



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DE LA LAGUNA
AMARILLA PERTENECIENTE AL NEVADO EL ALTAR EN LA
PROVINCIA DE CHIMBORAZO**

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para obtener al grado académico de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: LOURDES VERÓNICA MORENO AYALA
TUTORA: PAOLA CHILUIZA RAMOS MSc.

Riobamba-Ecuador

2017

© 2017, Lourdes Verónica Moreno Ayala

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de titulación experimental certifica que: El trabajo de investigación: “CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DE LA LAGUNA AMARILLA PERTENECIENTE AL NEVADO EL ALTAR EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”, de responsabilidad de la señorita egresada Lourdes Verónica Moreno Ayala, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Paola Chiluiza MSc.

DIRECTOR DE TESIS

Irene Gavilánez Ph.D

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Lourdes Verónica Moreno Ayala, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Lourdes Verónica Moreno Ayala
060408091-1

AGRADECIMIENTO

A Dios y María Auxiliadora, por bendecirme en todo momento.

A mis papis, por su paciencia y comprensión durante todo este proceso de locos, especialmente por alentarme a demostrar que lo que se quiere, se puede, gracias por acompañarme siempre.

A mis hermanos, Sebas y Joha y mi pequeña Isabella, que haría sin ustedes.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por haber permitido mi formación profesional y permitirme conocer a valiosas personas con las que los sueños se hicieron realidad, Andre S., Mari G., Feli P., Dani C., Cris Ch., Jessy N. y César G.

A Pao Chiluiza R., por haber sido la primera persona que me introdujo en el interesante mundo microbiano, por los conocimientos brindados, apoyo y cariño incondicional, por ser la amiga que me recuerda que “la vida está hecha de esperanzas”.

A mi amiga y hermana del alma, Anita, seguramente si no fuese por ti, hubiese renunciado sin haber empezado.

A Pedrito y Guido por su apoyo incondicional durante todo este enriquecedor proceso y todas esas salidas a lugares increíbles.

A Carlita H., Gise R, Vero V., Miguel S., y Amparito J. por hacer de esta experiencia en el laboratorio más divertida y enriquecedora pero sobre todo por compartir conocimientos, frustración, y alegrías microbianas

A mis amigos, Dr. Segundo T., Rafita P., Marjorie M., Antonella C., Alexa C., Andrea E. que aportaron con consejos, sonrisas y tranquilidad para que este logro quede plasmado en una de las tantas páginas del libro de mi vida.

Vero

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	16
1.1.	Antecedentes de la investigación.....	16
1.2.	Bioprospección	17
1.2.1.	Técnicas actuales de Bioprospección.	18
1.2.2.	Ambientes extremos	19
1.2.3.	Microorganismos extremófilos.....	20
1.2.3.1.	Microorganismos psicrófilos.....	20
1.2.3.2.	Microorganismos psicrotolerantes.	22
1.3.	Adaptaciones moleculares de los microorganismos psicrófilos.	23
1.3.1.	Aumento de la fluidez de la membrana plasmática.	24
1.3.2.	Producción de enzimas.	24
1.3.3.	Proteínas anticongelantes y crioprotectoras.....	24
1.3.4.	Formación de pigmentos.....	25
1.3.5.	Procesos de transcripción y traducción.....	25
1.4.	Importancia biotecnológica de las bacterias psicrófilas.	25
1.4.1.	Producción de exopolisacáridos	26
1.4.2.	Producción de enzimas	26
1.5.	Métodos de identificación microbiana.....	26
1.5.1.	Identificación fenotípica.	26
1.7.1.1.	Caracterización microscópica	27
1.7.1.2.	Caracterización macroscópica.....	27
1.7.1.3.	Caracterización Bioquímica.....	28
1.8.	Parque nacional Sangay	29
1.8.1.	Descripción de la Laguna Amarilla	30

CAPÍTULO 2

2.	MARCO METODOLÓGICO	31
3.1.	Tipo de investigación.....	32
3.2.	Diseño de la investigación.....	32
3.3.	Unidad de análisis.....	32
3.4.	Etapas de la investigación.....	32
3.4.1.	Recolección de la muestra.	32
3.4.1.1.	Análisis físico-químico del agua superficial de la Laguna Amarilla	32
3.4.1.2.	Análisis microbiológico.	33
3.4.2.	Aislamiento de cepas bacterianas	33
3.4.2.1.	Preparación de los medios de cultivo.....	33
3.4.2.2.	Suplemento de los medios de cultivo.....	35
3.4.2.3.	Inoculación de las muestras	35
3.4.2.4.	Incubación de los inóculos.....	35
3.4.2.5.	Aislamiento de las cepas bacterianas	36
3.4.3.	Caracterización fenotípica	36
3.4.3.1.	Caracterización macroscópica.....	36
3.4.3.2.	Caracterización microscópica.	36
3.4.3.3.	Caracterización bioquímica tradicional.....	37
3.4.4.	Test fisiológicos.....	39
3.4.4.1.	Hidrólisis de la caseína	39
3.4.4.2.	Hidrólisis del almidón.....	39
3.4.4.3.	Hidrólisis de la gelatina.....	40
3.4.4.4.	Prueba de resistencia a Cromo VI.....	40
3.4.4.5.	Prueba a concentraciones halófilas	40
3.4.5.	Prueba de sensibilidad antibiótica	40
3.4.6.	Curvas de crecimiento	41

CAPÍTULO 3

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1.	Resultados de análisis físico-químico del agua.	42
3.2.	Aislamiento de cepas bacterianas	45

3.2.1.	Identificación morfológica.....	46
3.2.1.1.	Identificación morfológica macroscópica.....	46
3.2.1.2.	Identificación microscópica y bioquímica.....	47
3.2.2.	Producción de proteasas.....	49
3.2.3.	Comportamiento microbiano.....	50
3.2.3.1.	Comportamiento bacteriano en caldos.....	50
3.2.3.2.	Comportamiento bacteriano en medios de cultivo sólidos.....	51
3.3.	Pruebas de sensibilidad antibiótica.....	52
3.4.	Curvas de crecimiento bacteriano.....	53
CONCLUSIONES.....		57
RECOMENDACIONES.....		56
BIBLIOGRAFÍA		

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Características coloniales.....	27
Tabla 1-2:	Medio de cultivo Luria Bertani.....	33
Tabla 2-2:	Medio de cultivo Agar PCA.....	34
Tabla 3-2:	Medio de cultivo Agar TSA.....	34
Tabla 4-2:	Medio de cultivo caldo TSB.....	34
Tabla 5-2:	Medio mínimo M9.....	34
Tabla 6-2:	Procesamiento de inoculación de las muestras.....	35
Tabla 7-2:	Medio de cultivo Triple Sugar Iron.....	38
Tabla 8-2:	Medio de cultivo Agar almidón.....	39
Tabla 9-2:	Medio de cultivo gelatina.....	40
Tabla 1-3:	Resultados del análisis físico químico.....	42
Tabla 2-3:	Valores referenciales en América Latina.....	43
Tabla 3-3:	Colonias por muestreo.....	45
Tabla 4-3:	Caracterización bioquímica y fisiológica de los clones aislados.....	47
Tabla 5-3:	Producción de proteasas.....	49
Tabla 6-3:	Crecimiento bacteriano en caldos.....	50
Tabla 7-3:	Características del crecimiento bacteriano PCA.....	51
Tabla 8-3:	Características del crecimiento bacteriano TSA.....	51
Tabla 9-3:	Resistencia a antibióticos.....	52
Tabla 10-3:	Ajustes de las curvas de crecimiento.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Etapas propuestas de un modelo de bioprospección en microbiología.....	17
Figura 2-1:	Clasificación de los microorganismos extremófilos.....	20
Figura 3-1:	Ubicación Laguna Amarilla.....	30
Figura 1-2:	Metodología empleada.....	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Curva de crecimiento clon B ₂	54
Gráfico 2-3:	Curva de crecimiento clon B ₄	54
Gráfico 3-3:	Curva de crecimiento clon B ₆	55
Gráfico 4-3:	Curva de crecimiento clon B ₇	55
Gráfico 5-3:	Curva de crecimiento clon TB ₇	55
Gráfico 6-3:	Curva de crecimiento clon TB ₉	55
Gráfico 7-3:	Curva de crecimiento clon tomate.....	56

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue caracterizar cepas bacterianas de la Laguna Amarilla del Nevado el Altar; se procesaron cinco muestras del agua recogidas en diferentes puntos durante una temporada seca y una lluviosa, se inocularon las muestras por la técnica de siembra en superficie en medios de cultivo TSA, TSB, PCA y LB, y se incubaron a temperaturas de 4°C, 10°C, 20°C y 37°C para determinar la temperatura óptima de crecimiento y posteriormente realizar el aislamiento de las cepas que presenten características psicrófilas y psicrófilas, después se realizaron pruebas bioquímicas tradicionales, y test fisiológicos, hidrólisis de almidón, caseína y gelatina, para su identificación, para comprobar la capacidad de estos microorganismos para sobrevivir cambios ambientales hostiles se sometieron a cada una de las cepas a concentraciones de metales pesados, cloruro de sodio a antibióticos de uso común, finalmente se lograron obtener diecinueve aislamientos puros identificados por microscopía como bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos, las pruebas de resistencia demostraron que las bacterias encontradas pueden presentar adaptaciones fisiológicas que permiten a las bacterias adaptarse y sobrevivir en ambientes poco comunes, pues, utilizan lo que se considerarían contaminantes y los metabolizan para su supervivencia, las capacidades presentadas por las bacterias de esta zona podrían ser utilizadas en el sector industrial, sin embargo se recomienda realizar un estudio utilizando técnicas de bioprospección actuales para lograr obtener un resultado más exacto.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <PSICRÓFILOS>, <PSICROTROFOS>, <BIOPROSPECCIÓN>, <LAGUNAS CRATÉRICAS> <LAGUNA AMARILLA>, <NEVADO EL ALTAR>, <PENIPE (CANTÓN)>.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize bacterial strains of The Yellow Lagoon of the Volcano Altar. Five samples of water collected at different points were processed during a dry and rainy season; samples were inoculated by the surface sowing technique in culture media TSA, TSB, PCA y LB, and incubated at temperatures of 4°C, 10°C, 20°C y 37°C to determine the optimal temperature of growth and later to carry out the isolation of the strains which present psychotropic and psychrophilic characteristics, then traditional biochemical tests were performed and also physiological tests, hydrolysis of starch, casein and gelatine for their identification, to check the ability of these microorganisms to survive hostile environmental changes each of the strains was subjected to concentrations of heavy metals, chloride of sodium to antibiotics of common use, finally nineteen pure isolates identified by microscopy were obtained as Gram-negative basils and Gram-positive cocci, resistance tests showed that the bacteria found may have physiological adaptations that allow bacteria to adapt and survive in uncommon environments because they use what would be considered contaminants and metabolize them for their survival, the capabilities presented by the bacteria of this zone could be used in the industrial sector, however, it is recommended to carry out a study using current bioprospecting techniques to obtain a more accurate result .

Key words: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <PSYCHROFILES>, <PSYCHOPHOTOS>, <BIOPROSPECTION>, <CRYSTAL LAKES>, <YELLOW LAGOON>, <EL ALTAR VOLCANO>, <PENIPE (CANTON)>.

INTRODUCCIÓN

Los glaciares albergan una amplia diversidad de microorganismos, metabólicamente variables, altamente tolerantes a múltiples tensiones ambientales y potencialmente útiles para fines biotecnológicos, investigadores mencionan que el estudio de microorganismos psicrófilos ha despertado un gran interés en el área de la biotecnología debido a las adaptaciones fisiológicas que se presentan en las membranas citoplasmáticas. (Ball et al. 2013) (Balcazar et al. 2015)

Los sistemas lacustres ubicados en zonas de alta montaña tienen la particularidad de mantener características especiales para la vida, estos ecosistemas se encuentran influenciados por varios factores ambientales que permiten que adquieran mayor importancia que los ecosistemas de baja altitud, al encontrarse estos en lugares de difícil acceso son lugares prístinos que mantienen sus características iniciales. (Morales, 1985)

En particular estos ambientes, de agua dulce no poseen gran cantidad de información sobre la microbiota encontrada, sin embargo la diversidad genética de estas zonas es extraña pues es más heterogénea que la encontrada en ambientes salinos.

La labor investigativa realizada por los centros de educación superior en el país es impredecible, ésta es el pedestal para el desarrollo tecnológico de procesos impulsados por el uso de microorganismos, que a su vez en el país son numerosos y aún no han sido estudiados. (Telegrafo ,2015) Por lo que es necesario el estudio de los microorganismos extremófilos, en este caso psicrófilos, porque aportan al conocimiento de los procesos que se desarrollan a nivel celular, así como también permite el establecer las fases de la evolución de los organismos del planeta además que representan un potencial recurso para aplicaciones biotecnológicas a nivel industrial.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar y caracterizar cepas bacterianas de la Laguna Amarilla perteneciente al Nevado El Altar en la Provincia de Chimborazo

Objetivos Específicos

Evaluar las características físico-químicos del agua de la Laguna Amarilla.

Aislar cepas bacterianas del agua superficial de la Laguna Amarilla.

Identificar la diversidad biológica de las cepas bacterianas mediante pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas.

Evaluar la resistencia que presentan las cepas bacterianas a antibióticos.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Los ambientes fríos representan aproximadamente el 85% del planeta Tierra, gran variedad de hongos bacterias, algas y levaduras han colonizado estos ambientes y en la actualidad se los conoce como microorganismos extremófilos, pues han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a condiciones en las que los seres humanos no podrían.

Años atrás los microorganismos extremófilos eran explorados por pocos grupos de investigadores en todo el mundo, en la actualidad son de gran interés debido a que ofrecen novedosas enzimas con estabilidad térmica y velocidades de reacción que no se consiguen con enzimas químicas (Demirjian, Morís-varas and Cassidy, 2001, pp.1-3)

El estudio de psicrófilos toma relevancia debido a la capacidad de estos de encontrarse en anabiosis y mantener su sistema metabólico activo, la microbiota que se encuentra en los glaciales, considerados como repositorio natural de material biológico con características propias de cada era geológica, los microorganismos de estas zonas pueden producir enzimas que funcionen óptimamente en temperaturas bajas y que podrían inactivarse en temperaturas moderadas. (Madigan, Martinko y Parker 2010)

La adaptación al frío que presentan ciertos microorganismos permiten que busquen la manera de desarrollarse y las adaptaciones a nivel fisiológico y molecular permiten que la vida pueda prosperar, pueden presentar modificación de la membrana lipídica, síntesis de proteínas, síntesis de exopolisacáridos y síntesis de enzimas que trabajan a bajas temperaturas (Fullana, 2014)

1.2. Bioprospección

Es la búsqueda sistemática y el desarrollo de nuevas fuentes de compuestos químicos, microorganismos, macroorganismos, secuencias de ácidos nucleicos y genes con potencial económico encaminado a la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad. (Centro Agronómico Tropical y de Enseñanza, 2002, p. 45)

Otros autores mencionan que la bioprospección consiste en el estudio de lugares poco explorados con condiciones ambientales particulares, el objetivo principal es el descubrimiento de sustancias u organismos que puedan ser utilizados en beneficio del ser humano en actividades industriales. (Cimera, 2015)

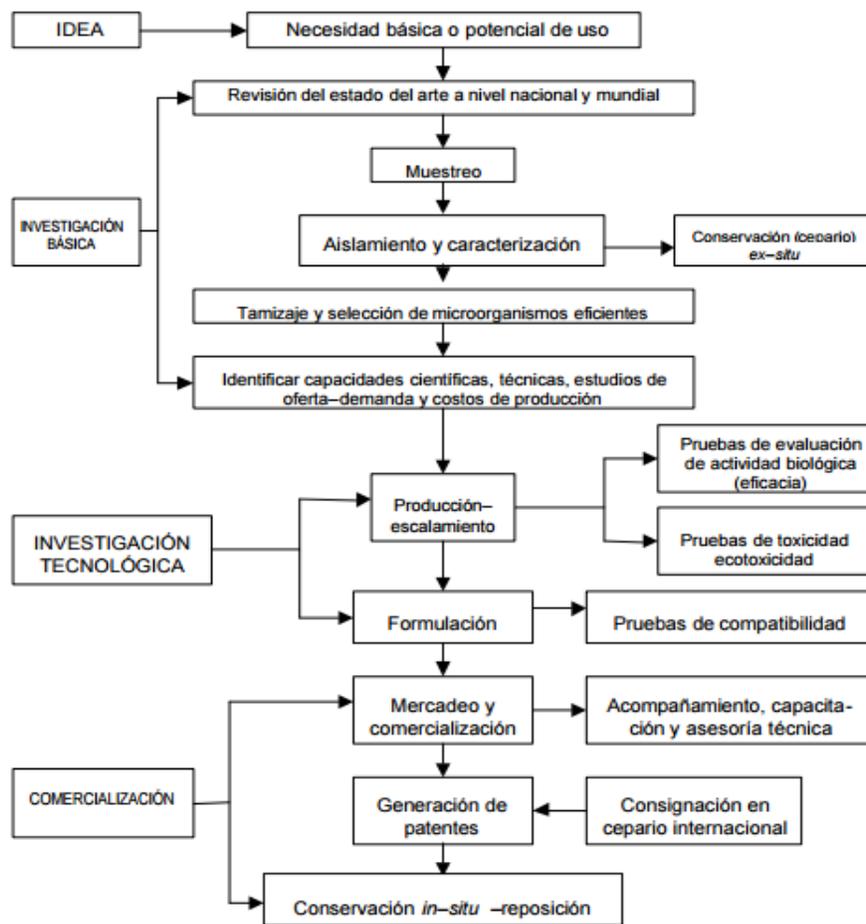


Figura 3-1: Etapas propuestas de un modelo de bioprospección en microbiología

Fuente: Cimera, Garzón 2015

En los últimos años con el desarrollo de la tecnología y la necesidad de mejorar los procesos industriales, la exploración de ambientes extremos con el fin de encontrar microorganismos y recursos genéticos ha alcanzado gran importancia en países ricos en biodiversidad. (Ruíz y Lapeña, 2009, p. 12)

En las décadas más recientes se han desarrollado técnicas independientes para la exploración de comunidades microbianas las mismas que permiten tener una percepción real de la estructura y función dentro del mismo ambiente natural o posteriormente en sistemas a escala de laboratorio.

1.2.1. Técnicas actuales de Bioprospección.

Microarrays de ADN.

Son una serie de sondas de ADN que están fijadas en una superficie en una disposición regular, la muestra a analizarse es marcada con un fluorocromo permitiendo el análisis de un sin número de genes en un solo experimento. (Aguado, 2007, pp.125-127)

Metanogenómica mediante NGS.

Se basa en el estudio de un conjunto de genomas, evitando la fase de inoculación e incubación de muestras, permite la caracterización de las muestras mediante la identificación de los microorganismos debido a las secuencias características de cada microorganismos, se necesita extraer el ADN directamente de la muestra y posteriormente fragmentarla para poder analizarla en las librerías de ADN

Metanogenómica basada en el gen 16S ARNr.

Se basa en el uso del ADN ribosomal que es considerado un marcador informativo de calidad contrastada, el ADN se extrae directamente de la muestra y es amplificado mediante PCR, sin embargo se puede estudiar el 16S evitando la amplificación. (Izquierdo, 2015)

FISH.

Se la conoce también como hibridación in situ, permite la detección de secuencias de ácidos nucleicos mediante el uso de una sonda con fluorocromo que se dirige a un lugar específico de los cromosomas y produce fluorescencia, esta técnica combina la precisión genética molecular que permite la identificación de células individuales en el lugar en el que se desarrollan, además permite la verificar la diversidad genética existente.

En ambientes acuáticos esta técnica permite la detección directa de los microorganismos existentes sin previa purificación además el uso de microsensores que permite la obtención de datos sobre la comunidad microbiana y la actividad metabólica que desarrollan (Rodríguez, 2013, pp.327-332)

1.2.2. *Ambientes extremos*

Son ambientes que se consideraban inhabitados debido a las condiciones físico-químicas que presentan en torno a la temperatura, pH, salinidad o presión, condiciones que convierten a los ambientes en lugares inhóspitos para el desarrollo de la mayoría de organismos, los organismos que logran desarrollarse en estas condiciones presentan un gran potencial bioactivo. (Garzón, 2015, p. 1-3) (Torres, 2012, p. 5)

Dentro de los ambientes extremos se encuentran los ambientes fríos que son más extensos y comunes que los ambientes calientes, las profundidades marinas, regiones polares y zonas que se encuentran en lugares de alta montaña, se caracterizan principalmente porque poseen rangos de temperaturas que oscilan entre 15°C hasta -20°C. (Castillo et al. 2005, pp. 383-384) (Madigan et al. 2015, p. 168)

El clima de alta montaña es un ambiente particular, a medida que se asciende la montaña la temperatura desciende, posee temperaturas que no superan los 15°C con precipitaciones anuales de 1000 mm., dentro de los ambientes de montaña se encuentran cuerpos de agua dulce donde se encuentran microorganismos que presentan adaptaciones propias a su entorno y pueden estar relacionados con la síntesis de productos naturales poco comunes (Cimera, 2015)

1.2.3. *Microorganismos extremófilos*

Los organismos que logran desarrollarse en condiciones inhóspitas son conocidos como “extremos”, este tipo de microorganismos forman parte de los dominios Archaea y Bacteria, aunque también se pueden encontrar microorganismos del dominio Eukarya. (Torres, 2012, pp.6-8)

Los microbiota de los ambientes extremos se adaptan a las condiciones del entorno dependiendo del nicho que cada microorganismo desempeñe, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que la diversidad microbiana en estos ambientes no es reducida. (Garzón, 2015, p. 2)



Figura 4-1: Clasificación de los microorganismos extremófilos

Fuente: Mata, 2006 citado por Garzón 2015.

1.2.3.1. *Microorganismos psicrofilos.*

Son microorganismos que prefieren las temperaturas bajas para su crecimiento, su forma de crecimiento es igual de rápida que la de los microorganismos que prefieren temperaturas ambientales cálidas. La temperatura óptima de crecimiento es de 15°C, pero su rango de temperatura comprende de 0°C – 20°C. (Castillo et al. 2005, p. 383)

Las algas y bacterias psicrófilas se las encuentra en las superficies de zonas nevadas y glaciares donde prestan un color distintivo a la superficie, a menudo estos microorganismos se encuentran en biotopos con altas presiones barométricas o alta concentración de sales, características que poseen las densas masas de hielo del ártico. (Madigan et al. 2015, pp.168-169) (Ramírez, Serrano R y Sandoval, 2006, pp.58-59)

Entre los géneros más destacados de este tipo de microorganismos extremófilos encontramos Gram negativos α -, β - y γ -proteobacteria y el phylum *Cytophaga–Flavobacterium–Bacteriodes* mientras que formando parte de los Gram positivos se encuentra *Arthrobacter* sp. y *Micrococcus* sp. (D'Amico et al. 2006)

Colwellia. Son bacterias barófilas facultativas, habitan en las superficies de cuerpos acuáticos y en muestras de suelos de ambientes con temperaturas bajas permanentes, este género puede sobrevivir a -1°C y tiene la capacidad de movilizarse en estas condiciones. Estas bacterias son importantes en los ciclos de carbono y además producen polihidroalcanoatos que pueden ser usados como plástico biodegradable. (Nogi et al., 2009, pp. 1627-1630) (Bowman et al., 1998, pp. 1171-1180)

Glaciacola. Son parte de la clase *Proteobacteria* se encuentran en el hielo antártico, especies invertebradas marinas, hidrotermales, sedimentos marinos, aguas frías, al igual que otras bacterias psicrófilas crecen en concentraciones moderadas de sal para su identificación se utilizó la técnica molecular FISH (Trappen et al., 2004, pp.1765-1769)

Polaribacter. Es un miembro de la familia *Flavobacteriaceae*, es el género más abundante en aguas marinas, especialmente en regiones Antárticas y Árticas, no exhiben crecimiento sobre los 10°C pero crecen en presencia de NaCl, su principal interés está en la producción de EPS que son utilizados en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica (Gosink, Woese and Staley, 1998, pp. 229-333)

Marinobacter. Son un grupo de bacterias que se encuentran en las profundidades marinas, muestras de petróleo, suelos salinos, agua superficial, nieve e hidrotermales, estos microorganismos cumplen un importante papel en los ciclos biogeoquímicos y ayudan a la biodegradación de compuestos alifáticos y compuestos policíclicos aromáticos, una de las especies que corresponden a este género es usada como modelo de comparación de genomas. (Singer et al., 2011, pp. 2065-2071)

Planococcus. Pertenece al phylum *Firmicutes*, poseen la habilidad de crecer en ambientes con altas concentraciones de sal y en ambientes moderadamente fríos, las especies de este género son degradadores eficientes de compuestos alifáticos y compuestos policíclicos aromáticos.

Shewanella. Pertenecen a la familia de Gama proteobacterias, son bacterias que se encuentran desde las profundidades marinas hasta aguas superficiales de océanos y lagos, la capacidad de estos para utilizar compuestos inorgánicos como aceptores de electrones llaman la atención de los investigadores porque pueden convertir sustancias tóxicas en productos más amigables usándolos como aceptores de electrones. (García, 2014, pp. 20-21)

1.2.3.2. *Microorganismos psicotolerantes.*

Son microorganismos que presentan sus temperaturas óptimas de crecimiento entre 20°C y 40°C, pero crecen también a temperaturas bajas de hasta 0°C, este tipo de microorganismos están más distribuidos en la naturaleza y pueden ser aislados de climas templados también juegan un papel importante en el catabolismo e hidrólisis de los polisacáridos. (Madigan et al. 2015, p.169) (Alvarenga 2015, pp. 48-49)

Arthrobacter. Es un género de microorganismos que se encuentran distribuidos en diferentes ambientes, se los puede encontrar en suelos, superficies de plantas, sistemas lacustres, agua subterránea, son bacterias heterotróficas que desarrollan un papel importante en la degradación de materia orgánica y compuestos químicos. (Fu et al., 2014, pp. 2-4)(Chen et al. 2009)

Micrococcus. Son organismos que se encuentran en aguas dulces, superficies de animales, sedimentos y suelos, son consideradas como bacterias inofensivas para el ser humano sin embargo puede causar enfermedades en humanos con el sistema inmunológico debilita, su especial característica es la formación de pigmentos que absorben radiación UV en un rango de 350 a 475 nanómetros, característica que puede ser utilizada por la industria cosmética. (Kocur, M., Kloss, W. E., & Schliefer, 2006, pp. 261-264)

Psychroflexus. Este género es de la familia *Flavobacteriaceae*, son microorganismos heterótrofos moderadamente halófilos, la primera especie descrita fue mesófila, este género se encuentra presente en el agua superficial de lagos salinos, profundidades de cuerpos acuáticos y sedimentos, dependiendo del nicho en que se encuentra presentan particulares características. (Chen et al., 2009, pp.569-571)

Moritella. Es un género psicotolerante que se encuentra en las profundidades marinas, es un barófilo estricto, la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados torna a este microorganismo uno de los más

importantes porque la producción de estos compuestos orgánicos pueden ser usados en la alimentación de los seres humanos.(Hayashi et al. 2016, pp. 101-108) (Xu et al., 2003, pp.533-534)

Pseudoalteromonas. Son un género de bacterias Gram negativas, principalmente se las encuentra en muestras de agua de mar, por su producción de enzimas a bajas temperaturas son considerados degradadores eficientes de quitina debido al contenido de genes que codifican la degradación de este polímero.(Wang et al., 2014, p.457)

Pseudomonas. Son bacterias que se desarrollan en ambientes oligotróficos, se encuentran con frecuencia en ambientes acuáticos y suelos, este género contiene especies de bacterias patógenas oportunistas, sin embargo, su importancia radica en que pueden metabolizar contaminantes aromáticos en un amplio rango de temperaturas. (González et al. 2013, pp. 183-185)

Psychrobacter. Género que fue descubierto por Juni & Heym en 1986, son bacterias que se encuentran en diferentes ambientes como suelos, formando parte del krill antártico, ambientes salinos, profundidades marinas, hielo y permafrost ártico. Estas bacterias pueden crecer en un rango de temperatura que va desde los -10°C hasta los 37° (García, 2014; pp.21-22)

Polaromonas. Es uno de los taxones bacterianos dominantes en el hielo glaciar, aguas profundas y superficiales antárticos, son microorganismos psicrotóxicos de lento crecimiento, éste género es un modelo de investigación de los patrones de distribución microbiana en la criósfera terrestre, son de importancia ecológica debido a la capacidad de degradación de compuestos contaminantes, principalmente xenobióticos, presentes en el ambiente.(Mattes et al. 2008, pp. 6404-4606)

1.3. Adaptaciones moleculares de los microorganismos psicrófilos.

Los ambientes extremos han obligado a los microorganismos a desarrollar mecanismos específicos de adaptación y estrategias bioquímicas adecuadas que permiten que los microorganismos superen barreras como disminución de la membrana plasmática, formación de hielo intracelular y desnaturalización de enzimas. (Garzón, 2013, pp. 7-8)

1.3.1. *Aumento de la fluidez de la membrana plasmática.*

Todas las células presentan una membrana citoplasmática que actúa como una barrera entre el medio extracelular y el citoplasma, por lo que es primordial conservar la integridad celular para mantener internamente las condiciones óptimas para el metabolismo celular. (Torres 2012)

La composición lipídica que poseen las membranas es compleja, y para mantener su fluidez los microorganismos psicrófilos son capaces de ajustar su composición de lípidos, es decir, presentan una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados de cadena corta para llevar a cabo las funciones bioenergéticas y de transporte. (Madigan, Martinko y Parker 2010)

1.3.2. *Producción de enzimas.*

Las enzimas producidas funcionan a manera óptima a bajas temperaturas debido a que presentan en su estructura secundaria mayor contenido de hélices alfa, menor cantidad de láminas beta y mayor cantidad de aminoácidos polares que las enzimas de organismos mesófilos, esta particularidad permite la flexibilidad de las enzimas para catalizar las reacciones metabólicas dentro de la célula. (Madigan et al. 2015, p. 169)

1.3.3. *Proteínas anticongelantes y crioprotectoras*

Son un grupo de proteínas estructuralmente diferentes que se unen a las partículas de hielo e impide su crecimiento, inhibiendo el proceso de congelación de los fluidos intracelulares o la re cristalización de las partículas de hielos evitando que las membranas de los microorganismos sufran daños. Estas proteínas han sido encontradas en bacterias, plantas, insectos, diatomeas y peces.

Los exopolisacáridos y la trehalosa son importantes crioprotectores, la trehalosa evita la desnaturalización y agregación de proteínas mientras que los exopolisacáridos ayuda a la adhesión celular facilitando la acumulación de nutrientes, además poseen la capacidad de retener agua lo que impide la desecación de los microorganismos y se disminuye la temperatura de nucleación del agua evitando la formación de cristales en la célula. (Phadtare, 2004) (Carrión, 2014, pp. 12-17)

1.3.4. *Formación de pigmentos.*

Son moléculas que se encuentran en la membrana citoplasmática que tienen un papel importante en el desarrollo de microorganismos a bajas temperaturas, pues éstas incrementan la rigidez de la bicapa lipídica presente en la pared celular y permiten que los microorganismos puedan protegerse de la radiación UV y así prevenir la lisis en estos ambientes.

La presencia de pigmentos es una mecanismos de protección contra la fotooxidación que puede ser provocada por la radiación UV o la luz visible, la presencia de éstos otorga a las bacterias colores tomates, rojos y hasta amarillos. (Hoover and Pikuta, 2008)

Entre los principales factores que afectan a la producción de pigmentos microbianos están la temperatura, cantidad de luz, pH, disponibilidad de carbono, el tipo de fermentación que realizan, los minerales presentes y la cantidad de oxígeno. (Kumar et al. 2015,pp.204-206)

1.3.5. *Procesos de transcripción y traducción*

Debido a las bajas temperaturas los mecanismos de transcripción y traducción se alteran, reduciendo así la actividad enzimática de este proceso, produciendo desestabilización en la estabilidad de los ácidos nucleicos porque las uniones de las bases nitrogenadas se fortalecen dando paso a la formación de estructuras secundarias.

1.4. *Importancia biotecnológica de las bacterias psicrófilas.*

La distribución generalizada de los microorganismos psicrófilos dentro de los ambientes refleja amplias capacidades metabólicas que pueden desempeñar cualquier papel en el ambiente que ha sido atribuido a otros microorganismos, forman parte de los ciclos principales de la naturaleza, sin embargo su importancia biotecnológica radica en la producción de compuestos biológicos y enzimas con la capacidad de actuar en ambientes fríos sin sufrir desnaturalizaciones. (Rusell, 1998, pp. 13-16)

1.4.1. *Producción de exopolisacáridos*

Las bacterias psicrófilas producen exopolisacáridos que de diferente composición y propiedades físico-químicas, estos polímeros son utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética como agente espesantes, estabilizantes debido a que pueden ser utilizados como oligosacáridos y monómeros del azúcar.(Freitas, Alves y Reis, 2011)

Los exopolisacáridos producidos por bacteria psicrófilas tienen la facilidad de secuestrar compuestos tóxicos y adsorber el dióxido de carbono, características útiles para procesos de biorremediación, además representan una ventaja competitiva al ser producidos de manera sostenible y ser compuestos biodegradables (Freitas, Alves y Reis, 2011)

1.4.2. *Producción de enzimas*

La modificación de compuestos orgánicos y volátiles se realiza con el uso de enzimas frío-activas, estas enzimas producidas por bacterias psicrófilas ofrecen beneficios económicos porque presentan velocidades de reacción altas, alto nivel de estereoespecificidad y minimizan reacciones que pueden ocurrir a temperaturas elevadas.(Alvarenga, 2015, p.49)

1.5. *Métodos de identificación microbiana*

La identificación microbiana permite cuantificar y establecer las especies microbianas que se encuentran en una muestra, la correcta identificación está determinada por el uso de colonias únicas procedentes de cultivos puros, es decir, se utiliza un solo tipo de microorganismo. (Castillo y Salavert, 2008, pp. 1-2)

1.5.1. *Identificación fenotípica.*

Se fundamenta en la descripción de características microscópicas y macroscópicas que presentan las cepas aisladas, considerando las características morfológicas y el medio de cultivo en que se desarrollan los microorganismos.

1.7.1.1. Caracterización microscópica

El estudio microscópico permite la observación de las características propias de cada microorganismos puede revelar la forma, agrupación y el tamaño que presentan las células en estudio. (Garzón, 2015, p. 11)

Tinción Gram.

Tinción diferencial, por el uso de dos colorantes, el principio se basa en las características de las pared celular de las bacterias que otorgan propiedades propias a cada microorganismo permite clasificarlos por la coloración que presentan en Gram positivos y Gram negativos. (López-Jácome et al. 2014, pp. 10-11)

1.7.1.2. Caracterización macroscópica

Basada en la identificación colonial, la observación se realiza en cultivos frescos y axénicos, la identificación está determinada por el tamaño, la forma, consistencia, elevación y coloración que presentan las colonias en un medio de cultivo.

Tabla 1-1: Características coloniales

	Detalle	Clasificación
Morfología colonias	Forma	<ul style="list-style-type: none">• Circular• Puntiforme• Irregular• Rizoide• Fusiforme
	Borde	<ul style="list-style-type: none">• Entero• Ondulado• Lobulado• Filamentoso
	Elevación de la colonia	<ul style="list-style-type: none">• Plana• Convexa• Elevada

	Superficie	<ul style="list-style-type: none"> • Lisa • Rugosa • Plegada
	Consistencia	<ul style="list-style-type: none"> • Cremosa • Membranosa • Viscosa

Fuente: Garzón, 2015. Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo, Colombia.

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

1.7.1.3. Caracterización Bioquímica

Se basa en un conjunto de pruebas bioquímicas sencillas que permiten identificar a un microorganismo de acuerdo a la actividad que presenta una ruta metabólica sobre un sustrato específico, es necesario realizar los test con cultivos frescos de no más de 48 horas de incubación para obtener resultados confiables. (Génova, 2000, p. 5)

Actualmente se utilizan sistemas de pruebas bioquímicas comerciales para la identificación de las bacterias que consisten en celdas miniaturizadas con sustratos liofilizados que permiten realizar entre 10 y 50 pruebas bioquímicas paralelamente, dependiendo del sistema se puede identificar una cantidad específica de bacterias con género y especie. (Bou et al. 2017, p. 602)

Fermentación de Glucosa-Sacarosa-Lactosa.

Esta prueba consiste en la identificación de bacterias fermentadoras de azúcares, cuando existe fermentación se producen ácidos orgánicos los que permiten el viraje del color del medio a un color amarillo, además permite la identificación de producción desulfuro de hidrógeno por parte de las bacterias esto se hace evidente cuando existe un cambio de color en medio a negro.

Prueba Citrato.

Es una prueba diferencial que permite determinar si los microorganismos en estudio son capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono y como fuente de nitrógeno las sales de amonio, para que exista metabolismo de citrato las bacterias deben poseer citrato permeasas. La prueba es positiva cuando existe un viraje de color de verde a azul.

Prueba de Sulfuro, Indol y Movilidad

Esta prueba permite la verificación de la movilidad y la producción de ácido sulfhídrico e indol por parte de las bacterias, al ser un medio rico en peptonas éstas pueden ser metabolizado por las bacterias para producir indol, para su lectura es necesario el reactivo de Erlich o Kovac's, a presencia de un anillo rojo evidencia la presencia de indol.

El medio SIM es un medio semisólido que por la turbidez que pueden generar las bacterias o por el crecimiento difuso fuera de la línea de siembra se puede determinar si presentan o no movilidad.

Prueba de Ureasa

La prueba es utilizada para determinar la capacidad de las bacterias de hidrolizar urea teniendo como resultado dos moléculas de amoníaco, la prueba es positiva cuando existe viraje de color tornándose el medio fucsia

1.8. Parque nacional Sangay

El Parque Nacional Sangay fue creado en el año de 1975 como reserva ecológica formando parte de Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), en 1979 es categorizado como parque nacional, comprende 502 067 hectáreas que se encuentran distribuidas en las provincias de Chimborazo, Tungurahua, Morona Santiago y Cañar.

El parque se extiende en la cordillera oriental, rodeado por tres volcanes el Tungurahua, Sangay y el extinto volcán El Altar. Su clima fluctúa con temperaturas de entre 6 a 24°C dependiendo del rango altitudinal que va de 1000 msnm hasta 5320msnm.(Ministerio de Ambiente, 2014)

El volcán el Altar es un estratovolcán inactivo, se encuentra en la cordillera Real a 25 kilómetros de la ciudad de Riobamba, posee una estructura en cono con una caldera en forma de herradura abierta, con una altura de 5319 msnm. es el quinto nevado más alto del Ecuador, en su última explosión se formaron seis picos y en su caldera se formó una laguna glacial denominada “Laguna Amarilla” (Eissen et al. 2004, p.44-46) (Ministerio de Ambiente 2014)

1.8.1. Descripción de la Laguna Amarilla

Conocida también como Laguna Collanes, es una de las lagunas del sistema lacustre de El Altar, se cree que se origina en 1490 en la última explosión registrada del volcán, y por la caída constante de sus glaciales, es una laguna cratérica que posee un diámetro de 3000 metros y se encuentra ubicada a 4100 msnm. (Rachowiecki y Thurber, 2008, p.223)

La temperatura del agua fluctúa entre 9°C y 14°C y recibe precipitaciones de 1000 a 2000mm en los meses de septiembre a febrero, una de las particularidades de este lugar es el color amarillento que presenta sus aguas, mismas que dan origen al Río Blanco.(Acosta, 2013, p.2) (Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Penipe, 2016)

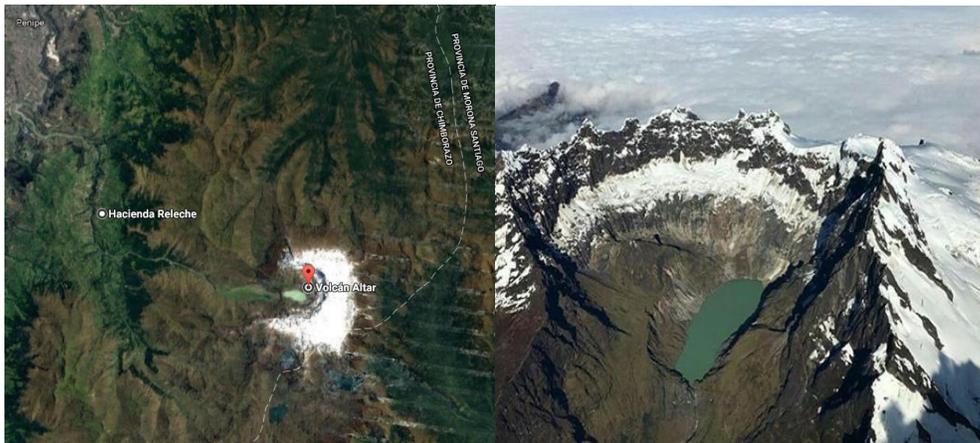


Figura 3-2: Ubicación Laguna Amarilla

Fuente: a) Google maps, 2017 b) Grupo de Trekking “Chimborazo”

Existen estudios geológicos y geoquímicos de las rocas que se encuentran en la parte interior la caldera que varían desde basaltos hasta riolitas según Eissen et.al (2007); Cáceres (2010) realizó un levantamiento de información de los casquetes glaciares presentes en el Ecuador, además de los estudios mencionados existen trabajos de titulación para la creación de rutas y planes turísticos, sin embargo no existen estudios registrados de estudios microbiológicos de la Laguna Amarilla.

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

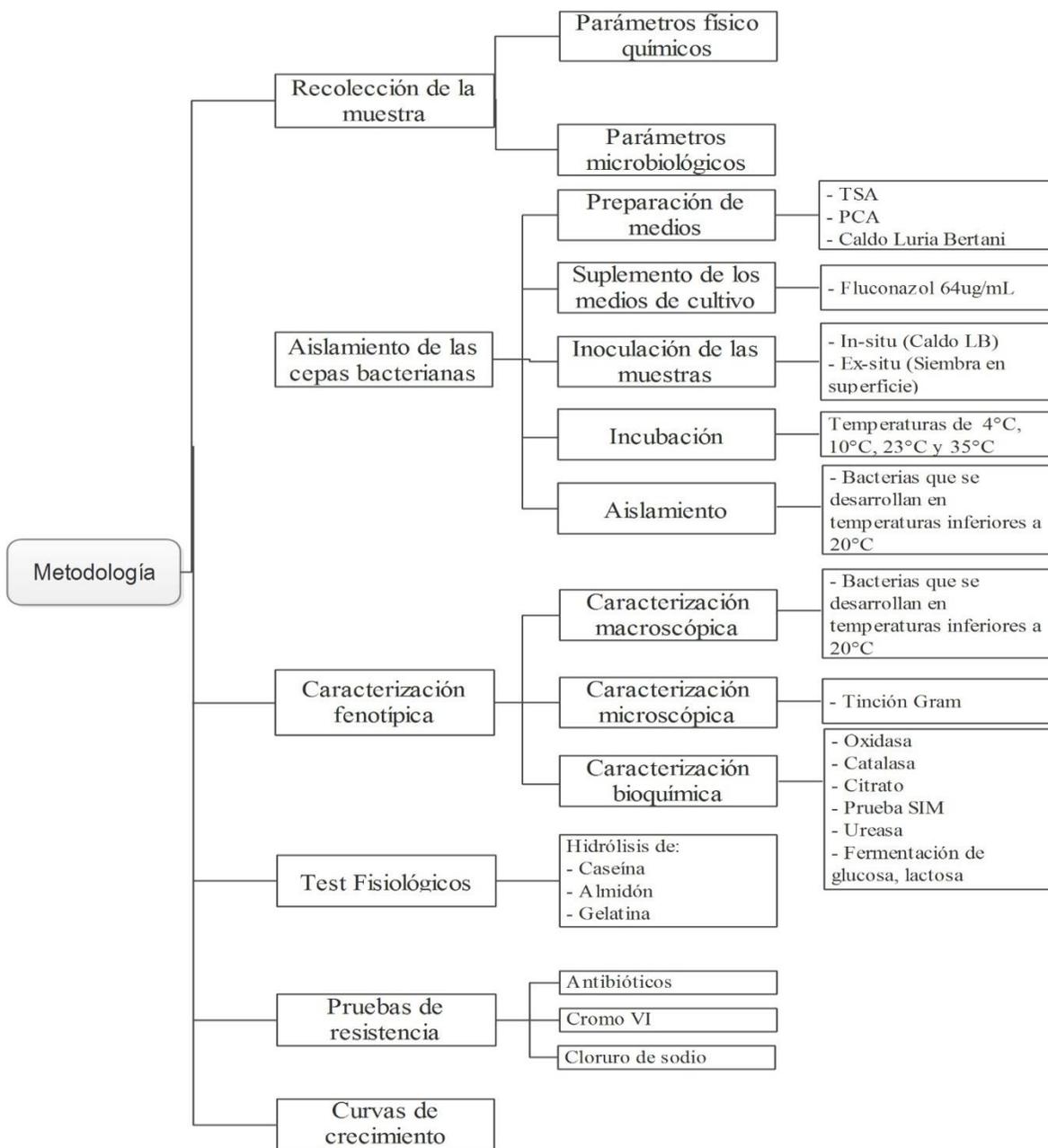


Gráfico 1-2. Metodología empleada

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

3.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación es experimental-exploratorio, debido a que es un estudio para descifrar conceptos para resolver un problema del que posee poca información, esta metodología se aplica para generar criterios que permitan precisar la hipótesis planteada. (Namakfroosh, 2005, pp.89-90)

3.2. Diseño de la investigación

El diseño experimental que se plantea es el diseño completamente al azar debido a que el factor de crecimiento microbiano estará determinado por la temperatura, lo que permitirá establecer el tipo de bacterias que se desarrollan sean éstas bacterias psicrófilas o psicrotolerantes por lo que se convierte en la variable de mayor interés para realizar la investigación propuesta.

3.3. Unidad de análisis

Agua superficial de la Laguna Amarilla ubicada en el Nevado El Altar, dentro del Parque Nacional Sangay, cantón Penipe, provincia de Chimborazo.

3.4. Etapas de la investigación

3.4.1. *Recolección de la muestra.*

Para la toma de muestras se utilizó envases de polipropileno y envases de 100 mL con 45mL de caldo LB, frascos ámbar de 1000mL de capacidad, botellas de DBO de 300mL, bolsas plásticas de polietileno estériles con sello hermético y pipetas pasteur de vidrio estériles. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1998, pp.4-6)

3.4.1.1. *Análisis físico-químico del agua superficial de la Laguna Amarilla*

La botella ámbar se lavó y enjuagó tres veces con el agua de la laguna, se llenó completamente el recipiente y se cerró procurando evitar la entrada de aire, para impedir la modificación de los compuestos químicos por la presencia del oxígeno.

3.4.1.2. *Análisis microbiológico.*

Los envases de polipropileno fueron lavados y enjuagados tres veces con el agua de la laguna para evitar que existan contaminantes en el interior, se llenaron las $\frac{3}{4}$ partes del envase de modo que exista una cámara de aire que permita la oxigenación y la mezcla de la muestra antes de la inoculación. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1998, pp. 4-6)

Las muestras fueron transportadas a una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, hasta el laboratorio SAQUIMIC. SA en la ciudad de Riobamba para los respectivos análisis físicos-químicos y al Laboratorio de Biotecnología Ambiental ubicado en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para los estudios microbiológicos.

3.4.2. *Aislamiento de cepas bacterianas*

3.4.2.1. *Preparación de los medios de cultivo*

Los medios a utilizarse se detallan en las tablas a continuación.

Tabla 1-2: Medio de cultivo caldo Luria Bertani

Ingrediente	Concentración del medio g/L
NaCl	5.0
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Tabla 2-2: Medio de cultivo Agar PCA

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Triptona	5.0
Dextrosa	1.0
Extracto de levadura	2.5
Agar	12.0

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Tabla 3-2: Medio de cultivo Agar TSA

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Triptona	15.0
Peptona de soya	5.0
NaCl	5.0
Agar	12.0

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Tabla 4-2: Medio de cultivo caldo TSB

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Triptona	15.0
Peptona de soya	5.0
NaCl	5.0

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Tabla 5-2: Medio mínimo M9

	Ingrediente	Cantidad
Solución de Sales M9	Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	64 g/L
	KH ₂ PO ₄	15 g/L
	NaCl	2.5 g/L
	NH ₄ Cl	5 g/L
Medio mínimo	MgSO ₄	2mL
	Glucosa	20mL
	CaCl ₂	100µL

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Los medios fueron preparados con agua destilada y esterilizados durante 15 minutos a 121°C y una presión de 1atm en autoclave por calor húmedo.

3.4.2.2. *Suplemento de los medios de cultivo.*

A los medios agarizados se adicionó fluconazol, agente antimicótico, con el objetivo de ejercer presión selectiva sobre los microorganismos que se desarrollan y evitar el crecimiento de levaduras, para esto se preparó una solución de fluconazol con una concentración de 64ug/mL, posteriormente se adicionó al agar esterilizado y se dispensó en cajas Petri.

3.4.2.3. *Inoculación de las muestras*

Las muestras recolectadas en cada punto fueron inoculadas in-situ y ex-situ (laboratorio), la inoculación in-situ se realizó para garantizar el mantenimiento de las células microbianas durante el transporte de las muestras, en la tabla 4.2 se describe la metodología de inoculación.

Tabla 6-2: Procesamiento de inoculación de las muestras

	Punto	Proceso de inoculación
In- situ	I-II-III-IV-Río	Se inocularon 5mL de agua superficial de la Laguna Amarilla en cada frasco de polipropileno con 45mL de caldo LB.
Ex-situ	I-II-III-IV-Río	Se inocularon por triplicado 100uL de la muestra directamente, en medio sólido PCA y TSA, y se diseminó el inóculo con un asa de Drigalsky.

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

3.4.2.4. *Incubación de los inóculos.*

Las placas con TSA y PCA se incubaron a 30°C y 23°C, durante 24 horas, mientras que los frascos que contenían Caldo LB se incubaron a 30°C durante 48 horas, el crecimiento bacteriano en este medio se determinó por la presencia de turbidez en los recipientes, mientras que en las placas se evidenció la formación de colonias.

Los microorganismos que se desarrollaron en los medios sin el suplemento antimicótico, fueron resembrados en cajas Petri que contenían fluconazol, para descartar el crecimiento de algún hongo o levadura, posteriormente los microorganismos encontrados se incubaron a 10°C durante 72 horas y 4°C durante 240 horas para evidenciar la existencia de bacterias psicrófilas en la Laguna Amarilla del Nevado El Altar.

3.4.2.5. Aislamiento de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas obtenidas en los medios agarizados fueron aisladas por criterios de selección, al buscar evidenciar el crecimiento de psicrófilas, la temperatura fue un parámetro importante para el aislamiento, con ayuda del asa de siembra se tomó una colonia y se realizaron resiembras en medio agarizados por estriado.

Las colonias que presentaban contaminación se las trató mediante el método de dilución y dispersión, con ayuda del asa bacteriológica se tomó la colonia y se colocó en tubos de ensayo que contienen 9mL de caldo LB, posteriormente se inoculó con la técnica de siembra en superficie.

3.4.3. Caracterización fenotípica

2.4.3.1. Caracterización macroscópica

La caracterización fenotípica fue determinada por observación directa de las características que presentan las colonias considerando principalmente pigmentación, borde, forma, consistencia y elevación, las colonias que presentaron morfologías similares fueron agrupadas en un solo grupo.

2.4.3.2. Caracterización microscópica.

Para la identificación morfológica y clasificación bacteriana se realizó tinción diferencial de Gram realizando un frotis en un portaobjetos de las colonias previamente aisladas, seguido se realizó la tinción descrita en bibliografía. (Tortora, Funke y Case, 2007, p.69)

2.4.3.3. *Caracterización bioquímica tradicional*

La identificación bioquímica se realizó con 19 cepas bacterianas que presentaron un óptimo crecimiento en temperaturas que fluctúan entre 4°C y 10°C.

- *Oxidasa*

Se tomó una colonia previamente aislada con un palillo estéril y se colocó en las tiras de oxidasa, se dejó reposar por un tiempo no mayor a 30 segundos y se obtuvo el resultado, si existe cambio la aparición de un color azul, la prueba es positiva.

- *Catalasa*

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno 3% en un portaobjetos y se suspendió la colonia en estudio, la producción inmediata de burbujas indica la presencia de la enzima catalasa.

- *Citrato*

Se preparó el medio de cultivo y se dispensó 5mL en los tubos de ensayo, se esterilizó y se dejó enfriar el agar con una inclinación de 45°, se realizó la inoculación con la técnica de siembra en estría desde el fondo del tubo hasta la parte superior, dejar incubar de 24 a 48 horas (MacFandinn, 2003, p. 94)

- *Prueba SIM*

Se preparó el medio SIM, seguido se dispensó 8mL de medio en los tubos de ensayo, se los esterilizó y se los dejó enfriar en posición vertical, consecutivamente se inocula la bacteria por punción en el fondo y se incuba durante 48 horas, agregar 15 gotas de reactivo de Kovac's para revelar el resultado, si se forma un anillo de color rojo en la parte superior del medio, la prueba es positiva a la producción de indol y si presenta un coloración negra el medio es positiva a producción de ácido sulfhídrico. (MacFandinn, 2003, pp. 195)

Para la prueba de movilidad se utilizó una aguja bacteriológica, y se inoculó la colonia a 0,6 cm de profundidad procurando realizar el mismo recorrido al extraer el agua, es recomendable incubar dos

tubos a diferentes temperaturas debido a que la temperatura óptima de crecimiento puede inhibir la movilidad de las bacterias. (Silva et al. 2006, pp. 365-366)

- *Ureasa*

La hidrolización de urea por parte de las bacterias aisladas se realizó en agar Base Urea de Christen, se preparó el medio base, y se esterilizó paralelamente con urea, posteriormente se combinó el agar base y la urea en condiciones de esterilidad y consecutivamente se dispensó 5mL de agar en tubos de ensayo, se enfrió en forma inclinada para su posterior inoculación e incubación a 30°C por 24 horas.

- *Fermentación de glucosa, lactosa y producción de ácido sulfhídrico.*

La prueba para el metabolismo de la glucosa se realizó en medio TSI, una vez preparado se dispensó en tubos de 5mL, se esterilizó y enfrió el medio con una inclinación 15° para formar el pico de flauta, se realizó la inoculación por siembra en estría y se incubó por 24 horas a 35°C.

Tabla 7-2: Medio de cultivo Triple Sugar Iron

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Peptona de carne	13.0
NaCl	5.0
Lactosa	10.0
Triptona	10.0
Glucosa	1.0
Citrato de hierro y amonio	0.5
Tiosulfato de sodio	0.3
Rojo fenol	0.025
Agar	15.0

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

2.4.4. *Test fisiológicos.*

2.4.4.1. *Hidrólisis de la caseína*

Para determinar la producción de enzimas proteolíticas se preparó el medio de cultivo agar leche consiste en la preparación de agar PCA suplementado con el 10% V/V de leche, al agar esterilizado y enfriado a una temperatura de 40°C se añadió la leche previamente esterilizada.

La inoculación se realizó a partir de los clones incubados over night en caldos, posteriormente se inocularon en los medios de cultivo por siembra en superficie y se los incubó durante 24 horas a diferentes temperaturas.

Posteriormente, determinados los clones que presentaron actividad proteolítica se evaluó la eficiencia de producción de las enzimas en diferentes temperaturas, con los clones aislados se realizaron siembras en superficie por estriado y se incubó a temperaturas de 37°C, 20°C y 10°C

2.4.4.2. *Hidrólisis del almidón*

Tabla 8-2: Medio de cultivo Agar almidón

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Extracto de carne	1.2
Peptona	2
Almidón	0.8
Agar	6

Fuente: Guía de medios de cultivo

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Se disolvieron los ingredientes en agua destilada, se llevó a ebullición hasta que el medio clarifique y se procedió a esterilizar el medio a 121°C y 1 atm de presión. La inoculación se realizó por estriado, para revelar que existió hidrólisis de almidón se cubrió la placa con lugol, la formación de un halo transparente demuestra la hidrólisis de éste.

2.4.4.3. *Hidrólisis de la gelatina*

La producción de gelatinasas se observó preparando agar gelatina, medio carente de carbohidratos, que permitió observar la licuefacción de la gelatina, una vez esterilizado se dispensó 5mL del medio en tubos de ensayo y se dejó enfriar, la inoculación se realizó con una aguja de siembra y se dejó incubar por 48 horas, pasado este tiempo fue necesario realizar la lectura sometiendo los tubos a baños de hielo para comprobar la licuefacción por parte de los clones

Tabla 9-2: Medio de cultivo gelatina

Ingrediente	Concentración del medio g/L
Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Gelatina	120.0

Fuente: Guía de medios de cultivo

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

2.4.4.4. *Prueba de resistencia a Cromo VI*

Los clones aislados fueron sometidos a pruebas con cromo VI, se preparó el medio de cultivo PCA suplementado con una concentración deseada de Cr previamente esterilizado, se realizó la siembra por estrías y se incubó por 48 horas a 20°C

2.4.4.5. *Prueba a concentraciones halófilas*

Considerando las adaptaciones fisiológicas y la capacidad metabólica que presentan los microorganismos psicrófilos se realizó una prueba de resistencia a sales, se suplementaron los medios TSA y PCA con 15% P/V de NaCl, se inoculó por estriado y se incubó a 20°C durante 48 horas.

2.4.5. *Prueba de sensibilidad antibiótica*

La sensibilidad bacteriana se determinó por exposición de cada una de las cepas a cinco antibióticos usando la técnica de Kirby Bauer, que menciona el uso de cultivos over nighth que alcancen la escala 0.5 de McFarland, con ayuda de un hisopo se inoculó la superficie de la placa en agar Mueller Hinton

y finalmente se adicionaron los antibióticos las cajas petri, cada antibiótico fue colocado en cantidades conocidas y se incubaron las cajas a 30°C por 48 horas.

La lectura de resultados se realizó midiendo los halos de inhibición que se han desarrollado cada una de las colonias analizadas a cada antibiótico y la interpretación se realizó mediante comparación de las longitudes de los halos con bibliografía.

2.4.6. *Curvas de crecimiento*

Para la realización de curvas de crecimiento se realizó un cultivo overnight con el objetivo de llegar a una concentración conocida de células, se empleó la escala 0.5 de Mc Farland, se incubaron los clones que presentaban características interesantes, producción de pigmentos y generación de expo polisacáridos.

Al conseguir la escala de Mc Farland se colocó el 20% los inóculos en TSB y se dejó incubar hasta que éstos alcancen una absorbancia de 0.2 en el espectrofotómetro, cuando se consiguió la densidad óptica deseada los caldos fueron incubados en baño maría durante 24 horas a 30°C y se realizaron mediciones en el espectrofotómetro cada hora.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados de análisis físico-químico del agua.

Los resultados obtenidos de las muestras de agua de la Laguna Amarilla, enviados al Laboratorio SAQUIMIC S.A. se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 1-3: Resultados del análisis físico químico

PARÁMETRO	UNIDADES	RESULTADOS
Color	Und Co/Pt	112
pH	Unid	6.30
Conductividad	μSiems/cm	147
Turbiedad	UNT	18
Cloruros	mg/L	5.7
Sulfatos	mg/L	48
Hierro	mg/L	0.24
Cromo VI	mg/L	0.04
DBO ₅	mg/L	1.80
Oxígeno disuelto	mg/L	6.7
Sólidos disueltos	mg/L	78

Fuente. Laboratorio SAQUIMIC S.A.

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

La Laguna Amarilla al encontrarse ubicada en un parque nacional y no presentar actividad antropogénica en sus alrededores por la dificultad de acceso, sus aguas deben ser consideradas como agua para actividades recreativas pasivas, únicamente para armonización de paisaje, por tanto este sistema es de interés ambiental y más no de interés para el área de salud. (Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo, 2009, pp. 18-19)

Considerando que no existen parámetros establecidos para este tipo de recursos hídricos la Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo, Argentina, ha optado por establecer criterios tomando como referencia al Consejo Nacional de Medio Ambiente de Brasil, Uruguay, Chile, Australia y Alemania, valores que se presentan a continuación.

Tabla 2-3. Valores referenciales en América Latina

PARÁMETRO	VALORES DE REFERENCIA
Oxígeno disuelto	>2mg/L
DBO ₅	<15mg/L
Nitratos, <i>E.coli</i> ,	-
Fósforo total	<5mg/L
pH	6-9
Temperatura	≤ 35°C
Sulfuros	<1mg/L
Cromo VI	-
Arsénico	-
Mercurio	-
Cromo total	-
Plomo	-
Fósforo total	<5mg/L
Cadmio	-
Hidrocarburos totales	<10mg/L
Cianuro	<100ug/L

Fuente. Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo, 2009

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Considerando los valores expuestos anteriormente el agua en estudio se encuentra bajo los límites establecidos de ACMAR en DBO₅, pH y oxígeno disuelto, pero de acuerdo al Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, este último parámetro está sobre límite permisible, sin embargo es necesario considerar que estos ecosistemas se encuentran en permanente cambio, pues las radiaciones solares, las bajas temperaturas y la baja disponibilidad de nutrientes hacen de estos cuerpos de agua hábitats inestables.

Además el agua cumple con los criterios establecidos en el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, pues la turbidez que presenta no supera los 20 UNT, y de acuerdo a percepción no se visualizó la presencia de espumas o sólidos que puedan causar olores o alteraciones en el color del agua.

Tomando en cuenta los resultados de los parámetros físicos químicos realizados, especialmente, la conductividad y presencia de cloruros se determina que el agua contiene baja cantidad de minerales, según Guerrón (2015), se trata de un lago oligotrófico, pero se debe tomar en cuenta que por la baja productividad primaria existente en la zona el agua debería ser clara, pero el cuerpo de agua presenta una coloración amarillenta verdosa (Facultad de Agronomía-Universidad de Buenos Aires, 2017)

Los valores de pH, con frecuencia se ven afectados por las características del suelo en el que se encuentra el sistema lacustre, cuando la formación está ubicada en suelos de origen volcánico el pH tiende a ser ácido, pero pueden presentar valores inferiores a 7 por la presencia de silicatos, pero los lagos naturales que no son víctimas de las actividades humanas tienden a presentar pH en un rango de 6.5 a 7.5 .(Grupo de Tratamiento de Aguas, 2015)

El valor de la temperatura registrado tiene un rango de 10°C a 14°C durante la mañana y la tarde, debido a la baja de temperatura registrada durante la noche, se cree existan decaimientos en la temperatura, porque la temperatura nocturna en el ambiente llega a los 0°C, a pesar de ello las oscilaciones térmicas pueden ser producidas por los deshielos que se producen en la laguna y el abastecimiento por riachuelos que descienden de las nieves perpetuas del nevado.

Según los resultados presentados en la Tabla 1 por Filker et.al (2016), se puede demostrar que los lagos presentes en una misma zona geográfica pero ubicada a diferentes alturas y bajo la influencia del clima pueden presentar propiedades físico químicas diferentes porque las condiciones ambientales son distintas en cada zona.

3.2. AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS

Tabla 3-3. Colonias por muestreo

MUESTREO 1	Promedio del número de colonias				MUESTREO 2	Promedio del número de colonias			
	PCA					PCA		TSA	
	37°	20°				37°	20°	37°	20°
Punto 1	0	2	-	-	Punto 1	3	5	8	12
Punto 2	16	12	-	-	Punto 2	3	3	2	6
Punto 3	0	0	-	-	Punto 3	4	10	0	10
Punto 4	2	18	-	-	Punto 4	4	11	2	7
Río	1	2	-	-	Río	4	5	4	2
	19	34	-	-		18	39	16	31

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Se realizó una siembra en superficie tanto en PCA como en TSA, la siembra se la realizó por triplicado obteniendo en un periodo de 12 horas colonias visibles en las placas incubadas a temperatura de 37°C mientras que en 24 horas se obtuvieron colonias visibles en 20°C, independientemente del medio de cultivo a utilizarse el crecimiento bacteriano puede darse en las dos temperaturas iniciales. (Straka and Stokes ,1960, pp.622-625)

Es necesario mencionar que las muestras fueron inoculadas in situ en caldo Luria-Bertania de igual manera, se procedió a realizar la inoculación en superficie y el resultado obtenido fue similar, sin embargo las características morfológicas que presentaron las colonias fueron particularidades que se detallan en el siguiente apartado.

3.2.1. *Identificación morfológica*

3.2.1.1. *Identificación morfológica macroscópica*

Las bacterias analizadas en su mayoría presentan una forma irregular, con elevación plana, bordes irregulares, de color blanco cuando son incubadas a una temperatura de 30°C, pero al incubarlas a 20°C las bacterias presentan cambios en su coloración, si bien la temperatura puede influenciar en la morfología que presentan, las bacterias encontradas no presentaron características muy distintas entre ellas, la superficie de las colonias era blanquecinas, con tendencia grumosa, pero además al ser estas bacterias sometidas a 20°C la superficie contrajo un brillo característico y se evidenció viscosidad en las colonias.

Los cambios objetables de las colonias puede deberse a los mecanismos de adaptación, pues al verse sometidas a cambios de temperaturas su metabolismo empieza a segregar sustancias para protegerse de las condiciones a las que se encuentran sometidas, tomando estos parámetros como referencia se aislaron 19 cepas bacterianas.

La generación de pigmentos observables en los clones se hizo evidente con la variación de la temperatura de incubación, pues los clones aislados e incubados a 30°C no presentaban pigmentos pero cuando la temperatura iba decreciendo los clones produjeron pigmentos rojos, tomates y amarillos, sin embargo la temperatura de incubación en el caso de B₆ inducía al cambio de color de las colonias que coincide con lo presentado por Kumar.

3.2.1.2. Identificación microscópica y bioquímica

Tabla 4-3: Caracterización bioquímica y fisiológica de los clones aislados

CARACTERÍSTICAS		PRUEBAS RÁPIDAS			TSI			SIM			HIDRÓLISIS					
CLON	FORMA	GRAM	CATALASA	OXIDASA	CITRATO	UREASA	GLUCOSA	LACTOSA	H ₂ S	INDOL	H ₂ S	MOVILIDAD	GELATINA	CASEÍNA	ALMIDÓN	LÍPIDOS
B1	Bacilos	-	+	+	-	+				-	-	+	+	-	+	-
B2	Bacilos	-	+	+	+	+				-	-	+	+	+	-	-
B3	Bacilos	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	Bacilos	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
B5	Cocos	+	+	+	+	+				-	-	+	+	+	-	-
B6	Bacilos	-	+	-	-	-				-	-	-	-	-	+	-
B7	Bacilos	-	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TB1	Bacilos	-	+	+		+				-	-	+	+	-	-	-
TB2	Bacilos	-	+	+		+				-	-	-	-	+	-	-
TB3	Bacilos	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
TB4	Bacilos	-	+	+		-				-	-	+	-	-	-	-
TB5	Bacilos	-	+	+	-	+				-	-	+	+	+	-	-
TB6	Bacilos	-	+	+		-				-	-	+	-	+	+	-
TB7	Bacilos	-	+	+		+				-	-	+	+	+	+	-
TB8	Bacilos	-	+	+		+				-	-	+	+	+	+	-
TB9	Bacilos	-	+	-		+				-	-	+	+	+	+	-
TB10	Bacilos	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Amarilla	Bacilos	-	-	+		-				-	-	-	-	-	+	-
Tomate	Bacilos	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

En la tabla 4.3, se muestran los resultados de los clones seleccionados para el estudio, de los 19 clones resultó que el 94.74% son bacilos Gram (-), mientras que el 5.26% son cocos Gram (+), estos resultados coincide con bibliografía encontrada donde se menciona que las bacterias que se encuentra

en ambientes fríos, especialmente en nieve, hielo y escombros Antárticos, son cocos Gram positivos o en su mayoría son bacilos Gram negativos formadores de esporas (Hoover and Pikuta, 2008, pp.2-4).

La prueba de oxidasa confirma la presencia de géneros bacterianos psicrotróficos debido a que la mayoría de los representantes de este grupo, son géneros que dan positivo a la prueba, dando así una referencia adecuada para realizar el análisis del género bacteriano al que estos clones representan, sin embargo debido a errores técnicos se evidenciaron resultados que impidieron el análisis de los 19 clones aislados, permitiendo únicamente el estudio del 26.31% de los clones para su identificación.

Según D'Amico et al. las bacterias psicrófilas no son fermentadores de azúcares, esta afirmación es evidente en el 21.05% de los clones, este resultado si bien coincide con D'Amico, no se podría garantizar que el resultado es verídico, pues el 68.42% de los clones no evidenciaron acidificación ni alcalinización del medio, manteniéndolo totalmente inalterado.

Con los resultados obtenidos se puede establecer que los clones aislados pueden pertenecer a los géneros *Flavobacterium*, *Shewanella*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* o *Psychrobacter*, pero en particular el interior de los lagos oligotróficos de agua dulce son inexplorados y es extraño encontrar estudios que describan la diversidad genética en estos ambientes debido a versatilidad de la misma, además la incidencia de los factores ambientales obligan a los microorganismos a adaptarse o bien pueden provocar alteraciones pronunciadas en las comunidades microbianas como es el caso del alto potencial genómico que les permite almacenar cambios en las diferentes condiciones ambientales. (Filker et al. 2016)

La escasez de datos sobre la microbiota presente en los lagos de alta montaña no permite tener aproximaciones contundentes de los géneros que posiblemente se pueden encontrar, pues los géneros psicrófilos mencionados, están presentes en ambientes fríos que presentan salinidad.

Los test de hidrólisis enzimática fueron realizados con dos propósitos, para tener una aproximación más real de la caracterización a nivel de género de los clones aislados y para la verificar la capacidad que las bacterias poseen para producir enzimas de interés industrial.

Los clones aislados llaman la atención pues el 57.89% son productores de proteasas y gelatinasas, la hidrólisis de la caseína fue evidenciada por presencia de zonas claras alrededor de las colonias, mientras que la producción de gelatinasas se hizo evidente en la licuefacción que se presentó en el

medio, además el 42% de los clones son productores de amilasas, la capacidad de los psicrófilos para producir enzimas está determinada por las adaptaciones a nivel molecular que éstos presentan, esta adaptación toma relevancia, pues, las enzimas extremófilas representan beneficios económicos para las industrias. (Espina, 2010, p.13)

3.2.2. *Producción de proteasas.*

Tabla 5-3: Eficiencia enzimática.

CLON	24H			48H			96H		
	30°C	20°	10°	30°C	20°	10°	30°C	20°	10°
B2	++	+	-	++	++	+			++
B4	++	+	-	++	++	+			++
B5	++	+	-	++	++	+			++
TB2	++	+	-	++	++	+			++
TB3	++	+	-	++	++	+			++
TB5	++	+	-	++	++	+			++
TB6	++	+	-	++	++	+			++
TB7	++	+	-	++	++	+			++
TB8	++	+	-	++	++	+			++
TB9	++	+	-	++	++	+			++
Tomate	++	+	-	++	++	+			++

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

El test fisiológico de producción de proteasas se realizó en los 19 clones aislados, pero únicamente se probó la eficiencia de los clones que presentaron capacidad enzimática, la producción de proteasas se evidenció por la presencia de halos alrededor de las colonias, de acuerdo a las temperaturas de activación de las enzimas se observó mayor producción de éstas a una temperatura de 30°C en las primeras 24 horas, seguida de una producción baja de los clones incubados a 20°C y una producción nula a 10°C.

A las 48 horas de incubación la producción de enzimas proteolíticas a 20°C era igual a la cantidad de enzimas producidas a 30°C, esto se evidenció por la clarificación completa del agar leche mientras que la producción de proteasas a 10°C fue baja, 48 horas después los clones incubados a 10°C presentaban de igual manera la clarificación completa del medio.

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática ha sido comparada con enzimas termoestables, se ha demostrado que las enzimas adaptadas al frío poseen mayor eficiencia catalítica y gran estabilidad en condiciones en las que enzimas termofílicas no podrían funcionar por lo que éstas ofrecen gran potencial biotecnológico.(D'Amico et al., 2006)

3.2.3. *Comportamiento microbiano*

3.2.3.1. *Comportamiento bacteriano en caldos*

Tabla 6-3: Crecimiento bacteriano en caldos

CLON	MEDIO M9			TSB		
	TURBIDEZ	PELÍCULA	SEDIMENTO	TURBIDEZ	PELÍCULA	SEDIMENTO
B1	+	-	-	+	-	-
B2	+	-	+	+	-	-
B3	+	-	-	+	-	-
B4	+	-	-	+	-	-
B5	+	-	+	+	-	-
B6	+	-	+	+	-	-
B7	+	-	+	+	-	-
TB1	+	-	-	+	-	-
TB2	+	-	+	+	-	-
TB3	+	-	-	+	-	-
TB4	+	-	-	+	-	-
TB5	+	-	-	+	-	-
TB6	+	-	+	+	-	-
TB7	+	-	-	+	-	-
TB8	+	-	-	+	-	-
TB9	+	-	-	+	-	-
TB10	+	-	+	+	-	-
Amarilla	-	-	-	+	-	-
Tomate	+	-	-	-	-	-

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

A las bacterias aisladas se las inoculó en caldo TSB y medio mínimo M9, para observar el comportamiento y crecimiento en los diferentes medios, el crecimiento en los dos medios fue similar, en 12 horas el 89.47% de los clones presentaron turbidez en el caldo TSB a excepción del 10.53%, correspondiente de los clones B6 y Amarilla, pues estas bacterias tardan en formar colonias visibles 120 horas.

En el medio mínimo, se evidenció crecimiento bacteriano al presentarse turbidez después de 96 horas transcurridas, pues, el contenido de carbohidratos y aminoácidos es escaso, sin embargo, queda demostrado que los clones se adaptan a las condiciones de estrés y empiezan a metabolizar los compuestos inorgánicos que tienen a disposición de una manera eficiente.

3.2.3.2. Comportamiento bacteriano en medios de cultivo sólidos

Tabla 7-3: Características del crecimiento bacteriano

PCA	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇
Rango de temperatura	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37
Tolerancia a NaCl 15%	-	-	-	-	-	-	-
Tolerancia a Cromo ug/L	100	450	100	100	100	100	450

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

Tabla 8-3: Características del crecimiento bacteriano

TSA	TB ₁	TB ₂	TB ₃	TB ₄	TB ₅	TB ₆	TB ₇	TB ₈	TB ₉	TB ₁₀
Rango de temperatura	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37	4-37
Tolerancia a NaCl 15%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerancia a Cromo ug/L	100	450	100	100	450	450	450	100	100	100

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

El rango de temperatura de crecimiento de las bacterias indica que son psicotolerantes, según Morita (1975) los psicrófilos obligados crecen en rangos de 4°C a 15°, mientras que los psicotolerantes pueden crecer hasta temperaturas de 40°C.

En las tabla 7.3. y 8.3. se evidencia la capacidad adaptativa de los clones a condiciones ambientales extremas, que les obliga a desarrollar componentes celulares y estrategias bioquímicas apropiadas para sobrevivir (Granada, 2012), únicamente el 31.57% de los clones pueden crecer a concentraciones de 450ug/mL de Cr pudiendo considerarse estos clones para procesos de descontaminación.

Los clones aislados no pueden resistir a concentraciones altas de sal, pues se cree la composición de los ácidos grasos no fue suficiente para mantener la fluidez ideal de la membrana, además la temperatura y la composición del medio también afectan a la composición de la membrana lipídica (Pucci, 2006)

3.3. Pruebas de sensibilidad antibiótica

La evaluación del efecto antibiótico a Gentamicina (CN), Cefuroxina (CXM), Ampicilina (AM), Amoxicilina (AX) y Tetraciclina (TE) sobre los clones aislados, presentaron que 14 clones son sensibles a CN y TE demostrando la resistencia al efecto de tres antibióticos, mientras que el clon B₃ presentó sensibilidad a todos los antibióticos, TB₁₀ se registra resiste únicamente a la AM y el clon B₂ únicamente presenta resistencia a la AX y AM.

Tabla 9-3: Resistencia a antibióticos

CLON	ANTIBIÓTICOS				
	CN	CXM	AMX	AX	TE
B1	S	R	R	R	S
B2	S	S	R	R	S
B3	S	S	S	S	S
B4	S	R	R	R	S
B6	S	R	R	R	S
B7	S	R	R	R	S
TB1	S	R	R	R	S
TB2	S	R	R	R	S
TB3	S	R	R	R	S

TB4	S	R	R	R	S
TB5	S	R	R	R	S
TB6	S	R	R	R	S
TB7	S	R	R	R	S
TB8	S	R	R	R	S
TB9	S	R	R	R	S
TB10	S	R	R	R	S
Tomate	S	S	R	S	S
S: Sensible R: Resistente					

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

La resistencia presentada a cefuroxina, ampicilina y amoxicilina puede ser una característica normal o adquirida por los clones por mutaciones o transferencia horizontal, los genes resistentes a antibiótico pudieron haberse generado en este ecosistema como mutaciones en los genes que ayudan a la protección contra otras bacterias, además que se debe considerar que las bacterias gram negativas poseen porinas en la membrana que evitan el paso de sustancias hidrofóbicas. (Abrera, Ómez and Úñiga 2007, pp.154-157)

3.4. Curvas de crecimiento bacteriano

Como el comportamiento de la variable respuesta (concentración) y la variable predictora (tiempo) se relacionan a través de una función no lineal conocida, se aplica un ajuste a los datos mediante un modelo de regresión no lineal para cada cepa en estudio.

Según Montgomery (2011), cualquier modelo que no sea lineal en los parámetros desconocidos es un modelo de regresión no lineal. De manera general usamos el modelo de regresión en la forma de $f(x, \theta) + \varepsilon$, en donde θ es un vector de $px1$, de parámetros desconocidos y ε es un error aleatorio no correlacionado cuyo $E(\varepsilon) = 0$ y cuya $Var(\varepsilon) = \sigma^2$ de manera específica presentamos el resumen de los modelos ajustados para las cepas en estudio en la Tabla 10.3.

Tabla 10-3: Ajustes de las curvas de crecimiento

CLON	MODELO	TIPO	R ²
B ₂	$y = 0,1889 \ln(x) + 8,1809$	Logarítmica	0,08636
B ₄	$y = 0,2525 \ln(x) + 8,2164$	Logarítmica	0,9717
B ₆	$y = -0,0002x^3 + 0,0062x^2 - 0,0022x + 7,9838$	Polinómica de tercer orden	0,9781
B ₇	$y = -5 * 10^{-5}x^3 - 0,0016x^2 + 0,1006x + 7,9178$	Polinómica de tercer orden	0,9416
TB ₇	$y = -0,0001x^3 + 0,004x^2 - 0,0063x + 8,0096$	Polinómica de tercer orden	0,8115
TB ₉	$y = -0,0001x^3 + 0,0058x^2 - 0,0298x + 8,0367$	Polinómica de tercer orden	0,7373
Tomate	$y = 0,2976 \ln(x) + 8,2683$	Logarítmica	0,8579

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

De manera general podemos decir, que el ajuste de los modelos es bueno, ya que los valores de R² son mayores a 0.7, lo que implica que, la mayor parte de la variabilidad de la variable concentración esta explicada por el respectivo modelo de regresión.

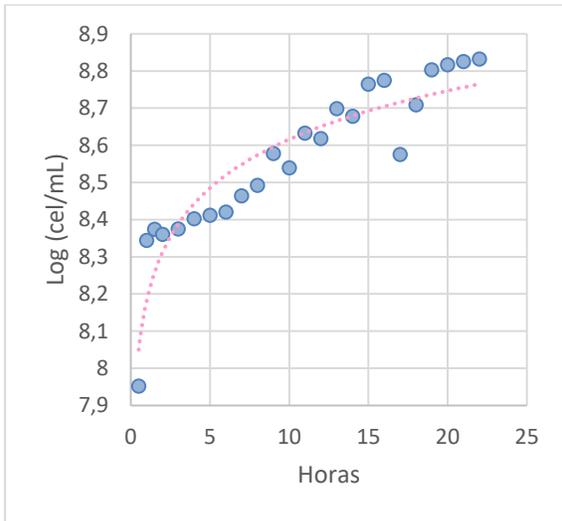


Gráfico 1-3: Curva de crecimiento clon B₂

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

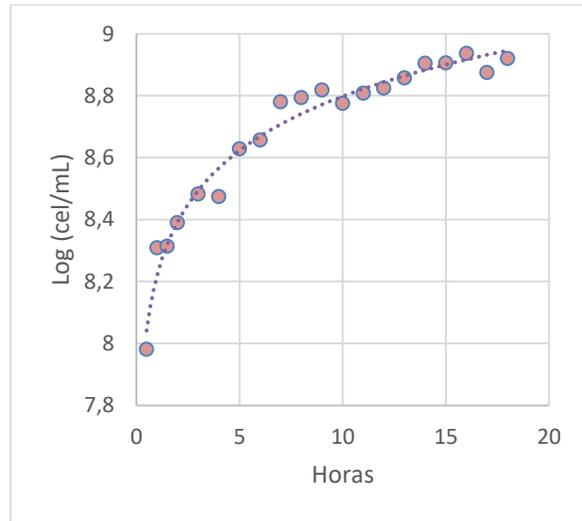


Gráfico 2-3: Curva de crecimiento clon B₄

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

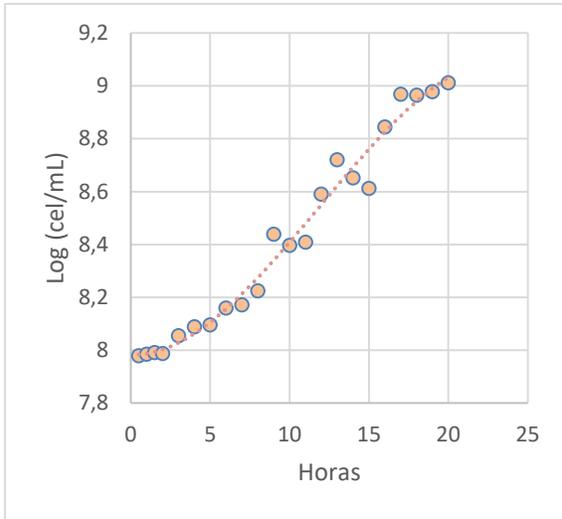


Gráfico 3-3: Curva de crecimiento clon B₆

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

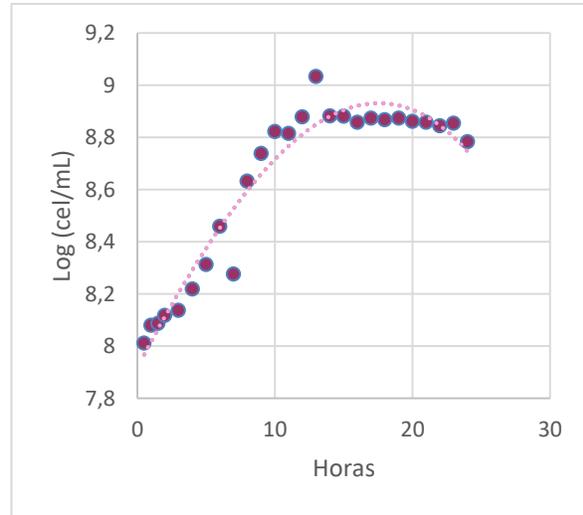


Gráfico 4-3: Curva de crecimiento clon B₇

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

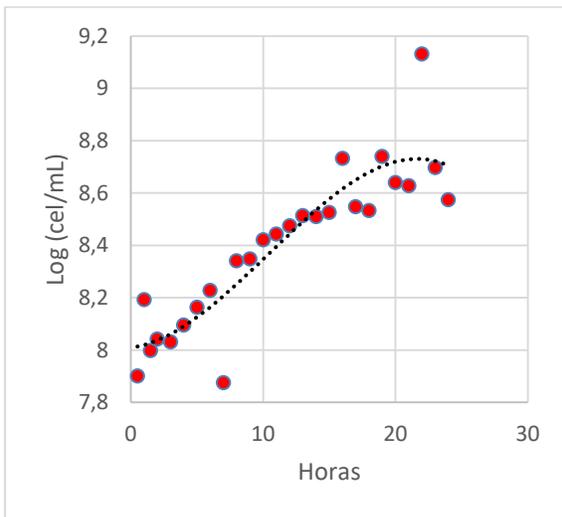


Gráfico 5-3: Curva de crecimiento clon TB₇

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

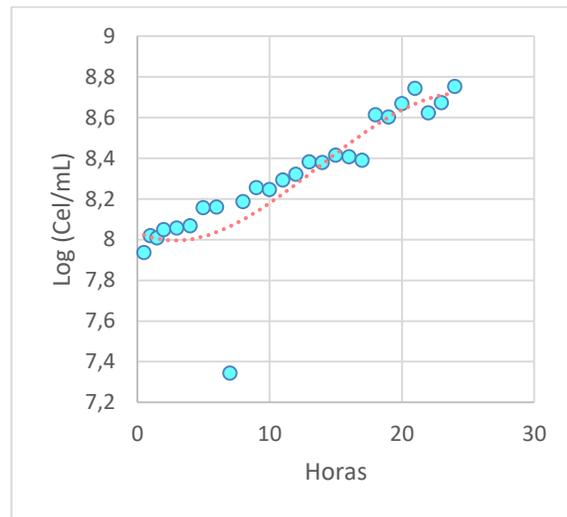


Gráfico 6-3: Curva de crecimiento clon TB₉

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

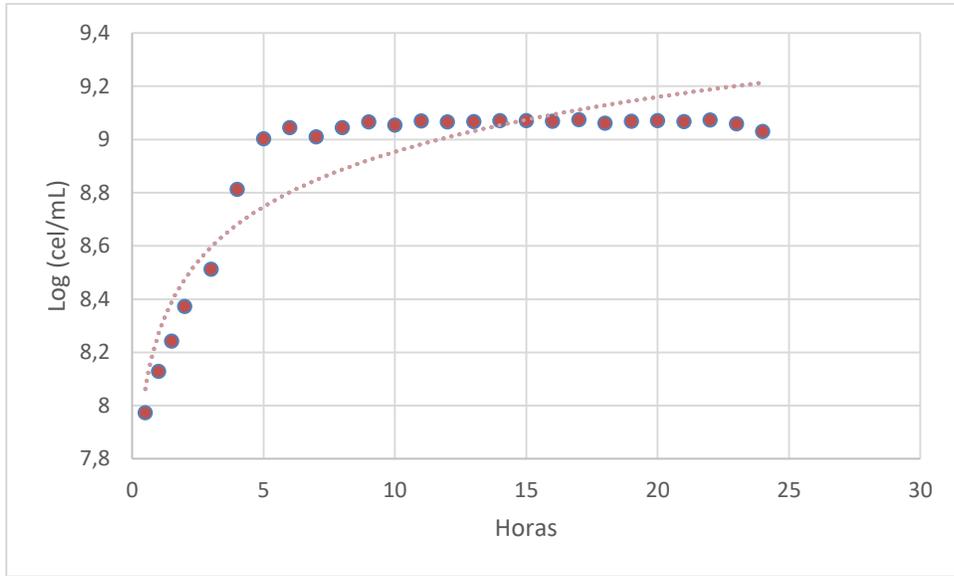


Gráfico 7-3: Curva de crecimiento clon tomate

Realizado por: Verónica Moreno, 2017

CONCLUSIONES

Considerando los parámetros físicos químicos analizados se establece que el agua de la Laguna Amarilla presenta las siguientes características: Color 112 Und Co/Pt, turbiedad 18 UNT, sulfatos 48mg/L, OD 6.7 mg/L, cloruros 5.7 mg/L, hierro 0.24mg/L y cromo VI 0.04 mg/L, siendo estas la de mayor interés debido a la coloración que el sistema lacustre presenta.

Las características morfológicas de las colonias, la capacidad de crecer en un rango de temperatura de 4°C a 37°C y la producción de expo polisacáridos han permitido realizar el aislamiento de 19 colonias bacterianas provenientes de agua de la Laguna Amarilla del Nevado el Altar, el 36.84% se aislaron en agar PCA mientras que el 63.16% se aislaron en TSA.

El 94.83% de los clones aislados fueron identificado bajo microscopia, permitiendo la clasificación en bacilos Gram negativos siendo el porcentaje restante cocos Gram positivos; la caracterización mediante pruebas bioquímicas no fue efectiva, debido a que éstas no están diseñadas para la identificación de microorganismos de muestras ambientales, por lo que es necesario utilizar técnicas independientes de cultivo para la identificación de la diversidad biológica en este tipo de ambientes.

Los clones aislados gram negativos presentaron resistencia a la Cefuroxina, Ampicilina y Amoxicilina, únicamente presentan sensibilidad a la Gentamicina y Tetraciclina, esto puede ser inducido por la adquisición de material extracromosomal que codifican el genoma para la producción de enzimas responsables de la resistencia.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos se plantean las siguientes recomendaciones:

Debido a que los lagos que se encuentran ubicados en altas montañas son ambientes que se enfrentan con temperaturas bajas, sales disueltas y baja disponibilidad de nutrientes características que permiten denominarlos como ambientes colonizados por microorganismos adaptados y especializados para sobrevivir, para lograr una aproximación experimental más real de los resultados obtenidos en la investigación de esta zona es necesario la realización de análisis del gen rRNA 16S y la creación de inventarios genéticos para posteriores estudios biotecnológicos.

La biocatálisis con el uso de enzimas hidrolíticas presentan alta demanda para la producción a nivel industrial, la eficiencia en las reacciones, menor consumo energético y la sostenibilidad ambiental representan un ahorro económico para las empresas por tanto, estudiar e identificar las enzimas hidrolíticas de los clones aislados por medio de metagenómica puede revelar características que podrían ser utilizados en biorremediación de ambientes contaminados, industria farmacéutica, alimenticia o fabricación de biocombustibles; para ello es necesario trabajar con bibliotecas metanogenómicas, como la elaborada por Singh,et.al (2015), donde se describe la técnica de screening realizada dependiendo del tipo de muestra y las enzimas que se pueden identificar y lograr una aplicación de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABRERA, et.al.** Colombia Médica La resistencia de bacterias a antibióticos , antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación Colombia Médica. 2007. , vol. 38, pp. 149–158.
2. **ACOSTA, T.**, El sistema lacustre del parque nacional Llanganates y su importancia como atractivo natural turístico en la provincia de Tungurahua durante el período enero- julio 2009 [en línea]. 2013.. S.l.: Universidad Técnica de Ambato. Disponible en: <http://redi.uta.edu.ec/handle/123456789/4483>.
3. **AGUADO, M.** Microarrays de adn en microbiología dna microarrays in microbiology. 2007 , vol. 1, no. 2, pp. 125–134. Disponible en: <https://revistas.ucm.es/index.php/rccv/article/viewfile/rccv0707230125a/22611>.
4. **ALVARENGA, A.** Selección y caracterización de cepas psicrotolerantes productoras de actividad α -L-Ramnosidasa. 2015,pp. 48–54.
5. **ARGENTINA, AUTORIDAD DE CUENCA MATANZA RIACHUELO.** Anexo : criterios utilizados para la definición de los valores asociados a cada zona de uso. [en línea]. 2009. Disponible en: <http://www.acumar.gov.ar/ACUsentencias/CausaMendoza/2009abril/060409e/AnexoIIusos060409.pdf>.
6. **ARGENTINA, FACULTAD DE AGRONOMÍA-UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.** Sustentabilidad en los sistemas agropecuarios y naturales. 2017. [en línea]. Disponible en: <https://ced.agro.uba.ar/ubatic/?q=node/77>.
7. **BALCAZAR, W., et.al.** Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research* [en línea], 2015, pp. 1–7. ISSN 09445013. DOI 10.1016/j.micres.2015.05.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.001>.
8. **BALL, M., et.al.** Bacteria recovered from high-altitude,tropical glacier in Venezuelan Andes. *World*

J Microbiol Biotechnol. , 2013.

9. **BOU, G., et al.** Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. , vol. 29, 2017. no. 8, pp. 601–608. DOI 10.1016/j.eimc.2011.03.012.
10. **BOWMAN, J. et al.**. *Colwellia demingiae* sp. nov., *Colwellia hornerae* sp. nov., *Colwellia rossensis* sp. nov. and *Colwellia psychrotropica* sp. nov. : psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesize docosahexaenoic acid (22 : 6~3. *international Journal of Systematic Bacteriology* [en línea], 1998, vol. 48, pp. 1171–1180. DOI ijs-48-4-1171. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/48/4/ijsem-48-4-1171.pdf?expires=1499559969&id=id&accname=guest&checksum=5DB409AE37C801DFD285ED61FC445933>.
11. **CARRIÓN, O.** Caracterización de una nueva bacteria antártica y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro. 2014, S.l.: Universidad de Barcelona.
12. **CASTILLO, F., et. al.** Psicrófilos y Psicrotolerantes. En: **TEBAR (ed.)**, *Bioteología Ambiental*. Madrid: s.n., 2005, pp. 616. ISBN 978-84-7360-211-2.
13. **CASTILLO, F.J. y SALAVERT, M.**. Técnicas de identificación. , s/f, pp. 15.
14. **CHEN, Y.-G., et.al.** *Psychroflexus sediminis* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from salt lake sediment in China. [en línea], 2009, pp. 569–573. DOI 10.1099/ijms.0.003269-0. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/59/3/569.pdf?expires=1499527472&id=id&accname=guest&checksum=57A029719B26FD16AE2E45D8D2786E9D>.
15. **CIMERA.** Bioprospecciones en ambientes acuáticos 2015.
16. **COSTA RICA, CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL Y DE ENSEÑANZA.** Bioprospección y monitoreo en la biodiversidad Costarricense. *Biodiversidad, biotecnológica y bioseguridad: Un enfoque hacia Mesoamerica y el Caribe*. S.l.: s.n., 2002, pp. 45.
17. **D'AMICO, S., et.al.** Psychrophilic microorganisms: challenges for life. [en línea], 2006, pp. 385–

389. DOI 10.1038/sj.embor.7400662. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1456908/>.

18. **DEMIRJIAN, D.C., MORÍS-VARAS, F. y CASSIDY, C.S.** Enzymes from extremophiles. 2001, pp. 144–151.
19. **ECUADOR, EL TELEGRAFO.** La bioprospeccion despega-en-un laboratorio en Ikiam. [en línea]. 2015, Disponible en: <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/4/la-bioprospeccion-despega-en-un-laboratorio-en-ikiam>.
20. **ECUADOR, INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** NTE INEN 2169 agua, calidad de agua, muestreo, manejo y conservacion de muestras. [en línea], 2014, pp. 20. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2169.1998.pdf>.
21. **ECUADOR, MINISTERIO DE AMBIENTE.** Ministerio del Ambiente. [en línea]. 2014, Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-sangay/>.
22. **EISSEN, J.-P., et.al.** El deslave del 13 de octubre del 2000 del volcán El Altar. *Investigaciones en Geociencias* [en línea], vol. 1, no. figura 2, . 2004. pp. 44–50. Disponible en: <http://cidbimena.desastres.hn/docum/crid/Septiembre2007/CD3/pdf/spa/doc15666/doc15666-a.pdf>.
23. **ESPINA, A.** Obtención y caracterización de una nueva lipasa bacteriana de origen marino Antártico, con actividad enzimática a bajas temperaturas, e n su forma nativa y recombinante. Universidad de Chile, 2010.
24. **ESPAÑA, GRUPO DE TRATAMIENTO DE AGUAS,.** Características físicas y organolépticas. 2015,[en línea]. Disponible en:
http://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/aguas/Caracteristicas_fisicas_y_organolepticas.asp#.
25. **FILKER, S., et.al.** Microbial eukaryote plankton communities of high-mountain lakes from three continents exhibit strong biogeographic patterns. , 2016, pp. 2286–2301. DOI 10.1111/mec.13633.

26. **FREITAS, F., ALVES, V. y REIS, M.** Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications, 2011 , pp. 388–398.
27. **FU, H., et.al.** Research Progress on the Actinomyces arthrobacter. , no. September, 2014, pp. 747–753.
28. **FULLANA, N.** Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura, 2014.
29. **GARCÍA, L.,** 2014. Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica *Shewanella frigidimarina* [en línea]. S.l.: Complutense de Madrid. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/24852/1/T35263.pdf>.
30. **GARZÓN, D.C.** “ Determinación De La Biodiversidad Bacteriana En Ecosistemas Glaciares De La Antártida ”. 2013.
31. **GARZÓN, V.,** 2015. Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia. *Tesis*, pp. 103. ISSN 01240064. DOI 10.1590/S0124-00642012000800004.
32. **GÉNOVA.** Identificación Bacteriana. 2000, pp. 1–20.
33. **GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO DEL CANTÓN PENIPE,** 2016. Candelaria. [en línea]. Disponible en: <http://www.penipe.gob.ec/index.php/turismo/la-candelaria>.
34. **GONZÁLEZ, N., et.al.** Efecto de la concentración de surfactante y de la temperatura en la biodegradación de naftaleno, antraceno y fenantreno por *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Stenotrophomonas sp.* aislados de un consorcio degradador de HAP. [en línea], 2013, pp. 182–187. Disponible en: <http://analesde-cp22.webjoomla.es/index.php/AnalesQuimica/article/viewFile/50/50>.
35. **GOSINK, J., WOESE, C. y STALEY, J.** Polaribacter gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the C’ophagaFlavobacterium- Bacteroides group and reclassification of ‘Flectobacillus glomerat.

International Journal of Systematic Bacteriology [en línea], vol. 48, 1998, pp. 223–235. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/48/1/ijbs-48-1-223.pdf?expires=1499535155&id=id&accname=guest&checksum=166EE70852467B21DFFE4CC E08DC1A04>.

36. **HAYASHI, S., et.al.** 2016. Enhanced production of polyunsaturated fatty acids by enzyme engineering of tandem acyl carrier proteins. *Nature Publishing Group* [en línea], no. September, 2016, pp. 1–6. DOI 10.1038/srep35441. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35441>.
37. **HOOVER, R. y PIKUTA, E.** Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments. , 2008, pp. 1–42.
38. **IZQUIERDO, P.** Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms, 2015.
39. **KOCUR, M., KLOSS, W. E., & SCHLIEFER, K.** Genus *Micrococcus*. *Prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolog*, 2006, pp. 961–971. DOI 10.1007/springerreference_3714.
40. **KUMAR, A., et.al.** Microbial pigments : production and their applications in various industries. , vol. 5, no. 1, 2015, pp. 203–212.
41. **LÓPEZ-JÁCOME, L.E., et.al.** Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología., vol. 3, 2014, pp. 8.
42. **MACFANDINN, J.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia Clínica [en línea].,2003,Tercera. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&dq=pruebas+bioquímicas&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjo3JXy9dnSAhXlwlQKHa8kBVcQ6AEIGDAA#v=onepage&q=Citrato&f=false>.
43. **MADIGAN, M., MARTINKO, J.M. y PARKER, J.** *Brock - Biología De Los Microorganismos.*

2010.

44. **MATTES, T.E., et.al.** The Genome of *Polaromonas sp.* Strain JS666 : Insights into the Evolution of a Hydrocarbon- and Xenobiotic-Degrading Bacterium , and Features of Relevance to Biotechnology □ †. , vol. 74, no. 20, 2008. pp. 6405–6416. DOI 10.1128/AEM.00197-08.
45. **MORALES, R.** Estudio de comunidades de rotíferos monogonotes de las lagunas de alta montaña en Sierra Nevada. S.I. 1985.
46. **MONTGOMERY, et al.**, Introducción al Análisis de Regresión Lineal. Tercera. 2011.
47. **NAMAKFROOSH, M.N.** *Metodología de la Investigación* [en línea]. Segunda. México: 2005. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=ZEJ7-0hmvhwC&pg=PA89&dq=investigación+exploratoria&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjqh_Xxs9HSAhVBWCYKHZnkAEEQ6AEIITAD#v=onepage&q&f=false.
48. **NINFA RAMÍREZ, D., SERRANO R, J.A. y HORACIO SANDOVAL, T.**, Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, vol. 37, no. 3, (2006), pp. 56–71. ISSN 10273956.
49. **NOGI, Y., et.al.** *Colwellia piezophila sp. nov.*, a novel piezophilic species from deep-sea sediments of the Japan Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], 2009, pp. 1627–1631. DOI 10.1099/ijms.0.03049-0. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/54/5/1627.pdf?expires=1499559968&id=id&accname=guest&checksum=5085A6FE86897385A7F58951F1485A4C>.
50. **PHADTARE, S.** Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. , 2004, pp. 125–136.
51. **PUCCI, G.** Changes in Membrane Fatty Acids of Microbacterium esteraromaticum GNP-5 with Changes of Temperature and Osmolarity, 2006.
52. **RACHOWIECKI, R. y THURBER, M.** Ecuador: Climbing and Hiking Guide. *Ecuador: Climbing*

and Hiking Guide. S.l.: s.n., 2008, pp. 208.

53. **RODRÍGUEZ, R.** Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos,2013.
54. **RUÍZ, M. y LAPEÑA, I.** Las nuevas fronteras de la exploración relacionadas con la genética. *Un blanco en movimiento: recursos genéticos y opciones para rastrear y monitorear flujos internacionales*. Gland, Suiza: UICN, 2009, pp. 138.
55. **RUSELL, N.** Molecular Adaptations in Psychrophilic Bacteria : Potential for Biotechnological Applications. , vol. 61, 1998, pp. 21.
56. **SILVA, M. del C., et.al.** *Técnico Especialista en Laboratorio* [en línea], 2006. Segunda. Sevilla: s.n. ISBN 978-84-665-6315-4. Disponible en: http://books.google.com.ec/books?id=e033m2_cqDwC&pg=PA249&dq=neumonia+pdf&hl=es&sa=X&ei=jBGWU7SIHcLlsASJsYGgAQ&ved=0CCUQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false%5Chttp://books.google.com.ec/books?id=e033m2_cqDwC&pg=PA249&dq=neumonia+pdf&hl=es&sa=X&ei=jBGWU7SIHcLlsASJs.
57. **SINGER, E., et.al.** Genomic Potential of *Marinobacter aquaeolei*, a Biogeochemical “Opportunitroph”. *Applied and Environmental Microbiology* [en línea], 2011, pp. 2763–2771. DOI 10.1128/AEM.01866-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126349/>.
58. **STRAKA, R. y STOKES, L.** Psychrophilic bacteria from antarctica [en línea]. 1960. S.l.: s.n. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC278898/?page=4>.
59. **TORRES, M. del R.** ¿La Vida? Microorganismos extremos. *Contactos*, vol. 87, (2012) pp. 5–16.
60. **TORTORA, G., FUNKE, B. y CASE, C.** *Introducción a la Microbiología* [en línea]. 2007. Novena. Buenos Aires: s.n. ISBN 978-950-06-0740-7. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA69&dq=Tinción+GRam+por+tipos&hl=es->

419&sa=X&ved=0ahUKEwjZ_OX15tvSAhUG5SYKHTmwCdMQ6AEIJAB#v=onepage&q=Tinc
ión GRam por tipos&f=false.

61. **TRAPPEN, S. Van, et.al.** *Glacielecola polaris* sp . nov ., a novel budding and prosthecate bacterium from the Arctic Ocean , and emended description of the genus *Glacielecola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolog* [en línea], 2014.pp. 1765–1771. DOI 10.1099/ijs.0.63123-0. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388742>.
62. **WANG, X., et.al.** International Journal of Biological Macromolecules Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp . DL-6 , a marine psychrophilic bacterium. *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea], vol. 70, 2014. pp. 455–462. ISSN 0141-8130. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.033. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.033>.
63. **XU, Y., NOGI, Y., KATO, C. y LIANG, Z.** *Moritella profunda* sp . nov . and *Moritella abyssi* sp . nov ., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. , 2003. pp. 533–538. DOI 10.1099/ijs.0.02228-0.