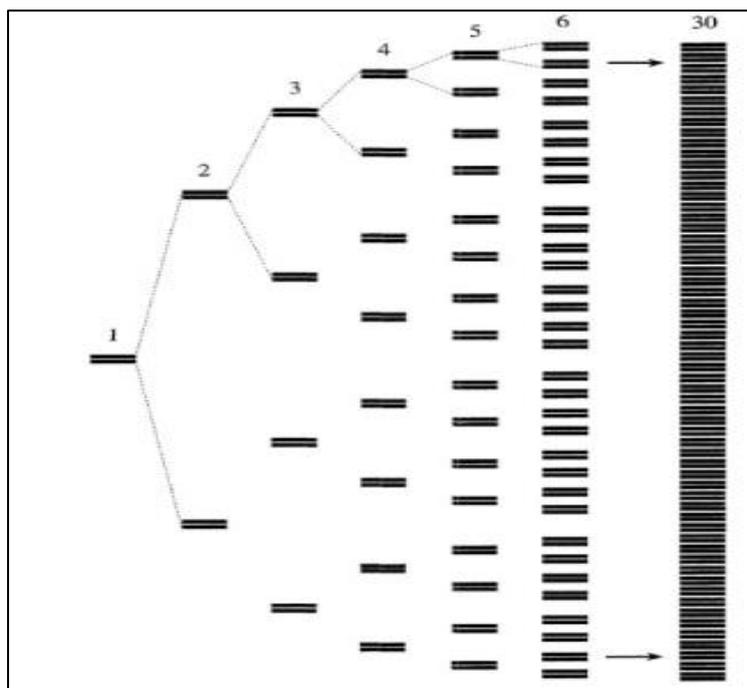


Ilustración 2-6: Acumulación de producto en la amplificación exponencial de ADN por PCR

Fuente: (Harris, 1998).

Esta técnica fue desarrollada en 1983 por el bioquímico estadounidense Kary B. Mullis. La efectividad de la PCR está determinada por criterios muy importantes, tales como:

- *Especificidad*, se logra mediante la producción de un solo producto de amplificación.
- *Eficiencia*, con la máxima producción de amplificación en función del número de ciclos.
- *Fidelidad*, número mínimo de errores introducidos por la ADN polimerasa durante la síntesis de la nueva cadena.
- *Sensibilidad*, le permite obtener una gran cantidad de copias de la cantidad mínima de ADN contenida en la muestra (Pinilla Bermudez, 2019, p. 33).

2.2.4.2. Componentes de la PCR

✓ *TAQ Polimerasa*

Proviene de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*, la cual habita en temperaturas muy altas, por ello su funcionamiento óptimo a 72°C y su vida media a 96°C es de 40 minutos. Esta Taq Polimerasa posee actividades de polimerasa y exonucleasa 5' -> 3', pero no realiza actividad exonucleasa 3' -> 5'.

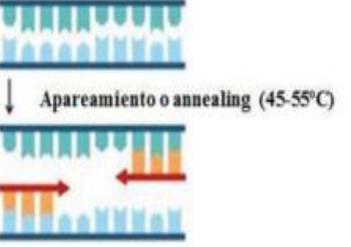
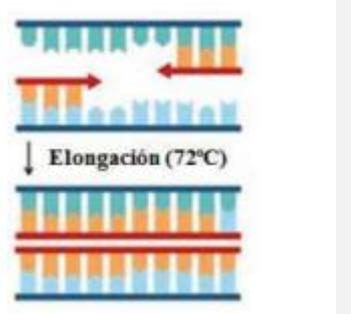
✓ *Oligonucleótidos o iniciadores*

También llamados cebadores o primers. Son secuencias cortas de ADN o ARN que se unen a fragmentos complementarios de ADN y sirven como punto de referencia para iniciar la síntesis de nuevas hebras de ADN (Pinilla Bermudez, 2019, p. 81).

El tamaño de estos oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia.

A continuación, se resumen las tres fases de la técnica de amplificación:

Tabla 2-1: Fases de la tecnología PCR

Fases	Descripción	Figura
<p>Fase de desnaturalización</p>	<p>Se da la separación de las dos hebras de ADN al romperse los puentes de hidrógeno que las mantienen unidas. Como resultado, se obtienen dos cadenas de ADN individuales que servirán como moldes para la unión de los primers y la síntesis de una nueva cadena de ADN complementaria.</p>	
<p>Fase de apareamiento o annealing</p>	<p>Ocurre la unión de los primers a la secuencia específica que fue separada en la etapa anterior. La temperatura en esta fase es considerablemente menor y varía según los primers empleados, estando en el rango de 45 a 55 °C.</p>	
<p>Fase de extensión o elongación</p>	<p>Una vez que los primers se han unido a sus respectivas cadenas complementarias de ADN, la ADN polimerasa lleva a cabo su función añadiendo nuevos nucleótidos complementarios a la hebra molde. El resultado es una molécula de ADN de doble cadena. Durante esta etapa, la temperatura se mantiene alrededor de los 72 °C.</p>	

Fuente: (Diz, 2020).

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).

2.2.5. *Ambientes extremos*

El ambiente extremo es un tipo de ambiente natural con una condición física y/o química especial como alta o baja temperatura, alta o baja acidez, alta presión, fuerte radiación y ambientes anóxicos extremos. Todos los microbios que se adaptan a ambientes extremos se denominan extremófilos (Wang, Wang, and Li, 2007, p.444). La naturaleza, sin embargo, contiene muchos ambientes extremos, como aguas termales, lagos salinos, desiertos, lagos alcalinos o ácidos y las profundidades del mar. Todos estos ambientes parecerían ser demasiado duros para que la vida sobreviviera. Sin embargo, en los últimos tiempos se han encontrado muchos organismos en ambientes muy extremos. Además, algunos de ellos no pueden sobrevivir en un entorno llamado "moderado" (Seckbach, Oren, y Stan-lotter, 2013, p. 99).

2.2.6. *Lagos cratéricos*

Los lagos volcánicos o también conocidos como cratéricos, son aquellos que se forman en el cráter de un volcán o están alojados en las calderas de volcanes, son considerados sistemas de alto riesgo al ser altamente influenciados por actividad volcánica o postvolcánica como emisiones de gases y manantiales de agua hidrotermal (Gunkel et al., 2008, p.29).

Los lagos cratéricos se forman por la influencia de condiciones climáticas, geoquímicas, procesos hidrogeológicos y de gasificación y una vez formado el cráter este se llena de agua (Gunkel et al., 2008, p.30).

De acuerdo con Umaña (2009, p. 138) la química del agua en los lagos volcánicos está determinada por la actividad volcánica, y emisión de gases tales como CO, CO₂, HF, HCl, SO₂ y compuestos de boro (B), así como agua hidrotermal.

2.2.6.1. *Microbiología de los lagos cratéricos*

Las lagunas cratéricas al contrario de las creencias no son estériles son ecosistemas muy ricos en vida, a pesar de que muchos de ellos presentan características ambientales, fisicoquímicas y químicas extremas. En los últimos años se han desarrollado investigaciones en muchas regiones del mundo para determinar las condiciones fisicoquímicas y químicas de estos ambientes y determinar cómo las mismas han influido en la biodiversidad microbiana que se ha adaptado a estas condiciones adversas y que hoy pueden ser fuente de biomoléculas con diversas aplicaciones biotecnológicas, industriales y medicinales (Morita, 1990, p. 59).

Se conoce muy poco acerca de los atributos de los microorganismos que habitan en ecosistemas extremos acuáticos ecuatorianos. La poca investigación ha generado que los procesos metabólicos de los microorganismos no se conozcan, así como su posible utilidad en el campo de la biotecnología, farmacéutica, ecología, y salud. Recientemente se han iniciado estudios fisicoquímicos y microbiológicos para poder conocer la microbiota del agua de las principales lagunas volcánicas cratéricas que existen en Ecuador, principalmente los lagos Cuicocha y Quilotoa, a fin de conocer, por un lado, la biodiversidad microbiana, y por el otro, determinar las características biológicas, biotecnológicas, ecológicas, farmacológicas y sanitarias de esta población (González, et al., 2021).

La microbiota de las lagunas volcánicas está constituida por dos tipos de microorganismos, muy diferentes en propiedades y origen, que coexisten: los llamados autóctonos que son los propios del hábitat y que constituyen la microbiota natural y los alóctonos procedentes de otro hábitat (aire, animales, peces, suelo y vegetales) y que se consideran contaminantes ocasionales (Naselli, et al., 2021, p. 77).

Dentro de los microorganismos que se han detectado en los ambientes acuáticos extremos, se encuentran diferentes especies del género *Bacillus* su heterogeneidad en la fisiología ecológica ha dificultado su clasificación taxonómica.

Bacillus es un género de interés para su estudio, dado que aporta un amplio perfil de diversidad fisiológica (acidofilia, alcalofilia, psicofilia, piezófilos y termofilia), además posee características por la variedad de enzimas que tienen, lo cual le permite desarrollarse en diferentes hábitats acuáticos como terrestres, además de permitirle la producción de diferentes tipos de metabolitos que les confieren una alta adaptabilidad a distintas condiciones ambientales. Se considera que algunas especies de *Bacillus* son patógenas para seres humanos y animales, pudiendo causar una variedad de enfermedades agudas y crónicas, otras pueden tener una tasa de mortalidad elevada, como es el caso del *Bacillus anthracis*, causante del ántrax (Farías, 2020, p. 32).

2.2.6.2. *Lagos cratéricos del Ecuador*

Los lagos volcánicos cratéricos poseen diversas condiciones extremas, como: altas concentraciones de sales, alta exposición a los rayos UV, bajas temperaturas, etc. En Ecuador existen distintos lagos o lagunas cratéricas, tales como Cuicocha, Amarilla, Mojanda y Quilotoa (González et al., 2021, p.26).

2.2.6.3. Laguna Cuicocha

La Laguna de Cuicocha se encuentra ubicada a 120 km, al norte de Quito; a 12 Km al sur oeste de Cotacachi y a 14 Km de la ciudad de Otavalo, en la provincia de Imbabura, cantón Cotacachi, forma parte de la Reserva Ecológica Cotacachi Cayapas. Esta laguna es conocida como Laguna de Cuicocha, en el lenguaje kichwa significa “laguna de los cuyes”, este nombre se debe ya que años atrás en este lugar existían una gran cantidad de cuyes, mientras que para otras personas es conocida como “Laguna de los Dioses” o “TsuiCocha” por ser escenario de ritos de purificación shamánicos (Escobar, 2019, p. 102).

En el interior se pueden visualizar dos islotes llamados Teodoro Wolf y José María Yerovi, la cima más alta es Teodoro Wolf a una altura de 300 metros sobre la superficie del cráter. La Laguna de Cuicocha es una caldera volcánica aún activa principalmente constituida por agua proveniente de las precipitaciones, el único afluente es la quebrada Chumabi que no aporta agua constantemente. La manera más idónea de llamar a Cuicocha desde el punto de vista volcánico es que se trata de una laguna cratérica activa (Instituto Geofísico - EPN, 2022, p. 12).

Las aguas de la laguna son tranquilas durante la noche y en las mañanas, en las horas de la tarde se observan fuerte oleaje, especialmente durante la época seca, esta comprende los meses entre junio y septiembre mientras que la época lluviosa está constituida entre los meses de octubre y mayo. Las temperaturas del aire varían entre 8,3 °C (nocturna) y 22,7 °C (diurna). La precipitación media anual puede llegar a los 1000 mm y es algo mayor que la evaporación, la cual llega a 858 mm (Bustos, y Serrano, 2014, p. 22).



Ilustración 2-7: Localización de la Laguna de Cuicocha

Fuente: Google Earth Pro, 2021.

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).

2.2.7. *Microorganismos extremófilos*

Los microorganismos extremófilos son aquellos que tienen un hábitat natural que alguna vez se pensó que era inhóspita para la supervivencia de los organismos vivos. Estos organismos han evolucionado para existir en una variedad de ambientes extremos y pertenecen a varias clases diferentes que incluyen termófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 45 °C); acidófilos (pH óptimo de crecimiento por abajo de 5); alcalófilos (pH óptimo de crecimiento por arriba de 8); psicrofilos (temperatura óptima de crecimiento por abajo de 10 °C) y piezófilos antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm); metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5 % a 30 % de sal) y otros (Gupta, et al., 2014, pp. 371-374; Demirjian, Morís-Varas, y Cassidy, 2001, pp. 144-146).

Según mencionan varios autores Demirjian, Morís-Varas, and Cassidy (2001, p.144), estos microorganismos están adaptados para propagarse en nichos ecológicos como respiraderos hidrotermales de aguas profundas, aguas termales, sistemas de respiraderos hidrotermales submarinos o sistemas de respiraderos hidrotermales de aguas profundas, regiones y océanos polares fríos y glaciares alpinos, lagos y ambientes salinos con pH extremo, ya sean ácidos (minas) o alcalinos (fuentes de carbono, suelos y lagos alcalinos); y con frecuencia, 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 y campos sulfatáricos. Como resultado, estos microorganismos producen biocatalizadores únicos que funcionan en condiciones en las que sus contrapartes mesófilas no podrían sobrevivir, lo que permite el desarrollo de biocatalizadores adicionales.

Según Oliart, Manresa, y Sánchez (2016, p. 29) los extremófilos se clasifican según las condiciones físicas o químicas extremas del entorno en el que se encuentran.

Tabla 2-2: Clasificación de microorganismos extremófilos

Tipo	Características	Microorganismo
Termófilos	Termófilos moderados (45–65°C) Termófilos (65–85°C) Hipertermófilos (<85°C)	<i>Thermus aquaticus</i>
Psicrofilos	Baja temperatura	<i>Polaromonas vacuolata</i>
Halófilos	➤ Halotolerantes, pueden	<i>Halobacterium sp.</i>

	<p>sobrevivir hasta un 5 % (p/v) de NaCl.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Halófilos ligeros, pero aún no pueden crecer por encima del 5 % de NaCl. ➤ Halófilas moderadas hasta un 20 % de sal halófilas extremas, requerir soluciones casi saturadas de 20–30 % NaCl a crecer. 	<i>Haloarcula sp.</i>
Alcalófilos	Exhiben un crecimiento óptimo por debajo de pH = 3	<i>Bacillus sp.</i>
Acidófilos	Crecen de manera óptima a pH superior a 9	<i>Bacillus acidocaldarius</i> <i>Desulfurolobus sp.</i>
Piezófilos	Antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm.	
Radioresistentes	Resisten altos niveles de radiación	
Xerófilos	Adaptado a vivir en un ambiente seco o con poca agua	
Aerobios, Anaerobios y Microaerófilos	<p>Crecen en presencia de oxígeno</p> <p>Crecimiento óptimo en ausencia de oxígeno</p> <p>Crece en <21% O₂</p>	<i>Treponema pallidum</i>

Fuente: (Gupta, et al., 2014) (Seckbach, Oren, y Stan-lotter, 2013).

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).

2.2.8. Resistencia de los microorganismos a condiciones ambientales extremas

2.2.8.1. Factores Físicos

✓ Temperatura

La temperatura afecta a los organismos de muchas formas, desde la destrucción de biomoléculas hasta la desnaturalización por los cristales de hielo (Oarga, 2009, p. 82).

Microorganismos termofílicos (crecimiento óptimo 50 °C o más) cuya importancia radica en que son fuentes de enzimas termoestables. De igual manera estos pueden ser clasificados en:

termófilos moderados (crecimiento óptimo; 50–60 °C), termófilos extremos (crecimiento óptimo; 60–80 °C) e hipertermófilos (crecimiento óptimo; 80-110 °C).

Este tipo de microorganismos termófilos se han aislado de las diferentes zonas ecológicas (por ejemplo, aguas termales, aguas profundas) de la tierra. Los organismos con mayor crecimiento. temperaturas (103-110 °C).

La mayoría de los organismos hipertermófilos pertenecen al Dominio Arquea, estos realizan procesos metabólicos comunes como: metanogénesis; respiración anaeróbica vía reducción de sulfato, reducción de azufre, reducción de nitrato, reducción de hierro, etc.; respiración aeróbica; o incluso fermentación (Seckbach, Oren, y Stan-lotter, 2013, p. 55).

En estudios anteriores, *P. fumarii* era considerado como el organismo más termófilo con T_{máx} de 113 °C, una T_{opt} de 106 °C, siendo incapaz de crecer por debajo de 90 °C. Sin embargo, en estudios más recientes lo tiene la cepa *Methanopyrus kandleri* aislada de las profundidades oceánicas cerca de Japón que tiene un T_{máx} de 122 °C (Takai, et al., 2008. p. 37).

Entre los géneros representativos se tiene *Archaeoglobus*, *Thermodiscus*, *Thermoproteus*, *Acidianus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Desulfurococcus* y *Sulfolobus*, que pueden oxidar H₂S o azufre elemental; los metanógenos *Methanothermus*, *Methanococcus* y *Methanopyrus*; y los reductores de nitrato *Pyrobaculum* y *Pyrolobus*. Entre las bacterias hipertermófilas también se incluyen en los géneros *Thermotoga* y *Aquifex*. (Seckbach, Oren, y Stan-lotter, 2013, p. 13).

Por otro lado, los microorganismos psicrófilos (temperatura de crecimiento de 15° C o menos) según Hoover, y Pikuta, (2009, p. 32) la temperatura más baja para el crecimiento de microorganismos que se ha reportado es -2 °C en los ecosistemas polares marinos para las bacterias reductoras de sulfato.

El nivel de subsistencia de la vida a baja temperatura está determinado por el punto de congelación del agua dentro de una célula. La cristalización del agua intracelular es letal para todos los organismos, excepto para el nemátodo *Panagro laimus davidi* (Morozkina, et al., 2010, p. 64).

Tabla 2-3: Microorganismos psicrófilos

Tipo de microorganismo	Ejemplos
Bacteria	Gram-negativas: <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Polaromonas</i> , <i>Psychroflexus</i> , <i>Polaribacter</i> , <i>Moritella</i> , <i>Vibrio</i> y <i>Pseudomona</i>
	Gram-positivas: <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Micrococcus</i> .
Arqueas	<i>Methanogenium</i> , <i>Methanococcoides</i> y <i>Halorubrum</i>
Hongos y levaduras	<i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i>
Eucariotas	<i>Reomita globosa</i> , <i>Heteromita</i>

Fuente: (Ramírez, Serrano, y Sandoval, 2006).

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).

✓ pH

El valor de pH afecta el crecimiento de bacterias, la mayoría de las bacterias tienen un crecimiento óptimo en el rango de pH de 6,5 a 7,5. Sin embargo, a condiciones extremas, condiciones muy altas (ácidas) o muy bajas (alcalinas) existen microorganismos capaces de adaptarse y sobrevivir a este medio. Se denominan acidófilos (óptimo de crecimiento a $\text{pH} < 2$), neutrófilos (óptimo de crecimiento a $\text{pH} 6-8$) y alcalófilos ($\text{pH} > 9$) (Oarga, 2009, p. 23).

Varias especies eucarióticas y procarióticas son organismos acidófilos. El hongo *Acontium cylvatium*, *Cephalosporium sp.*, *Trichosporon cerebriae* puede vivir en condiciones extremadamente ácidas ($\text{pH} = 0$).

Los alcalófilos y acidófilos utilizan varias estrategias para la adaptación de pH. Entre los mecanismos activos se tiene la captación secundaria de protones por parte de los antiportadores asociados a la membrana (Gupta, et al., 2014, p. 47).

Este tipo de microorganismos se adaptan para sobrevivir a este tipo de ambiente pH bajo o alto; los alcalófilos aíslan al interior de la célula del medio alcalino exterior ya que algunas moléculas, especialmente las hechas de ARN, se rompen a pH superior a 8, mientras que los acidófilos presentan una superficie de membrana cargada positivamente, una alta capacidad reguladora interna, y sistemas únicos del transporte. En este sentido, las células de los alcalófilos extremos se protegen con extremoenzimas que se localizan cerca de la pared celular o por medio de

secreciones externas (Ramírez, Sandoval, y Serrano, 2004, p. 15).

En la Tabla 4-2 se muestran las escalas de pH y algunos microorganismos anaerobios asociados a estos.

Tabla 2-4: Microorganismos anaerobios encontrados en diferentes rangos de pH.

pH	Tipo de microorganismo	Microorganismos encontrados
1.1 - 5.5	Acidófilos	<i>Lactobacillus spp</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
5.5 - 8.0	Neutrófilos	<i>Clostridium perfringes</i> <i>Methanococcus sp</i> <i>Methanobacterium sp</i> <i>Propionibacterium acidipropionici</i>
8.5 - 11.5	Alcalófilos	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium sporongenes</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Fusobacterium spp</i> <i>Micrococcus spp</i>

Fuente: (Corrales, et al., 2015)

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).

✓ Presión osmótica

Los microorganismos halófilos y halotolerantes se representan con diferentes especies de bacterias, arqueobacterias, cianobacterias y algas verdes *Dunaliella salina*.

Se puede afirmar que los géneros *Halomonas*, *Delega*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* y *Chromobacterium* engloban a la mayoría de las bacterias halófilas, tanto Gram positivas como Gram negativas, y que pueden ser aerobias o anaerobias facultativas (Ramírez, Serrano, y Sandoval, 2006, p. 28).

Según Ramírez, Serrano, y Sandoval (2006, p. 85), existen seis géneros principales en los cuales se pueden clasificar las arqueas halófilas. Cuatro de estos géneros, a saber: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* y *Halococcus*, contienen miembros que tienen la capacidad de crecer a un pH neutro. Por otro lado, los géneros *Natronobacterium* y *Natronococcus* están compuestos por arqueas que requieren condiciones alcalinas para su desarrollo.

Los microorganismos que toleran altas concentraciones de sal deben mantener una alta presión osmótica intracelular ya que estas generan pérdidas de agua en el proceso. Por ello, estos microorganismos enfrentan el estrés osmótico mediante un mecanismo principal que implica la acumulación de compuestos en grandes cantidades en el citoplasma para equilibrar la presión osmótica del medio externo., es decir el denominado “*salt-in*” o “sal en el citoplasma” que significa acumulación de iones inorgánicos (K⁺ y Cl⁻) dentro de una célula a la concentración, que es comparable a la externa. Cuando se produce un aumento en la concentración de KCl en el citoplasma, se produce una adaptación de todas las proteínas y componentes celulares a las elevadas concentraciones salinas (Ramírez, Serrano, y Sandoval, 2006, p. 96).

Otro de los mecanismos es “*salt out*” es decir se produce a través de la eliminación de sal del citoplasma (Morozkina, et al., 2010, p. 87). Este sistema es más flexible ya que permite la adaptación a las variaciones en la presión osmótica del medio, es característico de bacterias tanto halófilas como no halófilas, además arqueas metanógenas halófilas moderadas. Estos microorganismos, acumulan en su citoplasma solutos compatibles (aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína) estos tienen la función de mantener el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular (Ramírez, Serrano, y Sandoval, 2006, p. 61).

2.2.8.2. Factores Químicos

✓ Metales pesados (microorganismos metalófilos)

Los metales pesados son elementos metálicos con pesos atómicos altos; son elementos tóxicos que pueden ser nocivos a los seres vivos en pequeñas concentraciones. Los organismos llevan a cabo la acumulación de metales en sus tejidos a través del proceso de bioacumulación. Entre los metales pesados se tiene: mercurio (Hg), cromo (Cr), cadmio (Cd), arsénico (As) y plomo (Pb) (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, 2022, p. 98).

En investigaciones realizadas sobre resistencia a metales pesados (Pb, Cr, Cd) en bacterias se identificaron géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*. El comportamiento de resistencia frente al cadmio corresponde al siguiente orden teniendo como máximo al género *Micrococcus*, en orden descendente se ubican los restantes géneros: *Pseudomonas* > *Staphylococcus* > *Acinetobacter* > *Bacillus* > *Neisseria* (Martínez, et al., 2010, p. 55).

Otros estudios Acevedo Barrios, y Severiche Sierra (2013, p. 61) aislaron e identificaron bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*,

Salmonella sp, *Acinetobacter sp*) y bacterias Gram positivas: *Staphylococcus sp*.

✓ *Resistencia a Cromo VI*

Es un metal de transición de color blanco plateado muy resistente a la corrosión, que se encuentra en diferentes estados de oxidación, Cr (II) (+2), Cr (III) (+3) y Cr (VI) (+6). Los compuestos que contienen Cr (VI) se producen principalmente en procesos industriales, entre ellos: la fabricación de pigmentos inorgánicos como los cromatos de plomo, estampación de telas, preparación de catalizadores. La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha determinado que el Cr VI (+6) es cancerígeno en seres humanos. Además, provoca la alteración de cromátidas hermanas, anomalías cromosómicas y alteraciones en el ADN (Macri, Sica, y Morón, 2019, p. 14).

Se sabe que ciertos metales pesados pueden actuar como receptores y donadores de electrones, y las bacterias pueden transformarlos biológicamente. En el caso específico del cromo, este proceso implica un cambio químico en el metal conocido como biorreducción. Los microorganismos que viven en áreas contaminadas con cromo generalmente presentan tolerancia a los iones porque tienen mecanismos para eliminar o desintoxicar el ion, puesto que el contaminante no siempre es metabolizado. Los géneros de *Pseudomonas* y *Enterobacter* son algunos de los microorganismos que participan en la reducción del Cr (VI).

Se han reportado investigaciones donde diversos géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia* y *Cyanobacterium*, etc, tienen la capacidad de reducir el cromo hexavalente a cromo trivalente (Carrillo, et al., 2020, p. 41). En este contexto de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas putida* se ha identificado a la enzima ChrR.

Además, se han descrito microorganismos con potencial biorremediador, como la bacteria Gramnegativa *Serratia marcescens* aislada de aguas residuales terciarias (aguas que contienen residuos sólidos, líquidos o gaseosos), capaces de reducir el Cr (VI) y eliminar cerca del 80% del cromato en el medio de cultivo (Ramírez, et al., 2009, p. 82).

✓ *Resistencia a Cadmio*

El cadmio, un metal de color blanco con un ligero tinte azulado, es altamente resistente a la corrosión y se emplea en la electrodeposición de otros metales, especialmente el acero y el hierro. El cadmio puede ser dañino para el medio ambiente y además está asociado con una alta mortalidad de cáncer (Nordberg, 2012, p. 63). La Organización Mundial de la Salud establece que la aparición de los signos, síntomas y gravedad dependen de la cantidad del metal, y el tiempo de la

exposición y la vía de entrada (Londoño, Londoño, y Muñoz, 2016, p. 87).

Según Martínez, et al. (2010, p. 84) en suelos contaminados se aislaron microorganismos aerobios heterotróficos, pertenecientes a los géneros *Arthrobacter* y *Bacillus*, estos mostraron resistencia a dos o más metales (multirresistencia). De manera que se evaluó esta multirresistencia considerando metales como Ni, Pb, Zn, Cu y Co, en cepas procedentes de ecosistemas naturales. En la especie *Staphylococcus aureus*, la capacidad de resistir a metales como el cadmio, plomo y zinc, se debe al operón cadCA que se encuentra en el plásmido pI258.

Existen distintos géneros de bacterias como *Novosphingohium sp.*, *Ensifer sp.*, *Burkholderia sp.*, *P. aeruginosa*, que tienen excelente capacidad para metabolizar metales pesados, sin embargo, estas bacterias están asociadas al desarrollo de enfermedades en seres humanos y especies vegetales (Canchignia, et al., 2021, p. 52).

Existen investigaciones en donde se muestra la capacidad de biosorción de cadmio de algunas bacterias. Esta capacidad depende de la especie o cepa bacteriana, y se ha observado una mayor capacidad de biosorción en *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas* (Canchignia, et al., 2021, p. 53).

2.2.9. Mecanismo de resistencia bacteriana a metales pesados

Las bacterias resistentes a metales pesados se deben a la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustratos diferentes. Las bacterias han desarrollado diversos sistemas para sobrevivir a los efectos perjudiciales de los metales tóxicos, entre ellos se tiene:

- Componentes celulares que remueven iones y neutralizan su toxicidad,
- Enzimas que alteran el estado oxidativo-reductor de metales
- Membranas que expulsan especies dañinas del citoplasma (Marrero, Díaz, y Coto, 2010, p. 56).

Tabla 2-5: Factores genéticos que influyen en la resistencia a metales en bacterias.

Determinante genético	Metal al que confiere resistencia	Localización	Cepa bacteriana	Mecanismo involucrado
cad	Cd (II),	pI258.	<i>S. aureus.</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (CadA).
	Cd (II),	Cromosoma.	<i>C. metallidurans.</i>	
chr	Cr (VI).	pMOL28.	<i>C. metallidurans</i> <i>CH34.</i>	Eflujo mediante proteína de membrana (ChrA).
czc	Cd (II)	pMOL30	<i>C. metallidurans</i> <i>CH34</i>	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CzcABC). Expulsión mediante transportador tipo CDF (CzcD). Expulsión mediante ATPasa tipo P (CzcP).
ncc	Cd (II).	pTOM9.	<i>A. xylosoxydans</i> <i>31A</i>	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(NccABC).
	Cd (II),	pGOE2.	<i>C. metallidurans</i> <i>KTO2</i>	
znt	Cd (II)	Cromosoma	<i>C. metalidurans</i> <i>CH34.</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA).
	Cd (II)	Cromosoma	<i>E. coli.</i>	Expulsión mediante transportador tipo CDF (ZitB). Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA).

Fuente: (Marrero, Díaz, y Coto, 2010, pp. 67-68).

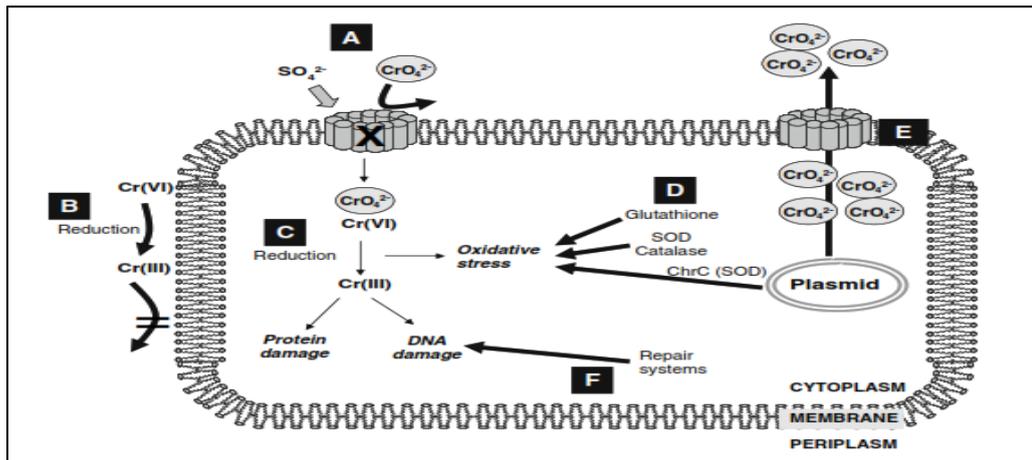


Ilustración 2-8: Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia de los cromatos en Células bacterianas.

Fuente: (Ramírez, et al., 2008).

En la Ilustración 8-2 se puede observar los diferentes mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia que poseen los cromatos en bacterias, en donde cada letra representa los mecanismos de daño y resistencia y se indican mediante flechas finas y gruesas, respectivamente.

- a. Vía de captación de sulfato codificada por cromosomas que también es utilizada por el cromato para ingresar a la célula; cuando está mutado (X) disminuye el transporte de cromato.
- b. Reducción extracelular de Cr (VI) a Cr (III) que no atraviesa la membrana.
- c. La reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III) puede generar estrés oxidativo, así como daño a las proteínas y al ADN.
- d. Las enzimas desintoxicantes están involucradas en la protección contra el estrés oxidativo, minimizando los efectos tóxicos del cromato.
- e. Los transportadores codificados por plásmidos pueden expulsar cromato del citoplasma.
- f. Los sistemas de reparación del ADN participan en la protección del daño generado por los derivados del Cr (Ramírez, et al., 2008, p. 16).

2.3. Requerimiento de oxígeno

2.3.1. Ausencia de oxígeno (microorganismos anaeróbicos)

Las bacterias anaerobias tienen un metabolismo que les permite obtener energía a partir de sustancias que no requieren oxígeno. Su proceso fermentativo implica una secuencia de pasos que interactúan en una serie de reacciones metabólicas complejas en ausencia de oxígeno, lo que es

fundamental en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre. Dentro de las bacterias anaerobias, que participan en las fases de hidrólisis y acidogénesis, se encuentran *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* que interactúan con algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, estas pueden usar al sulfato como aceptor de electrones en un tipo de respiración anaeróbica (Corrales, et al., 2015, pp. 55-81).

Entre ellos se encuentran el azufre elemental, el fumarato, el nitrato, el dimetilsulfóxido, el hierro (III) y el manganeso (IV). Se les considera como anaeróbicos estrictos y se les encuentra principalmente en hábitats anóxicos ricos en sulfato.

2.3.2. Tipos de poliextremófilos

Son aquellos extremófilos que pueden soportar múltiples factores en condiciones adversas. Son organismos unicelulares o pluricelulares que se encuentran en todo el mundo en una variedad de ambientes extremos donde la vida normal no es posible. En otras palabras, se puede ver en lugares donde nadie más puede sobrevivir. Los poliextremófilos son divididos en diferentes categorías - según en los hábitats donde se encuentran, algunos de ellos (Sharma, Mathur, y Singh, 2016, pp. 807-811).

Tabla 2-6: Clasificación de poliextremófilos

Nombres	Condiciones extremas	Microorganismo
Psicoacidófilos Psicoalcalófilos Termoacidófilos Termoalcalófilos	Condiciones extremas de temperatura y pH	<i>Sulfurisphaera ohwakuensis</i> <i>Thermococcus alcaliphilus</i>
Psicróhalófilos	Bajas temperaturas y altas concentraciones de sal.	<i>Psychromonas ingrahamii</i> (Temperaturas bajas -12 °C y salinidad alta 20 % NaCl)
Termopiezófilico Psicropiezófilos	Temperatura y presión	<i>Methanopyrus kandleri</i> <i>Colwellia hadaliensis</i>
Hipertermófilos	Temperatura y radiación	<i>Thermococcus gammatolerans</i> <i>Pyrococcus abyssi</i>
Haloacidófilos y haloalcalófilos	pH y salinidad	<i>Bacillus selenitireducens</i> <i>Natranaerobius thermophilus</i>
Piezoacidófilos Piezoalcalófilos	pH y presión	
	pH y radiación	<i>D. radiodurans</i>
	Salinidad y presión	<i>Halorhabdus utahensis</i>
	Desecación y radiación	<i>Macrobiotus areolatus</i>

Fuente: (Seckbach, Oren, y Stan-lotter, 2013).

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).

2.3.3. *Aplicación biotecnológica de microorganismos extremófilos*

Los microorganismos extremófilos tienen la capacidad para sintetizar enzimas, las cuales son sustancias biológicamente activas que demuestran mayor actividad y estabilidad, y también la capacidad de destrucción y/o eliminación de xenobióticos, incluyendo acumulación de iones de metales pesados, radionúclidos, etc., de modo que pueden ser utilizadas para su desarrollo biotecnológico y aplicación comercial en diferentes industrias (Morozkina, et al., 2010, pp.1-14).

El descubrimiento de nuevos extremófilos y sus enzimas ha tenido un gran impacto en el campo de la biocatálisis, en particular por los procesos metabólicos y funciones biológicas específicas de estos microorganismos los cuales están mediados por enzimas y proteínas que son responsables de las propiedades inusuales de los organismos (Gupta, et al., 2014, p.372).

Para Demirjian, Morís-Varas, y Cassidy (2001, p.144) las enzimas psicrófilas producidas por microorganismos adaptados al frío muestran una alta eficiencia catalítica, lo que ofrece un gran potencial para las industrias biotecnológicas, como las industrias de detergentes y alimentos, así como para la producción de químicos.

Los termófilos poseen proteínas termoestables y membranas celulares que no se desnaturalizan a temperaturas elevadas y resisten la proteólisis, mientras que los psicrófilos y barófilos tienen membranas estables, pared celular (a bajas temperaturas y/o alta presión) y proteínas únicas; Los halófilos tienen una mayor concentración de iones inorgánicos y solutos compatibles; acidófilos/alcalófilos mantienen su pH neutral bombeando el exceso de iones mediante mecanismos específicos. Estos microbios también mantienen la fluidez y estabilidad de su membrana en condiciones extremas y protegen su sistema genético en dicho entorno (Arora, y Panosyan, 2019, p. 218).

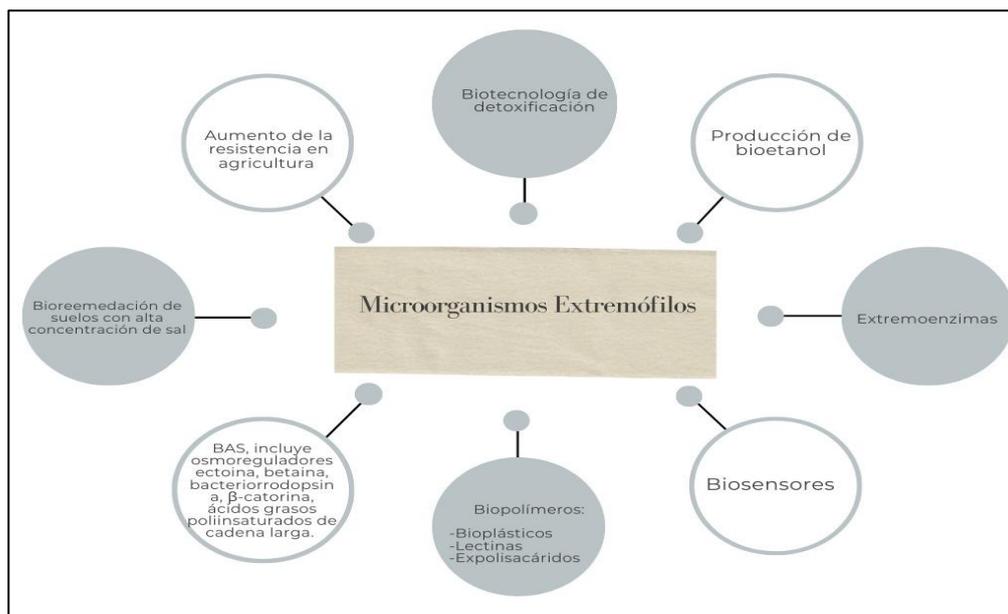


Ilustración 2-9: La aplicación de microorganismos extremófilos en biotecnología, medicina

Fuente: (Morozkina, et al., 2010, p.8).

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).

2.3.4. Medios de cultivo

Las células requieren una variedad de nutrientes para crecer, los nutrientes pueden ser tanto orgánicos e inorgánicos y se necesitan en dos niveles tanto macro como micro generalmente los microorganismos pueden fabricar sus propios nutrientes a través de elementos básicos como nitrógeno y carbono, sin embargo, es necesario en mínimas cantidades adicionar en pequeñas cantidades nutrientes orgánicos. La necesidad de estos nutrientes se hace evidente en periodo de crecimiento prolongado (Krikorian, 2015, pp. 42-59).

El primer objetivo para preparar un medio de cultivo es suministrar los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de microorganismos, los medios de cultivo deben tener macroelementos como (C, H, P, O, K, N, S, Ca y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl) por lo general se suministran estos nutrientes por medio de tres sales minerales KH_2PO_4 , *Ca* y *Mg*; se incluye una mínima cantidad de níquel (Krikorian, 2015, pp. 42-59).

2.3.4.1. Componentes de un medio de cultivo

Todas las fórmulas básicas existentes en el mercado actualmente cumplen con los requerimientos mínimos necesarios de los elementos requeridos, sin embargo, es necesario consultar las concentraciones de cada uno de los elementos presentes para escoger el medio de cultivo más idóneo para las necesidades del investigador. Todos los medios parecen beneficiarse en cierto

grado con suplementos vitamínicos los más utilizados son: tiamina, ácido nicotínico y piridoxina. Por lo tanto, los suplementos vitamínicos son estándares (Gómez, y Batista, 2006, pp. 17-24).

2.3.4.2. Características de los medios de cultivo

Entre las características más importantes de los medios de cultivo son:

- **Temperatura:** los microorganismos crecen en temperaturas específicas los medios de cultivos deben de proveer esta temperatura
- **pH:** Muchos de los cultivos crecen mejor con un pH neutro, aunque hay otros que requieren medios más ácidos.
- **Medios estériles:** todos los medios de cultivos deben ser completamente estériles para evitar que se pueda alterar, cubrir o incluso impedir el crecimiento microbiano normal.
- **Luz ambiental:** los medios de cultivo deben estar ubicados donde no estén expuesto a luz solar.
- **Humedad:** las condiciones de humedad deben ser las correctas tanto en el medio como en el agar a realizar.

2.3.4.3. Tipos de medios de cultivo

Según la proporción de agar, existen tres tipos:

- **Líquidos (caldos).** Al no contener un medio gelificante, los microorganismos pueden crecer en todo el medio. Este proceso es más rápido porque permite una mayor movilidad de microorganismos, por lo general se los usa en tubos de ensayo.
- **Sólidos.** Estos medios tienen una proporción de agar de entre el 15% y el 20%, el crecimiento de las bacterias se da en la parte superior del agar estos medios pueden depositarse en cajas Petri o en tubos de ensayo.
- **Semisólidos.** Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5%. Se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad (Barrero, 2016, pp. 4-21).

2.3.4.4. Tipos de agares y caldos

- **Agua de peptona.** medio de enriquecimiento no selectivo utilizado para realizar diluciones de microorganismos para la recuperación de células ya que proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano (Rodríguez, y Zhubernko, 2018, p. 130).

- **Medio Líquido de Tioglicolato.** Para el cultivo de microorganismos anaerobios, microaerófilos y aerobios, también aplicado en la realización de los ensayos de esterilidad (Rodríguez, y Zhubernko, 2018, p. 224).
- **Agar de recuento en placa (PCA).** Medio utilizado para determinación de recuentos bacterianos totales en aguas residuales, suelo, alimentos, etc. Permite el crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios.
- **Triptéina Soya (TSA).** Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos. Al ser suplementado con sangre permite el crecimiento de microorganismos exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis (Barrero, 2016, pp. 4-21).

2.3.5. *Morfología microscópica y macroscópica*

2.3.5.1. *Morfología microscópica*

La forma de las bacterias se debe a la rigidez de su pared celular y se clasifican en tres formas básicas: cocos (esféricos u ovals), bacilos (cilíndricos o en forma de bastón; rectos o curvados) y espirilos (en espiral). Después de la división celular, las bacterias se mantienen unidas manteniendo su independencia. Dependiendo del patrón de división, los cocos pueden formar diplococos, cadenas, racimos, tétradas y filamentos, como ocurre en *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. Los bacilos varían en longitud, desde cocobacilos muy cortos hasta bacilos extremadamente largos, con extremos redondeados o rectos. Es importante observar la morfología bacteriana con un microscopio óptico o electrónico debido a su pequeño tamaño. Además de la forma, las bacterias también pueden presentar diferentes comportamientos frente a la luz, olores particulares y consistencia de la colonia. Este microscopio nos permite visualizar bacterias difíciles de colorear, si se las coloca en glicerol, o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción; o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización (Varela, et al., 2008, pp. 93-100).

2.3.5.2. *Morfología macroscópica*

La morfología de la colonia es la base para la identificación preliminar y microbiana. Para la observación morfológica, es preferible examinar colonias recién cultivadas en medios no selectivos (Bou, et al., 2011, p. 46).

Las características de la colonia se pueden realizar mediante observación y la identificación está determinada por el tamaño, puede variar desde 0.5 mm como *Haemophilus spp.* o *Neisseria*

gonorrhoeae la cual es una bacteria relativamente pequeña en comparación con otras como las *Enterobacterias*, que son más grandes.. La superficie de la colonia también es importante y puede ser: plana, convexa, mamelonada, o umbilicada. En relación con el pigmento que adquieren, éste puede ser: verde, amarillo, etc. La apariencia de las colonias bacterianas puede variar en cuanto a su brillo u opacidad, y también pueden presentar olores característicos, como el olor frutal de *Pseudomonas aeruginosa* o el olor putrefacto de las bacterias anaerobias. Además, la consistencia de la colonia puede ser diferente en los distintos grupos de bacterias, siendo mucoide (M), lisa (S) o rugosa (R) (Varela, et al., 2008, pp. 93-100).

2.3.6. Identificación microbiana

2.3.6.1. Tinción diferencial de Gram

La clasificación de las bacterias se basa en su respuesta al método de tinción de Gram, que las divide en dos grupos principales: las bacterias Gram-positivas y las bacterias Gram-negativas. La razón de esta diferencia en la tinción se debe a las variaciones en la estructura de la pared celular de estos dos tipos de bacterias. Si la bacteria es de color púrpura, es probable que tenga una colonia grampositiva, Si la bacteria es rosada o roja, es probable que tenga una colonia gramnegativa (Santambrosio, Ortega, y Garibaldi, 2009, pp. 1-9).

2.3.6.2. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas

La pared bacteriana se encuentra adyacente a la membrana celular y está compuesta principalmente por peptidoglucano, lo que la diferencia de otras paredes celulares. Esta estructura semirrígida es responsable de la forma de la célula y tiene como función principal protegerla de la presión hidrostática intracelular. La pared celular es un componente esencial para la supervivencia de muchos organismos vivos, incluyendo plantas, hongos y bacterias. Aunque estas estructuras extracelulares se encuentran en diversos grupos, su origen evolutivo es diferente, lo que las convierte en estructuras celulares muy distintas. En bacterias encontramos dos tipos de paredes o envolturas celulares (Troncoso, et al., 2017, pp. 1214-1223).

2.3.7. Métodos moleculares de identificación bacteriana

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del ARNr 16S u otros genes se fundamenta en la amplificación genómica y en la secuenciación de genes o sus fragmentos. A continuación, se describen las etapas metodológicas de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S (Ilustración 13-2):

2.3.7.1. Extracción del ADN cromosómico

La extracción de ADN es el paso más crítico en todo el proceso de biología molecular. En la actualidad existen kits disponibles comercialmente que contienen protocolos específicos de extracción. Los procedimientos de extracción de ADN se caracterizan por la lisis de las células, así como la inactivación de las enzimas nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos o de otros restos celulares.

Las técnicas de extracción de ácidos nucleicos incluyen tratamientos químicos (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles); físicos (rotura mecánica: trituración, lisis hipotónica y o por digestión enzimática (proteínasa K) (Diz, 2020, p. 28).

Las muestras de ADN deben estar totalmente puras, para obtener resultados de calidad y correctos, por ello los métodos de purificación son necesarios y dependen de la muestra, cantidad, tipo de ácido nucleico, técnica de identificación, etc. Entre los métodos se tiene: extracción/precipitación, ultrafiltración, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad (Diz, 2020, p. 28).

2.3.7.2. Amplificación del gen

En esta etapa se dan las distintas reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis. El ADN se utiliza como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia del ARNr 16S (Bou, et al., 2011, p. 52).

Se puede describir la técnica de la PCR como un proceso que utiliza ciclos repetidos de tres temperaturas para lograr una replicación exponencial in vitro de moléculas de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc).

En cada ciclo, las moléculas se duplican hasta agotar los reactivos. La longitud del producto amplificado está determinada por los iniciadores (también llamados primers u oligonucleótidos), de cuyo diseño adecuado depende el éxito de la PCR (Salazar, Sandoval, y Armendáriz, 2013, p.114).

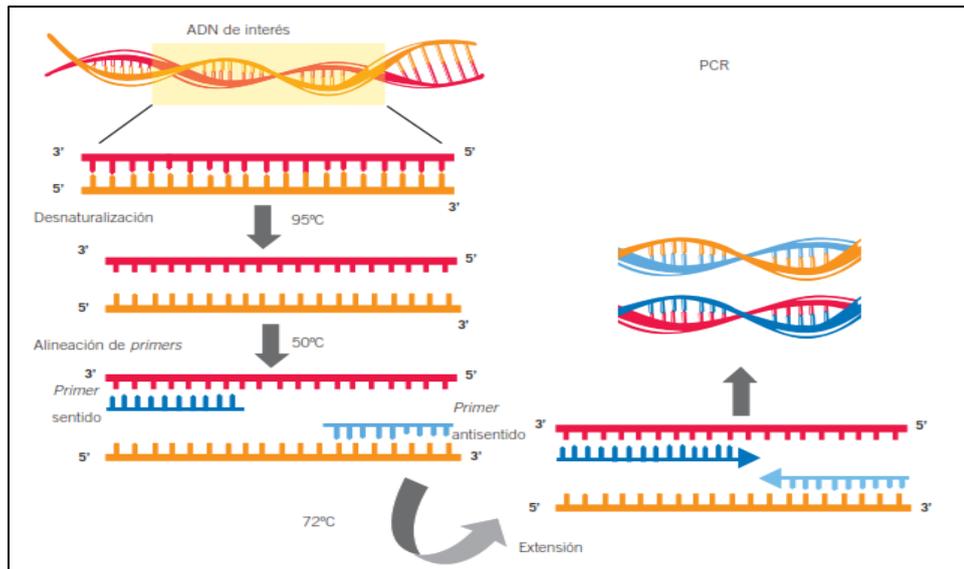


Ilustración 2-10: Esquema convencional de un PCR.

Fuente: (Salazar, Sandoval, y Armendáriz, 2013).

2.3.7.3. Electroforesis

La electroforesis consiste en la migración proporcional de moléculas (ADN, ARN o proteínas) a través de un gel u otro tipo de matriz porosa; cuyo movimiento es generado por un campo eléctrico.

Al aplicar este campo eléctrico las moléculas y fragmentos de moléculas de ácido nucleico se separan según su tamaño y conformación mediante electroforesis en geles de agarosa. Los ácidos nucleicos que migran más rápido en el gel de agarosa son los que presentan menor resistencia en su progresión (conformaciones más pequeñas y compactas). Por otro lado, al gel de agarosa se le agrega bromuro de etidio, el cual es un compuesto que se une a los ácidos nucleicos y emite fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta (Padilla, et al., 2011, p. 59).

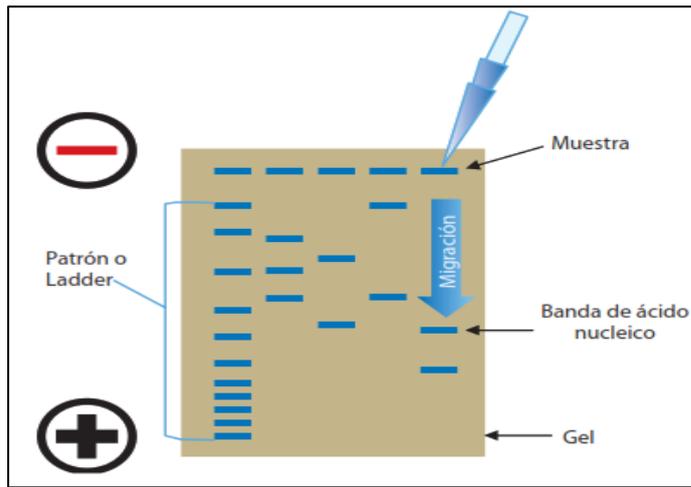


Ilustración 2-11: Electroforesis de ácidos nucleicos.

Fuente: (Salazar, Sandoval, y Armendáriz, 2013).

2.3.7.4. Determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón

En la secuenciación este utiliza el ADN como molde, se marcan los cuatro nucleótidos con fluorocromo de distinto color, se realiza el ciclo de secuenciación mediante PCR, se eliminan NTP sobrantes. Los fragmentos son sometidos a electroforesis en gel y mediante el sistema automatizado; cada base (adenina, timina, guanina y citosina) se marca con un fluorocromo diferente que absorbe diferentes longitudes de onda y luego se detecta a fin de poder leer la secuencia obtenida (Salazar, Sandoval, y Armendáriz, 2013, p. 85).

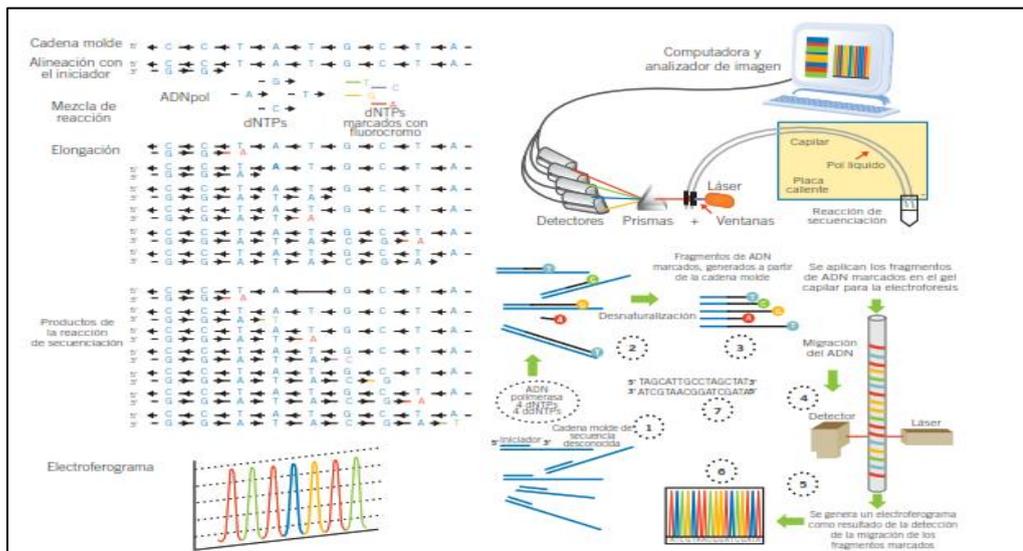


Ilustración 2-12: Secuenciación automatizada

Fuente: (Salazar, Sandoval, y Armendáriz, 2013).

2.3.7.5. Análisis de la secuencia

Este paso se realiza con el objetivo de identificar la cepa en estudio mediante la comparación con otras secuencias depositadas en bases de datos públicas o privadas a través de internet.

Actualmente existen un sinnúmero de bases de datos, algunas 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). Otras bases de datos son privadas, como: MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System). RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) es la base de datos de secuencias de ADNr (16S, 23S de procariontas, y 18S y 28S de eucariotas).

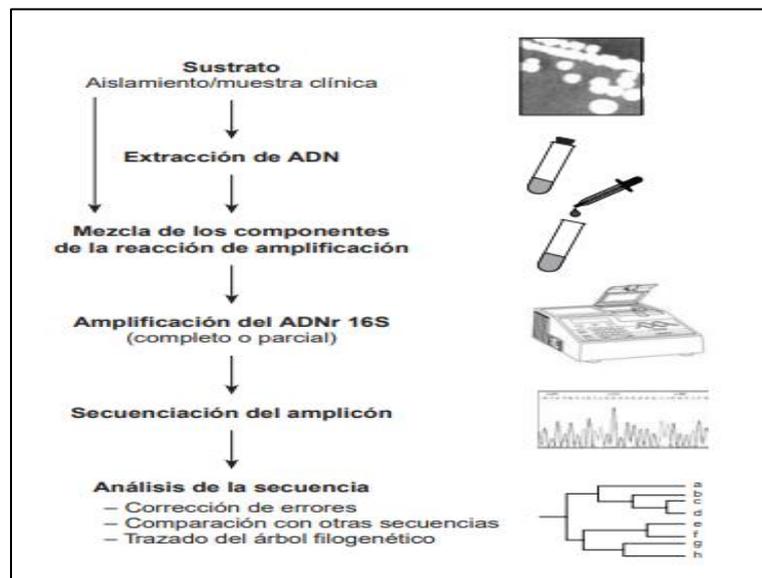


Ilustración 2-13: Etapas de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.

Fuente: (Rodicio, y Mendoza, 2004a).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de investigación

La investigación tiene un enfoque mixto, ya que este estudio combina tanto la recopilación y análisis de datos cuantitativos (análisis de muestras de sedimentos, ADN) como cualitativos (observación, revisión bibliográfica) para proporcionar una comprensión completa del tema en interés. Este enfoque es útil para abordar preguntas de investigación complejas que no pueden ser respondidas por completo por una sola metodología de investigación. Al combinar métodos cuantitativos y cualitativos, el investigador puede obtener una comprensión más profunda y completa de un fenómeno en particular (Sampieri, Collado, y Baptista, 2014, p. 63).

3.2. Nivel de Investigación

Según el nivel de profundización del objetivo de estudio es descriptiva, debido a que se describe las condiciones ambientales extremas que se presentan en el lugar con el objetivo de identificar las bacterias poliextremófilas capaces de crecer y así realizar un estudio independiente de cada característica permitiendo precisar la hipótesis propuesta, considerando la manipulación de variables es experimental y según el periodo temporal es transversal, ya que las muestras son recolectadas en un periodo de tiempo determinado en las distintas zonas de la Laguna Cuicocha.

3.3. Diseño de investigación

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

El diseño de la investigación responde a un diseño experimental ya que se establece el posible efecto de una causa que se manipula, en este caso las bacterias (variable dependiente) estarán condicionadas por tres variables independientes: ausencia de oxígeno, concentración de metales pesados Cromo (Cr) y Cadmio (Cd), presión osmótica (altas concentraciones de NaCl), lo que permitirá determinar el tipo de bacterias que se adapten a múltiples factores en condiciones adversas.

3.3.2. *Según las Intervenciones en el Trabajo de Campo*

El diseño de la investigación según el periodo temporal es transversal puesto que la recolección de muestras en campo se realizó en un momento determinado establecido.

3.4. Tipo de estudio

El Proyecto de Investigación corresponde a un estudio de campo, las muestras fueron recolectadas en la Laguna Cuicocha y su posterior preparación fue realizada en el laboratorio con el objetivo de comprender y utilizar la información obtenida con fines prácticos.

3.5. Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

3.5.1. Población

La población de estudio en el presente Proyecto de Investigación son las muestras de los sedimentos de la Laguna Cuicocha.

3.5.2. Selección y cálculo del tamaño de la muestra

Para seleccionar los puntos de muestreo se recopiló información bibliográfica, de manera que se establecieron los puntos de muestreo considerando las siguientes características:

- **Accesibilidad.** Dado la geografía de la Laguna Cuicocha, los puntos accesibles son escasos y la forma más factible de acceder es mediante un bote para la toma de muestras, el transporte de los equipos y material de muestreo.
- **Representatividad.** Los puntos de recolección representan un conjunto de rasgos característicos de los sedimentos de la laguna, siendo estos puntos georreferenciados en el software ArcGIS 10.4.
- **Seguridad.** El lugar de muestreo, su entorno y las condiciones climáticas deben garantizar la seguridad del muestreador.

A continuación, se establecen 4 puntos de muestreo, cuyas coordenadas se muestran en la Tabla 3-1:

Tabla 3-1: Coordenadas de los puntos de muestreo

MUESTRAS	CÓDIGO	COORDENADAS	
		X	Y
1	MC4	792949,98	10032615,6
2	MC8	792444,986	10034228,7
3	MC12	793681,522	10033871,6
4	MC16	794105,178	10032361,4

Realizado por: (Mosquera, C.; Samaniego, D., 2023).



Ilustración 3-1: Mapa de ubicación de puntos de muestreo

Fuente: Google Earth Pro, 2021.

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.6.1. Método de muestreo

El tipo de muestreo empleado es de carácter no probabilístico, ya que es un proceso de selección basado en las características del estudio, más no en criterios estadísticos de generalización o técnicas estandarizadas. De igual manera, la elección de las unidades de muestreo fue no aleatoria considerando la facilidad de acceso a los puntos de muestreo.

3.6.2. Muestreo

Los puntos de muestreo están definidos por las coordenadas y la profundidad, se establecieron 4 puntos de muestreo, las muestras se tomaron en tres diferentes profundidades (0.30-0.60-0.90 m), para ello se usaron 12 tubos falcon estériles, con una capacidad de 50mL con su respectiva tapa. Según el Protocolo para Toma de Muestras de Sedimentos es necesario previo a la recolección de la muestra se enjuaguen los equipos y materiales usados con el agua de la laguna, posteriormente limpiar todo el equipo de muestreo en el sitio de la toma de muestra con alcohol al 96%, para evitar problemas de contaminación cruzada (Parques Nacionales Naturales de Colombia Dirección Territorial Amazonía, 2018, p. 48).

3.6.2.1. Muestra compuesta

La preparación de esta muestra se realizó *in situ* se procedió a tomar una alícuota de cada submuestra, es decir de cada profundidad (0.30-0.60-0.90 m). En la pala se procedió a la extracción de piedras, palos, etc. y se mezcló con ayuda de una espátula para homogeneizar la muestra. Finalmente, las muestras compuestas fueron almacenadas en fundas ziploc estériles con una capacidad de 200g.

3.6.2.2. Rotulado de las muestras

Según lo establecido en la norma NTE INEN 2176 (2013, p. 25) se rotula las muestras considerando los datos de campo como: ubicación, profundidad, clave de la muestra, punto geográfico y el número de muestra, el etiquetado se lo realizó *in situ* como dicta la norma. Por otro lado, se realiza el llenado de la ficha de muestreo para cada punto en donde constan coordenadas, fecha de la recolección, condiciones atmosféricas, cantidad, técnica, nombre del recolector y demás datos relevantes en el campo.

3.6.2.3. Medición de parámetros físicos *in situ*

Se miden los parámetros físicos *in situ* (pH y temperatura) de las muestras compuestas, para ello se empleará el uso de un multiparámetro marca YIEREYI 4in1 (Ilustración 3-2). Para la medición de pH y temperatura se preparó una disolución 1:1, 20g de sedimento y 20ml de agua destilada en un envase estéril y con ayuda de una paleta se procedió a mezclar, se deja reposar la mezcla durante 2 min, posteriormente se coloca el multiparámetro en el sobrenadante de la muestra, se observa y registra los datos, finalmente se enjuaga con agua destilada y se procede a realizar lo mismo para las demás muestras compuestas.



Ilustración 3-2: Muestreo. A: Toma de muestra compuesta B: Preparación de la muestra
C: Medición de parámetros

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.2.4. Almacenamiento y transporte de muestras

Las muestras se colocaron en un cooler para su transporte para minimizar las pérdidas de humedad. Según la Norma Técnica Colombiana, las muestras de sedimento se deben almacenar y transportar enfriadas (a 4°C o menos) por ello se incluye hielo seco para mantener la cadena de custodia y ser transportadas inmediatamente al laboratorio y almacenarla a 4 °C, evitando el efecto de la luz solar así se asegura la validez de las determinaciones a efectuar (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, 1998, p. 87).



Ilustración 3-3: Almacenamiento de las muestras

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.3. *Medición de parámetros físicos en laboratorio*

La determinación de pH en las muestras de sedimentos se realizó en una porción 1:2 sedimento/agua. Para esto se pesaron 20 g de sedimento y se les agregó 40 ml de agua destilada. La mezcla sedimento/agua se agitó durante 10 minutos y se dejó reposar 10 minutos. Con ayuda del multiparámetro se midió el pH en el sobrenadante de la mezcla.

Por otro lado, la determinación de conductividad eléctrica en las muestras de sedimentos se realizó en una porción 1:5 sedimento/agua, es decir se pesó 10 g de sedimento y se les agregó 50 ml de agua destilada. La mezcla sedimento/agua se agitó durante 10 minutos y se dejó reposar 10 minutos. Con ayuda del multiparámetro se midió la conductividad eléctrica en el sobrenadante de la mezcla.

Finalmente se registró el valor de pH y conductividad al momento que la lectura se estabilizó.



Ilustración 3-4: Determinación de pH y temperatura en laboratorio

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.4. *Aislamiento bacteriano*

3.6.4.1. *Diluciones seriadas*

Las muestras de sedimento se procesaron empleando diluciones seriadas. Para ello se preparó la solución madre pesando 10 g de sedimento y se diluyó en 90 ml de agua de peptona al 1%, agitando durante varios minutos. A partir de esta solución se realizaron cuatro diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta el valor 10^{-4} (Samaniego, et al., 2018, p. 80).



Ilustración 3-5: Solución madre de cada punto de muestreo

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.4.2. Preparación de medios de cultivo

Tabla 3-2: Composición de Agua de peptona

Fórmula	Concentración del medio (g/L)
Peptona bacteriológica	10.0
Cloruro de sodio	5.0

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Tabla 3-3: Composición de TSA

Fórmula	Concentración del medio (g/L)
Digerido pancreático de caseína	15.0
Digerido papaínico de soya	5.0
Cloruro sódico	5.0
Agar	15.0

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023

Tabla 3-4: Composición de PCA

Fórmula	Concentración del medio (g/L)
Digerido pancreático de caseína	5.0
Dextrosa	1.0
Extracto de levadura	2.5
Agar	15.0

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y se esterizaron a 121 °C por 15 minutos.

3.6.4.3. *Inoculación de las muestras*

Posteriormente de cada dilución se tomó aproximadamente 1 μ l con ayuda de una micropipeta y se procedió a realizar la siembra por extensión en superficie con el asa digralsky en placas Petri con ambos medios. Se sembraron tres réplicas por dilución por muestra de sedimento.

3.6.4.4. *Incubación de inóculos*

Las placas se incubaron a 20° C ya que es la temperatura promedio de la laguna, por un periodo de tiempo de 24 a 72 horas, llevando un registro diario del crecimiento de las bacterias.

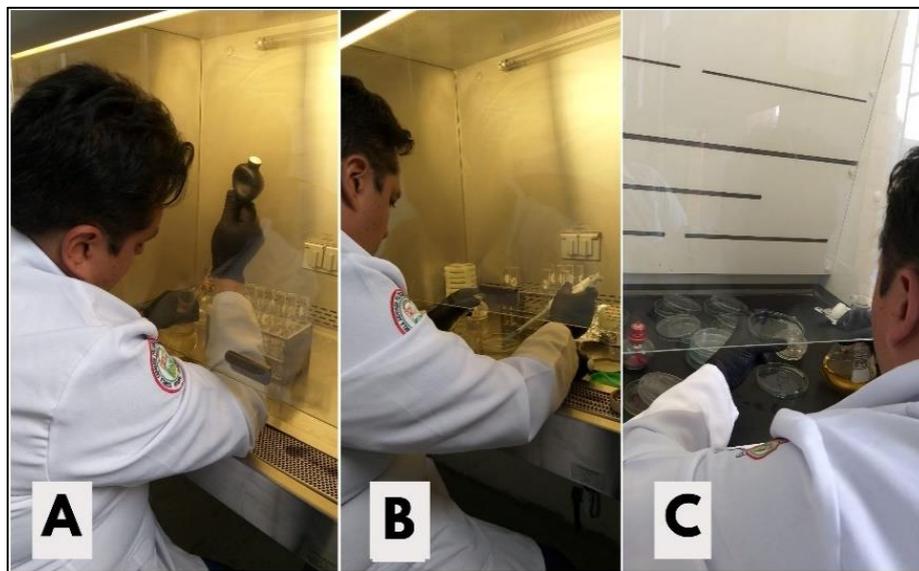


Ilustración 3-6: Aislamiento bacteriano A: Diluciones seriadas B: Siembra de superficie en placa C: Preparación con medios de cultivo

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.5. *Obtención de cultivos puros*

Se aislaron las cepas bacterias más representativas con ayuda del asa de siembra y cultivaron en un periodo de tiempo de 24 a 72 horas en medio de cultivo TSA y PCA, con 3 réplicas por colonia aplicando la técnica de siembra por agotamiento de estrías. Una vez culminado el periodo de incubación se procedió a realizar un análisis visual de cada uno de los clones obtenidos.

3.6.6. Caracterización bacteriana

3.6.6.1. Caracterización macroscópica

Se realizó mediante observación considerando características como: tamaño, forma, borde, elevación, textura, color, brillo, etc.

3.6.6.2. Caracterización microscópica

Se realizó tinción Gram en los clones de bacterias para ello se colocó en el portaobjetos una fina capa del cultivo, se fijó la muestra pasando el portaobjetos por la llama del mechero, se vertió una gota de cristal violeta durante 1 minuto en el frotis fijado por el calor, se enjuagó con agua destilada y se añadió solución de yodo o lugol durante 1 minuto, se enjuagó con agua destilada, se colocó una gota de alcohol cetona durante 20 segundos, se enjuagó con agua destilada, se agregó una gota de safranina durante 1 o 2 minutos, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar la placa. Se añadió una gota de aceite de inmersión en el portaobjetos y finalmente se observó al microscopio con el aumento de 100x. Una vez realizada la tinción, las bacterias grampositivas se tiñen de color púrpura y las bacterias gramnegativas de color rosa (Madigan, et al., 2015, p. 41).



Ilustración 3-7: Reactivos utilizados en Tinción Gram

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.7. Pruebas de resistencia

3.6.7.1. Prueba de resistencia a metales pesados Cromo VI y Cadmio

Los clones aislados fueron sometidos a pruebas con cromo VI y cadmio, se prepararon los medios de cultivo TSA y PCA suplementados con distintas concentraciones de Cr y Cd (Tabla 5-3) previamente esterilizado, se realizó la siembra por agotamiento de estrías y se incubó por 72 horas

a 20°C. Las concentraciones utilizadas para cada prueba se detallan a continuación:

Tabla 3-5: Concentraciones de Cromo y Cadmio

	C1 (ppm)	C2 (ppm)	C3 (ppm)	C4 (ppm)	C5 (ppm)	C6 (ppm)
Cromo (Cr)	10	100	1000	10 000	25 000	50 000
Cadmio (Cd)	10	100	1000	10 000	25 000	50 000

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.7.2. Prueba de resistencia a concentraciones halófilas

Considerando las pruebas de salinidad previamente realizadas para conocer la cantidad de sal presente en la laguna se pudo determinar las concentraciones de NaCl (Tabla 6-3), se suplementaron los medios TSA y PCA con NaCl, se inoculó por estriado y se incubó a 20°C durante 72 horas.

Tabla 3-6: Concentraciones de NaCl

	C1 (ppm)	C2 (ppm)	C3 (ppm)	C4 (ppm)	C5 (ppm)
NaCl	10	100	1 000	10 000	100 000

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.7.3. Pruebas de resistencia a condiciones anaerobias

Para la realización de esta prueba se utilizó el Medio Fluido Tioglicolato (Tabla 7-3), ya que es un medio específico para el cultivo de microorganismos aerobios, microaerófilos, anaerobios, para su preparación se disuelven 29g en 1 litro de agua destilada y se calentó agitando hasta alcanzar la ebullición y disolución completa. Posteriormente, se colocó 10ml del medio en tubos de ensayo y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Se esperó hasta que se enfrió y se tomó una colonia aislada de la placa y se punzó en el centro del tubo de ensayo sin llegar al fondo con la ayuda de un asa recta previamente esterilizada.

Finalmente se incubó tapado a 20°C, evitando el contacto de la luz, hasta observar desarrollo de los microorganismos.

Luego de la incubación, se puede evidenciar el crecimiento de microorganismos por la presencia de turbidez en los tubos de ensayo.

- Aerobios estrictos crecen en la parte superior del medio.
- Anaerobios facultativos crecen en todo el medio.
- Anaerobios estrictos crecen en el fondo del medio de cultivo (Rodríguez, y Zhubernko, 2018, p. 47).

Tabla 3-7: Composición de Medio Fluido Tioglicolato

Fórmula	Concentración del 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

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.8. Caracterización molecular de bacterias

3.6.8.1. Extracción y purificación de ADN bacteriano

La extracción de ADN de los aislados bacterianos se realizó aplicando la técnica fenol-cloroformo fundamentada en la lisis total de las células y sus estructuras subcelulares mediante el empleo de detergentes con la posterior eliminación de las proteínas mediante su extracción y la de componentes lipídicos con solventes orgánicos, para ello se etiquetaron los tubos eppendorf de 1.5 ml con tres perlas de vidrio estériles y se adicionó 500 μ L de buffer de extracción (CTAB, SDS, componentes del buffer) y 2 μ L de β -mercaptoetanol. Luego se tomó aproximadamente 50mg de la muestra en cada uno de los tubos (Ilustración 3-8).

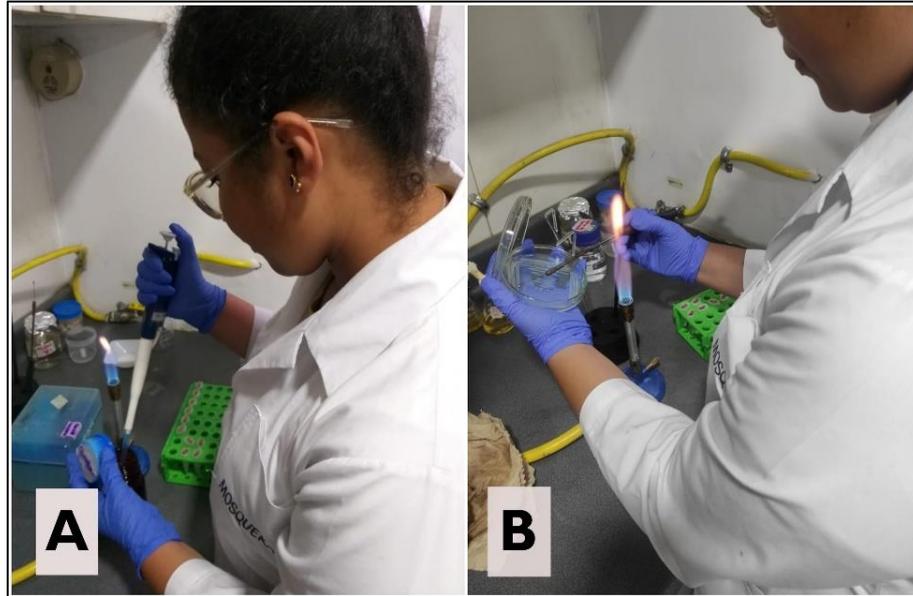


Ilustración 3-8: Extracción de ADN A: Adición de reactivos en tubos eppendorf con perlas B: Toma del asilado bacteriano

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Posteriormente se procedió a agitar la muestra usando BeadBeater a velocidad máxima (5 ciclos de 60 segundos con intervalos de 5 segundos) y se incubó en baño maría a 60°C por 30 min. Adicionalmente se añadió 500µL de cloroformo congelado, y se homogenizó en un vortex por 30 segundos y se dejó reposar unos minutos.

Se centrifugaron a 14500 rpm por 10 min, y se tomó el sobrenadante, cuidando no mezclar las dos fases y se colocó en un nuevo tubo estéril de 1.5mL. Luego se añadió al sobrenadante 150µL de acetato de sodio, 300µL de etanol 70% para precipitar el ADN y se dejó a -20°C durante toda la noche (Ilustración 3-9).

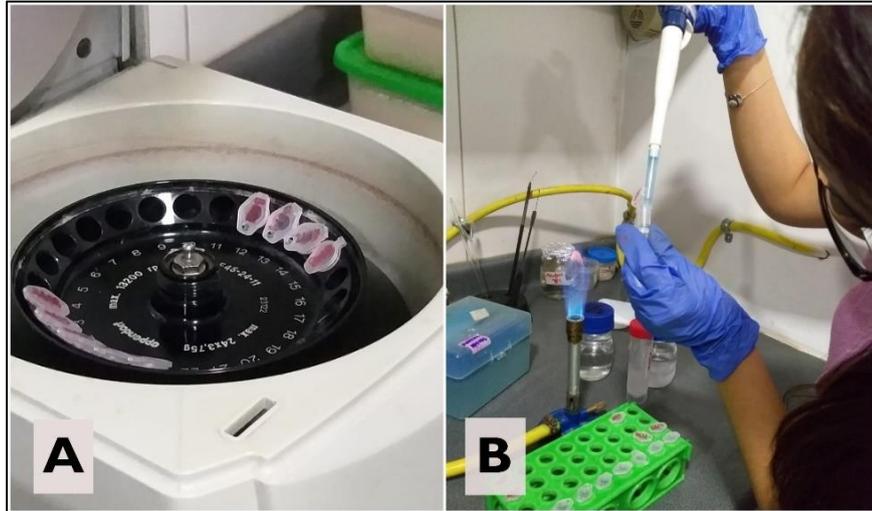


Ilustración 3-9: Purificación de ADN A: Centrifugación de muestras B: Extracción del sobrenadante

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Se centrifugó a 14500 rpm durante 17 min y se eliminó el sobrenadante conservando el pellet bacteriano. A continuación, se realizaron 2 lavados con etanol al 70%, se pipeteó y descartó el etanol por inversión. En la cámara de flujo laminar se dejó secar el pellet por 20 minutos, lo que permite la evaporación del alcohol y se resuspendió el pellet de ADN con 25 μ L de agua libre de nucleasas y se añadió 1 μ L de RNAsa y dejó incubar 30 min a 37°C, para eliminar el ARN contaminante proveniente de la extracción para, así, evitar interferencia del ARN en cuanto a la cuantificación y técnicas usadas posteriormente. Almacenar las muestras a -20°C hasta su posterior uso (Ilustración 3-10).



Ilustración 3-10: Purificación de ADN A: Centrifugación de muestras B:
Resuspensión del pellet de ADN en agua libre de nucleasas
Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Finalmente, para poder visualizar la calidad del ADN extraído se realiza la medición en NanoDrop 2000 de Thermo Scientific™. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20ng/μL para la amplificación (Ilustración 3-11).

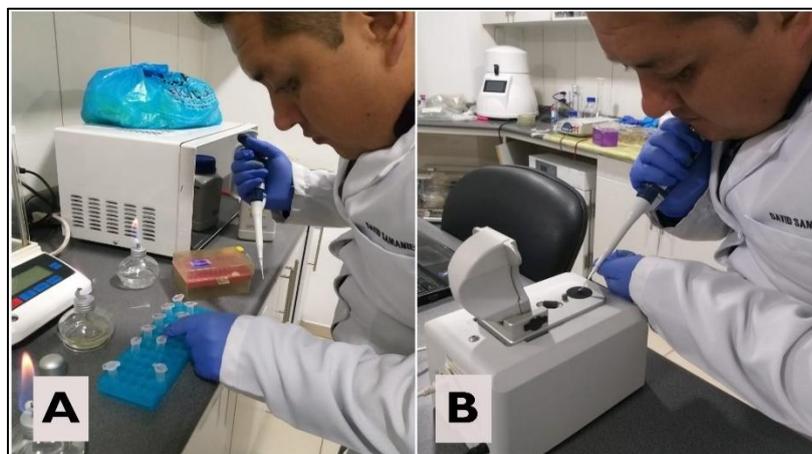


Ilustración 3-11: Valoración de pureza de ADN
Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

3.6.8.2. Amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR convencional

La amplificación de la región 16S se realizó aplicando la técnica de PCR, con un volumen final de 25μL por muestra, se preparó el máster mix utilizando el kit GoTaq Green Máster Mix con un volumen de 12.5μL, también primers universales (27F y 1492R) de 10μL forward y 10μL reverse,

2µL de muestras de ADN y 8.5µL de agua libre de nucleasas.

Tabla 3-8: Primers universales para el gen 16S

Gen	Primers	Secuencia 5'-3'	Tamaño
16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500pb
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	

Fuente: (Chen, et al., 2015, p. 4).

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Posteriormente se utilizó el termociclador con las siguientes condiciones:

Tabla 3-9: Condiciones de la PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 ° C	3 min	30-40 ciclos
Desnaturalización	95 ° C	30 s	
Alineamiento	Tm -3-5° C	30s	
Extensión	72° C	1 min/kb	
Extensión final	72° C	5 min	
Almacenamiento	10 ° C	Indefinido	

Fuente:(Serrato, et al., 1997).

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Los productos de PCR pudieron ser visualizados en gel de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó a 85V, utilizando marcadores Opti-DNA de 100 pb, 250 mA durante 35 minutos. Finalmente, se visualizó bajo luz ultravioleta en el equipo High Performance UV – transiluminador.

3.6.8.3. Secuenciación molecular e identificación bacteriana

Se secuenciaron los amplicones de los genes 16S ARNr. La secuenciación de la biblioteca de amplicones se realizó en Macrogen, Inc. (Seúl, República de Corea) y se logró a través de la plataforma Illumina con un sistema MiSeq.

Después del análisis de secuenciación molecular, se obtiene la secuencia de pares de bases y se realiza el ensamblaje utilizando programas bioinformáticos. Posteriormente se corrieron con la ayuda de Nucleotide BLAST (blastn) y comparadas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Medición de parámetros físicos in situ y en laboratorio

Los resultados obtenidos de la medición de los parámetros físicos in situ y en laboratorio de las muestras de sedimento de la Laguna Cuicocha, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 4-1: Parámetros físicos en campo y en laboratorio

Medición in situ				Medición ex situ (laboratorio)	
Muestreo	Código	Temperatura (°C)	pH	pH	Conductividad eléctrica (CE) (μS/cm)
Punto 1	MC4	21.6	7.7	7.89	126.3
Punto 2	MC8	19.1	7.7	8.36	115.6
Punto 3	MC12	24.4	6.74	8.09	134.3
Punto 4	MC16	20.9	7.35	7.60	165.6
Promedio		21.5	7.37	7.98	135.45

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

La temperatura de la Laguna Cuicocha dio un valor mínimo de 19,1 °C, correspondiente al punto 2 y un valor máximo de 24,4 °C para el punto 3, siendo el promedio de temperatura de la laguna de 21,5 °C (Tabla 4-1), datos similares se presentan en la laguna del Quilotoa.

Es importante resaltar que la temperatura del agua en lagunas puede variar dependiendo de la época del año en la que se realice el muestreo, para este estudio se realizaron los muestreos en el mes de septiembre que corresponde a la época seca (meses de julio-octubre). De igual manera es importante tomar en cuenta otros factores como: temperatura ambiental, altura a la que se encuentra, ubicación; aspectos que pueden incidir de forma directa en la temperatura.

Según Jácome, Vallejo, y Gómez de la Torre, (2019, p. 22) la temperatura ambiente en lagunas altoandinas oscila entre los 9 y 11 °C pero en días soleados puede subir hasta los 22 °C al medio día.

Además, Vázquez, y Caballero, (2021, p. 58) en su investigación “Lagos volcánicos y el cambio climático” mencionan que los ecosistemas acuáticos de agua dulce, como los lagos, son muy sensibles a los cambios antropogénicos. Entre los más importantes a considerar están: cambio de uso de suelo con el consecuente enriquecimiento con nutrientes, conocido como eutrofización y el cambio climático.

En la investigación realizada por Gunkel, et al., (2009, p. 704), sobre las características fisicoquímicas del agua de la Laguna Cuicocha, estos autores indican valores promedio de la temperatura del agua de 16 °C, los cuales son inferiores en 5 °C a los registrados en la presente investigación y la diferencia estaría dada por la época del año donde estos autores realizaron el trabajo que fue en el mes de marzo, además del efecto de corrientes hidrotermales que se observaron durante estas mediciones. Otros estudios manifiestan valores de temperatura promedio de 9,7 ° C (Alarcón, Diego, 2019, p. 47), sin embargo para este estudio se realizaron los muestreos en el periodo de transición de la época seca y la lluviosa.

La temperatura de las aguas de un lago cratérico se ven directamente afectadas por la actividad volcánica de las estructuras geológicas en las que se encuentran, por ejemplo, las lagunas en volcanes activos y con picos altos de actividad, como la laguna caliente del volcán Poás, con temperaturas que oscilan entre los 38 y 96 °C (Red Sismológica Nacional, 2018, p. 71).

Los valores de pH en la Laguna Cuicocha medidos en campo presentan una tendencia a la neutralidad ya que los valores oscilan entre los 6,74 (valor mínimo) correspondiente al punto 3 y 7,7 (valor máximo) para los puntos 1 y 2 (Tabla 4-1).

Por otro lado, los valores de pH medidos en laboratorio son similares, sin embargo, presentan una tendencia a la alcalinidad, los valores oscilan entre los 7,60 (valor mínimo) correspondiente al punto 4 y 8,36 (valor máximo) para el punto 2 (Tabla 4-1).

Teniendo en cuenta que el pH medido en campo se encontró en un rango de 6 a 7 (tendencia a la neutralidad) frente a las mediciones de pH medido en laboratorio oscilaron de 7 a 8 (ligeramente alcalino) con las condiciones controladas se denota la presencia de sesgo, esto se debe a que la medición de pH depende de varios factores entre ellos la temperatura, la variación de esta afecta a la solubilidad de sales y bases débiles, otro de los factores a considerar es la calibración de los equipos y la preparación de la muestra.

Las bacterias presentes en la laguna de estudio estarían dentro del tipo de neutrófilos (óptimo de crecimiento a pH (6–8). Según Iañez (2005, p. 47) el pH es un factor muy importante en el

metabolismo y la reproducción bacteriana, ya que los cambios repentinos pueden ser perjudiciales al afectar el transporte de membranas y solutos e inhibir las enzimas. Si el pH citoplasmático cae rápidamente por debajo de 5, la bacteria muere.

El pH promedio registrado en este estudio se asemeja a los obtenidos en el trabajo “Microbiota bacteriana de la laguna de Cuicocha y sus aplicaciones biotecnológicas” en donde el pH promedio medido fue de 7,28 (Alarcón, 2019, p.48), así como en el estudio de Vásquez, (2022, pp. 84-85) quien obtuvo de valores de pH entre 7,45 y 7,98.

Los datos de pH obtenidos en el presente Proyecto de Investigación son similares a los valores indicados por otros autores como Gunkel, et al., (2011, p.116), en su investigación reportaron valores de pH de 7,4-7,8 en verano ventoso. Según Pérez y Ramírez (2008, p. 206) los lagos naturales de alta montaña presentan valores de pH entre 6,5 y 7,5, exceptuando los lagos de turberas en páramos andinos, que registran valores de 4,0 y 5,0.

De igual manera, el pH del agua de la laguna volcánica Cuicocha es semejante a los señalados para la laguna Negra en la provincia de Chimborazo donde se reportaron valores de 6,5-7,0 (Pino, 2020, p. 70). Además, en el estudio “Calidad fisicoquímica del agua de la laguna volcánica craterica Quilotoa. Cotopaxi. Ecuador” los resultados promedios para pH fueron de 7.64 (pH ligeramente alcalino).

Según Christenson, et al. (2015, p.10) los lagos volcánicos se pueden subdividir en varias clases según su origen, entorno y la composición química de sus aguas. En su investigación mencionan distintas clases de lagos volcánicos, entre ellos aquellos que están contaminados con fluidos volcánicos ya que han perdido en gran medida sus componentes más reactivos, como los halógenos y el azufre, y son ricos en CO₂ y/o carbonato. Por ello su pH oscila entre neutro y >7, tiende a fomentar ecosistemas productivos, pero sus aguas inferiores pueden estar cargadas de CO₂ que podría provocar erupciones límnicas. A esta clase pertenece la Laguna Cuicocha ya que los valores de pH encontrados en esta laguna son semejantes.

Comparando estos valores con los parámetros establecidos en el Libro VI Anexo 1 del Texto Unificado de Legislación Secundaria, los límites máximos permisibles de pH para aguas con fines recreativos mediante contacto secundario son de 6,5-8,5 (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2015, p. 30); por lo que se deduce que los valores de pH se encuentran dentro de los límites máximos permisibles.

Otros de los parámetros físicos analizados fue la conductividad eléctrica, los sedimentos de la Laguna Cuicocha presentaron valores de 115,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (valor mínimo) correspondiente al punto 2 y 165,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (valor máximo) para el punto 4, dando un valor promedio de la laguna de 135,45 $\mu\text{S}/\text{cm}$. (Tabla 4-1).

De acuerdo con la investigación “Survey and assessment of post volcanic activities of a young caldera lake, Lake Cuicocha, Ecuador” Gunkel, et al., (2009, p.704) estos autores reportaron valores de conductividad eléctrica de 810,11 $\mu\text{S}/\text{cm}$, valor alto en comparación al obtenido en el presente trabajo. De igual manera en otros estudios se obtuvo valores de conductividad eléctrica promedio de la Laguna Cuicocha in situ de 833,10 (Alarcón, 2019, pp. 72-78).

Esta variación entre los valores en la conductividad eléctrica se debe a que en la presente investigación se realizó la medición de este parámetro en sedimentos de la laguna más no en agua. Los valores de este parámetro varían en el agua puesto que en este medio se pueden disolver varias sales minerales dándole altos valores de conductividad, además se usa exclusivamente el agua de la laguna, mientras que para sedimentos se utiliza una disolución agua destilada: sedimento.

Según Escobar, Albuja, y Andueza (2021, pp. 76-81) y su estudio en la laguna Negra analizaron valores de conductividad eléctrica elevada con un rango de valores desde 903 a 1253 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un valor promedio de 1085 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

En otros estudios realizados en lagunas volcánicas se obtuvieron valores de conductividad eléctrica en $\mu\text{S}/\text{cm}$ de 88,50 (valor mínimo) en el punto 5 y de 126,75 (valor máximo) para el punto 1 (Guangasig, et al., 2023, p. 82). Estos valores son semejantes al obtenido en el presente Proyecto de Investigación.

Se puede observar en la Tabla 1-4 que podría existir una relación entre el pH medido y la CE, puesto que el valor del pH alto corresponde a un valor bajo de la CE, por ende, el pH y la CE podrían tener correlación.

4.2. Aislamiento bacteriano

En el aislamiento bacteriano se obtuvieron 20 colonias, de las cuales se seleccionaron 8 cepas considerando diferentes criterios de selección en base a su morfología, algunas de las cuales tenían pigmentos llamativos, mientras que otras mostraban características como mucosidad o rugosidad. Es posible que algunas de las cepas seleccionadas fueran de la misma especie o incluso idénticas,

pero se priorizó la elección de aquellas que presentaban morfologías claramente distintas en la misma muestra. Aunque es posible que la misma cepa haya sido seleccionada en diferentes tipos de muestras, la probabilidad se reduce al tomar muestras de puntos diferentes.

Para la obtención de cultivos puros, se realizó 6 repiques de cada una de las 8 cepas (Ilustración 4-1).

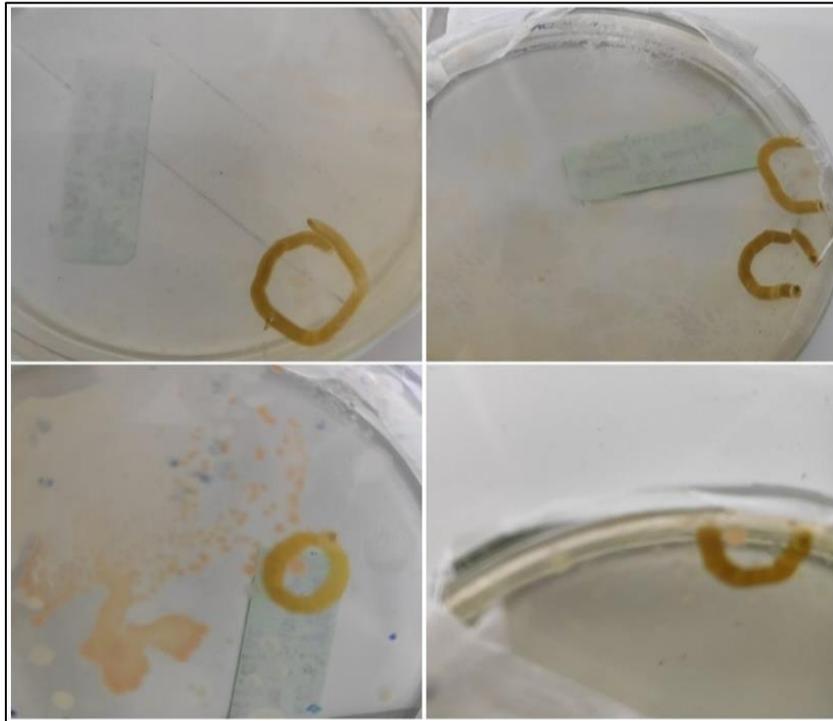


Ilustración 4-1: Bacterias seleccionadas para aislamiento

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

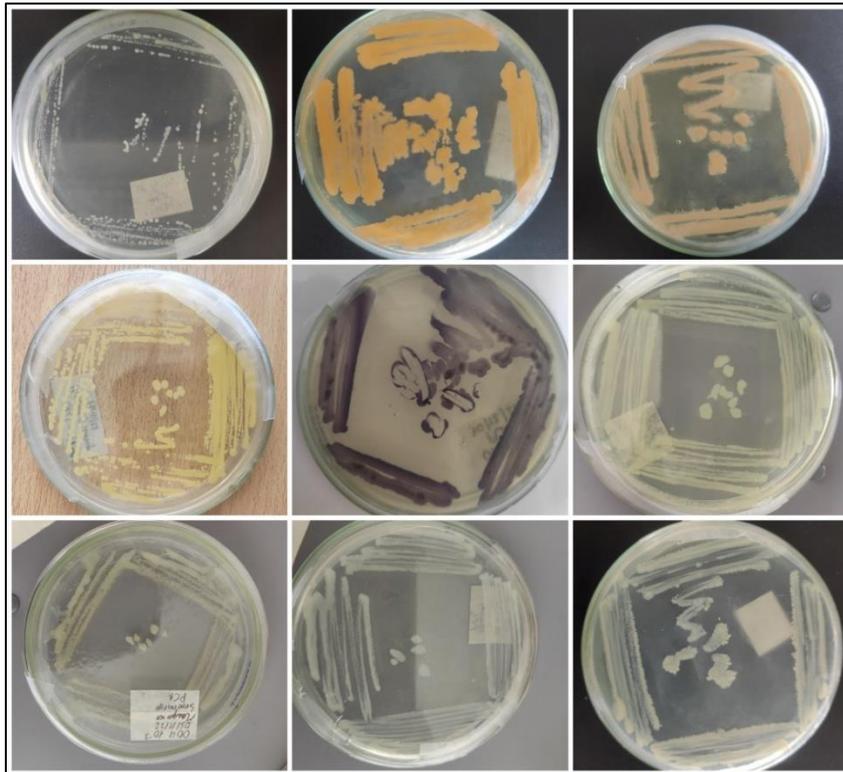


Ilustración 4-2: Bacterias aisladas

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

4.3. Caracterización bacteriana

4.3.1. Caracterización macroscópica

Las bacterias aisladas se caracterizaron morfológicamente teniendo en cuenta 9 aspectos: tamaño, forma, borde, elevación, textura, color, transparencia, superficie y brillo; observándose que la forma predominante es la circular. En cuanto a los bordes el predominante es el entero y una con borde rizoide.

En la elevación se puede observar que todas las bacterias aisladas son planas y en el color presentaron: blanco, crema, amarilla, anaranjado y morado. Según Meseguer Soria, (2004, p. 43) las haloarqueas al ser cultivadas en el laboratorio producen colonias de diversas coloraciones: rojizas, rosas o anaranjadas, dependiendo de las especies y las condiciones de cultivo.

La morfología es una característica muy importante pero no significativa para la diferenciación de microorganismos, en esta investigación hay colonias muy particulares con colores y texturas exclusivas tales como la MC16_R6_C9, presenta color morado y textura viscosa en comparación de las demás.

Tabla 4-2: Características macroscópicas de cepas aisladas

PUNTO DE MUESTREO	CÓDIGO	CEPA	TAMAÑO			FORMA				BORDE					ELEVACIÓN			TRANSPARENCIA		TEXTURA			COLOR		INDICAR COLOR	BRILLO		SUPERFICIE	
			PEQUEÑA	MEDIANA	GRANDE	CIRCULAR	FUSIFORME	RIZOIDE	FLAMENTOSA	IRREGULAR	ENTERO	RIZOIDE	LOBULADO	FLAMENTOSO	ONDULADO	PLANA	CONVEXA	ELEVADA	OPACA	TRANSPARENCIA	VISCOSA	CREMOSA	RUGOSA	NO PIGMENTADAS		PIGMENTADAS	BRILLO	SIN BRILLO	LISA
1	MC4	R2_C8	X			X				X					X			X		X			X	Crema	X		X		
		R1_C5		X		X				X					X			X		X			X	Blanco			X		
2	MC8	R1_C6		X					X					X			X		X			X	Blanco	X		X			
3	MCI2	R2_C4		X		X				X				X			X		X			X	Anaranjado intenso	X		X			
		R1_C1		X		X								X			X		X			X	Anaranjado leve	X		X			
4	MC16	R6_C9		X		X				X				X			X	X				X	Morado	X		X			
		R3_C3			X	X				X				X				X		X		X	Blanco		X				
		R2_C7			X	X				X				X			X		X			X	Amarillo leve	X		X			

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023

4.3.2. Caracterización microscópica

Las cepas aisladas se caracterizaron microscópicamente mediante tinción de Gram para describir la morfología que presentaba cada una. Dentro de la clasificación de Gram, 2 de las distintas cepas aisladas se tinturaron de color azul o morado por lo que están categorizadas como positivas y 6 cepas de color rosa, por lo tanto, corresponden a Gram negativas (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Resultado Tinción Gram de bacterias aisladas

Muestreo	Código	Cepa	Medio de cultivo	Morfología microscópica	Gram
Punto 1	MC4	R2_C8	PCA	Bacilos	-
		R1_C5	PCA	Bacilos	-
Punto 2	MC8	R1_C6	PCA	Bacilos	-
Punto 3	MC12	R2_C4	TSA	Bacilos	+
		R1_C1	TSA	Bacilos	-
Punto 4	MC16	R6_C9	PCA	Bacilo	-
		R3_C3	TSA	Cocos	+
		R2_C7	PCA	Bacilos	-

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

En la Ilustración 4-3 A, a través de la coloración de Gram de cepas provenientes de la muestra MC12_R2_C4, se observó bacterias Gram positivas, redondas. Por otro lado, en la Ilustración 3-4 B, correspondiente a MC12_R1_C1, se observó bacterias Gram-negativas, alargadas de forma bacilar y rectas.

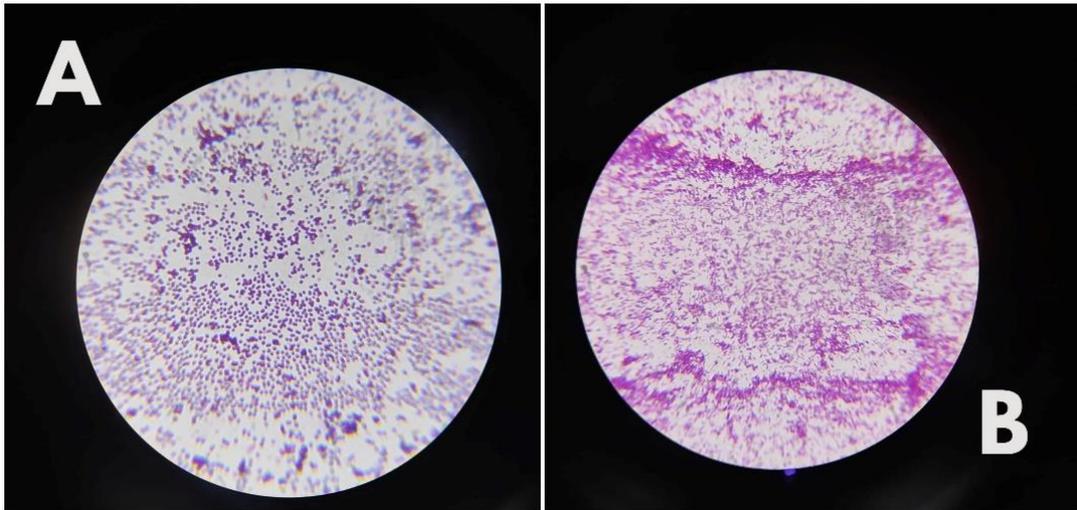


Ilustración 4-3: Observación 100x, Tinción Gram A: Coccos (+); B: Bacilos (-).

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Tabla 4-4: Caracterización microscópica y macroscópica

Tinción Gram	Morfología		Porcentaje (%)
	Bacilos	Cocos	Total
Positivas	1	1	2
Negativas	6	-	6
Total	7	1	8

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

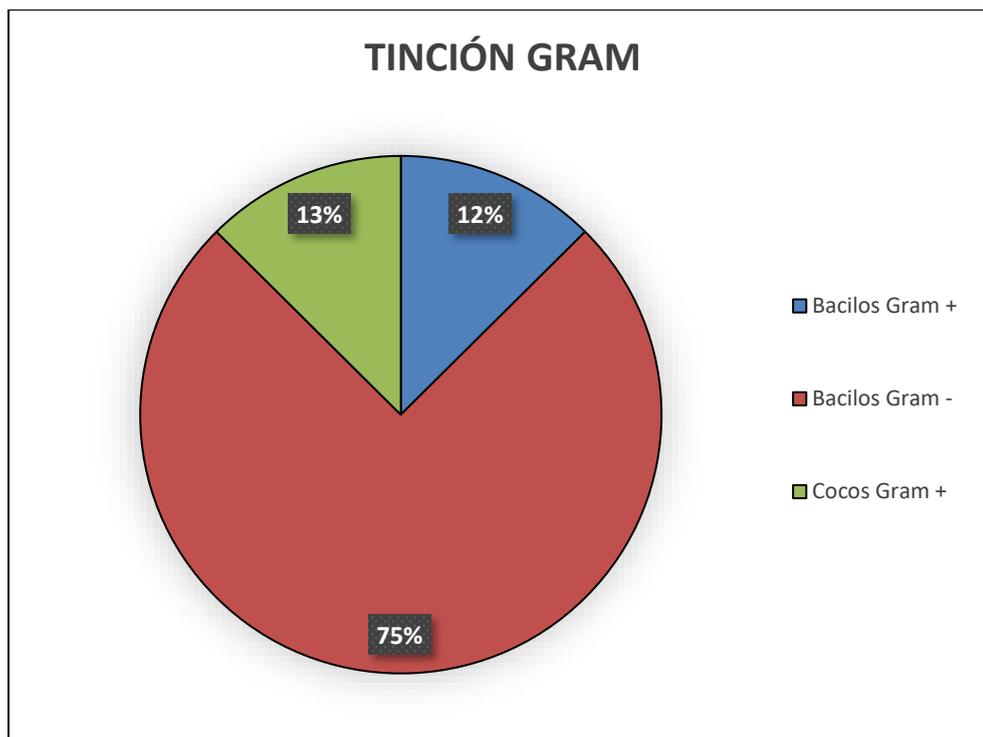


Ilustración 4-4: Porcentaje de bacterias según la tinción Gram aisladas del sedimento de la laguna de Cuicocha.

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

En la Ilustración 4-4 se observa que las cepas aisladas de la Laguna Cuicocha un 75% fueron bacilos Gram negativos y un 13% cocos Gram positivos y 12% bacilos Gram positivos. Estos resultados son similares a los reportados en la investigación realizada por Acuña (2021, p.97) en la Laguna de Quilotoa ubicada en la provincia de Cotopaxi, se identificó que el 73% corresponde a bacilos Gram negativos, el 18% cocos Gram positivos y el 9% bacilos Gram positivos. También Meneses (2013, p.33) indica que de las colonias aisladas en su estudio Bacterioplancton de tres Lagunas de alta montaña tropical andina en el Departamento de Boyacá, Colombia, los bacilos Gram negativos fueron predominantes en un 73%, 17 % bacilos Gram positivos y 10% cocos y cocobacilos Gram positivos y cocobacilos Gram negativos.

Según Hoover y Pikuta (2009, p.2) en los ambientes fríos, donde existe la presencia de nieve y hielo como en la Antártida, se han aislado en su mayoría cocos grampositivos y bacilos gramnegativos formadores de esporas, resultados que coinciden con los obtenidos en esta investigación.

La dominancia de Gram negativos según González et al. (1990, p. 72) y Vrede (1996, p. 85), citados en Meneses (2013, p. 99) se da debido a que los flagelados bacterívoros prefieren comer células más grandes, por ello se da la disminución de bacterias Gram positivas en lagunas oligotróficas.

4.4. Pruebas de resistencia a metales pesados

4.4.1. Cromo

Para determinar la resistencia de los clones aislados al cromo, se utilizó cromato de potasio (K_2CrO_4) se realizaron 6 pruebas evaluando su resistencia por triplicado. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla que se muestra a continuación.

Tabla 4-5: Pruebas de resistencia con cromo (VI)

Muestreo	Código	Cepa	Concentración (ppm)					
			10	100	1000	10000	25000	50000
Punto 1	MC4	R2_C8	X	X	X	X	X	X
		R1_C5	X	X	X	X	X	X
Punto 2	MC8	R1_C6	X	X	X	X	X	X
Punto 3	MC12	R2_C4	X	X	X	X	X	X
		R1_C1	X	X	X	X	X	X
Punto 4	MC16	R6_C9	X	X	X	X	X	-
		R3_C3	X	X	X	X	-	-
		R2_C7	X	X	X	X	X	X

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Del total de las 8 cepas todas resistieron la concentración inicial de 10 ppm. Las cepas bacterianas resistentes a altas concentraciones de cromato de potasio fueron aquellas que toleraron una concentración de 50000 ppm, fueron 6 entre ellas: MC4_R2_C8, MC4_R1_C5, MC8_R1_C6, MC12_R2_C4, MC12_R1_C1 y MC16_R2_C7 (Ilustración 4-5).



Ilustración 4-5: Pruebas de resistencia con Cr a concentración de 50000 ppm Muestra MC12_R1_C1

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023

Se conoce que no existe un rango específico de concentración para considerar a un organismo "metalófilo", ya que esto depende del tipo de metal y del organismo estudiado. Sin embargo, se considera que un organismo es capaz de crecer en ambientes con concentraciones de metales más altas que las que serían tóxicas para la mayoría de los organismos.

A continuación, se muestran algunas especies de bacterias resistentes a concentraciones de cromo hexavalente y las concentraciones que han demostrado tolerar:

Tabla 4-6: Bacterias resistentes a altas concentraciones de cromo (VI)

Especie bacteriana	Concentración de Cr (VI) tolerada	Fuente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hasta 800 ppm	Padmapriya, et al. (2018)
<i>Bacillus subtilis</i>	Hasta 1000 ppm	Chen, L., et al. (2015)
<i>Serratia marcescens</i>	Hasta 600 ppm	Cha, Cooksey, y Hwang (2017)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Hasta 2000 ppm	Mondal, Bhattacharya, y Datta (2017)
<i>Rhodococcus opacus</i>	Hasta 2000 ppm	Srinivasan, Selvam, y Philip, (2018)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Hasta 500 ppm	Li, et al. (2019)

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Se puede observar que las concentraciones a las cuales se ha demostrado la tolerancia al cromo (VI) en estudios previos con bacterias ya estudiadas son inferiores a las obtenidas en el presente

Proyecto de Investigación. Por lo tanto, se puede concluir que los clones aislados en este estudio son metalófilos, es decir, son capaces de tolerar altas concentraciones de Cr (VI).

Los resultados obtenidos en este Proyecto de Investigación con respecto a la resistencia a Cr tienen similitud a los obtenidos por Rodríguez (2017, p.51) en un estudio de resistencia a metales de muestras de agua residual de las trampas de grasas de los talleres de Municipio de Riobamba y estación de combustible de la ESPOCH evaluaron la resistencia a cromo (en concentraciones desde 100 a 4000 ppm), observándose una mayor resistencia de los clones obtenidos en este Proyecto de Investigación ya que se llegó hasta una concentración de 50000 ppm. La resistencia bacteriana observada podría atribuirse a que los clones pueden tener sistemas enzimáticos capaces de reducir el cromo hasta una forma menos tóxica.

Según Vásquez, et al. (2014, p. 65) en su investigación aislaron e identificaron microorganismos en lodos residuales de curtiembre capaces de tolerar concentraciones muy altas (330ppm). Por otra parte, en otras investigaciones se ha reportado crecimiento en cepas aisladas con concentración relativamente bajas (30 ppm) (Guatibonza, y Torrijos, 2018, p. 36).

En la investigación realizada por Salgado (2018, p. 62), los clones se adaptaron de mejor manera a concentraciones de 100, 200, 400 µg/ml, sin embargo, mostraron una inhibición de crecimiento en más de la mitad de la población a una concentración de 600 µg/ml.

Al comparar los resultados de tolerancia a Cr obtenidos en este estudio con los reportados por Paniagua, et al. (2003, p. 86) y Moraga, Merino, y Mondaca (2003, p. 59), se observa que nuestros clones presentan mayor tolerancia a Cr puesto que resistieron hasta 50000 ppm. Por su parte los clones evaluados por Paniagua, et al. (2003, pp. 19-20), con un nivel de tolerancia de hasta 750 µg/ml. Mientras que, según Moraga, Merino, y Mondaca (2003, p. 92), realizó ensayos de resistencia a Cr utilizando agar PCA suplementado con dicromato de potasio a diferentes concentraciones alcanzando una concentración máxima de 1600 µg/ml.

Las diferencias entre el nivel de tolerancia pueden deberse a distintos factores relacionados con las condiciones ambientales donde habitan los clones como: temperatura, pH, concentración del metal, etc., ya que estos les confieren características específicas a las bacterias.

En esta investigación como control de viabilidad del medio se inocularon los clones aislados en medio TSA y PCA sin suplementación de Cr (VI). Por otra parte, también se realizaron pruebas de resistencia a Cr (VI) con bacterias conocidas, es decir, con estudios previos, de modo que fueron utilizadas como muestras control.

Para el primer control se utilizó *Escherichia Coli* en medio TSA y PCA suplementado con Cr (VI) bajo las mismas condiciones, obteniendo crecimiento a concentración hasta 1000 ppm en PCA y 100 ppm en TSA (Tabla 4-7) (Ilustración 4-6). Según Azario, et al. (2010, pp.52-54) el efecto del cromo hexavalente en el crecimiento de *Escherichia coli* a bajas concentraciones de cromo hexavalente (0,05-5 ppm) no hubo efecto sobre el crecimiento de *Escherichia coli* sin embargo, a altas concentraciones de cromo VI (25-200 ppm) causó disminución del crecimiento bacteriano.

Tabla 4-7: Pruebas de resistencia con Cr (VI) en *Escherichia coli*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)					
		10	100	1000	10000	25000	50000
<i>Escherichia coli</i>	TSA	X	X	-	-	-	-
	PCA	X	X	X	-	-	-

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023

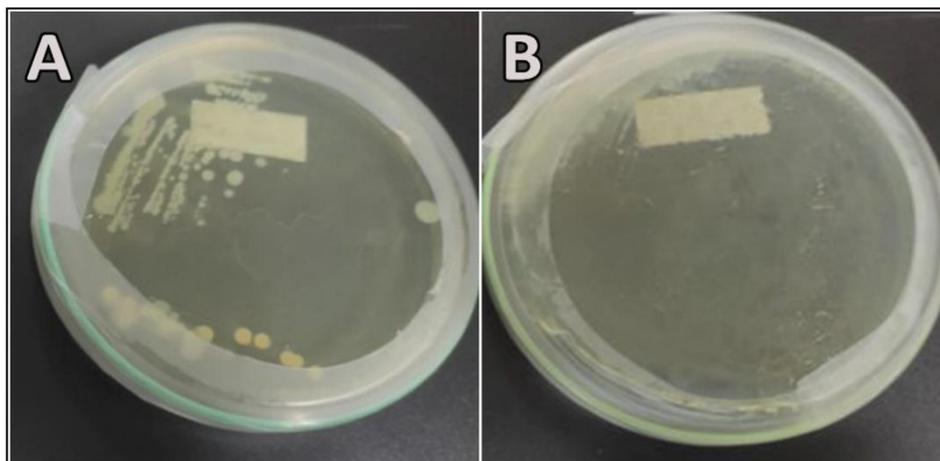


Ilustración 4-6: Pruebas de resistencia con Cr a concentración de 100 y 1000 ppm A: *E. coli* en TSA; B: *E. coli* en PCA

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

De manera similar, estos resultados concuerdan con Abskharon, et al. (2008, p. 68) en su investigación aislaron 12 cepas de *E. coli* de sitios de aguas residuales en la ciudad de Asiut, Egipto y determinaron su resistencia a metales pesados (Cd, Cr, Pb, Co, Cu, Ni y Zn) a concentraciones de 0,09–12 mM. Los resultados indicaron que la mayoría de las cepas aisladas crecieron de manera óptima a bajas concentraciones de metales pesados y los números disminuyeron gradualmente a medida que incrementaba la concentración.

Los resultados obtenidos en este ensayo con *Escherichia coli* con respecto a la resistencia a Cr son similares a los obtenidos por Mohamed, et al. (2020, p. 79), puesto que en este estudio, un

aislado de *E. coli* (FACU) pudo tolerar el cromato a 100 µg/ml después de 24 h, por ello estos resultados sugirieron que el aislado FACU es capaz de reducir Cr (VI).

Según Beltrán, y Gómez (2016, p.188) los determinantes genéticos que codifican proteínas implicadas en los mecanismos de resistencia a los metales se localizan en cromosomas bacterianos, en elementos móviles como plásmidos y transposones, o ambos. Los plásmidos que confieren resistencia a metales tienen gran especificidad, hasta el momento se han descrito genes de resistencia a plata (Ag), arsénico (Ar), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb), antimonio (Sb) y cinc (Zn) localizados en grandes plásmidos (165-200 kb).

Por otro lado, se ha evaluado la resistencia de *E. coli* en otros metales, según un estudio realizado por Chávez, et al. (2007, pp.114-117) 48 cepas de *Escherichia coli* aislada de un paciente adulto con síndrome diarreico en la ciudad de Puebla. Los resultados mostraron que todas las cepas fueron resistentes a los metales pesados Fe, Mo, V, Cu, Ni y Pb en concentraciones de 1000 ppm y 2000 ppm. También Vijayadeep, y Sastry (2014, p. 125) evaluó el efecto de la captación de metales pesados (Zn, Cu, Cd y Hg) en *E. coli* y *Bacillus sp*, considerando concentraciones de 1-5 ppm entre los resultados se reportó que *E. coli* tiene una mayor tasa de tolerancia en comparación con *Bacillus* ya que es un buen biosorbente para metales como Zn, Cu y Hg, mientras que *Bacillus* puede ser un biosorbente de elección contra la toxicidad por Cd.

En otro estudio realizado por Panigatti, et al. (2012, p. 95) se evaluó la tolerancia de *Escherichia coli* a concentraciones de cromo hexavalente de hasta 200 ppm. Además, se comprobó la adaptación de las cepas a la biorreducción de metales pesados como mecanismo de desintoxicación.

En la actualidad gracias a la bioinformática se ha logrado identificar los genes asociados a la resistencia de Cr (VI) según Menchaca (2015, p. 27) entre los genes representativos de los diversos mecanismos implicados en la resistencia a Cr(VI), se incluye a *yieF* (*Escherichia coli*; GI:388479524).

Para el segundo control se utilizó *Pseudomona aeruginosa* en medio TSA y PCA suplementado con Cr (VI) bajo las mismas condiciones, obteniendo crecimiento a concentración hasta 1000 ppm en TSA y 100 ppm en PCA (Tabla 4-8) (Ilustración 4-7). De igual manera para el control de viabilidad del medio se inocularon las bacterias aisladas en medio TSA y PCA sin suplementación de Cr (VI).

Tabla 4-8: Pruebas de resistencia con Cr (VI) en *Pseudomona aeruginosa*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)					
		10	100	1000	10000	25000	50000
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	TSA	X	X	X	-	-	-
	PCA	X	X	-	-	-	-

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

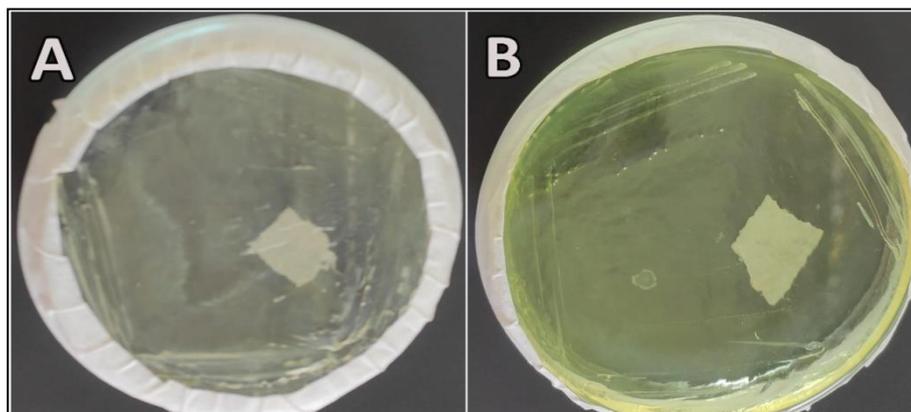


Ilustración 4-7: Pruebas de resistencia con Cr a concentración de 1000 y 100 ppm A: *Pseudomona aeruginosa* en TSA; B: *Pseudomona aeruginosa* en PCA

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Pseudomonas aeruginosa se clasifica como una bacteria Gram-negativa, gammaproteobacteriana y aeróbica perteneciente al género *Pseudomonadaceae*, resistente a algunos metales pesados como cobre, cromo, cadmio y níquel (Awasthi, et al., 2015, p. 82).

En varias investigaciones se ha reportado que *Pseudomonas aeruginosa* exhibe una captación eficiente de metales, y se ha observado la liosorción de iones de cadmio (II) y plomo (II) de la solución en células liofilizadas bajo diversas condiciones usando células de *P. aeruginosa* PAO1 (Konig-Péter, et al., 2014, p. 72).

Los resultados obtenidos en los ensayos con *P. aeruginosa* con respecto a la resistencia a Cr son similares a los obtenidos por Haroun, et al. (2017, p. 65), puesto que en su investigación las cepas de esta bacteria se sometieron a concentraciones milimolares variadas (1, 2, 5, 10, 20, 30 y 50 mM) de diferentes iones metálicos entre ellos dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$, en sus resultados se reportó crecimiento a una concentración de 10 mM, sin embargo el crecimiento fue completamente inhibido a 20 mM. Tampoco se observó crecimiento a 30 mM ni a concentraciones de 50 mM.

En la investigación de Oves, Khan, y Zaidi (2013, pp. 73-75) se determinó que la cepa OSG41 de *Pseudomonas aeruginosa*, tolera el cromo hasta la concentración de 1800 µg/ml y lo redujo en un 100 % a determinadas condiciones.

Según Abdul-Sada (2009, pp. 53-55) esta bacteria tiene tres posibles mecanismos de resistencia a metales pesados, en primer lugar, la acumulación de iones específicos puede disminuir, no por la interferencia con la captación sino por el uso de la extrusión activa de iones de metales pesados de las células y este mecanismo solo es específico para *Pseudomonas aeruginosa*. En segundo lugar, los cationes, especialmente los "amantes del azufre", pueden segregarse en compuestos complejos mediante moléculas que contienen tiol y luego expulsarse de la célula. En tercer lugar, algunos iones metálicos también pueden reducirse a un estado oxidativo menos tóxico por el complejo enzimas y mecanismos especiales de oxidación en las células.

Se conoce que los plásmidos son los que confieren resistencia a las bacterias, lo cual les permite tolerar concentraciones altas de antibióticos, metales pesados tóxicos, etc. En el estudio de Raja, y Selvam (2009, p. 260-262) el plásmido de ADN que se aisló de *P. aeruginosa* BC15 se designó como pBC15. El tamaño de este plásmido fue de aproximadamente 23 kb. A su vez, diversos estudios de experimentos de acumulación y resistencia a metales pesados concluyeron que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de resistir a metales pesados porque porta genes y tiene plásmidos que juegan un papel importante en la resistencia a metales pesados, lo que le confiere aplicaciones de biorremediación y bioacumulación de metales pesados en el futuro (Elgamal, Ahmed, y Abdelbary, 2018, p. 58).

Otros autores, Collard et al. (1994, p. 68) citados en Raja, y Selvam (2009, p. 18), manifiestan que algunos determinantes de resistencia a metales pesados se mueven del plásmido al cromosoma (o en la dirección inversa). Por lo tanto, los plásmidos que codifican la resistencia a los metales pesados son un aspecto importante de la investigación ambiental.

En este sentido, durante las investigaciones realizadas por Ramírez, et al. (2008, p. 58) se determinó que la salida de cromato transmembrana es un mecanismo de resistencia que involucra a la proteína ChrA, que funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa iones cromato citoplasmático siguiendo las fuerzas de protones y es inhibida por iones sulfato. Este mecanismo de resistencia ha sido descrito en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, se han identificado genes representativos relacionados con la resistencia de Cr (VI) como *mucD* para *Pseudomonas aeruginosa* (Menchaca, 2015, p. 27).

4.4.2. Cadmio

Para determinar la resistencia de los clones aislados al cadmio, se utilizó cloruro de cadmio ($CdCl_2$) realizaron 6 pruebas evaluando su resistencia por triplicado. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla que se muestra a continuación.

Tabla 4-9: Pruebas de resistencia con cadmio

Muestreo	Código	Cepa	Concentración (ppm)					
			10	100	1000	10000	25000	50000
Punto 1	MC4	R2_C8	X	X	X	X	X	X
		R1_C5	X	X	X	X	X	X
Punto 2	MC8	R1_C6	X	X	X	X	X	X
Punto 3	MC12	R2_C4	X	X	X	X	X	X
		R1_C1	X	X	X	X	X	-
Punto 4	MC16	R6_C9	X	X	X	X	X	-
		R3_C3	X	X	X	X	-	-
		R2_C7	X	X	X	X	X	X

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Todas las cepas bacterianas resistieron la concentración inicial (10 ppm) de cloruro de cadmio. Las cepas bacterianas resistentes a altas concentraciones de cloruro de cadmio fueron aquellas que toleraron una concentración de 50000 ppm, fueron 5 entre ellas: MC4_R2_C8, MC4_R1_C5, MC8_R1_C6, MC12_R2_C4 y MC16_R2_C7 (Ilustración 4-8).



Ilustración 4-8: Pruebas de resistencia con Cd concentración de 50000 ppm muestra MC16_R2_C7

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

La capacidad de resistencia al cadmio de las bacterias que ya han sido estudiadas puede variar en función de las condiciones ambientales (pH, presencia de otros compuestos y disponibilidad de nutrientes). Asimismo, cabe señalar que existen otras especies bacterianas que poseen resistencia al cadmio, pero que aún no han sido objeto de investigación.

A continuación, se presentan bacterias que tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones de cadmio en su entorno y que podrían ser utilizadas en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminados con este metal pesado.

Tabla 4-10: Bacterias resistentes a altas concentraciones de cadmio

Especie bacteriana	Concentración de Cd tolerada	Fuente
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Hasta 1000 ppm	Nies, et al. (1989)
<i>Micrococcus sp.</i>	Hasta 1000 ppm	Wang, et al. (2015)
<i>Pseudomonas putida</i>	Hasta 1000 ppm	Meng, et al. (2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hasta 800 ppm	Cha, Cooksey, y Hwang (2017)
<i>Bacillus cereus</i>	Hasta 500 ppm	Wang, et al. (2020)
<i>Escherichia coli</i>	Hasta 400 ppm	Satarug, et al. (2010)

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Se puede notar que las concentraciones de cadmio a las cuales se ha comprobado la resistencia en bacterias ya investigadas en estudios anteriores son menores en comparación con las concentraciones alcanzadas en este Proyecto de Investigación. Por ende, se puede inferir que los clones aislados durante este estudio son metalófilos, lo que significa que pueden sobrevivir en concentraciones elevadas de este metal.

Los resultados obtenidos en el estudio denominado “Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a metales pesados obtenidas de ambientes contaminados con derivados de hidrocarburos en la ciudad de Riobamba” son inferiores a los identificados en el presente estudio ya que Rodríguez (2017, p. 52) evaluó la resistencia a cadmio en dos medios (TSA y M9 en concentraciones desde 100 a 1500 ppm), obteniendo una mayor mortalidad para los clones en medio M9 (hasta los 100 ppm) mientras que en medio TSA mayor resistencia de los clones (hasta 1500 ppm). Sin embargo, en esta investigación los clones demostraron resistencia hasta una concentración de 50000 ppm en ambos medios (TSA y PCA). De manera que los clones aislados de la Laguna Cuicocha son más resistentes a concentraciones muy altas.

De igual manera, los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Dupontt, et al. (2001, p. 23) quienes encontraron bacterias resistentes a 50 a 1000 ppm. Por su parte, Rahman, et al. (2021, p. 61) reportó en su investigación el crecimiento de ocho aislamientos bajo altas concentraciones de metal (100 ppm, 200 ppm, 500 ppm y 800 ppm), como resultados se reportó que en más de la mitad de las muestras evaluadas se obtuvo crecimiento en medio suplementado con sulfato de cadmio, hasta una concentración de 500 ppm, excepto C7 y C8, donde se denotó ausencia de crecimiento.

Moraga, Merino, y Mondaca (2003, pp. 91-93) en su estudio aislaron clones de las aguas de la Bahía de Iquique, los cuales mostraron un valor de tolerancia máxima de 400 µg/ml para Cd. Por su parte Salgado (2018, p. 63) reportó en sus pruebas de resistencia a cadmio, los clones alcanzan una resistencia hasta la concentración de 1000 µg/ml, sin embargo, cuando se incrementa la concentración hasta 2000 µg/ml no se obtiene ningún crecimiento. Al comparar estos resultados con los obtenidos en nuestro Proyecto de Investigación los valores de tolerancia obtenidos para Cd corresponden a valores mayores, debido a que los clones bacterianos crecieron en concentración de hasta 50000 ppm.

De igual manera se realizaron muestras control con *Escherichia Coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia para *Escherichia Coli* en medio TSA y PCA suplementado con Cd bajo las mismas condiciones, se obtuvo crecimiento a concentración de hasta 100 ppm (Tabla 4-11) (Ilustración 4-9).

Tabla 4-11: Pruebas de resistencia con Cd en *Escherichia coli*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)					
		10	100	1000	10000	25000	50000
<i>Escherichia coli</i>	TSA	X	X	-	-	-	-
	PCA	X	X	-	-	-	-

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023

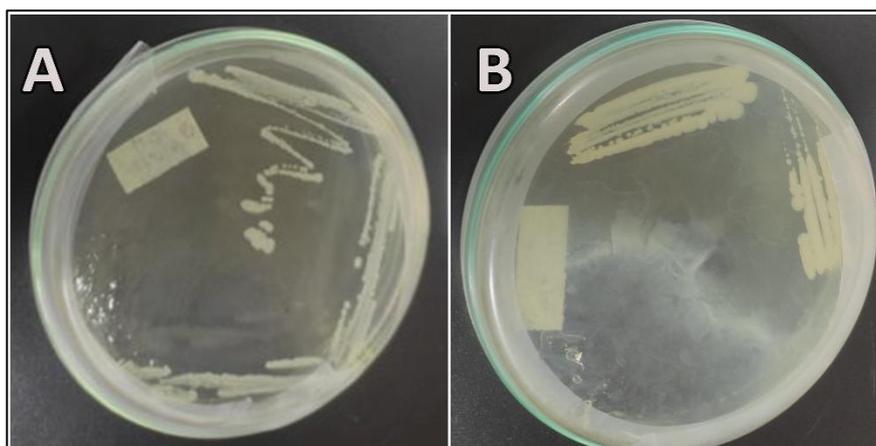


Ilustración 4-9: Pruebas de resistencia con Cd a concentración de 100 ppm A: *E. coli* en TSA; B: *E. coli* en PCA

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Los resultados reportados en nuestra investigación tienen similitud a los obtenidos en el estudio de Azario (2014, p. 80), en donde se determinó que *Escherichia coli* puede tolerar concentraciones muy elevadas de cromo (VI) como 200 ppm mientras que, en presencia tanto de una concentración del tóxico muy baja (0,25 ppm) no modifica el crecimiento bacteriano como en presencia de una concentración de cromo similar a la encontrada en ciertos efluentes industriales (25 ppm) que inhibe el crecimiento bacteriano en *Escherichia coli* no adaptadas.

En el estudio de Hossain, Mallick, y Kumar (2012, p. 55) se descubrió que el cadmio inhibe el crecimiento de la cepa *E. coli* puesto que el cadmio a 0,3 mM inhibe el crecimiento bacteriano en más del 50 %, mientras que finalizaba por completo a 0,6 mM cuando se añadía CdCl₂.

De igual manera se ha determinado la resistencia de *E. coli* a otros metales, en su investigación Chávez, et al. (2007, pp. 115-117) evaluaron la resistencia a metales pesados (Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg y V) esta bacteria fue resistente a 1000 ppm y 2000 ppm de cada uno de los metales.

Otros estudios realizados con enterobacterias aisladas de aguas contaminadas, han demostrado que estos microorganismos adquieren tolerancia al cobre, plata, cobalto, cromo, cadmio, mercurio, plomo, estaño y zinc, en estos aislamientos se ha identificado un mismo plásmido en común (>20 kb), de modo que se puede considerar como un posible factor que les confiere la tolerancia en medios extremos (Rivera, et al., 2006, p. 113).

Por su parte, hay estudios en donde se identifica el complejo proteínico CzcABC, como encargado de otorgar la resistencia a cobalto, zinc y cadmio en *Alcaligenes eutrophus* mediante flujo de cationes, esto ha sido investigado en *E. coli* usando vesículas de membrana, obteniendo como resultado en las mutantes de *E. coli* EC351, una alta resistencia a cobalto y cadmio. El mecanismo

funciona de la siguiente manera, en un principio ambos metales (Co y Cd) son acumulados y posteriormente eliminados a través del flujo de cationes de la misma forma que lo realiza *Alcaligenes eutrophus*, y mostrando, las mutantes, un complejo proteínico Czc-dependiente, pero con una pequeña diferencia, ya que este complejo CzcABC en *E. coli* es un antiportador de protones de zinc (Nies, 1995, pp. 2708-2011).

Finalmente, los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia para *Pseudomona aeruginosa* en medio TSA y PCA suplementado con Cd bajo las mismas condiciones, se obtuvo crecimiento a concentración de hasta 100 ppm (Tabla 4-12) (Ilustración 4-10).

Tabla 4-12: Pruebas de resistencia con Cd en *Pseudomona Aeruginosa*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)					
		10	100	1000	10000	25000	50000
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	TSA	X	X	-	-	-	-
	PCA	X	X	-	-	-	-

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

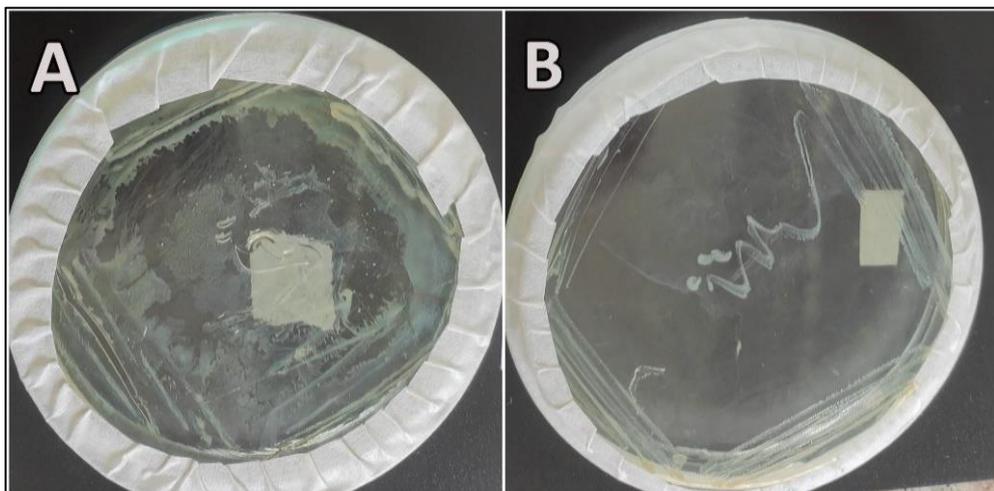


Ilustración 4-10: Pruebas de resistencia con Cd a concentración de 100 ppm A:

Pseudomona aeruginosa en TSA; B: *Pseudomona aeruginosa* en PCA

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Existen varios estudios en donde se ha aislado *P. aeruginosa* de diferentes regiones ambientales y se ha determinado su capacidad como bacteria resistente a Cd.

Abdelbary, Elgamal, y Farrag (2019, p. 25) consideran que *Pseudomonas aeruginosa* tiene gran capacidad para resistir y acumular iones metálicos como HgCl, MgSO₄, Zn₂O₃, MgCO₃, CuCl₂ y CdCl₂.

En la investigación realizada por Imron, et al. (2021, p. 52) se determinó la resistencia de bacterias aisladas de lixiviados a metales pesados por *Pseudomonas aeruginosa* cepa FZ-2, reportando como resultado que para *P. aeruginosa*, la tolerancia fue > 20 ppm para Cd. De igual manera, en el estudio de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados que viven alrededor de los jales El Fraile se determinó la tolerancia a Cd²⁺ 2 mM (224.82 ppm) de 141 cepas de agua, lixiviados, suelo, rizosfera y tallos de plantas, entre los géneros identificados se encontró *Pseudomonas sp* (Santana, Sánchez, y Romero, 2019, pp. 70-72).

Por otro lado, Chakraborty, y Das (2014, p. 14200) aislaron e identificaron cepas de *P. aeruginosa* JP-11 suplementado con varias concentraciones de CdCl₂ (500, 1000 y 2500 ppm) reportando la concentración de resistencia más alta de 1000 ppm.

Comparando los resultados obtenidos en este estudio se tienen valores menores esto se debe al tipo de cepa utilizada y de igual forma al medio de cultivo como las condiciones a las que fueron sometidas las bacterias.

De igual manera Moraga, Merino, y Mondaca (2003, p. 37) estudiaron la resistencia a metales pesados como Cd en bacterias aisladas de la bahía de Iquique, obteniendo como resultados que todas las cepas identificadas fueron bacterias Gram negativas no fermentadoras, principalmente de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*.

Según Awasthi, et al. (2015, p. 78) *Pseudomonas aeruginosa* tiene una alta capacidad de biorremediación para la contaminación por metales pesados, evitando que estos dañen el suelo y la biota que los tolera.

Estudios han demostrado que esta bacteria es capaz de remediar estanques de desechos con bajas concentraciones de cobre (Cu), fue capaz de eliminar el 30 % del cobre de un medio que contenía 160 ppm de cobre (Baltazar, et al., 2014, p. 47). Asimismo, se ha reportado la eliminación de arsénico (As) de las aguas subterráneas hasta en un 60 % al reducir las concentraciones de 1,0 mg/L a 0,4 mg/L (Pellizzari, et al., 2015, pp. 2-4).

La presencia de altas concentraciones de metales pesados en ecosistemas naturales o antropogénicos representa una presión selectiva permanente, recalcitrante y ampliamente distribuida, con importancia medioambiental, que ha contribuido al surgimiento y dispersión de nuevos genotipos microbianos que determinan la resistencia a metales (Marrero, Díaz, y Coto, 2010, p. 88).

Pseudomona aeruginosa tiene gran importancia en el ciclo de nutrientes por su capacidad para adaptarse rápidamente a los entornos hostiles, como los contaminados por metales pesados, según esta tendencia se debe al desarrollo de nuevas vías enzimáticas que contribuyen a esta resistencia y adaptabilidad a metales pesados. El plásmido que contiene el gen *cadA* codifica para una ATPasa específica para Cd en varios géneros bacterianos como *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp* (Beltrán, y Gómez, 2016, p. 47).

Otros autores han identificado un grupo de genes, *czr*, implicados en la resistencia al cadmio y al zinc en *Pseudomonas aeruginosa*. Según Hassan, *et al.* (1999, pp. 419-424) identificaron cinco genes, *czrSRCBA*, implicados en la resistencia a Zn y Cd.

En definitiva, estos resultados demostraron que los clones de ambos medios (TSA y PCA) poseen una excelente adaptación a la presencia de los metales pesados Cd y Cr, lo cual posiblemente se debe a la alta disponibilidad de nutrientes presentes en estos medios.

4.5. Prueba de resistencia a concentraciones halófilas

Para establecer la resistencia de los clones aislados a concentraciones halófilas, se utilizó cloruro de sodio (*NaCl*) se realizaron 5 pruebas evaluando su resistencia por triplicado. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla que se muestra a continuación.

Tabla 4-13: Pruebas de resistencia a concentraciones halófilas

Muestreo	Código	Cepa	Concentración (ppm)				
			10	100	1000	10 000	100 000
Punto 1	MC4	R2_C8	X	X	X	X	X
		R1_C5	X	X	X	X	X
Punto 2	MC8	R1_C6	X	X	X	X	X
Punto 3	MC12	R2_C4	X	X	X	X	X
		R1_C1	X	X	X	X	X
Punto 4	MC16	R6_C9	X	X	X	X	X
		R3_C3	X	X	X	X	X
		R2_C7	X	X	X	X	X

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Del total de las 8 cepas todas resistieron la concentración máxima de cloruro de sodio (*NaCl*), por lo tanto, todas las cepas bacterianas son resistentes a altas concentraciones halófilas,

MC4_R2_C8, MC4_R1_C5, MC8_R1_C6, MC12_R2_C4, MC12_R1_C1, MC12_R6_C9, MC12_R3_C3, MC16_R2_C7 (Ilustración 4-11).

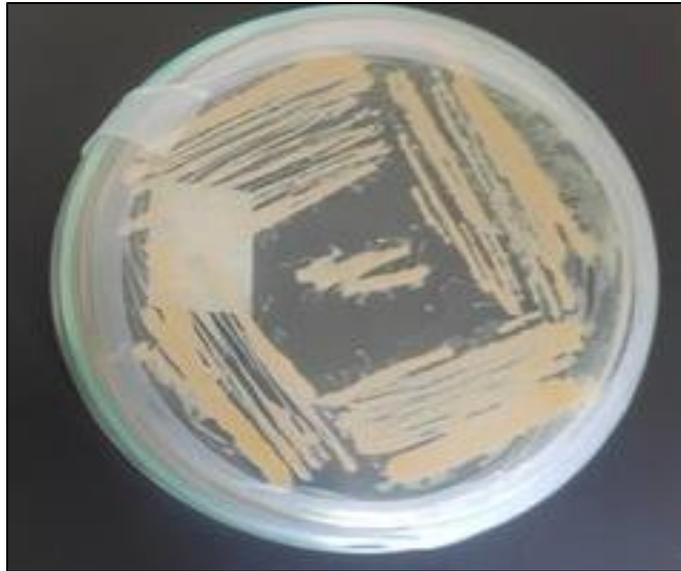


Ilustración 4-11: Pruebas de resistencia a NaCl concentración de 100000 ppm muestra MC12_R2_C4

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Según Kushner (1968, p. 59) los halófilos se clasifican en tres categorías diferentes: leves (1-3%); moderado (3-15%); y extremo (15-30%) de acuerdo con esta clasificación, los clones aislados de la Laguna Cuicocha son halófilos moderados.

En el estudio “Identificación de bacterias halófilas tolerantes a metales pesados” de suelo salino del Lago de Texcoco se aislaron y caracterizaron 75 cepas halófilas que mostraron crecimiento en concentraciones de 3-10% NaCl (p/v). Se identificaron las especies: *Salinicoccus roseus*, *Halomonas pantelleriensis*, *Nocardiopsis xinjiangensis* y *Nocardiopsis salina* por su capacidad de tolerancia a diferentes metales (Rosas, 2017, p. 78).

Por otra parte García Horstmann (2021, p. 105) en su investigación aisló muestras de sal y plantas de Castilla- La Mancha y evaluó su tolerancia a concentraciones de 3 al 25% de NaCl. A partir de las cuales, identificó 34 halófilos extremos.

En el estudio denominado “Caracterización de cepas bacterianas halófilas, inmovilización y evaluación de la capacidad de remoción de Cu (II) y Cd (II)” aisladas de piedras de cuarzo provenientes de terrenos áridos-salinos del distrito de Uchumayo de Arequipa se evaluó la resistencia de las cepas a distintas concentraciones (0.7-12% de NaCl) y entre los resultados

obtenidos se reportó un mejor crecimiento al 5% y 7% de salinidad en el medio, esta fue la concentración de sales o porcentaje en el cual las bacterias desarrollaron un crecimiento alto y significativo. Estos resultados son similares a los reportados en la presente investigación puesto que las cepas aisladas resistieron 100000 ppm (10%) en medio TSA y PCA. Sin embargo, la tolerancia reportada por Flores, Zavaleta, y Chávez (2010, p. 85) fue mayor, puesto que lograron identificar bacterias halotolerantes extremas, en su investigación reportaron el crecimiento de doce aislados capaces de tolerar concentraciones salinas entre 0 y 25%. Asimismo Cruz (2021, p. 115) aisló cepas bacterianas halófilas moderadas capaces de crecer óptimamente en 20% de NaCl a partir de las muestras de las lagunas-salinas de las Salinas del Marqués. Estas diferencias pueden deberse al medio de cultivo que se utilizó, así como también la temperatura a la cual fueron cultivados.

Según Corral, Amoozegar, y Ventosa (2019, p. 207) las características generales de los microorganismos halófilos son los bajos requerimientos nutricionales y la resistencia a altas concentraciones de sal con la capacidad de equilibrar la presión osmótica del ambiente.

En este contexto, en su investigación Valdez (2014, p. 52) logró obtener un consorcio de microorganismos halófilos (halotolerantes y halófilos débiles) a partir de agua de mar, identificando de que se trata de bacterias del tipo *Vibrio spp* y *Proteus spp*.

Según manifiestan Fernández, Zavaleta, y Arahall (2007, p. 60) en su investigación aislaron bacterias halófilas moderadas procedentes de las minas salinas de Atacocha-Ayacucho con tolerancia a concentraciones de hasta el 15% de NaCl.

Por otro lado, Borda, Calle, y Valdivia (2017, p. 49) en su investigación lograron aislar e identificar 14 cepas bacterianas, entre halófilas y halotolerantes, que presentan actividad antimicrobiana de las 71 cepas que fueron aisladas de la Laguna Chairkota en Potosí, Bolivia.

Recientes investigaciones como la realizada por Luque, et al. (2010, p. 459), describen especies halotolerantes asociadas al género *Halomonas*, en su investigación de un total de 365 cepas seleccionadas de las muestras (agua, suelo y sedimento) de Rambla Salada, 164 pertenecen a este género; por tanto llegaron a la conclusión que este es el microorganismo quimioheterótrofo aerobio cultivable que predomina en Rambla Salada.

Otras investigaciones se enfocan en la importancia de estos microorganismos halófilos a nivel biotecnológico, según manifiestan Alcarraz, y Vásquez (2014, p.13) los microorganismos aislados de suelos costeros y evaluados, alrededor del 30% muestran alguna actividad enzimática, es decir

pueden ser aprovechables para la biorremediación industrial, principalmente la industria de la curtiembre. Asimismo, Campaña, et al. (2008, p. 75) lograron aislar cepas halófilas de suelos salinos con capacidad de secretar enzimas hidrolasas del tipo amilasa, proteasa, inulinasa, xilanasas, etc. En este contexto, los extremófilos como los resistentes a altas concentraciones de salinidad son una opción atractiva que podría utilizar en diversas aplicaciones biotecnológicas industriales. Por lo tanto, la aplicación de extremófilos es importante en el desarrollo de nuevas moléculas con potenciales aplicaciones biomédicas. Los esfuerzos actuales se centran en abordar las necesidades de salud urgentes, en particular las de las principales amenazas mundiales, el cáncer y la resistencia a los antibióticos (Charlesworth, y Burns, 2015, pp. 147-50).

Por otra parte, hay estudios de hongos halotolerantes y halófilos que habitan en ambientes hipersalinos naturales no requieren estrictamente sal, puesto que pueden crecer y adaptarse a todo el rango de salinidad. Entre la microbiota identificada se tiene *Aspergillus*, *Penicillium* y otros géneros, como *Alternaria*., *Cladosporium*, *Fusarium*, *Debaryomyces*, *Scopulariopsis*, *Chaetomium*, *Wallemia* y *Hortaea* (Moubasher, Abdel-Sater, y Soliman, 2017; Plemenitas, et al., 2008, pp. 182-185).

En este apartado también se realizaron muestras control con *Escherichia Coli* (Ilustración 4-12) y *Pseudomona aeruginosa* (Ilustración 4-13). Los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia para *Escherichia Coli* en medio TSA y PCA suplementado con NaCl, se obtuvo crecimiento a concentración de hasta 10000 ppm (Tabla 4-14).

Tabla 4-14: Pruebas de resistencia con NaCl en *Escherichia coli*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)				
		10	100	1000	10000	100000
<i>Escherichia coli</i>	TSA	X	X	X	X	-
	PCA	X	X	X	X	-

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.



Ilustración 4-12: Pruebas de resistencia a NaCl con *E. coli* a concentración de 10000 ppm

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Los resultados en el presente estudio, concuerdan con los datos de la literatura de Omotoyinbo, y Omotoyinbo (2017, p. 33), donde los niveles de tolerancia de NaCl fueron de hasta 3% (p/v), se observó un crecimiento óptimo de *E. coli*. Sin embargo, un aumento en las concentraciones de NaCl por encima de 1,0 y 3,0% disminuyó el crecimiento a 37°C.

Según Ravishankar, y Juneja (2014, p. 131), las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, como *E. coli* y *Salmonella*, no toleran altos niveles de sal. No obstante ciertas cepas de *E. coli* son halotolerantes y pueden sobrevivir y crecer en altas concentraciones de sal (Zambonelli, 1992, p. 180). *Escherichia coli*, comúnmente crece en medios sin sal, sin embargo, puede resistir pequeñas cantidades de sal (0-4 %) (Stanier et al.1992 citado en Valdez, 2014, p. 24).

La alta fuerza osmótica se debe a la producción de prolina en las células (Ravishankar, y Juneja, 2014, p. 131). Varios estudios han reportado la acumulación de prolina en tejidos vegetales bajo condiciones de estrés hídrico. De manera similar, existen estudios de especies adaptadas a entornos con limitaciones de agua y se ha demostrado que estas especies de plantas no solo producen sino que también acumulan más prolina cuando las condiciones ambientales son extremadamente favorables para el estrés hídrico (Sánchez, 2020, p. 85).

En este contexto, se conoce que las bacterias a menudo están sometidas a estrés ambiental, como la falta de nutrientes, el choque osmótico, la variación de temperatura, el estrés oxidativo, etc (Boucher, et al., 1994, p. 258).

De acuerdo con el estudio “Effect of salt concentrations on the growth of heat-stressed and unstressed *Escherichia coli*” realizado por Abdulkarim, Fatimah, y Anderson (2009, pp. 51-53) observaron que el crecimiento óptimo para *E. coli* fue a una concentración del 0.5% (p/v) a 37°C, sin embargo fue decreciendo a medida que la concentración de NaCl aumentaba. En este estudio se realizaron 3 ensayos a distintas concentraciones (0.5 %, 1% y 1.5 %).

Por otro lado, en el estudio “Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy” se encontró mayor grado de daño morfológico a las células de *E. coli* O157: H7 a medida que la concentración de NaCl aumentó del 5% al 10% (Hajmeer, et al., 2006, p. 448).

Estos crecimientos óptimos decreciente de *E. coli* como resultado del aumento de la concentración de sal han sido reportados por Abdulkarim, Fatimah, y Anderson (2009, p. 163) y Hajmeer, et al. (2006, p. 89) en estos estudios se sugiere que el comportamiento de *E. coli* puede deberse al efecto hiperosmótico en las bacterias. Explicando que, el choque osmótico en los organismos, puede haber llevado a la inhibición del crecimiento.

Hrenovic, y Ivankovic (2009, pp. 149-148) encontraron que *E. coli* se multiplicaba durante 72 h a concentraciones de NaCl de hasta 5% mientras que la muerte total de esta bacteria se detectó a las 72 h mediante una concentración de NaCl del 20%. Además, en esta investigación también se cultivó *E. coli* en medios empobrecidos en nutrientes de manera que el crecimiento de la bacteria se inhibió hasta 3.5% de NaCl. De modo que se puede deducir que el medio en el cual se cultivan las bacterias influye directamente en el óptimo crecimiento, ya que debe ser un medio rico en nutrientes.

Por otra parte, Carlucci y Pramer, (1960, p. 83) realizaron pruebas de supervivencia de *E. coli* en diferentes concentraciones de agua de mar y en soluciones de NaCl de igual salinidad (0.85 %; 2.5 % ; 5 %), obteniendo la supervivencia de *E. coli* expresada en porcentaje después de 48 horas de 41.3 ; 2.1; < 0.01, respectivamente. Con estos resultados afirmaron que la salinidad contribuye significativamente a la rápida muerte de las células de *E. coli* en el agua de mar.

Es importante resaltar que en cada una de las investigaciones anteriormente mencionadas demuestran que cuanto mayor sea la concentración de NaCl en el medio, mayor será la inhibición

del crecimiento de las bacterias impidiendo de esta manera el crecimiento óptimo de las mismas. Por tanto, el grado en que se inhibe el crecimiento de *E. coli* es directamente proporcional al aumento de la concentración de NaCl.

Por otra parte, para el segundo control se utilizó *Pseudomona aeruginosa* en medio TSA y PCA suplementado con NaCl bajo las mismas condiciones, obteniendo crecimiento a concentración hasta 100000 ppm en ambos medios (Tabla 4-15). De igual manera para el control de viabilidad del medio se inocularon las bacterias aisladas en medio TSA y PCA sin suplementación de NaCl.

Tabla 4-15: Pruebas de resistencia con NaCl en *Pseudomona aeruginosa*

Cepa	Medio	Concentración (ppm)				
		10	100	1000	10000	100000
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	TSA	X	X	X	X	X
	PCA	X	X	X	X	X

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.



Ilustración 4-13: Pruebas de resistencia a NaCl con *Pseudomona aeruginosa* a concentración de 100000 ppm

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación son superiores a los obtenidos por Keskin, y Ekmekçi, (2008, pp. 44-45) quienes evaluaron el efecto de la sal sobre *P. aeruginosa* determinando su resistencia a concentraciones de sal al 3%, mientras que en concentraciones más altas de sal, se estaba inhibiendo o muriendo. De igual forma se realizaron pruebas al 7 % sin embargo esta concentración de sal tuvo un efecto bactericida sobre *P. aeruginosa*. Asimismo,

también mayores a los obtenidos por Deshwal, y Kumar, (2013, pp. 355-56) quienes en su estudio reportaron que todas las cepas de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. cepacia* y *P. fluorescens*) fueron capaces de sobrevivir hasta 2,5% de NaCl concentración en el medio.

Las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Acinetobacter* prosperan especialmente en medios con una concentración de sal que oscila entre 0,2 y 0,5 M de NaCl (0.5-3.0% p/v), y son consideradas débilmente halófilas (Rondan, y Zegarra, 2014, p. 23).

Otras bacterias son halotolerantes; es decir, son capaces de crecer en medios con sal o sin sal, generalmente suelen crecer a 1 M de NaCl (5% o más de sal); entre las mismas 24 se incluyen ciertas especies de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Clostridium*, *Sarcinas*, *Pseudomonas*, *Pediococcus* y *Alcalígenes* (Rondan, y Zegarra, 2014, p. 24).

Por otra parte, los resultados de esta investigación son similares a los indicados por De la Rosa, et al., (2007, p. 88) en donde se cultivaron en medio TSA enriquecido 46 cepas, con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 y 200 gl^{-1}). Después de 24 h, las cepas que pudieron crecer fueron observadas y clasificadas como moderadamente halotolerantes (75 gl^{-1}) muchos de ellos en concentraciones de hasta 150 gl^{-1} de sal. Entre los géneros identificados se tiene a *Pseudomonas*.

Según Akpor, et al., (2015, pp. 28-32) el efecto del cloruro de sodio sobre *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 100 mg/L no inhibe el crecimiento del aislado de prueba, mientras que hubo una inhibición del crecimiento del aislado a concentraciones superiores a 100 mg/L.

Por otro lado, Elabed, et al., (2019, p. 67) en su estudio encontró varios clones de *P. aeruginosa*, rescatados después de 14 años en cristales de sal marina evaporados naturalmente. Estos llegaron a la conclusión que, al recuperarse, esta bacteria muestra una mejor capacidad para crecer en condiciones altamente salinas.

4.6. Prueba de resistencia a condiciones anaerobias

Para las pruebas de requerimiento de oxígeno (condiciones anaerobias) se empleó el medio fluido tioglicolato. Los resultados se detallan a continuación:

Tabla 4-16: Resultado pruebas con tioglicolato

Muestreo	Código	Cepa	Medio de cultivo	Resultado de crecimiento (turbidez)	Tipo de microorganismos
Punto 1	MC4	R2_C8	PCA	++++	Anaerobio facultativo
		R1_C5	PCA	++++	Anaerobio obligado
Punto 2	MC8	R1_C6	PCA	+++	Anaerobio facultativo
Punto 3	MC12	R2_C4	TSA	++	Anaerobio facultativo
		R1_C1	TSA	++++	Anaerobio facultativo
Punto 4	MC16	R6_C9	PCA	++	Anaerobio facultativo
		R3_C3	TSA	++	Anaerobio obligado
		R2_C7	PCA	++	Anaerobio facultativo

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

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023

En la mayoría de las cepas se observó turbidez a lo largo del tubo (Ilustración 4-14), es decir son anaerobias facultativas (pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno), sin embargo, otras además de crecer a lo largo del tubo crecieron de manera abundante en el fondo del tubo (Ilustración 4-15).

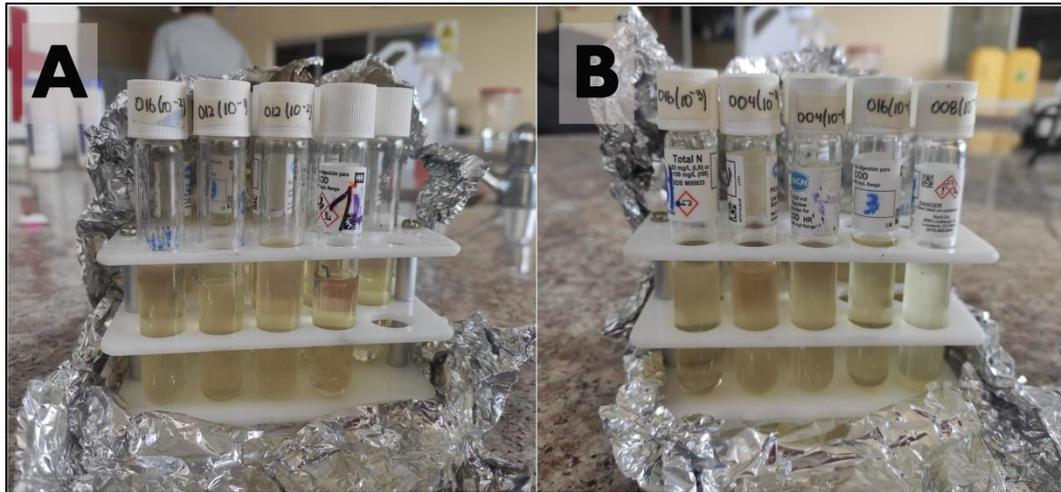


Ilustración 4-14: Pruebas con tioglicolato A: Bacterias aisladas en medio TSA B: Bacterias aisladas en medio PCA.

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Del total de las 8 cepas en 2 se observó este comportamiento de manera que se presume son anaerobios obligados: MC4_R1_C5 y MC16_R3_C3.



Ilustración 4-15: Bacterias con crecimiento en el fondo del tubo

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

Para obtener un contraste se realizaron ensayos con bacterias ya estudiadas, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en las mismas condiciones que las bacterias aisladas de la Laguna Cuicocha. En la Ilustración 4-16 se puede observar el crecimiento de *E. coli* en todo el medio indicando que se trata de una bacteria anaerobia facultativa. Tanto Savageau (1983, p. 285) como Stanford T. Shulman (2007, p. 84) citados en Fiallos, De Madrid, y Navarro (2018, p. 43) manifiestan que *E. coli* es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativa,

anaeróbica facultativa, es decir, puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno, tiene la habilidad de ajustarse a su entorno en el intestino, que es anaeróbico, así como en ambientes fuera del intestino, que son aeróbicos.

Escherichia coli es la bacteria anaerobia facultativa más importante del microbiota que se encuentra en el tracto gastrointestinal de los bebés humanos a las pocas horas del nacimiento. *E. coli* y su huésped humano coexisten, es decir forman una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida. Estas cepas rara vez causan enfermedades, excepto en huéspedes inmunocomprometidos o huéspedes con una alteración de la barrera gastrointestinal, como peritonitis. Por ello, comprende el anaerobio facultativo más abundante de la microflora intestinal humana (Vidal, et al., 2007, p. 377) (Kaper, Nataro, y Mobley, 2004, p. 123).



Ilustración 4-16: De izquierda a derecha, muestra de *E. coli* y Blanco.

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023

En cuanto a los resultados obtenidos con *Pseudomona aeruginosa* en la Ilustración 4-17 se puede observar el crecimiento de esta bacteria gramnegativa en todo el medio indicando que se trata de una bacteria anaerobia facultativa. Algunos autores consideran que *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones (Paz, et al., 2019, p. 181). Además, de tratarse de un bacilo Gram negativo aerobio es considerado un patógeno oportunista, puesto que es capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno y puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C por ello es considerado un microorganismo altamente versátil (Ochoa, et al., 2013, p. 58).

Por su parte Breidenstein, De la Fuente-Núñez, y Hancock (2011, p. 256) manifiesta que *P. aeruginosa* posee un metabolismo aerobio, puede crecer bajo condiciones anaerobias utilizando nitrato o arginina como aceptor final de electrones, además, se diferencia de otras especies por la producción de ácidos a partir de glucosa y xilosa, pero no a partir de lactosa o sacarosa.

De igual manera se han realizado pruebas con la reacción oxidación-fermentación en medio Hugh-Leifson en anaerobiosis, en donde se demuestra que no hay crecimiento de *P. aeruginosa* ya que es un microorganismo estrictamente aerobio (Callicó, et al., 2004, p. 583).

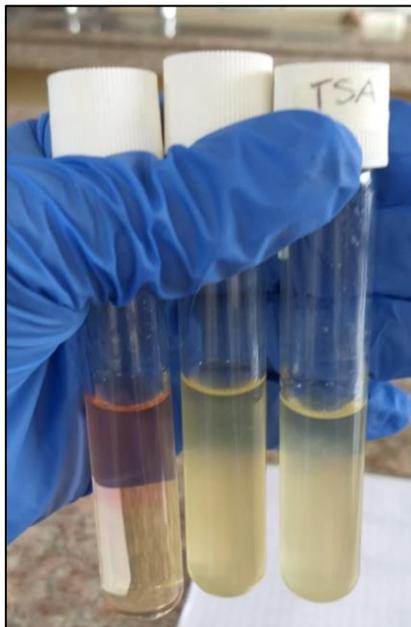


Ilustración 4-17: De izquierda a derecha, muestra de *P. aeruginosa* en TSA y PCA; Blanco.

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

4.7. Caracterización molecular

4.7.1. Extracción y purificación de ADN

Para la caracterización molecular, se obtuvo ADN de alta calidad, es decir sin contaminación de proteínas y sales en base a la medición de espectrofotometría en Nanodrop 2000, para evaluar la pureza de ADN se utilizó la relación de absorbancias y se comparó con los rangos establecidos para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos (Tabla 4-17), finalmente las concentraciones del ADN fueron ajustadas a 20ng/μl para la amplificación mediante PCR.

Tabla 4-17: Valores indicativos de pureza en muestras de ADN

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterio validez
Espectrofotometría	A260/280	Pureza	$\geq 1.8 - 2.1$. Pureza óptima
			$\geq 1.6 - 1.7$. Pureza aceptable
			< 1.6 . ADN contaminado con compuestos aromáticos
			> 2.1 . ADN contaminado con ARN
	A260/230	Pureza	$> 2 - 2.2$. Pureza óptima
			> 1.8 . Pureza aceptable
			< 1.8 . ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono
			< 1.5 . ADN altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono

Fuente: (Banco Nacional de ADN, 2020).

A continuación, se detallan los valores de pureza de ácido nucleico obtenidos de las muestras estudiadas:

Tabla 4-18: Valores de la pureza del ácido nucleico extraído

Código	Ácido nucleico (ng/μl)	260/280	260/230
Blanco	-0.4	0.55	0.56
MC4_R2_C8	3454.2	1.75	1.40
MC4_R1_C5	3938.7	2.08	1.86
MC8_R1_C6	1426.0	2.04	2.08
MC12_R2_C4	-	-	-
MC12_R1_C1	1494.6	2.07	2.36
MC16_R6_C9	677.7	2.01	2.29
MC16_R3_C3	-	-	-
MC16_R2_C7	3022.4	2.07	2.04

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

A 280nm se absorben las proteínas (en particular los aminoácidos aromáticos), la relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima si tiene un valor entre 1.8-2.1. Al comparar los valores obtenidos se determinó que todas las muestras están dentro del rango de pureza óptima con respecto a la contaminación con proteínas

Contaminantes tales como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos son absorbidos a una longitud de onda de 230nm. Comparando los rangos establecidos en la Tabla 4-17 se considera que 4 de las muestras obtenidas se encuentran dentro de los valores de pureza óptima, mientras que 1 muestra tiene pureza aceptable y 1 muestra posee ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono. Sin embargo, de manera general, los valores de ADN obtenidos son óptimos.

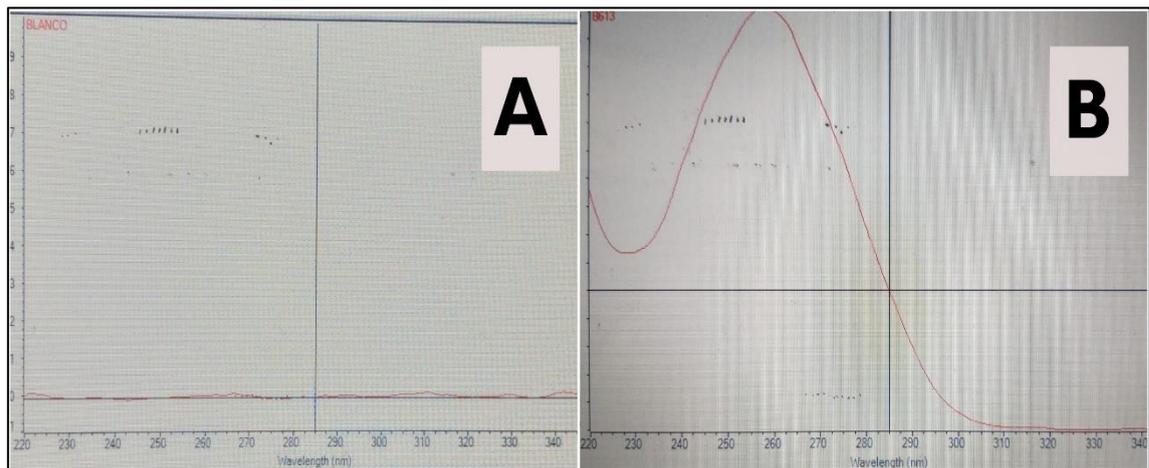


Ilustración 4-18: Valoración de la pureza del ácido nucleico extraído A: muestra Blanco; B: Muestra MC12_R1_C1

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

4.7.2. *Amplificación del gen 16ARNs mediante PCR convencional*

Se visualizó en gel de agarosa 1 % de fragmentos de aproximadamente 1200pb, amplificado con primers 27F/1492R, como se muestra en la Ilustración 4-19.

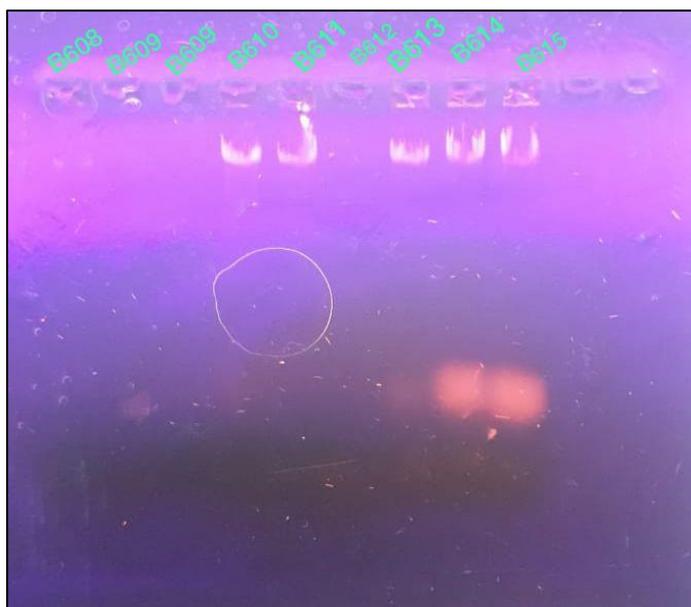


Ilustración 4-19: Electroforesis en gel de agarosa

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

4.7.3. *Secuenciación molecular e identificación bacteriana*

Los resultados obtenidos de la caracterización molecular en la mayoría de los casos confirman su identidad con un 99 %, en este sentido se logró identificar a las muestras etiquetadas como MC8_R1_C6, MC12_R2_C4, MC12_R1_C1 y MC16_R2_C7; y se confirmó su identidad con un 100% a las muestras MC16_R6_C9, MC4_R2_C8 y MC4_R1_C5. Por tanto, se obtuvo la calidad suficiente para lograr el ensamblaje entre las secuencias forward y reverse.

El porcentaje de identidad de los resultados debía ser mayor al 99% para obtener una identificación molecular satisfactoria de las bacterias, sin embargo, la muestra MC16_R3_C3 obtuvo un porcentaje de identidad menor al 99% (96.86), por lo que la búsqueda en la base de datos del NCBI se llevó a cabo con la cadena individual obtenida, considerando los resultados con mayor porcentaje de similitud.

Cabe mencionar que las 8 cepas bacterianas se identificaron con base a las secuencias obtenidas mediante la amplificación de la región 16s.

Una vez ensambladas las secuencias se procedió a la realizar la comparación con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI, lo que se traduce en un proceso de identificación de calidad.

A continuación, se presenta la identificación molecular de microorganismos aislados.

Tabla 4-19: Caracterización molecular de microorganismos aislados

Muestra	Longitud	Organismo	Fragmento	% de identidad	N ° Accesoión
MC8_R1_C6	531	<i>Pseudomonas fildesensis</i>	16s	99.43	NR_170438.1
		<i>Pseudomonas veronii</i>		99.43	NR_028706.1
MC16_R3_C3	1401	<i>Trichococcus patagoniensis</i>	16s	96.86	NR_041841.1
MC16_R6_C9	353	<i>Janthinobacterium sp.</i>	16s	100	CP019510.1
MC4_R2_C8	1459	<i>Pseudomonas sp.</i>	16s	100	JF312964.1
MC12_R2_C4	1484	<i>Exiguobacterium undae</i>	16s	99.87	NR_043477.1
MC12_R1_C1	886	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	16s	99.79	NR_025798.1
MC16_R2_C7	1459	<i>Pseudomonas sp.</i>	16s	99.93	CP019398.1
MC4_R1_C5	794	<i>Aeromonas salmonicida</i>	16s	100	CP052034.1

Realizado por: Mosquera, C; Samaniego, D, 2023.

En base al presente estudio se ha determinado que estos microorganismos pueden sobrevivir en más de una condición ambiental extrema, es decir son poliextremófilos todas las cepas identificadas en la Tabla 4-19.

4.7.3.1. *Pseudomonas fildesensis* / *Pseudomonas veronii* / *Pseudomonas sp.*

La comparación de secuencias de genes 16S rRNA indica que la cepa MC8_R1_C6 representa a dos miembros, uno del *Pseudomonas fildesensis* y el otro *Pseudomonas veronii*, pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria de la familia *Pseudomonadaceae* con un porcentaje de identidad de 99.43%, mientras que las cepas MC4_R2_C8 y MC16_R2_C7 representa a un miembro del *Pseudomonas sp.*, perteneciente a la clase Gammaproteobacteria de la familia *Pseudomonadaceae* con un porcentaje de identidad de 100 y 99.93%, respectivamente.

Pseudomonas es uno de los géneros más diversos de proteobacterias, con más de 200 especies y subespecies descritas. Dentro de este género hay microorganismos cosmopolitas que exhiben

diversos estilos de vida en una amplia gama de entornos, incluidos el agua, el suelo, las plantas y los animales (Palleroni, 2010, p. 58). Muchas especies son verdaderos paradigmas de adaptación, supervivencia y persistencia, ya que pueden utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuentes de energía, soportar diferentes tipos de daños, colonizar una gran cantidad de hábitats y producir una amplia gama de metabolitos para competir con otras bacterias (Moradali, Ghods, y Rehm, 2017, p. 88).

Varios autores han estudiado la resistencia de estas bacterias a diferentes metales pesados, Bedoya, Castaño, y Ochoa, (2019, pp. 70-76) reportó en su investigación que los aislados de *Pseudomonas spp.* tienen la capacidad de tolerar y/o resistir concentraciones de hasta 2500 mg/L de nitrato de plomo. Por su parte Mena, y Rafael (2016, p. 96) realizó ensayos de cepas tolerantes a 100 mg/L de Cu, Pb y Zn. obteniendo como resultados un alto grado de remoción a dichos metales, entre los cuales destaca una mayor eficiencia para plomo 88.8 %, cobre 79.7% y zinc 49,2%. Entre las cepas identificadas se encuentra *Pseudomonas sp.* De igual manera Puicon, y Hurtado (2013, p. 69) evaluaron la capacidad de reducción de mercurio en suelo, de tres cepas de *Pseudomonas sp* las cuales fueron capaces de crecer a 100 ppm de mercurio.

Según Barrionuevo, et al. (2009, p. 58) *Pseudomonas veronii* posee capacidad adsorptiva para Cd(II) y Zn(II) y además reduce Cr(VI) a Cr(III). También se ha realizado estudios de remoción de Cu(II) en reactores en donde *Pseudomonas veronii* demostró remover altas cantidades de metal de los en muy poco tiempo, permitiendo desorber casi el total del metal retenido (97,2%) (Busnelli, y Vullo, 2022, pp. 11-14).

Por tanto, cada uno de estos microorganismos son potenciales agentes que pueden integrarse en procesos que impulsan nuevas tecnologías de biorremediación.

Por otro lado, la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl se ha reportado en *Pseudomonas fildesensis* es capaz de crecer de manera óptima a 25 °C y con hasta un 4 % de NaCl (p/v) [óptimo 1 % de NaCl (p/v)] (Pavlov, et al., 2020, p. 3256). En el estudio de Singh, et al. (2010, pp. 164-165), se realizaron pruebas de tolerancia a metales pesados a cobre (300 µg/ml) y cromo (60 µg/ml) en 8 cepas de *Pseudomona spp.*

4.7.3.2. *Trichococcus patagoniensis*

La comparación de secuencias de genes 16S rRNA indica que la cepa MC16_R3_C3 representa a un miembro del *Trichococcus patagoniensis*, pertenece a la clase Bacilos de la familia Carnobacteriaceae con un porcentaje de identidad de 96.86%.

Esta cepa fue aislada del guano de pingüinos de Magallanes en la Patagonia chilena, esta cepa es anaerobia facultativa, extremadamente psicrotolerante, cocos móviles gramvariables (a veces elipses alargadas) con un diámetro de 1,3 a 2,0 μm solos o en pares, cadenas cortas y conglomerados -irregulares. Su crecimiento se produce dentro del rango de pH de 6,0 a 10,0, con un crecimiento óptimo a pH 8,5, mientras que el rango de temperatura fue de -5 a 35 $^{\circ}\text{C}$, con un crecimiento óptimo entre 28 y 30 $^{\circ}\text{C}$, es decir son mesófilas psicrotolerantes. En cuanto a requerimiento de oxígeno todas las especies del género *Trichococcus* son anaerobias facultativas (Pikuta, et al., 2006, p. 591).

Según Strepis, et al., (2020, pp. 7-8) *T. patagoniensis* pueden crecer a temperaturas negativas y tolerar salinidades altas concentraciones de NaCl. En su investigación evaluaron la tolerancia a la salinidad para las diferentes especies de *Trichococcus* entre ellas *T. patagoniensis* después de diez días, se observó un crecimiento débil al 6% de NaCl (p/v) por lo que se determinó que esta bacteria puede tolerar salinidades de hasta 5% (p/v) de NaCl.

La gran versatilidad metabólica de *Trichococcus*, por ejemplo, su tolerancia al oxígeno y a los metales y su capacidad de adaptarse a las variaciones de temperatura y a ambientes de alta salinidad, puede dar a los miembros de este género una ventaja en estos ecosistemas (Parshina, et al., 2019, pp. 529-531). En el estudio de se sugiere una mayor tolerancia de *Trichococcus* a los metales pesados. (Qian, et al. (2017, p. 169) también encontraron que en un reactor de biorreducción, en donde el género de fermentación dominante en condiciones existentes de Cr (VI) fue *Trichococcus*.

4.7.3.3. *Janthinobacterium sp.*

La comparación de secuencias de genes 16S rRNA indica que la cepa MC16_R6_C9 representa a un miembro del *Janthinobacterium sp.*, pertenece a la clase Betaproteobacteria de la familia Oxalobacteraceae con un porcentaje de identidad de 100%.

Varios autores como Gong, et al., (2017, p. 43) y Schloss, et al., (2010, pp. 576) han descrito que *Janthinobacterium* ha sido aislada de diferentes ambientes, sin embargo, de manera más común se puede encontrar en ecosistemas de suelo y agua en temperaturas frías, incluidos ecosistemas de agua dulce como la Laguna Cuicocha.

Las *Janthinobacterium* son bacterias Gram-negativas, psicrotolerantes, con forma de bastón, móviles por medio de flagelos. Se sabe que *Janthinobacterium* puede producir el pigmento púrpura violaceína, que tiene actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral,

antiparasitaria y antioxidante (Chernogor, et al., 2022, p. 84).

En el estudio realizado por Hornung, et al., (2013, p. 5) se menciona que *Janthinobacterium sp.* HH01, codifica un número notable de proteínas involucradas en resistencia a fármacos o metales pesados. De igual manera se reporta que *Janthinobacterium sp.* es capaz de crecer bien en presencia de niveles elevados de CuCl_2 (0,6 mM), ZnCl_2 (0,5 mM) y FeCl_3 (1,3 mM).

Por otro lado, también se ha informado que más del 2,4 % (170 genes cromosómicos) del genoma de esta bacteria les confieren tolerancia o resistencia a biocidas/metales y antibióticos. Algunos de esos genes de resistencia o tolerancia sirven en la defensa básica de la célula contra los metales superfluos, pero algunos son altamente especializados y se sabe que ocurren solo en unas pocas especies (Pal, et al., 2015, p. 11).

De igual manera existen investigaciones que manifiestan que esta bacteria puede tolerar concentraciones de NaCl, Gerwick, y Sitachitta (1998, p. 252) en su libro manifiesta que *Janthinobacterium sp.*, es una bacteria marina que requiere NaCl para crecer. Además, Gong, et al. (2017, p. 2) realizó ensayos para evaluar la tolerancia a la sal en agar TSB con concentraciones de NaCl que oscilaron entre 0,17 % y 3,17 %.

La adaptación de *Janthinobacterium* a diversos entornos puede conducir a cambios adaptativos en su potencial de producción de violaceína. Por ejemplo, se encontró que una cepa de *Janthinobacterium* aislada de una corriente glacial a gran altitud carecía de la típica pigmentación violeta, lo que indica una estrategia de adaptación y supervivencia en ecosistemas acuáticos hostiles de gran altitud donde los organismos deben ser tolerantes a las bajas temperaturas, la fuerte radiación y bajos nutrientes en lugar de depredación o competencia (Kumar, et al., 2018, pp. 7-10).

4.7.3.4. *Exiguobacterium undae*

La comparación de secuencias de genes 16S rRNA indica que la cepa MC12_R2_C4 representa a un miembro del *Exiguobacterium undae.*, pertenece a la clase Bacilos de la familia Familia Bacillales XII. Incertae Sedis con un porcentaje de identidad de 99.87%.

Las colonias superficiales en TSA tienen de 2–3 mm de diámetro después de 2 días a 25 °C, naranja, convexa, entera y brillante. El pigmento naranja no difunde en el medio. Además, en cuanto a requerimiento de oxígeno tiene crecimiento ocurre bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas condiciones (Schumann, Hippe, y Stra, 2002, pp. 1173-1174).

Se han aislado bacterias del género *Exiguobacterium sp* tolerantes a concentraciones de sal 15 % (p/v) de NaCl y 1 mmol L⁻¹ Mg²⁺ o Ca²⁺, respectivamente (Tan, et al., 2009, p. 588).

En este estudio, *Exiguobacterium sp.* GS1 mostró una rápida eliminación biológica de cromo hexavalente del agua.

Según Okeke (2008, pp. 1572-1577) en su investigación aisló una especie perteneciente a este género (*Exiguobacterium sp.* GS1) y demostró que se trata de una bacteria anaerobia facultativa halotolerante, termotolerante, psicoactiva y alcalitolerante. Además, esta bacteria muestra bioeliminación rápida de Cr (VI) lo cual le convierte en un organismo potencial para la biorremediación de contaminantes ambientales en diversos entornos complejos.

4.7.3.5. *Psychrobacter alimentarius*

La comparación de secuencias de genes 16S rRNA indica que la cepa MC12_R1_C1 representa a un miembro del *Psychrobacter alimentarius*, pertenece a la clase Gammaproteobacteria de la familia Moraxellaceae con un porcentaje de identidad de 99.79%.

Psychrobacter alimentarius es una bacteria gramnegativa, inmóvil, no formadora de esporas, aislada por primera vez de pescados y mariscos fermentados. Se han encontrado miembros del género *Psychrobacter* en varios hábitats, como alimentos, aves, peces, fuentes clínicas, agua de mar y ambientes fríos (Lee, et al., 2016, pp. 86-89).

Existen estudios en donde se ha demostrado que las cepas de *Psychrobacter* son capaces de acumular metales pesados, tal es el caso de Abd-Elnaby, et al. (2016, pp. 197-200), en su investigación reportaron que varias cepas de *Psychrobacter* tienen tolerancia o resistencia a varios metales, como: plomo (800 ppm), cadmio (250 a 400 ppm), zinc (50 y 300 ppm), níquel (300 y 400 ppm) y cobre (150 a 300 ppm). Por otro lado, también se han aislado cepas de *Psychrobacter alimentarius* en presencia de 2–3 % (v/p) de NaCl, determinando que se trata de una bacteria moderadamente halófila (Yoon, et al., 2005, p. 71).

Las cepas de *Psychrobacter* han mostrado su capacidad de biorremediar mediante la producción de la enzima anhidrasa carbónica (Li, Csetenyi, y Gadd, 2014, p. 271). Además, la secuenciación del genoma de *P. alimentarius* ha mostrado dos vías involucradas en la biosíntesis de terpenoides y degradación de benzoato (Lasa, y Romalde, 2017, p. 8).

4.7.3.6. *Aeromonas salmonicida*

La comparación de secuencias de genes 16S rRNA indica que la cepa MC4_R1_C5 representa a un miembro del *Psychrobacter alimentarius*, pertenece a la clase Gammaproteobacteria de la familia Aeromonadaceae con un porcentaje de identidad de 100%.

Aeromonas salmonicida son consideradas microorganismos Gram-negativos, fermentadores de glucosa y son anaerobios facultativos. Esta bacteria se puede hallar en diversos entornos, aunque su hábitat natural es el suelo, así como aguas dulces lólicas y lénticas, y aguas salobres y saladas. Su distribución está influenciada por varios factores como la temperatura ($\geq 20^{\circ}\text{C}$), materia orgánica, oxígeno disuelto y en algunos lugares salinidad (Grajales, y Hahn-von-Hessberg, Christine Grajales, 2018, pp. 77-79).

Después de 24 a 48 horas en agar TSA, la mayoría de los aislamientos de *A. salmonicida* generan un pigmento de color marrón-café (denominados cepas típicas). Sin embargo, según Buller (2004, p. 360), no todas las cepas tienen esta característica, ya que existen algunas que no producen pigmentación y cuando lo hacen, generalmente es de intensidad leve, además tienen un periodo de crecimiento más prolongado (mayor a 5 días), consideradas como atípicas.

A pesar de que no hay estudios en donde se demuestre que esta bacteria sea halotolerante, existen varias investigaciones en donde se manifiesta que existen bacterias dentro del género de *Aeromonas* que tienen la capacidad de tolerar concentraciones de sal y metales, en su estudio aislaron *Aeromonas hydrophila* en medio suplementado con diferentes metales entre ellos, Zn^{2+} y Cr^{6+} (25 y 400 $\mu\text{g/ml}$); Cu (150 y 2400 $\mu\text{g/ml}$) y Hg^{2+} (2,5 y 40 $\mu\text{g/ml}$). Como resultado, los aislados bacterianos presentaron un patrón resistente de $\text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$ (Lee, y Wendy, 2017, p. 402). Asimismo, se ha verificado que esta bacteria tolera metales pesados como cadmio, plomo, cobre y manganeso, siendo el cadmio el que presentó los mejores efectos inhibitorios, siendo efectivo hasta la concentración de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (Freitas, et al., 2018, pp. 1-5).

Por otra parte, en cuanto a concentraciones de sal (NaCl) no se han realizado investigaciones relacionadas con *Aeromonas salmonicida*, sin embargo, otras especies pertenecientes a este género han mostrado la influencia de la concentración de sal en el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* en concentraciones de 0.5%, 1.0% y 2.0%. El aumento en la concentración de sal resultó en el crecimiento de la disminución de este organismo (Lambert, y Bidlas, 2007, p. 102).

CONCLUSIONES

Se aislaron 8 cepas bacterianas de las cuales 5 crecieron en el medio de cultivo PCA y 3 en TSA. Se realizó la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas, del total, el 75% resultó ser Gram negativas, y un 25 % gram positivas de las cuales el 13% son cocos y 12% son bacilos.

Los clones aislados resistentes a altas concentraciones de cromo (50000ppm) en forma de cromato de potasio fueron 6: *Pseudomonas fildesensis* y *Pseudomonas veronii*; *Pseudomonas sp.*, *Exiguobacterium undae*, *Psychrobacter alimentarius*, *Pseudomonas sp.* y *Aeromonas salmonicida* mientras que las cepas resistentes a altas concentraciones de cadmio (50000ppm) fueron 5 entre ellas: *Pseudomonas fildesensis* y *Pseudomonas veronii*; *Pseudomonas sp.*, *Exiguobacterium undae*, *Pseudomonas sp.* y *Aeromonas salmonicida*. Para los ensayos de resistencia a cloruro de sodio todas las cepas resistieron la concentración máxima (100000ppm), demostrando que, se trata de bacterias halotolerantes. Por último, en cuanto a ausencia de oxígeno se utilizó el medio fluido de tioglicolato, y se pudo determinar que la mayoría de los clones son anaerobios facultativos, es decir pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno.

Se realizó la identificación molecular de las 8 cepas que resistieron las condiciones extremas planteadas, para ello se amplificó el gen 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los primers universales 27F/1492R y se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. lo cual permitió su secuenciación e identificación molecular donde se obtuvo las siguientes especies: *Pseudomonas fildesensis* y *Pseudomonas veronii* (99.43%); *Trichococcus patagoniensis* (96.86%); *Janthinobacterium sp.* (100%), *Pseudomonas sp.* (100%), *Exiguobacterium undae* (99.87%), *Psychrobacter alimentarius* (99.79%), *Pseudomonas sp.* (99.93%), *Aeromonas salmonicida* (100%).

RECOMENDACIONES

- ✓ Se sugiere profundizar el estudio de los microorganismos identificados en la presente investigación, para posibles aplicaciones en celdas microbianas, para la generación de bioelectricidad.

- ✓ Se propone investigar la resistencia de estos microorganismos en presencia de otras condiciones extremas como: otros metales pesados, temperatura, etc.

- ✓ Se recomienda evaluar la eficacia de estos microorganismos obtenidos en esta investigación como potenciales agentes biorremediadores de metales pesados.

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

BIBLIOGRAFÍA

ABD-ELNABY, H.M., ABOU-ELELA, G.M., GHOZLAN, H.A., HUSSEIN, H. y SABRY, S.A., Characterization and bioremediation potential of marine *Psychrobacter* species. *Egyptian Journal of Aquatic Research* [en línea], vol. 42, no. 2, pp. 193-203. 2016 .ISSN 20903278. DOI 10.1016/j.ejar.2016.04.003. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1687428516300206?token=E3740D1F9019A17A915896975121ABF21E1ED101682E7D2EB4BEDE6CA6B8B9AB37437FFBF0B0EA234902A6ED1DFDF066&originRegion=us-east-1&originCreation=20230412055705>.

ABDELBARY, S., ELGAMAL, M. y FARRAG, A. Trends in Heavy Metals Tolerance and Uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas Aeruginosa - An Armory Within* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 1-12. 2019. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/66686>.

ABDUL-SADA, H.K., A. RESISTANCE STUDY OF *Pseudomonas aeruginosa* TO HEAVY METALS. *Basrah Journal of Veterinary Research* [en línea], vol. 8, no. 2, pp. 52-60. DOI 10.33762/bvetr.2009.56874. 2009. Disponible en: https://www.mosuljournals.com/article_56874_1ab426cf3ba729218822866b9893b1de.pdf

ABDULKARIM, S.M., FATIMAH, A.B. y ANDERSON, J.G., 2009. Effect of salt concentrations on the growth of heat-stressed and unstressed *Escherichia coli*. *Journal of Food, Agriculture and Environment* [en línea], vol. 7, no. 3-4, pp. 51-54. ISSN 14590263. Disponible en: <https://strathprints.strath.ac.uk/18874/1/9.pdf>.

ABSKHARON, R.N.N., HASSAN, S.H.A., GAD EL-RAB, S.M.F. y SHOREIT, A.A.M., Heavy metal resistant of *E. coli* isolated from wastewater sites in Assiut City, Egypt. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [en línea], vol. 81, no. 3, pp. 309-315. 2008. ISSN 00074861. DOI 10.1007/s00128-008-9494-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18584108/>.

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

ACUÑA, J.N., *Evaluación limnológica y microbiológica de la Laguna del Quilotoa, provincia de Cotopaxi – Ecuador* [en línea]. Quito: s.n. ISBN 1757134646. 2021. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25227/1/UCE-FIGEMPA-CIA-ACUÑA>

JESSICA.pdf.

AGENCIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL DE ESTADOS UNIDOS, Términos M | US EPA. [en línea]. [Consulta: 20 julio 2022]. 2022. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/espanol/terminos-m>.

AGUADO, M., Microarrays de ADN en microbiología. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, vol. 1, no. 2, pp. 125-134. 2007. ISSN 1988-2688.

AKPOR, O.B., MORAH, B.L., ADEJOBI, O.I., OLONINEFA, S.D. y BABALOLA, O. TOLERANCE OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA TO SELECTED CONCENTRATIONS OF METALS AND SODIUM CHLORIDE. *Journal of Microbiology* [en línea], vol. 4, no. 3, pp. 27-33. 2015. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/340504173_TOLERANCE_OF_PSEUDOMONAS_AERUGINOSA_TO_SELECTED_CONCENTRATIONS_OF_METALS_AND_SODIUM_CHLORIDE.

ALARCÓN, D. *Microbiota bacteriana de la laguna Cuicocha y sus aplicaciones biotecnológicas* [en línea]. S.l.: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD. 2019. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/19013/1/T-UCE-0012-FIG-119.pdf>.

ALCARRAZ, M. y VÁSQUEZ, G. Aislamiento de microorganismos halófilos con potencial biotecnológico y análisis de parámetros fisicoquímicos en suelos costeros. *Aporte Santiaguino* 2014. [en línea], vol. 7, no. 2, pp. 09-14. ISSN 2070-836X. DOI 10.32911/as.2014.v7.n2.469. Disponible en: http://revistas.unasam.edu.pe/index.php/Aporte_Santiaguino/article/view/469/640.

ARORA, N.K. y PANOSYAN, H. Extremophiles: applications and roles in environmental sustainability. *Environmental Sustainability* 2019. [en línea], vol. 2, no. 3, pp. 217-218. ISSN 2523-8922. DOI 10.1007/s42398-019-00082-0. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00082-0>.

AWASTHI, G., CHESTER, A., CHATURVEDI, R. y PRAKASH, J. Study on Role of Pseudomonas aeruginosa on Heavy Metal Bioremediation. *Int. J. Pure App. Biosci* 2015. [en línea], vol. 3, no. 4, pp. 92-100. Disponible en: <http://www.ijpab.com/form/2015 Volume 3, issue 4/IJPAB-2015-3-4-92-100.pdf>.

AZARIO, R. *Análisis de la toxicidad de metales contaminantes sobre el crecimiento de Escherichia coli: Efecto del cromo, plomo y cadmio en solución* [en línea]. 2014. S.l.: Universidad Nacional del Litoral. Disponible en: https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/583/TESIS_version_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

AZARIO, R.R., SALVAREZZA, S.A., IBARRA, A. y GARCÍA, M. del C. Efecto del cromo hexavalente y trivalente sobre el crecimiento de escherichia coli ATCC 35218. *Informacion Tecnologica*, vol. 21, no. 1, pp. 51-56. ISSN 07168756. 2010. DOI 10.1612/inf.tecnol.4150it.08.

BALTAZAR, M., GRACIOSO, L., AVANZI, I., VEIGA, M., GIMENES, L., NASCIMENTO, C. y PERPETUO, E. Bioremediation potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* isolated from a copper-contaminated area. *BMC Proceedings* [en línea], vol. 8, no. S4, pp. 188. 2014. ISSN 1753-6561. DOI 10.1186/1753-6561-8-s4-p188. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/8/S4/P188>.

BANCO NACIONAL DE ADN. *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN* [en línea]. 2020. S.l.: s.n. Disponible en: www.bancoadn.org.

BARRERO, L. *Microbiología clínica* [en línea]. 2016. S.l.: s.n. Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>.

BARRIONUEVO, M., DANIEL, M.A., GARAVAGLIA, L., MÉNDEZ, N., CANDAL, R., CERDERIRA, S., CERETTI, H., RAMÍREZ, S., RECIULSCHI, E., ZALTS, A. y VULLO, D. Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales : factores a tener en cuenta para un diseño eficiente Redalyc Sistema de Información Científica Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales : factores a. *Revista Química Viva* [en línea], vol. 8, no. 2, pp. 106-124. 2009. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Silvana-Ramirez/publication/41805058_Tratamiento_biologico_de_efluentes_industriales_con_contenido_en_metales_factores_a_tener_en_cuenta_para_un_diseno_eficiente/links/5435747a0cf2dc341db29a92/Tratamiento-biologico-de-.

BEDOYA, J., CASTAÑO, G. y OCHOA, S. Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp . de aguas residuales del Valle de Aburrá Tolerance lead of native *Pseudomonas* spp . wastewater from Aburrá Valley. *Rev. Colomb. Biotecnología* [en línea], vol. XXI, no. 1, pp. 68-76. 2019. DOI 10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v21n1/0123-3475-biote-21-01-135.pdf>.

BELTRÁN, M.E. y GÓMEZ, A.M. BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO (Cd), CROMO (Cr) Y MERCURIO (Hg) MECANISMOS BIOQUÍMICOS E INGENIERÍA GENÉTICA : UNA REVISIÓN. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* [en línea], vol. 12, pp. 172-197. 2016. DOI <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2027>. Disponible en: <file:///C:/Users/david/Downloads/macero,+ART05.pdf>.

BORDA, P.V.A., CALLE, V.A.V. y VALDIVIA, J.L.S. Producción de bacteriocinas por bacterias halófilas y halotolerantes de la Laguna Chairkota, Potosí – Bolivia. *Revista de Investigación e Información en Salud ARTÍCULO CIENTÍFICO Producción* [en línea], 2017. vol. 12, pp. 42-51. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/pdf/riis/v12n29/v12n29_07.pdf.

BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J.A. y VALDEZATE, S. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* [en línea]. S.l.: s.n. 2011. ISBN 9788461479320. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

BOUCHER, S.N., SLATER, E.R., CHAMBERLAIN, A.H.L. y ADAMS, M.R., *Production and viability of coccoid forms of Campylobacter jejuni* [en línea]. 1994. S.l.: s.n. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7989256/>.

BREIDENSTEIN, E.B.M., DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. y HANCOCK, R.E.W. Pseudomonas aeruginosa: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology* [en línea], 2011. vol. 19, no. 8, pp. 419-426. ISSN 0966842X. DOI 10.1016/j.tim.2011.04.005. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21664819/>.

BULLER, N. *Bacteria from Fish and other aquatic animals* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 0851997384. 2004. Disponible en: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Buller2004.pdf>.

BURBANO, G.G. y LÓPEZ, G.C. *Identificación Molecular de bacterias resistentes al Arsénico (As) y al Cromo (Cr) de la Microcuenca del Río Gala del Cantón Camilo Ponce Enríquez* [en línea]. 2022. S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/17628/1/236T0626.pdf>.

BUSNELLI, M.P. y VULLO, D.L. Copper Removal Mediated by *Pseudomonas veronii* 2E in Batch and Continuous Reactors. *Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems* [en línea], 2022. vol. 10, no. 1. ISSN 18489257. DOI 10.13044/j.sdewes.d8.0351. Disponible en: <http://www.sdewes.org/jsdewes/pid8.0351>.

BUSTOS, A. y SERRANO, L. *Departamento De Ciencias De La Tierra Y La Construcción Carrera De Ingeniería Geográfica Y Del Medio Ambiente Proyecto De Titulación Previo a La Obtención Del Título De Ingenieras Geógrafas Y Del Medio Ambiente* [en línea]. 2014. S.l.: Universidad de las Fuerzas Armadas. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/9573/1/T-ESPE-048211.pdf>.

CALLICÓ, A., CEDRÉ, B., SIFONTES, S., TORRES, V., PINO, Y., CALLÍS, A.H. y ESNARD, S.C. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Phenotypical and Serological Characterizations of Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates*. 2004. [en línea], vol. 13, no. 3, pp. 1-9. ISSN 1025028X. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=23130937&lang=es&site=ehost-live>.

CAMPAÑA, J., CIRA, L., ESTRADA, M.I., CORONADO, J.C. y ACOSTA, M. *Búsqueda nuevos catalizadores biológicos en microorganismos halófilos* [en línea]. 2008. S.l.: s.n. Disponible en: <https://smbb.mx/congresos/smbb/guadalajara15/PDF/XVI/trabajos/I/IC-07.pdf>.

CANCHIGNIA, F., AUHING, J., CEDEÑO, Á., CARRILLO, M. y BRAVO, D. *Guía 12: Mitigación de cadmio por microorganismos*. 2021. S.l.: s.n. ISBN 978-9942-22-525-2.

CARLUCCI, A.F. y PRAMER, D. An Evaluation of Factors Affecting the Survival of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*, 1960. vol. 8, no. 4, pp. 247-250.

CARRILLO, J., YAH, R., FLORES, E., SAÚL, S. DOMÍNGUEZ, M., VÁZQUEZ, F., MEDRANO, G., HERNÁNDEZ, C. y SOTO, M. Reducción de Cr +6 por bacterias aisladas de suelos agrícolas en Reduction of Cr +6 for isolated bacteria of agricultural soils in. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* [en línea], vol. 16, no. 3, 2020. pp. 113-121. Disponible en: <https://doi.org.1033154/rln.2020.03.04>.

CHA, J.S., COOKSEY, D.A. y HWANG, M.P. Copper resistance in *Serratia marcescens* and its potential applications. *Biotechnology Letters*, vol. 39, no. 1, 2017. pp. 89-97.

CHAKRABORTY, J. y DAS, S. Characterization and cadmium-resistant gene expression of biofilm-forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. *Springer* [en línea], vol. 21, no. 24, pp. 14188– 14201. 2014. DOI 10.1007/s11356-014-3308-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25056746/>.

CHARLESWORTH, J.C. y BURNS, B.P. Untapped Resources: Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in Archaea. *Hindawi Publishing Corporation* [en línea], pp. 1-7. 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.1155/2015/282035> Review. Disponible en: <https://downloads.hindawi.com/journals/archaea/2015/282035.pdf>.

CHÁVEZ, E., GARCÍA, M.D.R., AVELINO, F., GIL, C. y CASTAÑEDA, E.I. Identificación de tres factores de virulencia en cepas de *Escherichia Coli* aisladas de humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* [en línea], 2007. vol. 27, no. 4, pp. 114-117. ISSN 14050994. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2007/ei074c.pdf>.

CHEN, L., YANG, X., JIAO, Y. y YANG, S. *Bacillus subtilis* JF-2 alleviates chromium toxicity in *Brassica napus* L. by promoting the growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of seedlings. . *Environmental Science and Pollution Research*, 2015. vol. 22, no. 22, pp. 17654-17662.

CHEN, Yi Lin, LEE, C.C., LIN, Y.L., YIN, K.M., HO, C.L. y LIU, T. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics* [en línea], 2015. vol. 16, no. 18, pp. S13. ISSN 14712105. DOI 10.1186/1471-2105-16-S18-S13. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/16/S18/S13>.

CHERNOGOR, L., BAKHVALOVA, K., BELIKOVA, A. y BELIKOV, S. Isolation and Properties of the Bacterial Strain *Janthinobacterium* sp. SLB01. *Microorganisms* [en línea], 2022. vol. 10, no. 5, pp. 1-13. ISSN 20762607. DOI 10.3390/microorganisms10051071. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/5/1071>.

CHRISTENSON, B., NÉMETH, K., ROUWET, D., TASSI, F., VANDEMEULEBROUCK, J. y VAREKAMP, J.C. Volcanic Lakes. *Springer*, 2015. DOI 10.1007/978-3-642-36833-2.

CORRAL, P., AMOOZEGAR, M.A. y VENTOSA, A. Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine Paulina. *Marine Drugs* [en línea], vol. 18, no. 33, pp. 1-33. 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7024382/#:~:text=Halophiles are organisms>

represented by, around the world %5B1%5D.

CORRALES, L.C., ROMERO, M.D., BOHÓRQUEZ, J.A. y CORREDOR, A.M. Bacterias anaerobias : procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. 2015. pp. 55-81.

CRUZ, D.N., 2021. *Identificación de bacterias y arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl in vitro* [en línea]. S.l.: s.n. Disponible en: [http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx/jspui/bitstream/LITER_CIIDIROAX/510/1/Cruz_Luna%2C D. N. %282021%29.pdf](http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx/jspui/bitstream/LITER_CIIDIROAX/510/1/Cruz_Luna%2C_D._N._%282021%29.pdf).

DE LA ROSA, S.C., MUÑOZ, A.A., BARAHONA, L.F. y GAMBOA, M.M. Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *Letters in Applied Microbiology ISSN* [en línea], vol. 45, pp. 289-294. 2007. DOI 10.1111/j.1472-765X.2007.02185.x. Disponible en: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1303/1/2007_Rosa_Garcia_Susana.pdf.

DEMIRJIAN, D.C., MORÍS-VARAS, F. y CASSIDY, C.S. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, no. 2, pp. 144-151. 2001. ISSN 13675931. DOI 10.1016/S1367-5931(00)00183-6.

DESHWAL, V.K. y KUMAR, P. Effect of Salinity on Growth and PGPR Activity of Pseudomonads Vishal. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)* [en línea], vol. 2, no. 6, pp. 353-356. 2013. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Vk-Deshwal/publication/340504048_Effect_of_Salinity_on_Growth_and_PGPR_Activity_of_Pseudomonads/links/5e8db83a4585150839c7a8c1/Effect-of-Salinity-on-Growth-and-PGPR-Activity-of-Pseudomonads.pdf.

DIONISI, H., LOZADA, M. y OLIVERA, N. Bioprospection of marine microorganisms : potential and challenges for Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2012. vol. 44, no. 2, pp. 122-132. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213024208012>.

DIZ, O.M., Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto* [en línea], 2020. vol. III, pp. 88-111. Disponible en: <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>.

DUPONTT, J., DÍAZ, L., ATENCIO, L. y PÉREZ, A. Susceptibilidad a Hg + 2 y Cd + 2 en cepas bacterianas biodegradadoras " calmare Chico " Estado Zulla Susceptibility To Hg + 2 and Cd + 2 in biodegrading bacterial strains of anthracene isolated at the " calmare Chico " Beach In Zulla State. *Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas* [en línea], no. 3, pp. 252-258. 2001. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/3966/3965>.

ELABED, H., GONZÁLEZ, E., IBACACHE, C., BAKHROUF, A., JOHNSTON, P., GADDOUR, K., BLÁZQUEZ, J. y RODRÍGUEZ, A. Seawater salt-trapped *Pseudomonas aeruginosa* survives for years and gets primed for salinity tolerance. *BMC Microbiology* [en línea], vol. 19, no. 1, pp. 1-13. ISSN 14712180. 2019. DOI 10.1186/s12866-019-1499-2. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1499-2>.

ELGAMAL, M.S., AHMED, A.F. y ABDELBARY, S. Bioscience Research Evaluation of nickel tolerance by identified polluted soils. [en línea], no. January, pp. 518-529. 2018. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/325796034_Evaluation_of_nickel_tolerance_by_identified_Pseudomonas_aeruginosa_isolated_from_Egyptian_polluted_soils.

ESCOBAR, J.J. *Estudio de la Biodiversidad Microbiana en las aguas de la Laguna del Quilotoa, Provincia Cotopaxi-Ecuador* [en línea]. Quito: Universidad Central del Ecuador. Consulta: 20 mayo 2019. [2022]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18197/1/T-UCE-0012-FIG-095.pdf>.

ESCOBAR, S., ALBUJA, A. y ANDUEZA, F.D. Calidad fisicoquímica del agua de la laguna Colta. Chimborazo. Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo* [en línea], vol. 11, no. 1, pp. 80-90. ISSN 1390-7042. 2021. DOI 10.29166/revfig.v11i1.3135. Disponible en: <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/figempa/v11n1/2602-8484-figempa-11-01-00076.pdf>.

FARÍAS, M.E. Microbial Ecosystems in Central Andes Extreme Environments: Biofilms, Microbial Mats, Microbialites and Endoevaporites. *Microbial Ecosystems in Central Andes Extreme Environments: Biofilms, Microbial Mats, Microbialites and Endoevaporites* [en línea], 2020. pp. 1-292. [Consulta: 16 abril 2023]. DOI 10.1007/978-3-030-36192-1/COVER. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-36192-1>.

FERNÁNDEZ, Y., ZAVALA, A.L. y ARAHAL, D.R. Bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho. *Ciencia e Investigación* [en línea], 2007. vol. 10, no. 2, pp. 59-63. ISSN 1561-0861. DOI 10.15381/ci.v10i2.4955. Disponible en:

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/4955/4113>.

FIALLOS, J., DE MADRID, M. de L. y NAVARRO, A. Caracterización serológica de *Escherichia coli* en cepas de origen humano. *Portal de la Ciencia* [en línea], no. 14, pp. 41-52. 2018. Disponible en: https://www.academia.edu/63870218/Caracterización_serológica_de_Escherichia_coli_en_cepas_de_origen_humano.

FLORES, M.L., ZAVALA, A.I. y CHÁVEZ, E.L. Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana - San Martín. *Ciencia e Investigación* [en línea], vol. 13, no. 2, pp. 88-92. ISSN 1561-0861. DOI 10.15381/ci.v13i2.3232. 2010. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v13_n2/pdf/a07v13n2.pdf.

FREITAS, M., BRAGA, N., JATOBÁ, L., PEIXOTO, S., TEIXEIRA, S., CORDEIRO, R. y DE SIMONI, J.J. The presence of plasmids in *Aeromonas hydrophila* and its relationship with antimicrobial and heavy metal-resistance profiles. *Ciência Rural* [en línea], vol. 48, no. 9. DOI 10.1590/0103-8478cr20170813. 2018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170813>. <https://www.scielo.br/j/cr/a/7HmbSqwZftqTnLFTTrZ65NyJ/?format=pdf&lang=en>.

GARCÍA HORSTMANN, Á., *Estudio de microorganismos halófilos moderados productores de exopolisacáridos pertenecientes a salinas de interior en Castilla-La Mancha* [en línea]. S.l.: Universidad Autónoma de Madrid. 2021.

GERWICK, W.H. y SITACHITTA, N. Nitrogen-Containing Metabolites from Marine Bacteria. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* [en línea]. S.l.: s.n. 1998. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1099483108600620>.

GÓMEZ, G. y BATISTA, C. Optimización De Medios De Cultivos Para Microorganismos, Una Valiosa Estrategia Para La Producción De Biopreparados De Interés Agrícola. *Cultivos Tropicales* [en línea], vol. 27, no. 3, pp. 17-24. 2006. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825002.pdf>.

GONG, X., SKRIVERGAARD, S., KORSGAARD, B.S., SCHREIBER, L., MARSHALL, I.P.G., FINSTER, K. y SCHRAMM, A. High quality draft genome sequence of *Janthinobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from a frozen freshwater pond. *Standards in Genomic Sciences* [en línea], vol. 12, no. 1, pp. 1-7. ISSN 19443277. DOI 10.1186/s40793-017-

0230-x. 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s40793-017-0230-x>.

GONZÁLEZ, M., ALARCÓN, D., VITERI, F., VILLACIS, L., ESCOBAR, S., ARAUJO, L., MEDINA, G. y ANDUEZA, F. Microbial biodiversity and biotechnological bioprospection of ecuador andean volcaniclakes View project Chemical and microbiological study of microbial biodiversity or mineral hot springs of Ecuador View project. *Rev Fac Farm* [en línea], vol. 63, no. 2, pp. 27-33. [Consulta: 26 mayo 2022]. 2021. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/352667369>.

GRAJALES, S. y HAHN-VON-HESSBERG, CHRISTINE GRAJALES, A. Reporte de caso de *Aeromonas salmonicida* en tilapia case report of *Aeromonas salmonicida* in nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*) in caldas, Colombia. *Boletín científico centro de museos* [en línea], vol. 22, no. 1, pp. 76-85. DOI 10.17151/bccm.2018.22.1.6. 2018. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v22n1/0123-3068-bccm-22-01-00076.pdf>.

GUANGASIG, V., JARAMILLO, E., TABARES, L., BRITO, G., OÑA, J. y GALARRAGA, E. Calidad fisicoquímica del agua de la laguna Limpiopungo del parque nacional Cotopaxi – Ecuador. [en línea]. 2023. [Consulta: 23 marzo 2023]. Disponible en: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/calidad-fisicoquimica-del-agua-de-la-laguna-limpiopungo-del-parque-nacional-cotopaxi-ecuador/>.

GUATIBONZA, B.R. y TORRIJOS, D.M. *Aislamiento, Evaluación y Selección de Microorganismos con Capacidad de Detoxificación de Cromo a Partir de Muestras de Agua Contaminadas con Metales Pesados* [en línea]. 2018. S.l.: Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Disponible en: [https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/17781/Proyecto de Investigación Diana Marcela Torrijos Gómez y Brusby Rodrigo Guatibonza Hernandez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/17781/Proyecto%20de%20Investigaci3n%20Diana%20Marcela%20Torrijos%20G3mez%20y%20Brusbly%20Rodrigo%20Guatibonza%20Hernandez.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

GUNKEL, G., BEULKER, C., GRUPE, B., GERNET, U. y VITERI, F. Aluminium in Lake Cuicocha, Ecuador, an Andean Crater Lake: Filterable, Gelatinous and Microcrystal Al Occurrence. *Aquatic Geochemistry*, vol. 17, no. 2, pp. 109-127. ISSN 13806165. 2011. DOI 10.1007/s10498-010-9114-z.

GUNKEL, G., BEULKER, C., GRUPE, B. y VITERI, F. Survey and assessment of post volcanic activities of a young caldera lake, Lake Cuicocha, Ecuador. *Natural Hazards and Earth System Science*, vol. 9, no. 3, pp. 699-712. ISSN 16849981. 2009. DOI 10.5194/nhess-9-699-2009.

GUPTA, G., SRIVASSTAVA, S., KHARE, S. y PRAKASH, V. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology* [en línea], vol. 7, no. 2, pp. 371-380. 2014. DOI 10.5958/2230-732X.2014.00258.7. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34878388/2014_IJAEB_G.N._Gupta_Extremophiles-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1653614637&Signature=bSSwfMpJs5Zx~0HP5-rYgZLE6-qwHBXlkJgMuHElnArcl5RjRCaVhD59WgH65CSIC3u80Gwn231j~uOEtMGb1wJsa0mtzw1X-i-hBgvo-sagFmK4XMhTeQ9.

HAJMEER, M., CEYLAN, E., MARSDEN, J.L. y FUNG, D.Y.C. Impact of sodium chloride on Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus analysed using transmission electron microscopy. *Food Microbiology* [en línea], vol. 23, no. 5, pp. 446-452. [Consulta: 4 abril 2023]. ISSN 0740-0020. 2006. DOI 10.1016/J.FM.2005.06.005. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074000200500105X?via%3Dihub>.

HAROUN, A., KAMALUDEEN, K., ALHAJI, I., MAGAJI, Y. y OAIKHENA, E. Evaluation of Heavy Metal Tolerance Level (MIC) and Bioremediation Potentials of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Makera-Kakuri Industrial Drain in Kaduna, Nigeria. *European Journal of Experimental Biology* [en línea], vol. 7, no. 5, pp. 3-6. DOI 10.21767/2248-9215.100028. 2017. Disponible en: <https://www.primescholars.com/articles/evaluation-of-heavy-metal-tolerance-level-mic-and-bioremediation-potentials-of-pseudomonas-aeruginosa-isolated-from-make-92215.html>.

HARRIS, E., *A Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques* [en línea]. S.l.: Oxford University Press UK. ISBN 9780198028017. 1998. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/165410>.

HASSAN, M., LELIE, D. Van Der, SPRINGAEL, D., RO, U., AHMED, N. y MERGEAY, M., Identification of a gene cluster, *czt*, involved in cadmium and zinc resistance in Pseudomonas aeruginosa k. *Gene* [en línea], vol. 238, pp. 417-425. 1999. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111999003492>.

HOOVER, R. y PIKUTA, E., Psychrophilic and Psychrotolerant Microbial Extremophiles in Polar Environments. *Polar Microbiology* [en línea], pp. 115-156. DOI 10.1201/9781420083880-c5. 2009. Disponible en: <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20100002095/downloads/20100002095.pdf>.

HORNUNG, C., POEHLEIN, A., HAACK, F.S., SCHMIDT, M., DIERKING, K., POHLEN, A., SCHULENBURG, H., BLOKESCH, M., PLENER, L., JUNG, K., BONGE, A., KROHN-MOLT, I., UTPATEL, C., TIMMERMANN, G., SPIECK, E., BODE, E., BODE, H.B., DANIEL, R., SCHMEISSER, C., POMMERENING-RO, A. y STREIT, W.R., The Janthinobacterium sp . HH01 Genome Encodes a Homologue of the V . cholerae CqsA and L . pneumophila LqsA Autoinducer Synthases. *Plos One* [en línea], vol. 8, no. 2, pp. 1-16. DOI 10.1371/journal.pone.0055045. 2013. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23405110/>.

HOSSAIN, S.T., MALLICK, I. y KUMAR, S., Ecotoxicology and Environmental Safety Cadmium toxicity in Escherichia coli : Cell morphology , Z-ring formation and intracellular oxidative balance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [en línea], 2012. vol. 86, pp. 54-59. ISSN 0147-6513. DOI 10.1016/j.ecoenv.2012.09.017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.017>.

HRENOVIC, J. y IVANKOVIC, T., Survival of Escherichia coli and Acinetobacter junii at. *Journal of Biosciences*, 2009. vol. 151, no. November, pp. 144-151.

IAÑEZ, E., Microbiología General. [en línea]. 2005. [Consulta: 23 marzo 2023]. Disponible en: https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451642.

IMRON, M.F., KURNIAWAN, S.B., ROZAIMAH, S. y ABDULLAH, S., 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], 2021. vol. 6. Disponible en: <https://sustainenvironres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42834-021-00088-6#Sec17>.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN, *Norma Técnica Colombiana NTC-ISO 5667-12*. 1998. Colombia: s.n.

INSTITUTO GEOFÍSICO - EPN, Campaña de medición de CO2 difuso en la Laguna de Cuicocha - Instituto Geofísico - EPN. [en línea]. [Consulta: 16 abril 2023]. 2022. Disponible en: <https://www.igepn.edu.ec/interactuamos-con-usted/1963-campana-de-medicion-de-co2-difuso-en-la-laguna-de-cuicocha>.

JÁCOME, E.T., VALLEJO, B. y GÓMEZ DE LA TORRE, M., Impactos del cambio climático sobre la flora acuática de las Lagunas Verdes, volcán Chiles, Ecuador. *Biota Colombiana* [en línea], vol. 20, no. 2. ISSN 0124-5376. 2019. DOI 10.21068/c2019.v20n02a02. Disponible en: <http://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/625/655>.

KAPER, J.B., NATARO, J.P. y MOBLEY, H.L.T., Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* [en línea], vol. 2, no. 2, pp. 123-140. 2004. ISSN 17401526. DOI 10.1038/nrmicro818. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>.

KESKIN, D. y EKMEKÇI, S., Investigation of The Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in Foods and The effect of salt and pH on *P. aeruginosa*. *HACETTEPE JOURNAL OF BIOLOGY AND CHEMISTRY* [en línea], 2008. vol. 36, no. 1, pp. 41-46. Disponible en: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1727509>.

KONIG-PÉTER, A., KOCSIS, B., KILÁR, F. y PERNYESZI, T., Bio-adsorption characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2014. vol. 79, no. 4, pp. 495-508. ISSN 18207421. DOI 10.2298/JSC130314070K.

KRIKORIAN, A., *Medio de cultivo: generalidades, composición y preparación* [en línea]. 2015. S.l.: s.n. 2015. Disponible en: [http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo de Tejidos en la Agricultura/capitulo3_parte1.pdf](http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo3_parte1.pdf).

KUMAR, R., ACHARYA, V., SINGH, D. y KUMAR, S., Strategies for high-altitude adaptation revealed from high-quality draft genome of non-violacein producing *Janthinobacterium lividum* ERGS5:01. *Standards in Genomic Sciences* [en línea], 2018. vol. 13, no. 1, pp. 1-13. ISSN 19443277. DOI 10.1186/s40793-018-0313-3. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29721151/>.

KUSHNER, D.J., Halophilic Bacteria. *Advances in Applied Microbiology* [en línea], vol. 10, no. C, pp. 73-99. [Consulta: 31 marzo 2023]. 1968. ISSN 0065-2164. DOI 10.1016/S0065-2164(08)70189-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065216408701898>.

LAMBERT, R.J.W. y BIDLAS, E., Gamma study of pH, nitrite, and salt inhibition of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology* [en línea], 2007. vol. 73, no. 7, pp. 2239-2246. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.02013-06. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/AEM.02013-06?src=getfr>.

LASA, A. y ROMALDE, J.L., Genome sequence of three *Psychrobacter* sp. strains with potential applications in bioremediation. *Genomics Data* [en línea], 2017. vol. 12, pp. 7-10. ISSN 22135960. DOI 10.1016/j.gdata.2017.01.005. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2017.01.005>.

LEE, J., KWON, M., YANG, Y., WOO, J., LEE, K., HONG, G. y KIM, O., Complete Genome Sequence of *Psychrobacter alimentarius* PAMC 27889, a Psychrophile Isolated from an Antarctic Rock Sample. *Genome* [en línea], 2016. vol. 4, no. 4, pp. 4-5. DOI 10.1128/genomeA.00704-16.Copyright. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/genomeA.00704-16>.

LEE, S.W. y WENDY, W., Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*) coinfecting with motile *aeromonas* septicemia and edwardsiellosis. *Veterinary World* [en línea], 2017. vol. 10, pp. 803-807. DOI 10.14202/vetworld.2017.803-807. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5553151/pdf/VetWorld-10-803.pdf>.

LEMA, J.E., “*evaluación de la tolerancia a metales pesados: Cobalto, Mercurio y Plomo en microorganismos aislados de laguna de Ozogoché en la parroquia Achupallas del Cantón Alausí*” [en línea]. 2019. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [Consulta: 20 mayo 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/13203/1/236T0462.pdf>.

LI, Q., CSETENYI, L. y GADD, G.M., Biomineralization of metal carbonates by *Neurospora crassa*. *Environmental Science and Technology* [en línea], vol. 48, no. 24, pp. 14409-14416. ISSN 15205851. 2014. DOI 10.1021/es5042546. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01442/full>.

LI, Y., XU, Z., DU, L., FENG, Y., CAI, L. y ZHU, J., A novel *Enterobacter cloacae* MR-1 capable of simultaneous chromate reduction and azo dye decolorization. 2019. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 364, pp. 411-419.

LONDOÑO, L.F., LONDOÑO, P.T. y MUÑOZ, F.G., Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Biocnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 14, no. 2, pp. 145. 2016. DOI 10.18684/bsaa(14)145-153.

LUQUE, R., QUESADA, E., BÉJAR, V. y LLAMAS, I., *Aislamiento de cepas del género Halomonas con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia)* [en línea]. 2010. S.l.: s.n. Disponible en: [https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/26609/Ars Pharm 2010%3B51%28Suppl3%29453-462.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/26609/Ars_Pharm_2010%3B51%28Suppl3%29453-462.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

MACRI, M., SICA, D. y MORÓN, G.D., Exposición a Cromo y sus compuestos. [en línea], 2019. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/13_cromo_guia_de_actuacion_y_diagnostico.pdf.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., BENDER, K.S., BUCKLEY, D.H. y STAHL, D.A., *Brock Biología de los microorganismos*. 2015. S.l.: s.n. ISBN 9788490225370.

MADRIGAL, L.S., MORÁN, E.F. y MÉNDEZ, J.Á., bioprospección y sustentabilidad participativa : una mirada Bioprospecting and democracy : a view from the right to biological diversity. 2014. [en línea], vol. 3, no. 5. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4773589>.

MAIER, R.M. y NEILSON, J.W., *Extreme Environments* [en línea]. S.l.: Elsevier Inc. ISBN 9780123946263. 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00007-7>.

MARRERO, J., DÍAZ, A. y COTO, O., Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* [en línea], vol. 41, no. 1. ISSN 0253-5688. 2010. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf>.

MARTÍNEZ, A., CRUZ, M., VERANES, O., CARBALLO, M.E., SALGADO, I., OLIVARES, S., LIMA, L. y RODRÍGUEZ, D., 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* [en línea], vol. 41, pp. 1-10. 2010. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509038.pdf>.

MENA, M.P. y RAFAEL, H., *biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de pasivos ambientales mineros y aguas del Rio Hualgayoc - Cajamarca* [en línea]. S.l.: s.n. 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v19n2/0124-7107-reus-19-02-00309.pdf>.

MENCHACA, N.D., *Aislamiento e identificación de bacterias metalófilas resistentes a cromo hexavalente con potencial aplicación en procesos de biorremediación* [en línea]. S.l.: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. 2015. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/11393/1/1080215523.pdf>.

MENESES, L.A., *bacterioplancton de tres lagunas de alta montaña tropical andina en el departamento de Boyacá, Colombia* [en línea]. S.l.: s.n. 2013. Disponible en: <https://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/handle/001/2008/TGT-635.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

MENG, Y., XUE, X., WANG, L., XU, H., XU, L. y YANG, Y., The effects of cadmium on cell growth and fatty acid composition of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019. vol. 26, no. 26, pp. 27100- 27107.

Ministerio Del Ambiente Agua Y Transición Ecológica, *Norma De Calidad Ambiental Y De Descarga De Efluentes : Recurso Agua*. 2015. S.l.: s.n. 2015. Libro VI-Anexo 1.

MOHAMED, M.S.M., EL-ARABI, N.I., EL-HUSSEIN, A., EL-MAATY, S.A. y ABDELHADI, A.A., Reduction of chromium-VI by chromium-resistant *Escherichia coli* FACU: a prospective bacterium for bioremediation. *Folia Microbiologica* [en línea], vol. 65, no. 4, pp. 687-696. ISSN 18749356. DOI 10.1007/s12223-020-00771-y. 2020. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31989423/>.

MONDAL, S., BHATTACHARYA, S. y DATTA, S., Characterization of chromium-resistant *Alcaligenes faecalis* strains isolated from tannery effluent. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017. vol. 24, no. 7, pp. 6491-6501.

MORADALI, M.F., GHODS, S. y REHM, B.H.A., *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle : A Paradigm for Adaptation , Survival , and Persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology* [en línea], vol. 7, pp. 1-29. DOI 10.3389/fcimb.2017.00039. 2017. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00039/full>.

MORAGA, R., MERINO, C. y MONDACA, M.A., Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas* [en línea], vol. 31, no. 1, pp. 91-95. 2003. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/imar/v31n1/art10.pdf>.

MORALES, R., *Estudio de las Comunidades de Rotíferos Monogontes de las Lagunas de Alta Montaña de Sierra Nevada*. S.l.: 1985. Universidad de Granada.

MORENO, L.V., *Caracterización de cepas bacterianas de la laguna Amarilla perteneciente al nevado El Altar En La Provincia De Chimborazo* [en línea]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [Consulta: 19 mayo 2022]. 2017. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/13203/1/236T0462.pdf>.

MORITA, R.Y., The starvation-survival state of microorganisms in nature and its relationship to the bioavailable energy. *Experientia* [en línea], vol. 46, no. 8, pp. 813-817. ISSN 1420-9071. DOI 10.1007/BF01935530. 1990. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF01935530>.

MOROZKINA, E. V., SLUTSKAYA, E.S., FEDOROVA, T. V., TUGAY, T.I., GOLUBEVA, L.I. y KOROLEVA, O. V., Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 1-14. ISSN 00036838. 2010. DOI 10.1134/S0003683810010011.

MOUBASHER, A.-A.H., ABDEL-SATER, M.A. y SOLIMAN, Z.S.M., Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. *J. Mycol. Médicale* [en línea], vol. 28, pp. 76-86. DOI 10.1016/j.mycmed.2017.12.003. 2017. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29602635/>.

NASELLI, L., DOKULIL, M., ELLIOTT, A. y PADISÁK, J., New, old and evergreen frontiers in freshwater phytoplankton ecology: the legacy of Colin S. Reynolds. *Springer Nature Switzerland* [en línea], 2021. Disponible en: <https://nora.nerc.ac.uk/id/eprint/529084/3/N529084PP.pdf>.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, Hibridación fluorescente in situ (FISH). [en línea]. [Consulta: 21 marzo 2023]. 2023a. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Hibridacion-fluorescente-in-situ>.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, Tecnología de microarrays (chips de ADN o ARN). [en línea]. [Consulta: 21 marzo 2023]. 2023b. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Tecnologia-de-microarrays>.

NIES, D., NIES, A., H., C.L. y SILVER, S., Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. vol. 86, no. 19, pp. 7351- 7355.

NIES, D.H., The Cobalt , Zinc , and Cadmium Efflux System CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* Functions as a Cation-Proton Antiporter in *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* [en línea], vol. 177, no. 10, pp. 2707-2712. 1995. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7751279/>.

NORDBERG, G., *METALES: PROPIEDADES QUIMICAS Y TOXICIDAD* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 20 julio 2022]. 2012. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/162520/Capítulo+63.+Metales+propiedades+químicas+y+toxicidad>.

OARGA, A., Life in extreme environments. *REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA*, 2009. vol. 9, no. 1995, pp. 1-10.

OCHOA, S.A., LÓPEZ, F., ESCALONA, G., CRUZ, A., DÁVILA, L.B., LÓPEZ, B., JIMÉNEZ, Y., GIONO, S., ESLAVA, C., HERNÁNDEZ, R. y XICOHTENCATL, J., Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Medigraphic* [en línea], vol. 70, no. 2, pp. 138-150. 2013. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v70n2/v70n2a10.pdf>.

OKEKE, B.C., Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [en línea], vol. 35, no. 12, pp. 1571-1579. ISSN 13675435. DOI 10.1007/s10295-008-0399-5. 2008. Disponible en: https://watermark.silverchair.com/jimb1571.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAac485ysgAAAsowggLGBgkqhkiG9w0BBwaggK3MIICswIBADCCAqwGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMENwCVxm5luo7G8_2AgEQgIICfWIL3mzAA4HjYR__obVT4rEZQPkRGXEQ0t6Q8KiykpsF4I.

OMOTOYINBO, O. y OMOTOYINBO, B., Effect of Varying NaCl Concentrations on the Growth Curve of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Science Publishing Group* [en línea], pp. 31-34. DOI 10.11648/j.cb.20160405.11. 2017. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Oluwasegun-Omotoyinbo/publication/321213003_Effect_of_Varying_NaCl_Concentrations_on_the_Growth

[_Curve_of_Escherichia_coli_and_Staphylococcus_aureus/links/5a15383a4585150052132618/Eflect-of-Varying-NaCl-Concentrations-o.](#)

OVES, M., KHAN, M.S. y ZAIDI, A., Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. *European Journal of Soil Biology* [en línea], vol. 56, pp. 72-83. ISSN 1164-5563. 2013. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.02.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.02.002>.

PADILLA, C., DIEZ, J., MARTÍNEZ, E., BÁRCENA, J. y GARCÍA, C., *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico.* [en línea]. 2011. S.l.: s.n. 2011. Disponible en: [https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17 ELECTROFORESIS ACS NUCLEICOS GELES AGAROSA.pdf](https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17_ELECTROFORESIS_ACS_NUCLEICOS_GELES_AGAROSA.pdf).

PADMAPRIYA, P., USHA, M.S., ARULSELVI, P.I. y VASANTHI, N.S., Isolation and characterization of Cr(VI) resistant *Pseudomonas aeruginosa* from tannery effluent. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018. I vol. 7, no. 7, pp. 190-197.

PAL, C., BENGTSSON-PALME, J., KRISTIANSOON, E. y LARSSON, D.G.J., Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* [en línea], vol. 16, no. 1, pp. 1-14. ISSN 14712164. DOI 10.1186/s12864-015-2153-5. 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>.

PALLERONI, N.J., The pseudomonas story. *Environmental Microbiology* [en línea], vol. 12, no. 6, pp. 1377-1383. ISSN 14622912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x. 2010. Disponible en: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>.

PANIAGUA, G.L., MONROY, E., VACA, S. y GONZÁLEZ, S.E., Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. *Revista Médica del Hospital General de México S.S.* [en línea], vol. 66, no. 1, pp. 13-21. ISSN 0185-1063. 2003. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2003/hg031c.pdf>.

PANIGATTI, M.C., GRIFFA, C., BOGLIONE, R., GENTINETTA, F. y CASSINA, D., Uso de Escherichia Coli para biorremediación de efluentes contaminados por Cromo. *Avances en Ciencias e Ingeniería* [en línea], vol. 3, no. 2, pp. 11-24. 2012. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323627686002.pdf>.

PARQUES NACIONALES NATURALES DE COLOMBIA DIRECCIÓN TERRITORIAL AMAZONÍA, *Protocolo para Toma Muestras Sedimentos de de para de Análisis Mercurio y otros Metales*. Cartagena: 2018. s.n.

PARSHINA, S.N., STREPIS, N., AALVINK, S., NOZHEVNIKOVA, A.N., STAMS, A.J.M. y SOUSA, D.Z., Trichococcus shcherbakoviae sp. nov., isolated from a laboratory-scale anaerobic EGSB bioreactor operated at low temperature. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 69, no. 2, pp. 529-534. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijsem.0.003193. 2019. Disponible en: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/69/2/529_ijsem003193.pdf?expires=1681269890&id=id&accname=guest&checksum=C883A911AD72145CD6F5EDB100EBAE.

PAVLOV, M.S., LIRA, F., MARTINEZ, J.L., OLIVARES-PACHECO, J. y MARSHALL, S.H., Pseudomonas fildesensis sp. Nov., a psychrotolerant bacterium isolated from antarctic soil of king george island, South Shetland Islands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 70, no. 5, pp. 3255-3263. ISSN 14665034. DOI 10.1099/ijsem.0.004165. 2020. Disponible en: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/70/5/3255_ijsem004165.pdf?expires=1681421880&id=id&accname=guest&checksum=40A3F4FAA65E140EA47E0F2C63E78D4E.

PAZ, V.M., MANGWANI, S., MARTÍNEZ, A., ÁLVAREZ, D., SOLANO, S.G. y VÁZQUEZ, R., Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología* [en línea], vol. 36, no. 2, pp. 180-189. ISSN 0716-1018. DOI 10.4067/s0716-10182019000200180. 2019. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v36n2/0716-1018-rci-36-02-0180.pdf>.

PELLIZZARI, E., MARINICH, L., FLORES, S. y GIMÉNEZ, C., Degradación de arsénico por Pseudomonas aeruginosa para bioremediación de agua. Estudio preliminar. *Avances en Ciencias e Ingeniería* [en línea], vol. 6, no. 1, pp. 1-6. 2015. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323635882001.pdf>.

PÉREZ, G.R. y RAMÍREZ, J.J., *Fundamentos de limnología neotropical* [en línea]. 2a. Medellín: s.n. ISBN 9789587141443. 2008. Disponible en: https://www.academia.edu/41460514/FUNDAMENTOS_DE_LIMNOLOGIA_NEOTROPICAL_2DA_ED_ROLDAN_RAMIREZ.

PIKUTA, E. V., HOOVER, R.B., BEJ, A.K., MARSIC, D., WHITMAN, W.B., KRADER, P.E. y TANG, J., *Trichococcus patagoniensis* sp. nov., a facultative anaerobe that grow at -5 °C, isolated from penguin guano in Chilean Patagonia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. 9, pp. 2055-2062. 2006. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijms.0.64225-0.

PINILLA BERMUDEZ, G., *Biología molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones* [en línea]. S.l.: Editorial El Manual Moderno Colombia. ISBN 9789588993423. 2019. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/128367>.

PINO, E.G.L., *Caracterización De Bacterias Aisladas De La Laguna Negra En La Provincia De Chimborazo*. S.l.: 2020. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

PLEMENTAS, A., VAUPOTIC, T., LENASSI, M., KOGEJ, T. y GUNDE, N., Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology* [en línea], vol. 61, pp. 67-75. ISSN 01660616. DOI 10.3114/sim.2008.61.06. 2008. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2610308/pdf/0067.pdf>.

PUICON, Y. y HURTADO, J., Bioremediation of soils polluted with mercury by using *Pseudomonas* sp isolated from informal mining zones. *Universidad Peruana Cayetano Heredia* [en línea], pp. 1-7. 2013. Disponible en: <https://www.aidisnet.org/wp-content/uploads/2019/07/233-Peru-oral.pdf>.

QIAN, J., ZHOU, J., WANG, L., WEI, L., LI, Q., WANG, D. y WANG, Q., Direct Cr (VI) bio-reduction with organics as electron donor by anaerobic sludge. *Chemical Engineering Journal* [en línea], vol. 309, no. 127, pp. 330-338. ISSN 13858947. DOI 10.1016/j.cej.2016.10.077. 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.077>.

RAHMAN, K., MENON, U., SIVASUBRAMANIAN, V. y RANJITHA, J., Removal of cadmium by heavy metal-resistant bacteria isolated from Hussain Sagar Lake—Hyderabad. *Biomass Conversion and Biorefinery* [en línea], vol. 12, no. 5, pp. 1703-1713. ISSN 21906823. DOI 10.1007/s13399-021-01354-8. 2021. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31989423/>.

RAJA, C.E. y SELVAM, G.S., Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. *International Journal of Environmental Science and Technology* [en línea], vol. 6, no. 2, pp. 259-266. ISSN 17352630. DOI 10.1007/BF03327630. 2009. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?st09029>.

RAMÍREZ, M., DÍAZ, C., VARGAS, E., RIVEROS, H., CAMPOS, J. y CERVANTES, C., Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Springer Science* [en línea], vol. 21, pp. 321-332. DOI 10.1007/s10534-007-9121-8. 2008. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17934697/>.

RAMÍREZ, N., SERRANO, J.A. y SANDOVAL, H., Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea], vol. 37, pp. 56-71. 2006. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>.

RAVISHANKAR, S. y JUNEJA, V.K., Preservatives: Traditional Preservatives - Sodium Chloride. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* [en línea], pp. 131-136. DOI 10.1016/B978-0-12-384730-0.00259-7. 2014. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002597?via%3Dihub>.

RED SISMOLÓGICA NACIONAL, ¿La temperatura de los lagos volcánicos puede dar alguna señal de erupción? [en línea]. [Consulta: 24 marzo 2023]. 2018. Disponible en: <https://rsn.ucr.ac.cr/documentos/educativos/vulcanologia/348-la-temperatura-en-los-lagos-volcanicos-da-alguna-senal-de-erupcion>.

RIVERA, A., CHÁVEZ, E., RENDÓN, G. y GIONO, S., VIABILIDAD DE *Escherichia coli* EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONTAMINANTES. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [en línea], vol. 23, no. 2, pp. 110-113. 2006. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v23n2/a06v23n2.pdf>.

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

RODRÍGUEZ, C. y ZHUBERNKO, R., *MANUAL BioCen DE MEDIOS DE CULTIVO* [en línea]. 2018. S.l.: s.n. 2018. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>.

RODRÍGUEZ, L., *Aislamiento Y Caracterización De Bacterias Resistentes a Metales Pesados Obtenidas De Ambientes Contaminados Con Derivados De Hidrocarburos En La Ciudad De Riobamba* [en línea]. 2017. S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6625/3/236T0257.pdf>.

RODRÍGUEZ, R. y SUESCÚN, G., Aplicaciones e inconvenientes de la técnica hibridación in situ fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Salud Uninorte* [en línea], vol. 29, no. 2, pp. 327-340. ISSN 20117531. 2013. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4773589>.

RONDAN, C.I. y ZEGARRA, F.T., *CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS HALÓFILAS, INMOVILIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE Cu (II) Y Cd (II)* [en línea]. S.l.: UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA FACULTAD. 2014. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/198133172.pdf>.

ROSAS, J.R., *Identificación de bacterias halófilas tolerantes a metales pesados* [en línea]. S.l.: Universidad Autónoma del Estado de México. 2017. Disponible en: http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/79794/Tesis_JRRR.pdf?sequence=1&isAllowed=y Maestría

RUBIO, S., PACHECO, R.A., GÓMEZ, A.M., PERDOMO, S. y GARCÍA, R., Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica* [en línea], vol. 61, no. 2. ISSN 0041-9095. DOI 10.11144/javeriana.umed61-2.sngs. 2019. Disponible en: [https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2\(2020\)/231062391008/231062391008_visor_jats.pdf](https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2(2020)/231062391008/231062391008_visor_jats.pdf).

SALAZAR, A., SANDOVAL, A. y ARMENDÁRIZ, J., *Biología Molecular Fundamentos y Aplicaciones en las ciencias de la salud.* México, D. F.: McGRAW-HIL. ISBN 9788578110796.

SALGADO, C., 2018. *Evaluación de resistencia de bacterias a los metales pesados, en la microcuenca del Rio Chibunga* [en línea]. 2013. S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/10243>.

SAMANIEGO, L.M., MAIMOUNA, H., CORBEA, O., RONDÓN CASTILLO, A.J. y PLACERES ESPINOZA, I., Aislamiento , identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp . antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal* [en línea], vol. 33, no. 3, pp. 1-11. 2018. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v33n3/2224-4697-rpv-33-03-e02.pdf>.

SAMPIERI, R., COLLADO, C. y BAPTISTA, M. del P., *Metodología de la investigación* [en línea]. VI. S.l.: s.n. [Consulta: 13 junio 2022]. ISBN 9781456223960. 2014. Disponible en: <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>.

SÁNCHEZ, M.L., Importancia de la prolina como regulador osmótico natural y el efecto de su aplicación exógena en la disminución de los efectos del estrés hídrico en la planta | Metroflor. *Metroflor-agro* [en línea]. [Consulta: 6 abril 2023]. 2020. Disponible en: <https://www.metroflorcolombia.com/importancia-de-la-prolina-como-regulador-osmotico-natural-y-el-efecto-de-su-aplicacion-exogena-en-la-disminucion-de-los-efectos-del-estres-hidrico-en-la-planta/>.

SANTAMBROSIO, E., ORTEGA, M. y GARIBALDI, P., Tinción y observación de microorganismos. *Universidad Tecnológica Nacional* [en línea], pp. 9. 2009. Disponible en: http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_ano/biotecnologia/practico4.pdf.

SANTANA, A., SÁNCHEZ, A. y ROMERO, Y., Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados , obtenidas de los jales mineros El Fraile , México Identification and isolation of heavy-metal tolerant and bioaccumulator bacteria obtained from El Fraile mine tai. *TERRA LATINOAMERICANA* [en línea], vol. 38, no. 1, pp. 67-75. 2019. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v38n1/2395-8030-tl-38-01-67.pdf>.

SATARUG, S., BAKER, J.R., URBENJAPOL, S., HASWELL-ELKINS, M., REILLY, P.E., WILLIAMS, D.J. y MOORE, M.R., A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters*, vol. 192, no. 2, pp. 151-159. 2010.

SCHLOSS, P.D., ALLEN, H.K., KLIMOWICZ, A.K., MLOT, C., GROSS, J.A., SAVENGSUKSA, S., MCELLIN, J., CLARDY, J., RUESS, R.W. y HANDELSMAN, J., Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA and Cell Biology* [en línea], vol. 29, no. 9, pp. 533-541. ISSN 10445498. 2010. DOI 10.1089/dna.2010.1020. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20626288/>.

SCHUMANN, P., HIPPE, H. y STRA, B., *Exiguobacterium undae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 52, pp. 1171-1176. 2002. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/52/4/0521171a.pdf?expires=1681271341&id=id&accname=guest&checksum=CF4094CB0E9E5DEE8519138224B07C04>.

SECKBACH, J., OREN, A. y STAN-LOTTER, H., *Polyextremophiles*. S.l.: s.n. ISBN 9789400764873.

SERRATO, A., FLORES, L., APORTELA, J. y SIERRA, E., *PCR: Reaccion en cadena de la Polimerasa* [en línea]. 1997. S.l.: s.n. 2013. Disponible en: <http://www.iztacalco.df.gob.mx/inicio/images/pdf/PCR.pdf>.

SHARMA, J., MATHUR, N. y SINGH, A., Protease Production from Polyextremophilic Bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [en línea], vol. 5, no. 5, pp. 807-815. 2016. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/71042456/Jyoti_20Sharma__20et_20al-libre.pdf?1633212474=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DProtease_Production_from_Polyextremophil.pdf&Expires=1653585232&Signature=SQqc5fzSNz7kEi30FgrIT40RRNnE8129V6AJ.

SINGH, V., CHAUHAN, P.K., KANTA, R., DHEWA, T. y KUMAR, V., Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [en línea], vol. 3, no. 2, pp. 164-167. ISSN 0976044X. 2010. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Tejpal-Dhewa/publication/259752634_Isolation_and_characterization_of_Pseudomonas_resistant_to_heavy_metals_contaminants/links/0046352d9377f74856000000/Isolation-and-characterization-of-Pseudomonas-resistant-to-heavy-me.

SRINIVASAN, V., SELVAM, G. y PHILIP, L., Bioremediation of hexavalent chromium (Cr(VI)) by *Rhodococcus opacus* isolated from tannery effluent contaminated soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 6, no. 4, pp. 5444-5454. 2018.

STREPIS, N., NARANJO, H.D., MEIER-KOLTHOFF, J., GÖKER, M., SHAPIRO, N., KYRPIDES, N., KLENK, H.P., SCHAAP, P.J., STAMS, A.J.M. y SOUSA, D.Z., Genome-guided analysis allows the identification of novel physiological traits in *Trichococcus* species. *BMC Genomics* [en línea], vol. 21, no. 1, pp. 1-13. ISSN 14712164. DOI 10.1186/s12864-019-6410-x. 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6950789/>.

TAKAI, K., NAKAMURA, K., TOKI, T., TSUNOGAI, U., MIYAZAKI, M., MIYAZAKI, J., HIRAYAMA, H., NAKAGAWA, S., NUNOURA, T. y HORIKOSHI, K., Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 31, pp. 10949-10954. ISSN 00278424. 2008. DOI 10.1073/pnas.0712334105.

TAN, L., QU, Y.Y., ZHOU, J.T., LI, A. y GOU, M., Identification and characteristics of a novel salt-tolerant exiguobacterium sp. for Azo. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 159, no. 3, pp. 728-738. ISSN 02732289. 2009. DOI 10.1007/s12010-009-8546-7.

TORRES, O.D. y VELHO, L., La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciencia da Informacao* [en línea], vol. 38, no. 3, pp. 96-110. ISSN 01001965. DOI 10.1590/S0100-19652009000300007. 2009. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/ci/a/ZbqbSBpwfZq3TgPjSb63PYf/?format=pdf&lang=es>.

TRONCOSO, C., PAVEZ, M., SANTOS, A., SALAZAR, R. y BARRIENTOS DÍAZ, L., Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *International Journal of Morphology* [en línea], vol. 35, no. 4, pp. 1214-1223. ISSN 07179502. DOI 10.4067/S0717-95022017000401214. 2017. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v35n4/0717-9502-ijmorphol-35-04-01214.pdf>.

UMAÑA, G., Comparison of basic limnological aspects of some crater lakes in the Cordillera Volcánica Central, Costa Rica. *Revista Geológica de América Central* [en línea], no. 43. ISSN 0256-7024. DOI 10.15517/rgac.v0i43.3461. 2009. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=45437350007>.

VALDEZ, K.K., *Estudio de la reducción de compuestos orgánicos en agua residual salina mediante microorganismos halotolerantes.pdf* [en línea]. S.l.: CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.C. 2014. Disponible en: [https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/330/1/Estudio de la reducción de compuestos orgánicos en agua residual salina mediante microorganismos halotolerantes.pdf](https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/330/1/Estudio%20de%20la%20reducci3n%20de%20compuestos%20org3nicos%20en%20agua%20residual%20salina%20mediante%20microorganismos%20halotolerantes.pdf).

VARELA, G., CHINEN, I., GADEA, P., MILIWEBSKY, E., MOTA, M.I., GONZÁLEZ, S., GONZÁLEZ, G., GUGLIADA, M.J., CARBONARI, C., ALGORTA, G., BERNADÁ, M., SABELLI, R., PARDO, L., RIVAS, M. y SCHELOTTO, F., <Varela 2008 SUH Uruguay.pdf>. *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 40, pp. 93-100.

VÁSQUEZ, P.C., *Análisis fisicoquímico, químico y microbiológico del agua y sedimento periférico de la Laguna Cuicocha, provincia de Imbabura – Ecuador* [en línea]. S.l.: Universidad Central del Ecuador. 2022. Disponible en: [http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/28413/1/UCE-FIGEMPA-CIA-VASQUEZ PAOLA.pdf](http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/28413/1/UCE-FIGEMPA-CIA-VASQUEZ%20PAOLA.pdf).

VÁSQUEZ, Y.M., VILLAMIL, J.C., SÁNCHEZ, L.C. y LANCHEROS, A.G., Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres. *Nova* [en línea], vol. 12, no. 21, pp. 57. ISSN 1794-2470. DOI 10.22490/24629448.996. 2014. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n21/v12n21a05.pdf>.

VÁZQUEZ, G. y CABALLERO, M., Los lagos volcánicos y el cambio climático. [en línea]. [Consulta: 24 marzo 2023]. 2021. Disponible en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1192-los-lagos-volcanicos-y-el-cambio-climatico>.

VELÁSQUEZ, A.V., QUINTERO DE LA HOZ, M., JIMÉNEZ, E.Y., BLANDÓN, L.M. y GÓMEZ, J., *Microorganismos marinos extremófilos con potencial en bioprospección*. 2018. S.l.: s.n. 2018.

VIDAL, J.E., CANIZÁLEZ, A., GUTIÉRREZ, J. y NAVARRO, F., Patogénesis molecular , epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. , vol. 49, no. 5. 2007.

VIJAYADEEP, C. y SASTRY, P., Effect of Heavy Metal Uptake by E. coli and Bacillus sps. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* [en línea], vol. 05, no. 05, pp. 8-10. DOI 10.4172/2155-6199.1000238. 2014. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/effect-of-heavy-metal-uptake-by-e-coli-and-bacillus-sps-2155-6199.1000238.php?aid=30272>.

WANG, J., WANG, Y. y LI, Q., Potential contributions of extremophiles to hydrocarbon resources in marine extreme environments: A review. *Frontiers of Earth Science in China*, vol. 1, no. 4, pp. 444-451. ISSN 20950209. DOI 10.1007/s11707-007-0055-9. 2007.

WANG, L., CUI, Y., LI, X., LI, J., XIE, X. y LI, Y., Cadmium-resistant strain Micrococcus sp. LCR12 from a high-cadmium environment: its role in reducing cadmium accumulation in Brassica napus. . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015. vol. 122, pp. 122-128.

WANG, X., ZHANG, T., WANG, Y., SUN, X. y ZHU, L., Effect of cadmium on Bacillus cereus S5 growth, metabolism and gene expression. *Science of The Total Environment*, 2020. vol. 703, pp. 135561.

YOON, J.H., YEO, S.H., OH, T.K. y PARK, Y.H., Psychrobacter alimentarius sp. nov., isolated from squid jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 55, no. 1, pp. 171-176. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijms.0.63140-0. 2005. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/55/1/171.pdf?expires=1681280019&id=id&accname=guest&checksum=19752E1E127A8C6A1897F1C9C4552F60>.

ZAMBONELLI, C., *Microbiologia dei salumi*. 1992. S.l.: Edagricole.

ANEXOS

ANEXO A: INFORME DE RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001



Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Aislamiento e identificación molecular de microorganismos – David Samaniego / Camila Mosquera

Informe No.: A-382

Técnico Responsable: Francisco Garrido, Ing.

Fecha: 06/04/2023

Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
B608	MC8-R1-C6	531	<i>Pseudomonas fildesensis</i> <i>Pseudomonas veronii</i>	16s	99.43 99.43	NR_170438.1 NR_028706.1
B609	MC16-R3-C3	1401	<i>Trichococcus patagoniensis</i>	16s	96.86	NR_041841.1
B610	MC16-R6-C9	353	<i>Janthinobacterium</i> sp.	16s	100	CP019510.1
B611	MC4-R2-C8	1459	<i>Pseudomonas</i> sp.	16s	100	JF312964.1
B612	MC12-R2-C4	1484	<i>Exiguobacterium undae</i>	16s	99.87	NR_043477.1
B613	MC12-R1-C1	886	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	16s	99.79	NR_025798.1
B614	MC16-R2-C7	1459	<i>Pseudomonas</i> sp.	16s	99.93	CP019398.1
B615	MC4-R1-C5	794	<i>Aeromonas salmonicida</i>	16s	100	CP052034.1

Firma

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen



esPOCH

**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: 17 / 07 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Camila Stefanía Mosquera Chichande David Armando Samaniego Sánchez
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

1266-DBRA-UPT-2023