



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

**EVALUACIÓN PROSPECTIVA DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA
Y PROTEOLÍTICA EN BACTERIAS DE LAS AGUAS TERMALES
DE LOS ILINIZAS, PROVINCIA DE COTOPAXI.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: JOCELYNE VANESSA LÓPEZ ALMEIDA

LILIANA CARLOTA SORIA NOROÑA

DIRECTOR: DR. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2018

©2018, Jocelyne Vanessa López Almeida y Liliana Carlota Soria Noroña.

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: Tipo Proyecto de Investigación **“Evaluación prospectiva de la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las aguas termales de los Ilinizas, provincia de Cotopaxi”**, de responsabilidad de las señoritas Jocelyne Vanessa López Almeida y Liliana Carlota Soria Noroña, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Dra. Yolanda Díaz

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Cristina Calderón

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Nosotras JOCELYNE VANESSA LÓPEZ ALMEIDA Y LILIANA CARLOTA SORIA NOROÑA somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el presente documento y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

JOCELYNE VANESSA LÓPEZ ALMEIDA

LILIANA CARLOTA SORIA NOROÑA

DEDICATORIA

A Dios, por habernos permitido llegar hasta este punto de nuestras vidas y habernos dado salud para lograr nuestros objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A nuestros padres y familia, por habernos inculcado buenos valores, la capacidad para afrontar la vida y luchar por nuestras metas, además de brindarnos todo su apoyo y cariño durante todo el arduo trabajo hecho, por siempre confiar en nuestras capacidades, alentándonos a alcanzar esta nueva etapa en nuestras vidas.

A nuestra asesora Dra. Yolanda Díaz, por ser un ejemplo de docente en esta prestigiosa institución, la cual formó nuestra ética y conocimientos como futuros profesionales, por su amistad y ayuda brindada en la culminación de este trabajo de investigación.

A nuestro tutor Dr. Gerardo Medina, por ser un gran guía, maestro y amigo, el cual nos brindó su apoyo, comprensión y confianza durante toda la realización de nuestro trabajo de titulación.

Jocelyne López.

Liliana Soria.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su infinita bondad y amor, por darnos salud y bendecirnos, dándonos la fuerza y la voluntad para cumplir con nuestras metas.

A nuestros padres por ser grandes ejemplos a seguir, por enseñarnos a luchar por nuestros objetivos y a no rendirnos, por el amor y el cariño que diariamente nos muestran y por todo su apoyo económico durante nuestra vida estudiantil.

A nuestros hermanos y hermanas por darnos ánimos durante nuestros momentos de dificultad y por ser grandes compañeros y amigos en nuestro diario vivir.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y Escuela de Ciencias Químicas por formarnos como futuros profesionales con ética, moral, brindándonos los conocimientos y bases necesarias para nuestro desempeño laboral.

Al Dr. Gerardo Medina por su apoyo, comprensión y confianza durante toda la realización de nuestro trabajo, por su interés y por defendernos y ayudarnos en los momentos de adversidad, demostrando ser un gran maestro y amigo.

A la Dra. Yolanda Díaz por ser un ejemplo de docente en esta prestigiosa institución y por su amistad y ayuda brindada en la culminación de este trabajo de investigación.

A la Dra. Yolanda Buenaño por todas las facilidades brindadas, por la guía dada en nuestro trabajo práctico, por su comprensión y paciencia y por su calidad tanto de persona como docente.

Jocelyne López.

Liliana Soria.

RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. OBJETIVO	2
1.1. General	2
1.2 Específicos	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. MARCO CONCEPTUAL	4
2.2.1. <i>Microorganismos extremófilos</i>	4
2.2.2. <i>Enzimas termoestables</i>	6
2.2.3. <i>Proteasas termoestables</i>	7
2.2.4. <i>Lipasas termoestables</i>	7
2.2.5. <i>Cultivo bacteriano</i>	8
2.2.5.1. <i>Clasificación de las bacterias según sus necesidades nutricias</i>	9
2.2.5.2. <i>Clasificación por la temperatura de desarrollo</i>	9
2.2.5.3. <i>Necesidades gaseosas</i>	10
2.2.5.4. <i>Potencial hidrogeno</i>	10
2.2.6. <i>Medios de cultivo</i>	111
2.2.6.1 <i>Clasificación de los medios de cultivo</i>	11
2.2.6.2 <i>Medio de cultivo PCA</i>	12

CAPÍTULO II

3.	METODOLOGÍA	13
3.1.	Lugar de muestreo	13
3.1.1.	<i>Aguas termales los Ilinizas</i>	13
3.2.	Tipo y diseño de la investigación	14
3.3.	Obtención de la muestra	14
3.4.	Técnicas de recolección de datos	17
3.4.1.	<i>Toma de muestras</i>	17
3.4.2.	<i>Caracterización física de las muestras de agua</i>	17
3.4.3.	<i>Diseño de las unidades experimentales para las pruebas de degradación de tributirina y caseína con bacterias de las aguas termales de los Ilinizas</i>	18
3.4.3.1.	<i>Preparación de los medios de cultivo utilizados</i>	18
3.4.3.2.	<i>Aislamiento, selección y recuento de las colonias bacterianas</i>	19
3.4.4.	<i>Determinación de la actividad lipolítica y proteolítica</i>	20
3.4.4.1.	<i>Inoculación de las cepas bacterianas</i>	20
3.4.4.2.	<i>Medición del índice de potencia de actividad enzimática</i>	20
3.4.4.3.	<i>Aislamiento por agotamiento de las bacterias</i>	21
3.4.4.4.	<i>Caracterización microscópica y macroscópica de los aislados bacterianos</i>	21
3.4.4.5.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	21
3.4.5.	<i>Análisis estadístico</i>	22
3.4.5.1.	<i>Sistema de variables</i>	22
3.4.5.2.	<i>Operacionalización de variables</i>	22
3.4.5.3.	<i>Índice de potencia (IP)</i>	22
3.4.5.4.	<i>Análisis de la varianza con un factor (ANOVA) y prueba de rango múltiple Tukey</i>	23

CAPÍTULO III

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1.	Caracterización física de las muestras de agua.....	24
4.2.	Recuento de las colonias bacterianas.....	26
4.3.	Pruebas de degradación de tributirina y caseína con las bacterias de las aguas termales de los Ilinizas.....	32
4.4.	Determinación del índice de potencia de actividad enzimática.....	32
4.4.1.	<i>ANOVA del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT.....</i>	<i>48</i>
4.4.2.	<i>Prueba de rango múltiple Tukey del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT.....</i>	<i>49</i>
4.5.	Evaluación microscópica de los aislados bacterianos.....	50
4.6.	Evaluación macroscópica y pruebas bioquímicas.....	54
	CONCLUSIONES.....	57
	RECOMENDACIONES.....	58
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de los microorganismos extremófilos y ejemplos de aplicación de sus enzimas.....	5
Tabla 2-1: Clasificación de las bacterias.....	9
Tabla 1-2: Indicadores e instrumentos o técnicas para cada variable	22
Tabla 1-3: Caracterización física de las muestras de agua.....	24
Tabla 2-3: Recuento de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCA+AD.....	26
Tabla 3-3: Promedio de las colonias bacterianas que crecieron en medio PCA+AD	28
Tabla 4-3: Recuento de las colonias bacterianas que crecieron en medio PCA+AT	29
Tabla 5-3: Recuento de las colonias bacterianas que crecieron a temperatura de 4 °C	30
Tabla 6-3: Determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en el medio LD+AD	32
Tabla 7-3: Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con AD.	38
Tabla 8-3: Determinación del IPP mostrado por los aislados bacterianos en el medio LD+AT.....	39
Tabla 9-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un índice de potencia proteolítica mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con agua termal	44
Tabla 10-3: Determinación del índice de potencia de actividad lipolítica (IPL) mostrado por los aislados bacterianos en el medio MM+AT.....	45
Tabla 11-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPL mayor o igual a 1,50 por fuente termal en el tratamiento con agua termal.	47
Tabla 12-3: Factores intersujetos del IP en medio con AD y AT a una temperatura de 35 °C	48

Tabla 13-3: ANOVA del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT	48
Tabla 14-3: Comparaciones múltiples del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT por fuente termal.	49
Tabla 15-3: Evaluación microscópica de los aislados bacterianos del medio LD+AD	50
Tabla 16-3: Evaluación microscópica de los aislados bacterianos del medio LD+AT y MM+AT.....	51
Tabla 17-3: Total de aislados bacterianos Gram + y Gram -	52
Tabla 18-3: Total de aislados bacterianos según su forma	53
Tabla 19-3: Evaluación macroscópica y pruebas bioquímicas de los los clones bacterianos aislados.....	54
Tabla 20-3: Género y especie de los clones bacterianos aislados	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Clasificación de las bacterias según su pH.	11
Figura 1-2:	Aguas termales los Ilinizas.	13
Figura 2-2:	Fuente termal 1.	15
Figura 3-2:	Fuente termal 2.	15
Figura 4-2:	Fuente termal 3.	16
Figura 5-2:	Fuente termal 4.	16
Figura 6-2:	Fuente termal 5.	17

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Valores de pH y temperatura obtenidos para cada fuente termal	25
Gráfico 2-3: Recuento a las 120 horas de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCA con agua destilada.....	27
Gráfico 3-3: Unidades formadoras de colonia por mililitro vs fuente termal	29
Gráfico 4-3: Unidades formadoras de colonia por mililitro vs fuente termal	30
Gráfico 5-3: Unidades formadoras de colonia por mililitro vs fuente termal	31
Gráfico 6-3: Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con AD.....	38
Gráfico 7-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPP mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con agua termal.	44
Gráfico 8-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPL mayor o igual a 1,50 por fuente termal en el tratamiento con agua termal.	48
Gráfico 9-3: Porcentaje de aislados bacterianos según su forma y diferenciación entre Gram + y Gram -	53

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo A** Caracterización física de las muestras de agua.
- Anexo B** Recuento de las colonias bacterianas.
- Anexo C** Estabilización de los aislados bacterianos.
- Anexo D** Pruebas enzimáticas en los aislados bacterianos y medición del índice de potencia de actividad enzimática.
- Anexo E** Aislamiento por agotamiento de los clones bacterianos.
- Anexo F** Observación microscópica de los aislados bacterianos.
- Anexo G** Observación macroscópica y pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos.

RESUMEN

Este trabajo de titulación tuvo como objetivo evaluar la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las Aguas Termales de los Ilinizas de la Provincia de Cotopaxi, para esto se tomaron tres muestras representativas de cada una de las cinco fuentes termales escogidas, además de una muestra compuesta para la preparación de medios de cultivo. Se analizó in situ el pH y la temperatura en cada punto de muestreo. Se procedió a sembrar en placas con medio PCA más agua destilada y más agua termal, realizando un recuento cada 24 horas de las colonias bacterianas inoculadas a 30 °C. Se seleccionaron 48 colonias bacterianas y se repicaron hasta su estabilización (3 veces). Se realizaron pruebas enzimáticas de degradación en medios con PCA más leche descremada, PCA más mantequilla y PCA más aceite de oliva, los mismos que fueron preparados en agua termal y agua destilada, se identificaron aquellos aislados bacterianos capaces de degradar tributirina y caseína. Se procedió a determinar el índice de potencia enzimática tanto lipolítica como proteolítica de los aislados bacterianos identificados anteriormente, para esto se usaron los medios PCA mas leche descremada y mantequilla modificado. Se realizó tinción Gram en 100 clones bacterianos y se aislaron diez clones representativos de cada fuente termal las cuales presentaron el mayor índice de potencia. Se emplearon pruebas bioquímicas para la identificación de los diez clones bacterianos aislados, los mismos que corresponden a los siguientes géneros: *Haemophilus*, *Proteus*, *Gardnerella*, *Plesiomonas*, *Psychrobacter*, *Campylobacter* y *Micrococcus*. Como recomendación en la toma de muestras se debe procurar no afectar el sitio o zona de muestreo con el fin de que cada muestra sea representativa del lugar.

Palabras clave: <TECNOLOGÍAS Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOTECNOLOGÍA> <LIPOLÍTICA> <PROTEOLÍTICA> <FUENTES TERMALES> <ILINIZAS> <COTOPAXI (PROVINCIA)>

ABSTRACT

This main objective of the current research work was to evaluate the lipolytic and proteolytic activity of bacteria in the hot springs of the Ilinizas, located in the Cotopaxi Province. For this purpose, three representative samples from each of the five hot springs chosen were taken, besides a simple compound for the preparation of culture media. The pH and the temperature were analyzed in situ at each simple point. Simultaneously, distilled water and more thermal water were plated with PCA medium doing a counting of the bacterial colonies inoculated at 30 °C every 24 hours. It selected 48 bacterial colonies and repeated three times until getting their stabilization. It made enzymatic degradation tests in the PCA media adding skim milk, PCA with butter and PCA with olive oil, which were prepared in thermal water and distilled water identifying those bacterial isolates capable of degrading tributyrin and casein. On the other hand, it determined the enzymatic power index lipolytic, as well as proteolytic of the bacterial isolates identified above; for which used the PCA media with skim milk and modified butter. It made gram stain 100 bacterial clones and ten representative clones of each thermal source were isolated which presented the highest power index. Biochemical test was used to identify the then isolated bacterial clones, which correspond of the following genera: Haemophilus, Proteus, Gardnerella, Plesiomonas, Psychrobacter, Campylobacter and Micrococcus. Finally, as a recommendation in the taking of samples, ensure no affect the site or sampling area in the order to make each simple representative of the place.

Keywords: <TECHNOLOGIES AND SCIENCES OF ENGINEERING>
<BIOTECHNOLOGY> <LIPOLYTIC> <PROTEOLYTIC> <THERMAL SOURCES>
<ILINIZAS> <COTOPAXI (PROVINCE)>

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema.

La biotecnología ambiental pretende mejorar las condiciones ambientales desfavorables, en especial para el ser humano, mediante el uso de organismos. El Ecuador es un país mega diverso, conocido a escala mundial por su riqueza y su variedad tanto en fauna, flora, y microorganismos, lo cual lo constituye una reserva genética, y metabólica.

Sin embargo, según estudios realizados por Oliart et al., (2016: p. 82), se estima que menos del 1% de los microorganismos que habitan en el planeta han sido estudiados, y pudiera haber alrededor de 50 millones de especies bacterianas por descubrir.

Hasta la actualidad según Montaña et al., (2010: p. 16) se han descrito 45 000 especies de bacterias, esto sugiere que los ecosistemas del planeta podrían contener una elevada diversidad microbiana aún no descubierta. Por tal motivo se plantea realizar un estudio bioprospectivo para determinar la presencia de microorganismos con actividades enzimáticas en las aguas termales de los Ilinizas, para dar respuesta y aportar a la comunidad información relevante:

¿Pueden las bacterias de las aguas termales de los Ilinizas ser una fuente potencial de nuevas enzimas? ¿Existe actividad proteolítica y lipolítica en las bacterias aisladas de estas aguas?

Justificación

En nuestro mundo existe una extensa diversidad de microorganismos, de los cuales sólo se conoce el 3% y pocos se han estudiado con profundidad (Montaña et al., 2010: p. 16). Las bacterias fueron las primeras formas de vida en colonizar la Tierra, adaptándose hasta obtener una capacidad para usar distintas fuentes de energía.

Las bacterias y otros microorganismos pueden crecer en los ambientes diversos. Su capacidad y eficiencia metabólica permitieron que ellos colonizaran la superficie terrestre, el aire, el agua y prácticamente todas las regiones geográficas del planeta.

Siendo el Ecuador una de las 17 regiones de mayor mega diversidad en el mundo, es una fuente de nuevos e innumerables microorganismos y sustancias con aplicaciones médicas, alimentarias

e industriales, con un enorme potencial de generación de riqueza y bienestar. Por lo que la búsqueda de actividad lipolítica y proteolítica en aguas termales es de interés científico en nuestro país, ya que la biodiversidad, en cuanto a bacterias y sus enzimas aisladas a partir de estos cuerpos de agua, es un tema no explorado.

A su vez el enfoque actual de las nuevas investigaciones, en concordancia con la evolución de los procesos productivos a nivel industrial, está en la producción y purificación de enzimas, con el fin de reducir costos y optimizar los procesos industriales, y a su vez generar nuevas tecnologías por ejemplo en el área de las biotransformaciones aplicables a nivel industrial y biotecnológico.

Debido a esto, se plantea el estudio de microorganismos termófilos cuyas enzimas termo resistentes son de gran valor industrial, al presentar ventajas asociadas a su mayor estabilidad por ejemplo frente a altas temperaturas, pH extremos y agentes desnaturalizantes, lo que permitiría una mayor eficiencia en los procesos industriales.

Tanto las proteasas como lipasas termoestables presentan un gran potencial de aplicación biotecnológica en la industria, pudiendo ser empleadas en la síntesis de biopolímeros, producción de fármacos, cosméticos, detergentes, industria del cuero entre otros productos.

1. OBJETIVO

1.1. General

Evaluar prospectivamente la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las aguas termales de los Ilinizas, provincia de Cotopaxi.

1.2. Específicos

Caracterizar físicamente el agua de las fuentes termales de Los Ilinizas.

Aislar las colonias bacterianas de las fuentes termales de Los Ilinizas.

Realizar pruebas de degradación de tributirina y caseína con las bacterias de las aguas termales de Los Ilinizas.

Determinar el índice de potencia de la actividad enzimática de proteasas y lipasas en bacterias de las aguas termales de Los Ilinizas.

Identificar las colonias bacterianas mediante pruebas bioquímicas y tinción Gram.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Paladines mencionó que en el Ecuador se han documentado 167 manantiales de aguas termales y minerales; y, más de 1000 manantiales de agua fresca de montaña, ubicados principalmente en el callejón Interandino y alrededor de los grandes volcanes (Paladines citado en Carrión, 2014: p. 3).

El Ecuador registra 60 puntos de aguas termales. Las termas se localizan en 7 provincias de la Sierra, una de la Costa y una de la Amazonía (Carrión, 2014: p. 2). El científico Wolf en su obra capital “Geografía y Geología del Ecuador” publicada en 1892, al referirse a las aguas termales y minerales del país decía: “El Ecuador es muy rico en aguas termales y minerales”; pero el uso que se hace de ellas es casi nulo (Wolf, 1892 citado en Carrión, 2014: p. 3).

Han pasado 116 años desde que Wolf, escribió sobre la bondad y propiedades de las aguas termales y minerales del país. Lamentablemente hasta ahora, salvo casos aislados, no se ha hecho nada por conocer e investigar nuestras aguas minerales. Por lo que existe un bajo desconocimiento de las mismas, incluso de parte de instituciones (Wolf, 1892 citado en Carrión, 2014: p. 3).

Martínez, (2006: pp. 5-6) demostró que las 72 cepas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Bioprosos de la Universidad de Guadalajara, producen proteasas en un medio de cultivo con caseína.

En un estudio de Lee et al., (2009: p. 153) se aislaron y caracterizaron 54 cepas bacterianas a partir de aguas termales, aproximadamente el 56% de los aislamientos exhibieron actividad amilasa, mientras que el 36% y 18% de los aislados exhiben actividad proteolítica y lipolítica, respectivamente.

Daniele et al., (2011: p. 173) aislaron la especie *Geobacillus stearothermophilus* de las aguas termales de Las Trincheras, en Venezuela, concluyendo que posee actividad lipolítica, a una temperatura óptima de 55 °C y un pH de 10,5.

Navas et al., (2014: p. 46) aislaron dos bacterias termofílicas, pertenecientes a los géneros *Thermus* y *Geobacillus*, a partir de aguas termales de la provincia de Salta, Argentina, en las cuales identificaron proteasas y lipasas, concluyendo que el microorganismo *Thermus sp* identificado, es un potencial productor de enzimas termofílicas que podrían ser aplicadas en la industria alimentaria.

Calero et al., (2017: p. 49) estudiaron las proteasas alcalinas producidas por dos bacterias termófilas aisladas de sedimentos de los géiseres de Candarave, tales bacterias termófilas mostraron capacidad proteolítica en medio sólido, formando un halo de hidrólisis de 46 mm a 50 °C.

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. Microorganismos extremófilos.

Los extremófilos son organismos que no solamente sobreviven, sino que se desarrollan exitosamente en las condiciones más inhóspitas e impensables para la vida. Son organismos que no sólo toleran y sobreviven a ciertas condiciones naturales extremas, sino que las requieren para poder crecer y multiplicarse (Ramírez, 2010: p. 57).

Los hábitats donde viven los extremófilos incluyen manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos; lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, y con relativa frecuencia ambientes en que combinan dos o más factores extremos, como alta temperatura y condiciones ácidas, en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos (Madigan y Marss, 1997; Rothschild y Mancinelli, 2001; Canganella, 2011 citado en Sarmiento et al., 2015: p. 148).

Los microorganismos extremofílicos representan una fuente subutilizada e innovadora de nuevas enzimas. Estos microorganismos han desarrollado mecanismos únicos para hacer frente a temperaturas extremas, pH ácido y básico, alta salinidad, alta radiación, baja actividad de agua y altas concentraciones de metal entre otras condiciones ambientales (Sarmiento et al., 2015: p. 148).

Se consideran termófilos aquellos microorganismos que necesitan temperaturas por encima de 65 °C, la temperatura para un crecimiento óptimo se encuentra entre 70 – 80 °C (Ramírez et al., 2006: p. 57). Existe una clasificación dentro de este grupo donde los termófilos crecen a una temperatura óptima de 45-70 °C como *Bacillus acidocaldarius* y *Bacillus stearothermophilus*. (Pedroza, 2001 citado en Rubiano, 2006: p. 5).

Los componentes celulares de los termófilos deben enfrentarse a la desnaturalización y la descomposición debidos a las altas temperaturas en las que se desarrollan, para lo que han de utilizar una combinación de estrategias (Puente, 2011: p. 3).

Ray (1971) y Brock (1985) mencionan que los lípidos de membrana juegan un papel fundamental en la termofilia de estos organismos y su composición se debe adaptar a las fluctuaciones en la temperatura ambiente para mantener sus funciones sin perder el compromiso con la estabilidad química necesaria para evitar por ejemplo la desnaturalización de sus proteínas por efecto de la disolución a alta temperatura (Ray, 1971; Brock, 1985 citados en Puente, 2011: p. 4).

En la siguiente tabla se puede observar la clasificación de los microorganismos extremófilos y ejemplos de aplicación de sus enzimas:

Tabla 1-1: Clasificación de los microorganismos extremófilos y ejemplos de aplicación de sus enzimas.

Tipo	Microorganismos	Enzimas	Aplicación
Termófilos	<i>Bacillus sp.</i>	Proteasas	Detergentes, hidrólisis en alimentos y bebidas, panificación.
	<i>Streptomyces sp.</i>	Glucosihidrolasas	Procesamiento de almidón, celulosas, pectinas y procesamiento de textiles.
	<i>Bacillus lincheniformis</i>	(amilasas, glucoamilasas, celulasas)	Modificación de quitina para uso farmacéutico y alimenticio.
	<i>Trichoderma sp.</i>	Quitinasas	
	<i>Bacillus sp.</i>	Xilanasas	Blanqueo de papel.
	<i>Geobacillus sp.</i>	Lipasas estererasas	Detergentes, modificación de grasas y lácteos, reacciones estero específicas y biosíntesis orgánicas, biocatálisis en disolventes orgánicos y curtido de pieles.
Psicrófilos	<i>Thermus aquaticus</i>	DNA polimerasas	Biología molecular.
		Deshidrogenasas	Reacción de óxido reducción.
	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Proteasas	Detergentes, industria de alimentos.
	<i>Cytophaga sp.</i>	Amilasas	Detergentes y panificación.
	Deshidrogenasas	Biosensores.	
	<i>Vibrio sp.</i>	Lipasas	Detergentes, alimentos y cosméticos.

Halófilos	<i>Halobacterium sp.</i>	Proteasas	Síntesis de péptidos.
	<i>Haloarcula sp.</i>	Deshidrogenasas	Biocatálisis en disolventes orgánicos.
Alcalófilos	<i>Bacillus sp.</i>	Proteasas y celulasas	Detergentes e industria de alimentos.
Acidófilos	<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Amilasas, Glucoamilasas	Procesamiento de almidón.
	<i>Desulfurolobus sp.</i>	Proteasas y celulasas	Componentes de alimentos.
		Oxidasas	Desulfuración del carbono.

Fuente: Revista Ciencia UAT, 2016 (Universidad Autónoma de Tamaulipas. Vol. 11. Nº. 1, Ciudad Victoria jul./dic. 2016).

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

2.2.2. *Enzimas termoestables.*

Existe un gran número de enzimas con aplicación industrial, sin embargo, muchas de ellas sólo pueden funcionar bajo limitadas condiciones de temperatura, pH y medio de reacción. (Sarmiento, 2015 citado en Oliart, 2016: p. 84).

Se puede definir como extremoenzima o extremozima a los enzimas responsables de catalizar reacciones químicas en los microorganismos que habitan en ambientes extremos, como pueden ser temperaturas muy altas o muy bajas, valores de pH altos o bajos, presiones altas, concentraciones de sales o metales alta. Los microorganismos poseedores de estos enzimas reciben el nombre de extremófilos, debido al hecho de que viven en condiciones que resultan letales para otros microorganismos. Los microorganismos extremófilos comúnmente pertenecen al dominio Archaea (Oliart et al., 2016: p. 84).

Las proteínas de organismos termófilos necesitan de mecanismos que les permitan tener la estabilidad suficiente para conservar su estructura tridimensional y la integridad del centro activo, mientras mantienen la flexibilidad necesaria para llevar a cabo su función (Hammes-schiffer, 2003 citado en Puente, 2011: p. 25).

En general las proteínas de organismos termófilos tienen una superficie más polar, un núcleo más apolar y mejor empaquetado, un número mayor de interacciones iónicas, puentes de sulfuro y una optimización de estructuras secundarias, dando lugar a unas proteínas más pequeñas con un núcleo hidrofóbico mucho más compacto minimizando o eliminando cavidades dentro de la proteína y bucles en el exterior de ella (Hammes-schiffer, 2003 citado en Puente, 2011: p. 25).

Desde un punto de vista industrial, las enzimas termófilas poseen ciertas ventajas sobre sus contrapartes mesófilas. Estas enzimas son activas y eficientes bajo altas temperaturas. También

son altamente resistentes a agentes desnaturalizantes y disolventes orgánicos. Además, las enzimas termófilas realizan reacciones más rápidas y son más fáciles de separar de otras proteínas termolábiles durante los pasos de purificación (Sarmiento, Peralta & Blamey, 2015: p. 3).

2.2.3. *Proteasas termoestables.*

Las enzimas proteolíticas o proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, estas enzimas rompen un mismo tipo de enlace, el enlace amida o peptídico. Las proteasas se han convertido en las principales enzimas industriales, y constituyen más del 65% del mercado mundial de enzimas. Estas enzimas son ampliamente empleadas en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y del cuero (Haki & Rakshit, 2003 citado en Rubiano, 2006: pp. 25-26).

Las limitaciones de las proteasas mesófilas obtenidas a partir de animales y vegetales, han dirigido las investigaciones hacia las proteasas de microorganismos extremófilos, utilizadas como aditivos en detergentes, además de sus aplicaciones en la industria del cuero para el tratamiento pieles, reemplazando el uso de químicos tóxicos, esto hace que estas enzimas ocupen las principales posiciones con respecto a las aplicaciones comerciales (Granados et al., 2003 citado en Rubiano, 2006: pp. 25-26).

Las proteasas son usadas en la industria alimenticia, para la fabricación de galletas, pan, etc., en la industria cervecera y en la industria de detergentes, mejorando la eficacia del lavado hidrolizando las proteínas coaguladas que no son dispersadas por el agua (Granados et al., 2003 citado en Rubiano, 2006: pp. 25-26).

Una forma de aplicación industrial de las proteasas sería sobre fibras proteínicas tales como plumas, cabello y uñas, las cuales, están abundantemente disponibles en la naturaleza como residuos. Estas pueden ser convertidas a biomasa útil, entre otros, proteínas concentradas o aminoácidos usando proteasas obtenidas a partir de ciertos microorganismos (Anwar & Saleemuddin, 1998 citado en Rubiano, 2006: pp.25- 26).

2.2.4. *Lipasas termoestables.*

Las enzimas de las bacterias termófilas actúan como biocatalizadores realizando reacciones de síntesis o hidrólisis. Las lipasas suelen ser empleadas para producir alimentos por ejemplo para la producción de determinados sabores en quesos y otros alimentos por la producción de ácidos grasos volátiles, pero al generarse diferentes problemas debido a la contaminación se las está estudiando para darles usos diferentes como por ejemplo utilizarlas en procesos de tratamientos de agua (Durán, 2010 citado en Pazmiño Flores, 2016: pp. 9-11).

Las bacterias lipolíticas pertenecen a un grupo de bacterias heterogéneas que generan lipasas, estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar grasas y aceites. Algunas bacterias aeróbicas, anaeróbicas y proteolíticas poseen actividad lipolítica. Entre estas tenemos *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y algunos mohos (Abner, 2011 citado en Pazmiño Flores, 2016: pp. 9-11)

Las lipasas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilglicerolos in vivo. Además, pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (Bornscheuer, 1994 citado en Pazmiño Flores, 2016: pp. 9-11)

Una característica peculiar de las lipasas es que son enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que operan unidas a interfaces lípido-agua. Bajo estas condiciones, se produce un incremento de la actividad catalítica, respecto a las soluciones con concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica, fenómeno conocido como activación interfacial (Sarda, 1958 citado en González, .Moreno & Monte 2010: pp. 124-140).

Las lipasas han suscitado un interés creciente para la industria debido a su versatilidad, estereoselectividad, estabilidad frente a solventes orgánicos y capacidad de degradar compuestos orgánicos en mezclas de reacción con baja actividad de agua, bajo determinadas condiciones, las lipasas pueden catalizar reacciones químicas distintas de hidrólisis, como esterificación, interesterificación, alcoholólisis, acidólisis y aminólisis. (Segura, 2004 citado en González, .Moreno & Monte 2010: pp. 124-140).

Estas hidrolasas se han empleado como aditivos para detergentes, en la industria alimentaria, papelera, química y energética; así como para la producción de cosméticos, en tratamientos ambientales y en el diseño de biosensores (Segura, 2004 citado en González, .Moreno & Monte 2010: pp. 124-140).

2.2.5. *Cultivo bacteriano.*

Debido al pequeño tamaño, las bacterias no pueden estudiarse como individuos aislados, sino como poblaciones. Estas poblaciones deben cumplir con el requisito de provenir de una sola célula. Para obtenerlas debemos ser capaces de cultivarlas, utilizando medios de cultivo con los nutrientes necesarios y en cantidades apropiadas a los requerimientos específicos de los microorganismos que se desean cultivar (Rojas, 2011: p. 26-40).

2.2.5.1. Clasificación de las bacterias según sus necesidades nutricias.

Se clasifican en forma general como:

a) **Autótrofas:** se desarrollan en medios de cultivo sencillos compuestos por sales minerales, utilizan CO₂ como fuente de carbono. Tienen un metabolismo completo que les permite sintetizar todos los compuestos orgánicos necesarios para su desarrollo y propagación. Poseen importancia en los ciclos biológicos de los elementos son muy importantes en la naturaleza (Rojas, 2011: p. 26-40).

b) **Heterótrofas:** son las bacterias que obtienen los nutrientes de moléculas complejas para su desarrollo. Es el grupo más importante del punto de vista médico. Las integrantes de este grupo difieren enormemente en sus requerimientos de fuentes de carbono, pero estos son siempre compuestos orgánicos. (Rojas, 2011: p. 26-40).

En la tabla 2-1 se muestra una clasificación de las bacterias de acuerdo a los tipos tróficos:

Tabla 2-1: Clasificación de las bacterias.

Tipo	Fuente de Carbono	Fuente de Energía
Fotolitótrofos	CO ₂	Luz
Fotoorganótrofos	Compuestos orgánicos	Luz
Quimiolitótrofos	CO ₂	Reacciones REDOX
Quimioorganótrofos	Compuestos orgánicos	Reacciones REDOX

Fuente: Rojas Triviño, 2011.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

2.2.5.2. Clasificación por la temperatura de desarrollo.

Las bacterias se clasifican según la temperatura en (Tortora, Funke & Case, 2007: pp. 30-53):

- **Psicrófilas:** crecen a temperaturas bajas, alrededor de 0 °C, pero el desarrollo óptimo es entre 10 y 15 °C, existen especies que tienen desarrollo hasta - 15 °C. Su temperatura máxima está entre 18-20 °C.
- **Mesófilas:** tienen una temperatura de desarrollo alrededor de los 25 a 42 °C, en este grupo se encuentran casi todas las bacterias patógenas.

- Termófilas: tienen temperatura óptima de desarrollo entre los 45 °C y a temperatura de 70 °C.
- Termófilas facultativas: termotolerantes desarrollan bien a menos de 45 °C y a temperaturas superiores.
- Hipertermófilos: poseen temperaturas óptimas de crecimiento entre 80-100 °C.

Temperatura de crecimiento óptimo: es la temperatura en que se obtiene el máximo desarrollo en el tiempo mínimo (de 12 h a 24 h en general). Esta temperatura puede no ser la óptima para el desarrollo de diversas características del microorganismo, como: pigmentación y morfología (Tortora, Funke & Case, 2007: pp. 30-53).

2.2.5.3. *Necesidades gaseosas.*

Las bacterias se clasifican por sus necesidades gaseosas en (Atlas & Bartha, 2002: pp. 15-20):

- Aerobias: necesitan para su desarrollo la presencia de oxígeno libre.
- Microaerófilas: son bacterias aerobias facultativas que crecen mejor en concentraciones de CO₂ entre el 5 y el 10%, y tensión de O₂ reducido.
- Anaerobias estrictas: sólo desarrollan en ausencia de oxígeno libre, la presencia de este gas induce a la formación de peróxidos letales.
- Anaerobias Facultativas: son los microorganismos que desarrollan en presencia de oxígeno y en su ausencia.

Las Bacterias Aerotolerantes: tienen el mismo perfil metabólico que las anaerobias, pero las distingue su capacidad de tolerar el O₂ del aire no tolerado por las anaerobias estrictas (Atlas & Bartha, 2002: pp. 15-20).

2.2.5.4. *Potencial hidrógeno (pH).*

En general el pH óptimo de desarrollo de una bacteria está 6,5 a 7,5; los límites máximos oscilan entre 4,0 y 9,0 (Atlas & Bartha, 2002: pp. 15-20). En la figura 1-1 se muestra la clasificación de las bacterias según su pH óptimo de crecimiento:

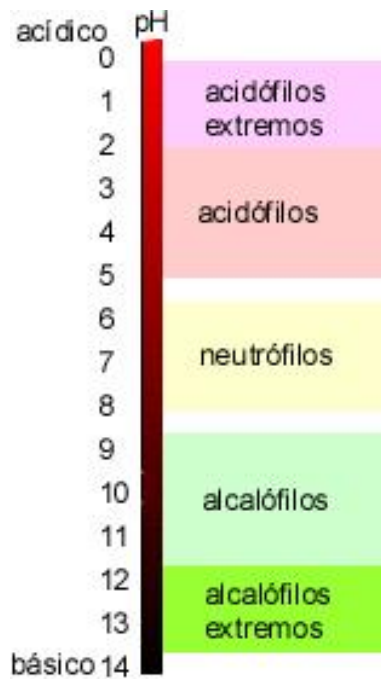


Figura 1-1: Clasificación de las bacterias según su pH.

Realizado por: Atlas, R. M., & Bartha, R., 2002.

2.2.6. *Medios de cultivo.*

Se denomina medio de cultivo a una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua que sirven para el crecimiento bacteriano (Olivas, 2004: pp. 40-48).

2.2.6.1. *Clasificación de los medios de cultivo.*

Según su consistencia se clasifican en (Olivas, 2004: pp. 40-48):

- Sólidos (contienen del 1 al 2% de agar).
- Semisólidos (contienen del 0,3 al 0,7% de agar).
- Líquidos (sin agregado de agar).

Según su composición química se clasifican en (Olivas, 2004: pp. 40-48):

- Sintéticos o químicamente definidos: son los que provienen de mezclas de productos naturales y que su composición es perfectamente conocida.

- Naturales o semisintéticos: son los que contienen extractos o infusiones de productos naturales y que su composición química no está perfectamente conocida.

Según su utilidad se clasifican en:

- Medios Nutritivos: son medios simples que contienen los nutrientes básicos para permitir el crecimiento de muchas bacterias heterótrofas. (Carrascal & Burbano, 2003: pp. 5-10).
- Medios enriquecidos: la adición de componentes como sangre, suero, vitaminas, aminoácidos u otros componentes ricos en compuestos orgánicos provenientes de animales o plantas, al caldo o agar nutritivo, les proporciona sustancias nutritivas complementarias que permiten el cultivo de organismos heterótrofos exigentes (Carrascal & Burbano, 2003: pp. 5-10).
- Medios selectivos: añadiendo al agar nutritivo ciertos productos especiales, puede impedirse el desarrollo de algunos grupos bacterianos sin inhibir otros. Por ejemplo, el cristal violeta en concentraciones específicas previene el crecimiento de bacterias Gram positivas sin afectar el desarrollo de Gram negativas (Carrascal & Burbano, 2003: pp. 5-10).
- Medios diferenciales: la adición de ciertas sustancias químicas a los medios de cultivo trae como resultado determinado tipo de crecimiento bacteriano o cambios, permitiendo diferenciar distintos tipos de bacterias. El medio agar-sangre sirve como medio de enriquecimiento y diferencial (Carrascal & Burbano, 2003: pp. 5-10).
- Medios y test de identificación: para caracterizar microorganismos se utilizan, de manera convencional, una amplia variedad de medios y pruebas en los que se producen cambios bioquímicos específicos (Carrascal & Burbano, 2003: pp. 5-10).

2.2.6.2. *Medio de cultivo PCA*

Medio de cultivo recomendado para el recuento de bacterias aeróbicas en ambientes acuáticos, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos. También es recomendado como medio general para determinar poblaciones microbianas (Mast Group Ltd, 2017: p. 1)

La productividad de este medio, está basada en el alto contenido nutricional de sus componentes, que permite el desarrollo de las bacterias presentes en la muestra. Cuando se analiza leche y productos lácteos algunos autores recomiendan suplementarla con leche descremada estéril de uso bacteriológico en una proporción de 1 g por litro (Mast Group Ltd, 2017: p. 1).

CAPÍTULO II

3. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de muestreo.

3.1.1. *Aguas termales los Ilinizas.*



Figura 1-2: Aguas termales los Ilinizas.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

El sitio de colecta de las aguas termales se encuentra ubicado en los páramos del Illiniza Sur, en la parroquia San Juan de Pastocalle, perteneciente a Latacunga (Flores et al., 2014: p. 70).

Las aguas termales de los Ilinizas son aguas subterráneas, que se ubican a una altura de 4046 msnm, la temperatura ambiente promedio al año en la zona es de 11 °C, la precipitación es de 1500 a 3000 mm, estas aguas termales ofrecen una forma natural de mantener, alcanzar o recuperar la salud física y estética mediante sesiones termales periódicas, constituye una de las prioridades recreativas y de salud de las personas que la visitan (Flores et al., 2014: p. 70).

El acceso a las Aguas Termales es por la Panamericana central de Latacunga- Quito, Pastocalle la vialidad para el acceso al centro poblado es asfaltado y el acceso a los distintos barrios y comunidades son caminos de tercer orden (Flores et al., 2014: p. 70).

En este lugar se decidió tomar 5 fuentes de muestreo, las mismas que presentaron las siguientes características:

La fuente 1 (Figura 2-2) aldeaña a un precipicio, se encuentra rodeada por rocas y su agua posee una tonalidad naranja característica, en la misma podemos encontrar una vertiente proveniente de la montaña y una cueva.

La fuente 2 (Figura 3-2) se encuentra a una corta distancia de la fuente 1, sus aguas de tonalidad naranja se vierten por un terreno rocoso, a su alrededor se aprecia abundante maleza, esta fuente se ubica en una pendiente la cual la divide en dos zonas.

La fuente 3 (Figura 4-2) se encuentra a una corta distancia de la fuente 2, sus aguas de tonalidad naranja se vierten por un terreno rocoso hasta reposar formando una laguna, a su alrededor también se aprecia abundante maleza. En esta fuente se realizan ritos ceremoniales y se puede observar velas en la parte baja de la maleza.

La fuente 4 (Figura 5-2) se encuentra en la zona más alta, sus aguas poseen una tonalidad naranja. Posee dos vertientes, una proveniente directamente de la montaña y otra de la superficie del subsuelo, las rocas que la rodean tienen una tonalidad rojo intenso.

La fuente 5 (Figura 6-2) es una cascada que registra la menor temperatura, rodeada de piedras de gran tamaño, esta fuente se encuentra al ingresar al lugar, sus aguas poseen una tonalidad naranja. Cercana a la misma se halla un puente de paso.

3.2. Tipo y diseño de la investigación.

El tipo de investigación es experimental y prospectiva.

Experimental, porque actuamos constantemente sobre el objeto de estudio de nuestra investigación, lo cual corresponde a las bacterias de las aguas termales de los Ilinizas y su respectiva actividad enzimática.

3.3. Obtención de la muestra.

El criterio de muestreo de cada fuente termal se basó en tomar 3 diferentes muestras representativas de puntos de interés con el fin de tener una apreciación real de la microbiota del área como se muestra a continuación:



Figura 2-2: Fuente termal 1.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.



Figura 3-2: Fuente termal 2.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.



Figura 4-2: Fuente termal 3.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.



Figura 5-2: Fuente termal 4.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.



Figura 6-2: Fuente termal 5.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

De todas las fuentes termales se obtuvo una muestra compuesta de 2 litros con el fin de preparar los medios de cultivo iniciales y facilitar de esta manera el crecimiento bacteriano.

3.4. Técnicas de recolección de datos.

3.4.1. Toma de muestras.

Para la toma de muestras se utilizaron frascos de plástico con tapa, limpios y estériles, se procedió a enjuagar el frasco por lo menos tres veces con el agua de la fuente, tomando la muestra en contra corriente con el fin de evitar contaminación. A continuación, se procedió a tapar inmediatamente los frascos y a sellar con parafilm para evitar fugas, colocando finalmente las muestras en contenedores para mantener la temperatura de las mismas. Cada muestra fue identificada según la fuente termal muestreada.

3.4.2. Caracterización física de las muestras de agua.

La caracterización física de las muestras de agua se realizó in situ y se analizaron los siguientes parámetros: pH y temperatura del agua.

3.4.3. *Diseño de las unidades experimentales para las pruebas de degradación de tributirina y caseína con bacterias de las aguas termales de los Ilinizas.*

3.4.3.1. *Preparación de los medios de cultivo utilizados.*

- Medio PCA.

Este medio de cultivo está conformado por triptona 5 g/l, dextrosa 1 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l y agar 12 g/L. para su preparación se siguió las instrucciones de la etiqueta comercial Mast Group Ltd.

- Medio leche descremada (LD).

En un matraz erlenmeyer se disolvieron 20 g/L de leche descremada en $\frac{1}{4}$ del volumen total a preparar, se esterilizó a 121 °C. En otro matraz se preparó 16 g/L de agar PCA en los $\frac{3}{4}$ de volumen restante, se calentó hasta ebullición durante un minuto y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. En condiciones asépticas se mezcló la leche descremada con el agar PCA y se vació en las cajas petri estériles (Ramírez y Luna., 1996).

- Medio mantequilla (M).

En matraz erlenmeyer se disolvieron 23 g de agar PCA, 25 g de mantequilla, para 1000 mL de agua termal (AT) o agua destilada (AD). Se agitó hasta que se logró una mezcla homogénea, después se autoclavó el medio a 121 °C y 1 atm de presión con el fin de evitar contaminación y garantizar condiciones de asepsia.

- Medio mantequilla modificado (MM).

En matraz erlenmeyer se disolvieron 15 g de agar PCA, 10 g de mantequilla y 10 ml de tween 80, para 1000 mL de AT o AD. Se agitó hasta que se logró una mezcla homogénea, después se autoclavó el medio a 121 °C y 1 atm de presión con el fin de evitar contaminación y garantizar condiciones de asepsia.

- Medio aceite de oliva (AO).

En matraz erlenmeyer se disolvieron 23,5 g de agar PCA, 20 ml de aceite, 20 ml de tween 80 y 100 gotas de vitamina A, para 1000 mL de AT o AD. Se agitó hasta que se logró una mezcla homogénea, después se autoclavó el medio a 121 °C y 1 atm de presión con el fin de evitar contaminación y garantizar condiciones de asepsia.

- Medio aceite de oliva modificado (AOM).

En matraz erlenmeyer se disolvieron 23,5 g de agar PCA, 10 ml de aceite, 10 ml de tween 80 y 50 gotas de vitamina A, para 1000 mL de AT o AD. Se agitó hasta que se logró una mezcla homogénea, después se autoclavó el medio a 121 °C y 1 atm de presión con el fin de evitar contaminación y garantizar condiciones de asepsia.

3.4.3.2. *Aislamiento, selección y recuento de las colonias bacterianas.*

Mediante el método de siembra en superficie utilizando un haza de vidrio se procedió a sembrar tres réplicas de cada punto de muestreo, en tres volúmenes diferentes de 25, 50 y 100 µl, en cajas Petri con medio agar PCA y agua destilada (PCA+AD). Adicionalmente se realizaron dos réplicas a un volumen de 50 µl, por cada fuente termal, en cajas Petri con medio agar PCA preparado con la muestra compuesta del agua Termal (PCA+AT) de las fuentes.

Cada tratamiento se incubó a 30 °C. y se procedió a realizar un recuento bacteriano de las placas Petri con medio PCA+AD y PCA+AT, por un total de 5 días cada 24 horas.

Las placas Petri donde se observó una mayor población bacteriana a las 24 horas, se llevaron a la nevera, a fin de conservarlas. A las 48 horas se verificó el crecimiento de nuevas colonias bacterianas, por lo que se realizó un recuento de las mismas en los siguientes 3 días.

Se seleccionaron al azar 48 representantes de cada una de las diferentes colonias bacterianas que crecieron en las placas Petri con medio PCA+AD. De la misma forma se escogieron 48 representantes de cada una de las diferentes colonias bacterianas que crecieron en placas petri con medio PCA+AT, por cada Fuente Termal.

Las 48 colonias bacterianas seleccionadas por cada fuente termal, en medio PCA+AD y en medio PCA+AT fueron sembradas por el método de picadura en el mismo medio e incubado a 30 °C (Herrera, 2003; Alane 1996), con el uso de una Plantilla.

Se seleccionaron al azar 96 representantes de cada una de las diferentes colonias bacterianas que crecieron a 4 °C, y se sembraron en cuatro cajas Petri con 48 UFC cada una, de las cuales dos fueron incubadas a una temperatura de 4 °C y las otras dos a 30 °C.

A fin de estabilizar las colonias bacterianas, estas fueron replicadas luego de 24 horas de crecimiento en el mismo medio. Contando con al menos tres repiques.

3.4.4. *Determinación de la actividad lipolítica y proteolítica.*

3.4.4.1. *Inoculación de las cepas bacterianas.*

Se inocularon las respectivas cepas por cada fuente termal, además de las cepas que crecieron inicialmente a una temperatura de 4 °C, mediante la técnica de sembrado por picadura en placas Petri con medio:

Leche descremada + Agua destilada (LD+AD)

Leche descremada + Agua termal (LD+AT)

Mantequilla + Agua destilada (M+AD)

Mantequilla + Agua termal (M+AT)

Debido a la ausencia de los halos de hidrólisis en el medio mantequilla, tanto con agua destilada como con agua termal, se procedió a inocular a las cepas que crecieron en placas Petri con medio mantequilla, en el medio aceite de oliva más agua destilada (AO+AD) y aceite de oliva más agua termal (AO+AT) respectivamente.

A continuación, se realizaron pruebas modificando los medios anteriormente mencionados, ya que estos no permitían una identificación precisa de los halos de hidrólisis, por lo que se preparó tales medios disminuyendo la concentración tanto de aceite de oliva como de mantequilla, y se procedió a la inoculación de las cepas que crecieron en el anterior medio en los siguientes tratamientos:

Aceite de Oliva + Agua destilada. * Modificado (AOM+AD)

Aceite de Oliva + Agua termal. * Modificado (AOM+AT)

Mantequilla + Agua destilada. * Modificado (MM+AD)

Mantequilla + Agua termal. * Modificado (MM+AT)

En todos los tratamientos las cepas inoculadas se incubaron a 30 °C.

3.4.4.2. *Medición del índice de potencia de actividad enzimática.*

Se identificó aquellos clones bacterianos que presentaron halos de hidrólisis en los medios: LD+AD, LD+AT, MM+AD, MM+AT.

Se realizaron 3 réplicas con los clones identificados por cada fuente termal que presentó crecimiento bacteriano, además de los clones que crecieron inicialmente a una temperatura de 4 °C, en los medios anteriormente mencionados, se procedió a incubar a una temperatura de 35 °C. A las 24 horas de crecimiento, se registró el halo de hidrólisis.

3.4.4.3. *Aislamiento por agotamiento de las bacterias.*

Se seleccionó un clon bacteriano por cada fuente termal de los tratamientos con agua destilada y con agua termal. Como criterios para la selección de cada clon se tuvo en consideración su color y la presencia de un mayor halo de hidrólisis tanto proteolítico como lipolítico.

3.4.4.4. *Caracterización microscópica y macroscópica de los aislados bacterianos.*

- Microscópica

Se realizó una Tinción Gram de 90 clones bacterianos, los cuales mostraron un halo de hidrólisis y de 10 clones bacterianos que no mostraron halo de hidrólisis. Se procedió con la observación al microscopio con el fin de identificar forma y la clase bacteriana, Gram+ o Gram- (Tortora, Funke & Case, 200: pp. 55-74).

- Macroscópica

En la identificación macroscópica se tomó en consideración color y tamaño, de los 10 clones bacterianos aislados por agotamiento (Tortora, Funke & Case, 200: pp. 55-74).

3.4.4.5. *Pruebas bioquímicas.*

A cada clon bacteriano aislado, se le realizaron cinco pruebas bioquímicas las cuales fueron:

- Catalasa
- Medio SIM
- Prueba de la urea
- Medio con manitol salado
- Medio TSI

3.4.5. Análisis estadístico.

3.4.5.1. Sistema de variables.

- Hipótesis

En bacterias de las aguas termales de los Ilinizas es posible encontrar proteasas y lipasas.

- Variables

Variable dependiente: Presencia de proteasas y lipasas.

Variable independiente: Estado fisiológico de la colonia bacteriana.

Variable interviniente: Características físicas del agua.

3.4.5.2. Operacionalización de variables.

Tabla 1-2: Indicadores e instrumentos o técnicas para cada variable.

Variable	Conceptualización	Indicadores	Instrumentos o Técnicas
Dependiente	Presencia de proteasas y lipasas.	Diámetro de la colonia.	Regla
		Diámetro del halo de hidrólisis.	Regla
Independiente	Estado fisiológico de la colonia bacteriana.	Clase bacteriana.	Tinción Gram. Microscopio.
		Color y tamaño de los aislados.	Observación.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

3.4.5.3. Índice de potencia (IP)

Se valoró la actividad proteolítica y lipolítica de acuerdo al índice de potencia (IP). El IP es la relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia (Herrera, 2003; Alane, 1996).

Ecuación 1. Índice de potencia (IP)

$$IP = \frac{\text{Diámetro del Halo de Hidrolisis}}{\text{Diámetro de la Colonia}}$$

3.4.5.4. *Análisis de la varianza con un factor (ANOVA) y prueba de rango múltiple Tukey.*

Se realizó un ANOVA y una prueba de rango múltiple Tukey de los resultados del índice de potencia de actividad enzimática, utilizando el programa SPSS IBM.

CAPÍTULO III

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización física de las muestras de agua.

A continuación, se muestran el pH y la temperatura de las tres muestras recolectadas por cada fuente termal:

Tabla 1-3: Caracterización física de las muestras de agua.

Fuente	Muestra	pH	\bar{pH}	T °C	\bar{T} °C
1	I	6	6,3	29	30,3
	II	6		30	
	III	7		32	
2	I	6	6,3	30	30,0
	II	7		30	
	III	6		30	
3	I	6	6,6	28	29,3
	II	7		30	
	III	7		30	
4	I	6	6	30	30,6
	II	6		32	
	III	6		30	
5	I	7	6,3	19	20,0
	II	6		22	
	III	6		19	
Total			6,3	28	

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

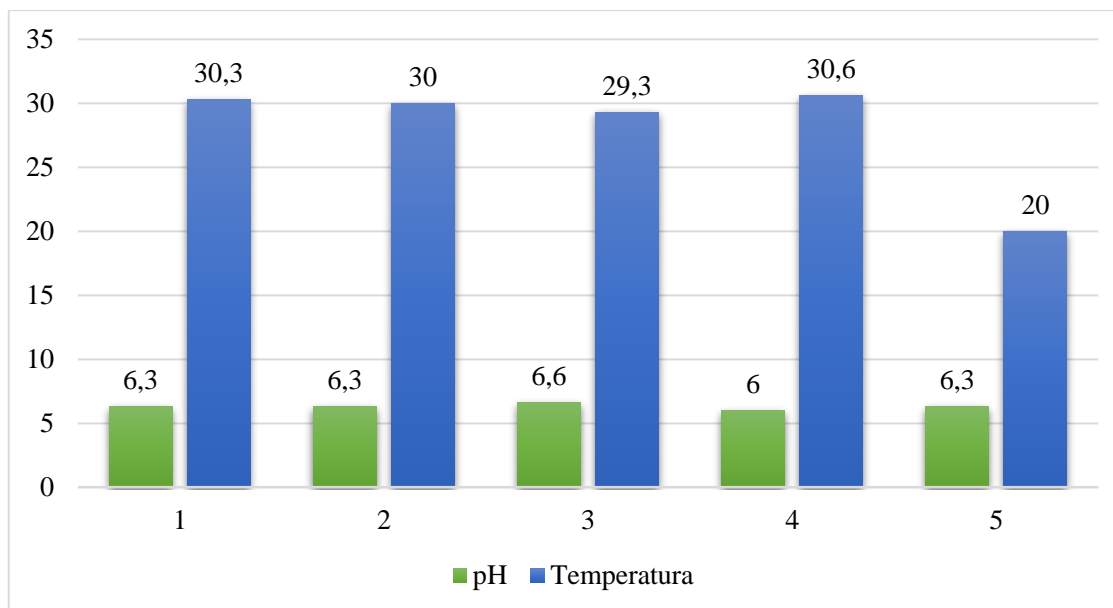


Gráfico 1- 3: Valores de pH y temperatura obtenidos para cada fuente termal.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

La determinación del pH en las fuentes termales mostró, dependiendo del lugar de muestreo, un rango entre 6 y 7.

La fuente termal 3 tuvo el mayor valor de pH correspondiente a 6,6 mientras que la fuente 4 tuvo el menor valor de pH, el cual fue de 6. En cuanto a la temperatura la fuente termal 4 mostró el mayor valor siendo este de 30,6 °C, en contraste la fuente termal 5 mostró el menor valor de temperatura correspondiente a 20 °C.

El promedio de pH total de todas las fuentes fue de 6,3 mientras que el promedio de temperatura total de todas las fuentes termales fue de 28 °C, estos valores de pH y temperatura promedio son cercanos a los reportados por Benavidez, (2017: p. 86) de 6,25 y 24,75 °C respectivamente, el cual realizó su estudio en la fuente termal 1 de los Ilinizas.

La temperatura ambiente del lugar fue de 6 °C, la diferencia entre la temperatura promedio total de todas las fuentes termales y la temperatura ambiente es de 22 °C, según Méndez, (2018: p. 1) el cual nos dice que se llaman aguas termales a las aguas minerales que salen del suelo con más de 5 °C que la temperatura ambiental, podemos decir que las fuentes muestreadas son consideradas aguas termales.

Las fuentes termales muestreadas en este trabajo de investigación no han sido estudiadas por el INAMI, por lo que no se registran valores referentes al pH y temperatura para estas fuentes.

4.2. Recuento de las colonias bacterianas.

Tabla 2-3: Recuento de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCA+AD.

Fuente	Tiempo (h)	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3		
		UFC/25 μ L	UFC/50 μ L	UFC/100 μ L	UFC/25 μ L	UFC/50 μ L	UFC/100 μ L	UFC/25 μ L	UFC/50 μ L	UFC/100 μ L
1	24	0	3	3	1	1	1	1	1	3
	72	2	4	10	1	2	3	1	2	3
	120	2	4	12	1	4	6	1	2	6
2	24	12	20	49	2	3	3	1	47	90
	72	12	22	49	2	3	3	1	47	91
	120	12	26	49	2	4	5	11	47	91
3	24	0	0	1	0	0	2	109	180	438
	72	1	0	3	0	0	2	109	180	438
	120	1	1	6	1	1	3	109	180	438
4	24	0	0	0	0	0	8	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	9	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	9	0	0	0
5	24	65	162	200	60	150	188	64	159	201
	72	65	162	200	60	150	188	64	159	201
	120	65	162	200	60	150	188	64	159	201

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

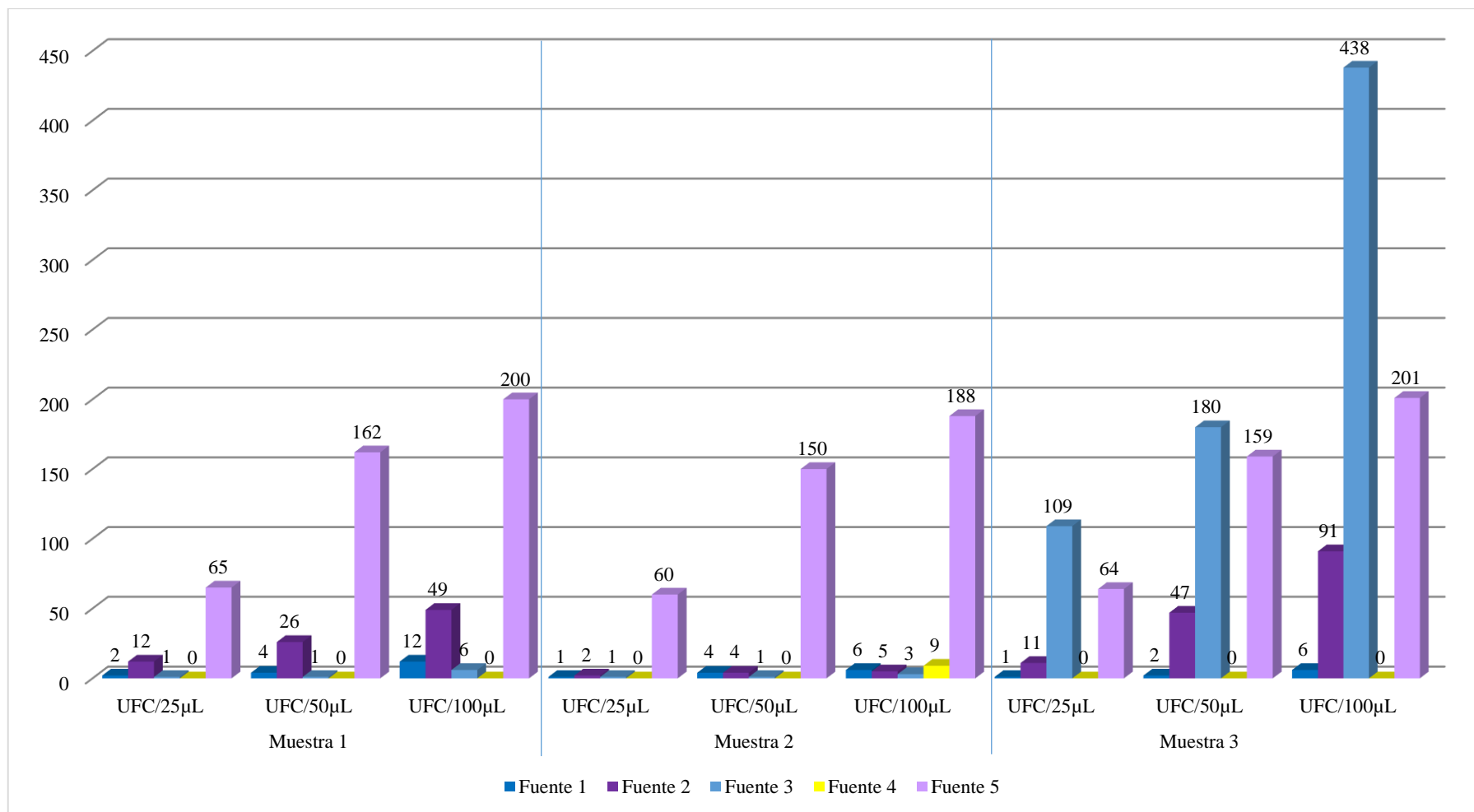


Gráfico 2-3: Recuento a las 120 horas de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCA+AD.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

En la muestra 1 el mayor recuento bacteriano fue de la fuente 5 correspondiendo a 200 UFC a un volumen de 100 μL , 162 UFC a un volumen de 50 μL y 65 UFC a un volumen de 25 μL , esta muestra fue recolectada cercana a un puente que permite el paso hacia las otras 4 fuentes y en una zona empozada, por lo que el mayor crecimiento bacteriano en esta muestra correspondiente a la fuente 5, se puede relacionar a contaminantes externos debido a la intervención humana y al reposo del agua misma cercana a rocas del lugar.

En la muestra 2 el mayor recuento bacteriano fue de la fuente 5 correspondiendo a 188 UFC a un volumen de 100 μL , 150 UFC a un volumen de 50 μL y 60 UFC a un volumen de 25 μL , esta muestra de tal fuente fue recolectada en una zona con la presencia de varios insectos, por lo que el mayor crecimiento de las bacterias registrado, puede atribuirse a la contaminación del agua debida a tales insectos.

El mayor recuento bacteriano fue en la muestra 3 de la fuente 3 correspondiendo a 438 UFC a un volumen de 100 μL , 180 UFC a un volumen de 50 μL y 109 UFC a un volumen de 25 μL , esta muestra de tal fuente corresponde a una zona de maleza extensa que impide el paso de la luz solar, además de contar con agua clara sin la coloración tomate característica del lugar y siendo un espacio usado para la realización de limpieas, por lo que el mayor crecimiento bacteriano observado puede deberse a una contaminación debido al uso que le da el ser humano a estas aguas.

El menor recuento bacteriano en general de todas las muestras y volúmenes fue en la fuente 4 en las cuales no hubieron UFC, con excepción de la muestra 2 a un volumen de 100 μL en la cual se registró 9 UFC. Esta fuente se encuentra en una mayor altitud en comparación con las fuentes 1,2,3 y 5, por lo que se presume que no es intervenida por el ser humano manteniéndose sin contaminación y estéril en su mayoría.

En la fuente 1, el mayor recuento bacteriano se registró en la muestra 1 a un volumen de 100 μL , siendo este el valor de 12 UFC, la cual difiere a lo reportado por Benavides (2017: p. 88) de 31 UFC reportados en la muestra 2 de la misma fuente termal, por lo que se presume que la variación en el recuento bacteriano se debe a una diferencia en las condiciones climáticas y la técnica de recolección de muestras.

Tabla 3-3: Promedio de las colonias bacterianas que crecieron en medio PCA+AD.

Fuente	1	2	3	4	5
$\overline{\text{UFC/mL}}$	67	443	1394	10	2541

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

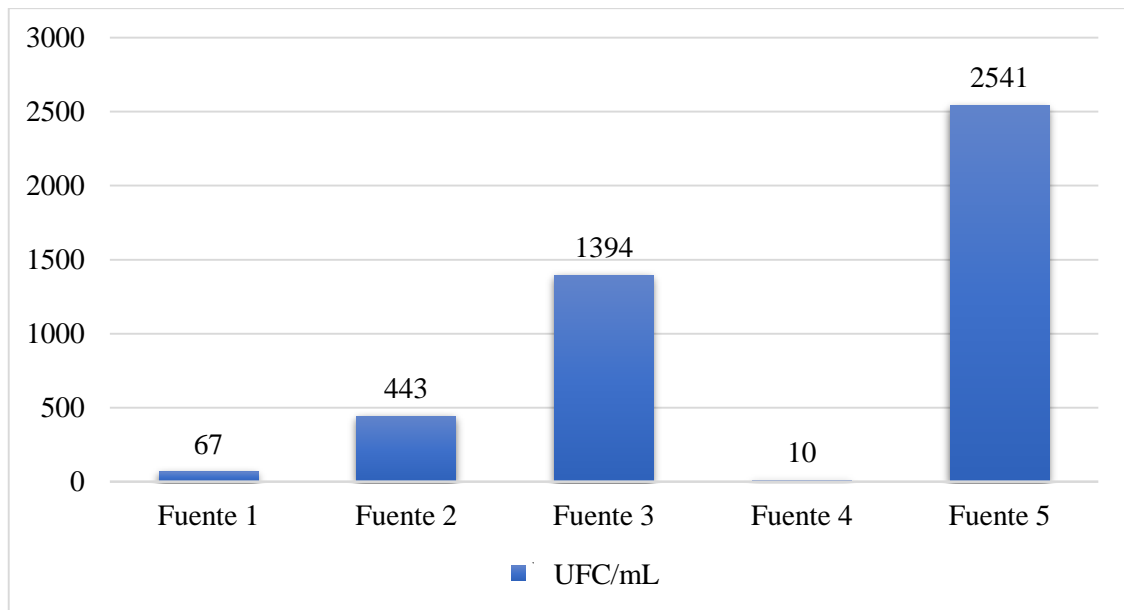


Gráfico 3-3: Unidades formadoras de colonia por mililitro vs fuente termal.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

El mayor promedio del recuento bacteriano corresponde a un valor de 2541 UFC/mL de la fuente 5, el menor promedio del recuento bacteriano es de 10 UFC/mL de la fuente 4, para los tratamientos con agua destilada.

Tabla 4-3: Recuento de las colonias bacterianas que crecieron en medio PCA+AT.

Fuente	Tiempo (h)	Muestra 1	Muestra 2	$\frac{UFC}{mL}$
		UFC/50 μ L	UFC/50 μ L	
1	24	27	2	1070
	72	49	8	
	120	99	8	
2	24	28	8	2670
	72	141	59	
	120	147	120	
3	24	4	0	420
	72	3	18	
	120	3	39	
5	24	968	615	15830
	72	968	615	
	120	968	615	

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

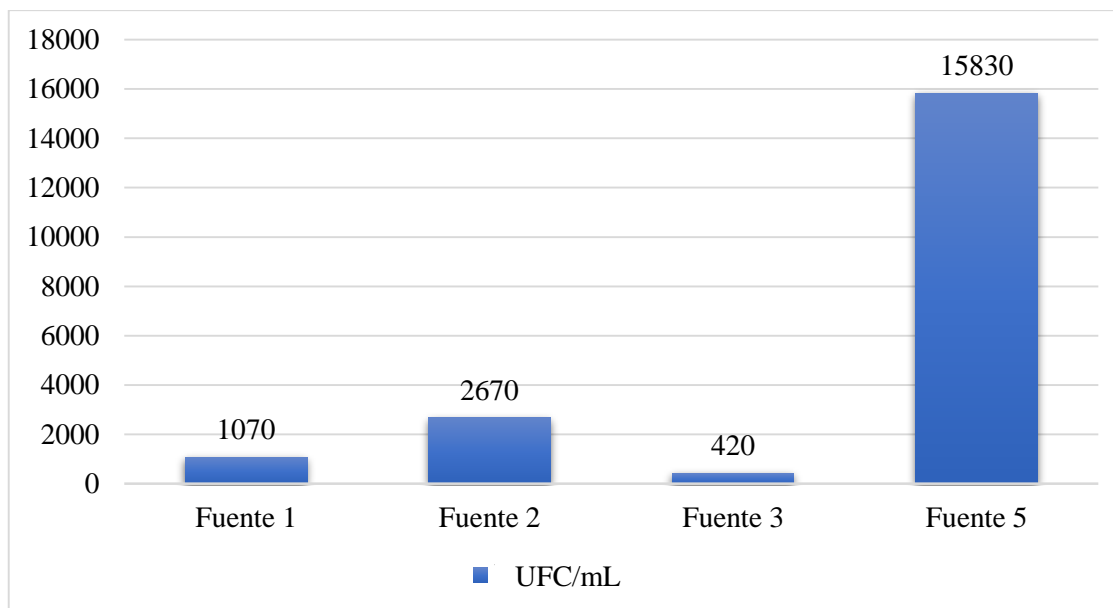


Gráfico 4-3: Unidades formadoras de colonia por mililitro vs fuente termal.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

El mayor promedio del recuento bacteriano corresponde a un valor de 15830 UFC/mL de la fuente 5, el menor promedio del recuento bacteriano es de 420 UFC/mL de la fuente 3, para los tratamientos con agua termal. En los tratamientos en medio PCA+AT se registra un mayor recuento bacteriano que en los tratamientos en medio PCA+AD.

Tabla 5-3: Recuento de las colonias bacterianas que crecieron a temperatura de 4 °C

Volumen (µL)	UFC	$\frac{\overline{UFC}}{mL}$	Fuente	Medio con
100	6	60	2	Agua destilada
25	7	250	3	Agua destilada
50	11			Agua destilada
100	24			Agua destilada
25	4			Agua destilada
50	13	230	5	Agua destilada
100	27			Agua destilada
50	29			Agua Termal
50	37	660	5	Agua Termal

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

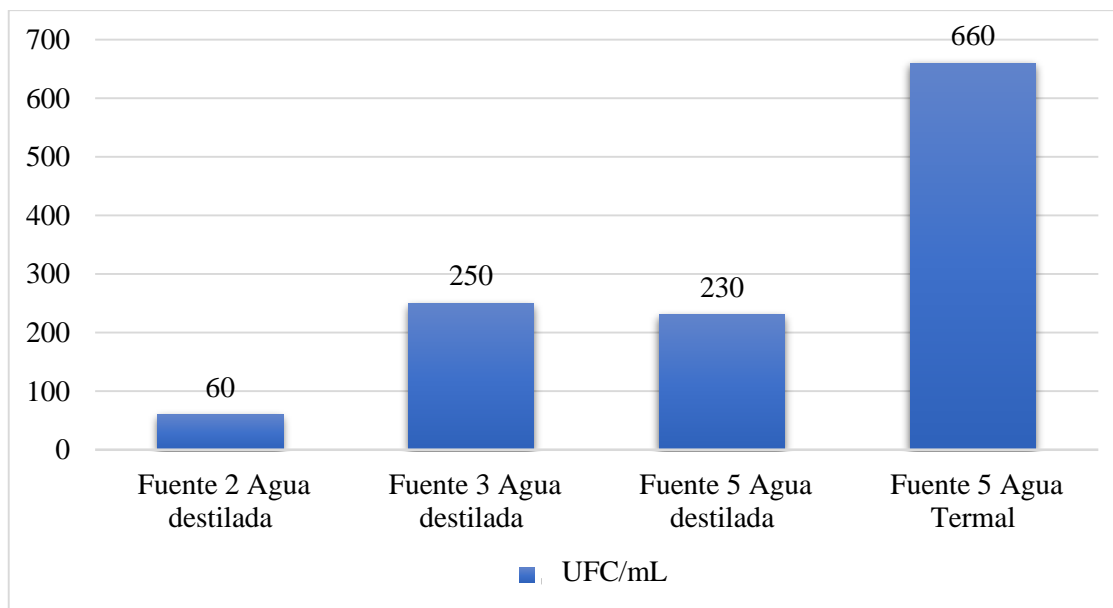


Gráfico 5-3: Unidades formadoras de colonia por mililitro vs fuente termal.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

En los tratamientos a 4 °C, el mayor recuento bacteriano registrado corresponde al medio utilizado con agua termal en la fuente termal 5 siendo este de 660 UFC/mL.

En cambio, el menor recuento bacteriano registrado corresponde al medio utilizado con agua destilada en la fuente termal 2 con un valor de 60 UFC/mL.

Según Carrión (2014: p. 67) la temperatura ambiente del lugar puede llegar hasta 0 °C, además la fuente 5 identificada como una cascada, exhibe la menor temperatura de todas las fuentes muestreadas a pesar de ser un agua termal, por lo que se justifica la presencia de microorganismos psicotolerantes. No se encontraron estudios realizados en los cuales se indique la presencia de bacterias psicrófilas obtenidas de aguas termales.

El mayor promedio del recuento bacteriano de todas fuentes corresponde a un valor de 15830 UFC/mL de la fuente 5 en medio PCA con agua termal, siendo mayor al reportado por Guayllasaca (2015: p. 62), de 962 UFC/mL quien realizó un estudio en la fuente del balneario Yanayacu de la provincia del Cañar.

Cabe recalcar que el pH encontrado en tal estudio fue de 9,0 considerándose como aguas básicas, a diferencia del valor de pH promedio de 6,3 de las fuentes termales muestreadas en este trabajo registrándose estas como aguas ligeramente ácidas.

Los resultados obtenidos del crecimiento bacteriano en los medios PCA+AD y PCA+AT indican que en el AT existen factores que favorecen el crecimiento bacteriano.

4.3. Pruebas de degradación de tributirina y caseína con las bacterias de las aguas termales de los Ilinizas

Con las pruebas de degradación realizadas en los medios M+AT, M+AD, MM+AD, AO+AD, AO+AT, AOM+AT y AOM+AD; no se logró visualizar claramente halos de hidrólisis de los aislados bacterianos, sin embargo, debido a las distintas pruebas e información recolectada se modificó el medio mantequilla añadiendo un emulsionante y asemejando el medio tributirina comercial, lográndose observar halos claros de hidrólisis a las 24 horas de incubación.

Finalmente, la observación de halos de hidrólisis de los aislados bacterianos se logró en los medios: LD+AD, LD+AT, MM+AT; por lo que se procedió a utilizar tales medios para la determinación del IP de cada aislado bacteriano.

4.4. Determinación del índice de potencia de actividad enzimática.

Tabla 6-3: Determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en el medio LD+AD.

Fuente	Aislado	Halo de la colonia (cm)	Halo de hidrólisis (cm)	IP	\bar{IP}
1	1	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,2	0,2	1,00	
	2	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,2	0,2	1,00	
	3	0,3	0,4	1,33	1,31
		0,3	0,4	1,33	
		0,4	0,5	1,25	
	4	0,4	1,1	2,75	2,67
		0,4	1	2,50	
		0,4	1,1	2,75	
	5	0,25	0,9	3,60	3,12
		0,4	1,2	3,00	
		0,4	1,1	2,75	
	6	0,5	0,5	1,00	1,00
		0,4	0,4	1,00	
		0,4	0,4	1,00	
	7	0,2	0,4	2,00	1,44
		0,3	0,4	1,33	
		0,2	0,2	1,00	

2	8	0,1	0,4	4,00	3,00
		0,1	0,2	2,00	
		0,1	0,3	3,00	
	9	0,3	0,3	1,00	1,00
		0,4	0,4	1,00	
		0,4	0,4	1,00	
	10	0,4	0,8	2,00	2,08
		0,4	0,8	2,00	
		0,4	0,9	2,25	
	11	0,4	0,4	1,00	1,00
		0,4	0,4	1,00	
		0,3	0,3	1,00	
	12	0,7	0,7	1,00	1,00
		0,4	0,4	1,00	
		0,5	0,5	1,00	
	13	0,4	0,4	1,00	1,07
		0,5	0,6	1,20	
		0,3	0,3	1,00	
	14	0,9	1	1,11	1,14
		1,3	1,6	1,23	
		1,2	1,3	1,08	
15	1	1,1	1,10	1,13	
	1	1,2	1,20		
	1	1,1	1,10		
16	0,4	1,2	3,00	2,87	
	0,4	1,2	3,00		
	0,5	1,3	2,60		
17	0,5	0,9	1,80	1,88	
	0,5	1	2,00		
	0,6	1,1	1,83		
18	0,3	0,4	1,33	1,44	
	0,4	0,7	1,75		
	0,4	0,5	1,25		
19	0,6	0,7	1,17	1,21	
	0,6	0,8	1,33		
	0,7	0,8	1,14		
20	0,5	0,8	1,60	1,61	
	0,5	0,9	1,80		
	0,7	1	1,43		
21	0,5	1,3	2,60	2,95	
	0,4	1,3	3,25		
	0,4	1,2	3,00		
22	0,5	1,3	2,60	2,73	
	0,5	1,4	2,80		
	0,5	1,4	2,80		

	23	0,5	1,2	2,40	2,44	
		0,6	1,4	2,33		
		0,5	1,3	2,60		
	24	0,6	1,2	2,00	2,00	
		0,6	1,2	2,00		
		0,6	1,2	2,00		
	25	0,5	1,3	2,60	2,82	
		0,4	1,3	3,25		
		0,5	1,3	2,60		
	26	0,5	1,2	2,40	2,47	
		0,5	1,3	2,60		
		0,5	1,2	2,40		
	27	0,5	1,2	2,40	2,52	
		0,5	1,2	2,40		
		0,4	1,1	2,75		
	28	0,6	1,4	2,33	2,33	
		0,6	1,4	2,33		
		0,6	1,4	2,33		
	29	0,6	0,6	1,00	1,00	
		0,7	0,7	1,00		
		0,4	0,4	1,00		
	30	0,5	1,3	2,60	2,72	
		0,5	1,4	2,80		
		0,4	1,1	2,75		
	31	0,6	1,4	2,33	2,42	
		0,6	1,4	2,33		
		0,5	1,3	2,60		
	32	0,3	0,4	1,33	1,39	
		0,2	0,3	1,50		
		0,3	0,4	1,33		
	3	33	0,5	1,2	2,40	2,57
			0,5	1,25	2,50	
0,5			1,4	2,80		
34		0,5	1,3	2,60	2,60	
		0,5	1,3	2,60		
		0,5	1,3	2,60		
35		0,5	1,4	2,80	2,59	
		0,6	1,3	2,17		
		0,5	1,4	2,80		
36		0,5	1,3	2,60	2,73	
		0,4	1,2	3,00		
		0,5	1,3	2,60		
37		0,6	1,4	2,33	2,42	
		0,5	1,3	2,60		
		0,6	1,4	2,33		

	38	0,6	1,5	2,50	2,44
		0,6	1,4	2,33	
		0,6	1,5	2,50	
	39	0,5	1,3	2,60	2,67
		0,5	1,3	2,60	
		0,5	1,4	2,80	
	40	0,6	1,4	2,33	2,51
		0,5	1,3	2,60	
		0,5	1,3	2,60	
	41	0,5	1,3	2,60	2,47
		0,5	1,2	2,40	
		0,5	1,2	2,40	
	42	0,5	1,3	2,60	2,82
		0,5	1,3	2,60	
		0,4	1,3	3,25	
	43	0,6	1,4	2,33	2,51
		0,5	1,3	2,60	
		0,5	1,3	2,60	
	44	0,5	1,3	2,60	2,51
		0,5	1,3	2,60	
		0,6	1,4	2,33	
	45	0,6	1,3	2,17	2,39
		0,5	1,2	2,40	
		0,5	1,3	2,60	
46	0,6	1,4	2,33	2,51	
	0,5	1,3	2,60		
	0,5	1,3	2,60		
47	0,5	1,3	2,60	2,67	
	0,5	1,3	2,60		
	0,5	1,4	2,80		
48	0,4	1,1	2,75	2,83	
	0,4	1,1	2,75		
	0,4	1,2	3,00		
5	49	0,5	0,9	1,80	1,33
		0,4	0,4	1,00	
		0,5	0,6	1,20	
	50	0,5	0,9	1,80	1,32
		0,5	0,5	1,00	
		0,6	0,7	1,17	
	51	0,6	0,9	1,50	1,23
		0,5	0,5	1,00	
		0,5	0,6	1,20	
	52	0,5	1,1	2,20	1,75
		0,4	0,5	1,25	
		0,5	0,9	1,80	

	53	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,3	0,3	1,00	
		0,3	0,3	1,00	
	54	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,1	0,1	1,00	
	55	0,5	1,4	2,80	2,80
		0,5	1,3	2,60	
		0,5	1,5	3,00	
	56	0,5	1,4	2,80	2,80
		0,5	1,3	2,60	
		0,4	1,2	3,00	
	57	0,3	0,3	1,00	1,00
		0,1	0,1	1,00	
		0,1	0,1	1,00	
	58	0,3	0,3	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,1	0,1	1,00	
	59	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,1	0,1	1,00	
	60	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,1	0,1	1,00	
	61	0,5	1,3	2,60	2,60
		0,5	1,3	2,60	
		0,5	1,3	2,60	
	62	0,5	1,2	2,40	2,13
		0,6	1,2	2,00	
		0,6	1,2	2,00	
	63	0,5	1,1	2,20	2,40
		0,4	1	2,50	
		0,4	1	2,50	
	64	0,4	1,1	2,75	2,83
		0,4	1	2,50	
		0,4	1,3	3,25	
65	0,4	0,9	2,25	1,73	
	0,4	0,7	1,75		
	0,5	0,6	1,20		
66	0,6	1,4	2,33	2,17	
	0,7	1,4	2,00		
	0,6	1,3	2,17		
67	0,6	1,1	1,83	2,01	
	0,5	1,1	2,20		
	0,5	1	2,00		
Psicrotolerantes					

68	0,4	0,4	1,00	1,00
	0,4	0,4	1,00	
	0,4	0,4	1,00	
69	0,4	1,3	3,25	3,17
	0,4	1,3	3,25	
	0,4	1,2	3,00	
70	0,2	0,3	1,50	1,67
	0,2	0,3	1,50	
	0,1	0,2	2,00	
71	0,5	1	2,00	1,89
	0,5	1	2,00	
	0,6	1	1,67	
72	0,6	1,2	2,00	1,89
	0,6	1,2	2,00	
	0,6	1	1,67	
73	0,6	1,3	2,17	2,11
	0,6	1,3	2,17	
	0,6	1,2	2,00	
74	0,2	0,2	1,00	1,00
	0,2	0,2	1,00	
	0,2	0,2	1,00	
75	0,6	1,3	2,17	2,17
	0,6	1,3	2,17	
	0,6	1,3	2,17	
76	0,6	1,5	2,50	2,45
	0,7	1,7	2,43	
	0,7	1,7	2,43	
77	0,5	0,6	1,20	1,24
	0,5	0,6	1,20	
	0,3	0,4	1,33	
78	0,6	1,3	2,17	2,06
	0,6	1,2	2,00	
	0,6	1,2	2,00	
79	0,5	1,3	2,60	2,97
	0,5	1,4	2,80	
	0,4	1,4	3,50	
80	0,4	0,5	1,25	1,23
	0,5	0,6	1,20	
	0,4	0,5	1,25	

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

El mayor índice de potencia registrado en la fuente 1 pertenece al aislado bacteriano 5 con un valor de 3,12, a su vez en la fuente termal 2 el aislado bacteriano 37 exhibe un valor de IP máximo de 2,95, en la fuente termal 3 el aislado con el máximo IP es la 33 con un valor de 2,83,

el aislado 64 de la fuente termal 5 tiene el valor de IP mayor de 2,83, por último, dentro de los psicotolerantes el mayor IP observado es de 3,17 registrado en el aislado bacteriano 69.

Tabla 7-3: Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con AD.

Fuente Termal	Total de aislados bacterianos	Número de aislados bacterianos con IPP \geq 2,00	%
1	15	4	27
2	17	11	65
3	16	16	100
5	16	5	31
Psicotolerantes	16	8	50

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

Aunque los valores máximos del IPP fueron obtenidos en clones provenientes de las fuentes 1 y 2, la fuente 3 es la que mostró el mayor número de clones (16 de 16) con IPP \geq 2,00

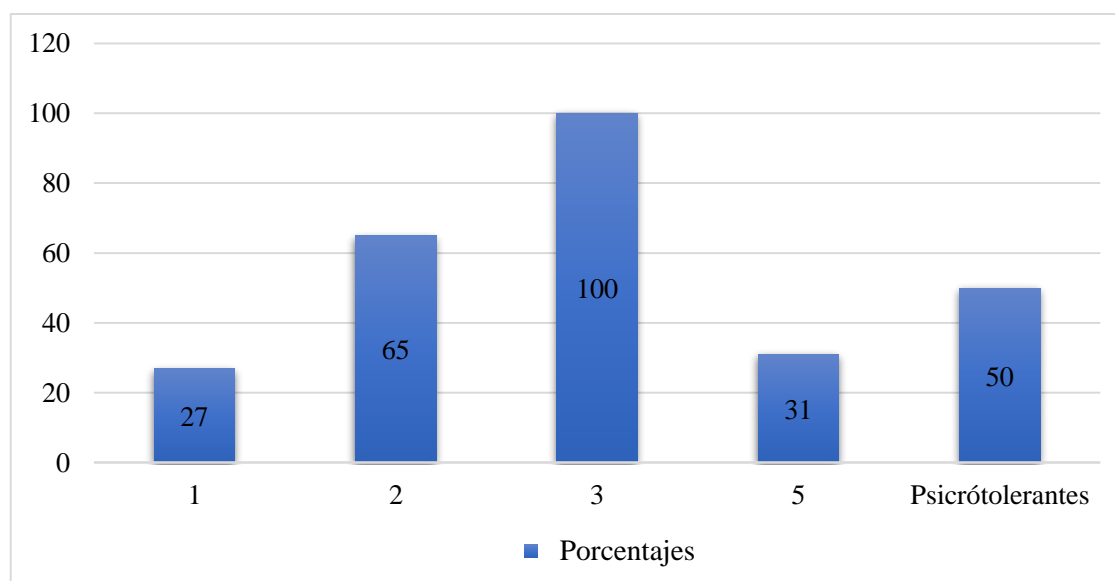


Gráfico 6-3: Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con AD.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

La fuente termal 3 es la que mayor porcentaje tiene de aislados bacterianos que poseen un IPP mayor o igual a 2,00 en el tratamiento con agua destilada, con un valor del 100%

Tabla 8-3: Determinación del IPP mostrado por los aislados bacterianos en el medio LD+AT.

Fuente	Aislado	Halo de la colonia (cm)	Halo de hidrólisis (cm)	IP	\bar{IP}	
1	1	0,4	0,8	2,00	2,31	
		0,4	0,9	2,25		
		0,3	0,8	2,67		
	2	2	0,5	1,2	2,40	2,27
			0,5	1,1	2,20	
			0,5	1,1	2,20	
	3	3	0,7	1	1,43	1,43
			0,7	1,1	1,57	
			0,7	0,9	1,29	
	4	4	0,5	1,1	2,20	2,20
			0,5	1,1	2,20	
			0,5	1,1	2,20	
2	5	0,1	0,2	2,00	1,67	
		0,1	0,2	2,00		
		0,1	0,1	1,00		
	6	6	0,3	0,4	1,33	1,78
			0,2	0,4	2,00	
			0,2	0,4	2,00	
	7	7	0,3	0,4	1,33	1,44
			0,2	0,3	1,50	
			0,2	0,3	1,50	
	8	8	0,2	0,2	1,00	1,00
			0,2	0,2	1,00	
			0,1	0,1	1,00	
	9	9	0,4	1,1	2,75	2,92
			0,4	1,3	3,25	
			0,4	1,1	2,75	
	10	10	0,5	1,1	2,20	2,58
			0,5	1,4	2,80	
			0,4	1,1	2,75	
	11	11	0,4	1,1	2,75	2,94
			0,3	1,1	3,67	
			0,5	1,2	2,40	
	12	12	0,4	1,1	2,75	2,98
			0,3	1,2	4,00	
			0,5	1,1	2,20	

	13	0,5	1,1	2,20	2,73
		0,3	1,2	4,00	
		0,6	1,2	2,00	
	14	0,5	1,2	2,40	2,49
		0,4	1,3	3,25	
		0,6	1,1	1,83	
	15	0,2	0,3	1,50	1,17
		0,2	0,2	1,00	
		0,2	0,2	1,00	
	16	0,4	1	2,50	3,01
		0,3	1,3	4,33	
		0,5	1,1	2,20	
	17	0,4	0,7	1,75	1,64
		0,3	0,5	1,67	
		0,2	0,3	1,50	
	18	0,5	1,2	2,40	2,52
		0,4	1,2	3,00	
		0,6	1,3	2,17	
	19	0,4	1,2	3,00	3,31
		0,3	1,3	4,33	
0,5		1,3	2,60		
20	0,4	1,1	2,75	3,17	
	0,3	1,2	4,00		
	0,4	1,1	2,75		
3	21	0,6	1,3	2,17	2,39
		0,5	1,3	2,60	
		0,5	1,2	2,40	
	22	0,6	1,2	2,00	2,20
		0,5	1,2	2,40	
		0,5	1,1	2,20	
	23	0,5	1,3	2,60	2,73
		0,5	1,3	2,60	
		0,4	1,2	3,00	
	24	0,4	0,8	2,00	2,50
		0,4	1	2,50	
		0,3	0,9	3,00	
	25	0,1	0,2	2,00	2,00
		0,1	0,2	2,00	
		0,1	0,2	2,00	
	26	0,1	0,1	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,2	0,2	1,00	

	27	0,2	0,3	1,50	1,78
		0,2	0,5	2,50	
		0,3	0,4	1,33	
	28	0,1	0,2	2,00	1,67
		0,2	0,3	1,50	
		0,2	0,3	1,50	
5	29	0,6	1,4	2,33	2,03
		0,8	1,4	1,75	
		0,7	1,4	2,00	
	30	0,4	0,6	1,50	1,39
		0,3	0,4	1,33	
		0,3	0,4	1,33	
	31	0,4	1,3	3,25	2,68
		0,5	1,1	2,20	
		0,5	1,3	2,60	
	32	0,5	1,5	3,00	2,60
		0,7	1,5	2,14	
		0,6	1,6	2,67	
	33	0,6	1,5	2,50	2,61
		0,6	1,6	2,67	
		0,6	1,6	2,67	
	34	0,6	1,6	2,67	2,67
		0,6	1,5	2,50	
		0,6	1,7	2,83	
	35	0,4	1,2	3,00	2,75
		0,4	1	2,50	
		0,4	1,1	2,75	
	36	0,3	0,4	1,33	1,56
		0,3	0,5	1,67	
		0,3	0,5	1,67	
	37	0,4	1,6	4,00	2,93
		0,7	1,6	2,29	
		0,6	1,5	2,50	
	38	0,3	1,3	4,33	3,03
		0,5	1,3	2,60	
		0,6	1,3	2,17	
	39	0,4	1,4	3,50	3,42
		0,4	1,3	3,25	
		0,4	1,4	3,50	
	40	0,4	0,5	1,25	1,25
		0,4	0,5	1,25	
		0,4	0,5	1,25	

	41	0,4	1,4	3,50	3,42
		0,4	1,3	3,25	
		0,4	1,4	3,50	
	42	0,4	1,4	3,50	3,42
		0,4	1,4	3,50	
		0,4	1,3	3,25	
	43	0,4	1,3	3,25	2,95
		0,5	1,3	2,60	
		0,4	1,2	3,00	
	44	0,6	1,6	2,67	2,61
		0,6	1,6	2,67	
		0,6	1,5	2,50	
Psicrotolerantes	45	0,6	0,7	1,17	1,66
		0,5	0,8	1,60	
		0,5	1,1	2,20	
	46	0,3	0,4	1,33	1,56
		0,3	0,5	1,67	
		0,3	0,5	1,67	
	47	0,4	1,3	3,25	3,86
		0,3	1,2	4,00	
		0,3	1,3	4,33	
	48	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,3	0,3	1,00	
	49	0,6	1,1	1,83	2,41
		0,5	1,2	2,40	
		0,4	1,2	3,00	
	50	0,4	1,2	3,00	3,00
		0,4	1,1	2,75	
		0,4	1,3	3,25	
	51	0,5	1	2,00	2,89
		0,4	1,2	3,00	
		0,3	1,1	3,67	
	52	0,3	0,3	1,00	1,00
		0,3	0,3	1,00	
		0,3	0,3	1,00	
	53	0,5	1	2,00	2,55
		0,5	1,2	2,40	
		0,4	1,3	3,25	
	54	0,7	1,4	2,00	2,49
		0,6	1,6	2,67	
		0,5	1,4	2,80	

	55	0,6	1,6	2,67	2,72
		0,6	1,6	2,67	
		0,6	1,7	2,83	
	56	0,6	1,3	2,17	2,52
		0,5	1,3	2,60	
		0,5	1,4	2,80	
	57	0,4	0,9	2,25	2,25
		0,4	0,9	2,25	
		0,4	0,9	2,25	
	58	0,5	1	2,00	2,27
		0,5	1,2	2,40	
		0,5	1,2	2,40	
59	0,5	0,9	1,80	2,43	
	0,4	1	2,50		
	0,4	1,2	3,00		
60	0,7	1,4	2,00	2,39	
	0,6	1,5	2,50		
	0,6	1,6	2,67		

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

El mayor índice de potencia registrado en la fuente 1 pertenece al aislado bacteriano 1 con un valor de 2,31, a su vez en la fuente termal 2 el aislado bacteriano 19 exhibe un valor de IP máximo de 3,31, en la fuente termal 3 el aislado con el máximo IP es el 23 con un valor de 2,73, el aislado 39 de la fuente termal 5 tiene el valor de IP mayor de 3,42, por último, dentro de los psicotolerantes el mayor IP observado es de 3,86 registrado en el aislado bacteriano 47.

Comparando entre los tratamientos con agua destilada y agua termal, se concluye que el mayor IPP registrado pertenece a los psicotolerantes del tratamiento con agua termal, ya que posee un valor de 3,86 el aislado bacteriano 47, esto está de acuerdo con lo encontrado en el apartado 4.2 Recuento de las colonias bacterianas donde se demostró que el AT favorece el crecimiento de los clones.

Pascual Domínguez (2014: p. 48), obtiene un IPP de 1,9 a las 48 horas de crecimiento y 32 °C para la cepa *Bacillus licheniformis*, este valor es menor a los reportados en este trabajo de investigación para las evaluaciones con el medio leche descremada a 24 horas y 35 °C, ya que el mayor IPP obtenido fue de 3,86 del aislado bacteriano 47, perteneciente al grupo de psicotolerantes, siendo este valor el doble del reportado por Pascual Domínguez.

Tabla 9-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPP mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con agua termal.

Fuente Termal	Total de aislados bacterianos	Número de aislados bacterianos con $IP \geq 2,00$	%
1	4	3	75
2	16	10	62
3	8	5	62
5	16	13	81
Psicrotolerantes	16	12	75

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

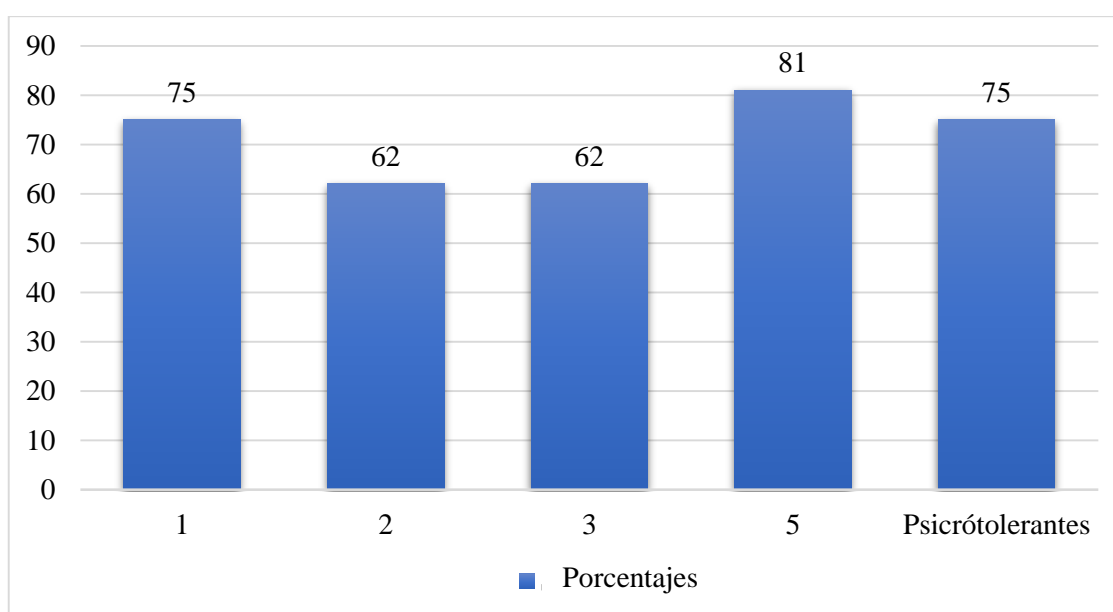


Gráfico 7-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPP mayor o igual a 2,00 por fuente termal en el tratamiento con agua termal.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

La fuente termal 5 tiene el mayor porcentaje de aislados bacterianos que poseen un índice de potencia proteolítica mayor o igual a 2,00 en el tratamiento con AD, con un valor del 81%

Comparando los tratamientos de agua destilada y agua termal se concluye que el mayor porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPP mayor o igual a 2,00, se registra en la fuente 3 con un valor del 100% en el tratamiento con agua destilada.

Tabla 10-3: Determinación del índice de potencia de actividad lipolítica (IPL) mostrado por los aislados bacterianos en el medio MM+AT.

Fuente	Aislado	Halo de la colonia (cm)	Halo de hidrólisis (cm)	IP	\bar{IP}
1	3	0,4	0,7	1,75	1,52
		0,5	0,7	1,40	
		0,5	0,7	1,40	
2	10	0,4	0,6	1,50	1,94
		0,3	0,7	2,33	
		0,3	0,6	2,00	
	11	0,4	0,6	1,50	1,50
		0,4	0,6	1,50	
		0,4	0,6	1,50	
	15	0,4	0,8	2,00	2,33
		0,3	0,8	2,67	
		0,3	0,7	2,33	
3	21	0,4	0,6	1,50	1,83
		0,4	0,8	2,00	
		0,3	0,6	2,00	
	22	0,4	0,6	1,50	1,67
		0,4	0,6	1,50	
		0,3	0,6	2,00	
5	29	0,4	0,6	1,50	1,50
		0,4	0,6	1,50	
		0,4	0,6	1,50	
	30	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,3	0,3	1,00	
		0,2	0,2	1,00	
	31	0,4	0,6	1,50	1,47
		0,3	0,5	1,67	
		0,4	0,5	1,25	
	32	0,3	0,6	2,00	1,73
		0,5	0,6	1,20	
		0,3	0,6	2,00	
	33	0,3	0,6	2,00	1,83
		0,4	0,6	1,50	
		0,3	0,6	2,00	
	34	0,4	0,5	1,25	1,64
		0,3	0,5	1,67	
		0,3	0,6	2,00	
36	0,2	0,2	1,00	1,00	
	0,2	0,2	1,00		
	0,2	0,2	1,00		

	37	0,3	0,5	1,67	1,62
		0,5	0,6	1,20	
		0,3	0,6	2,00	
	38	0,2	0,5	2,50	2,07
		0,5	0,6	1,20	
		0,2	0,5	2,50	
	40	0,2	0,2	1,00	1,00
		0,2	0,2	1,00	
		0,2	0,2	1,00	
	43	0,3	0,6	2,00	1,89
		0,3	0,6	2,00	
		0,3	0,5	1,67	
	44	0,4	0,5	1,25	1,81
		0,2	0,5	2,50	
		0,3	0,5	1,67	
Psicrotolerantes	45	0,3	0,6	2,00	1,67
		0,4	0,6	1,50	
		0,4	0,6	1,50	
	50	0,4	0,8	2,00	1,67
		0,4	0,7	1,75	
		0,4	0,5	1,25	
	51	0,3	0,5	1,67	1,47
		0,4	0,6	1,50	
		0,4	0,5	1,25	
	52	0,4	0,7	1,75	1,64
		0,4	0,6	1,50	
		0,3	0,5	1,67	
	54	0,4	0,6	1,50	1,61
		0,3	0,5	1,67	
		0,3	0,5	1,67	
	55	0,4	0,6	1,50	1,56
		0,3	0,5	1,67	
		0,4	0,6	1,50	
	56	0,4	0,7	1,75	1,58
		0,4	0,6	1,50	
		0,4	0,6	1,50	
	57	0,3	0,7	2,33	1,69
		0,4	0,6	1,50	
		0,4	0,5	1,25	
58	0,4	0,7	1,75	1,75	
	0,4	0,7	1,75		
	0,4	0,7	1,75		

	59	0,4	0,5	1,25	1,33
		0,4	0,6	1,50	
		0,4	0,5	1,25	
	60	0,4	0,5	1,25	1,23
		0,5	0,6	1,20	
		0,4	0,5	1,25	

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

El mayor índice de potencia registrado en la fuente 1 pertenece al aislado bacteriano 1 con un valor de 1,52, a su vez en la fuente termal 2 el aislado bacteriano 15 exhibe un valor de IPL máximo de 2,33, en la fuente termal 3 el aislado con el máximo IPL es la 21 con un valor de 1,83, el aislado 38 de la fuente termal 5 tiene el valor de IPL mayor de 2,07, por último, dentro de los psicotolerantes el mayor IPL observado es de 1,75 registrado en el aislado bacteriano 58.

Godínez & Calderón. (2008: p. 40), obtienen un IPL de 1,78 a los 7 días de crecimiento y 21 °C para la cepa *Penicillium camemberti*, este valor es menor a los reportados en este trabajo de investigación para las evaluaciones con el medio mantequilla modificado a las 24 horas y 35° C, ya que el mayor IPL obtenido fue de 2,33 del aislado bacteriano 15, perteneciente a la fuente termal 2.

Comparando la actividad lipolítica y proteolítica en agua termal, se concluye que el mayor IP registrado pertenece al aislado bacteriano 15 de la fuente 2 ya que posee un valor de IP de 2,33 y 3,31 respectivamente.

Tabla 11-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPL mayor o igual a 1,50 por fuente termal en el tratamiento con agua termal.

Fuente Termal	Total de aislados bacterianos	Número de aislados bacterianos con $IPL \geq 2,00$	%
1	1	1	100
2	3	3	100
3	2	2	100
5	12	8	67
Psicotolerantes	11	9	82

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

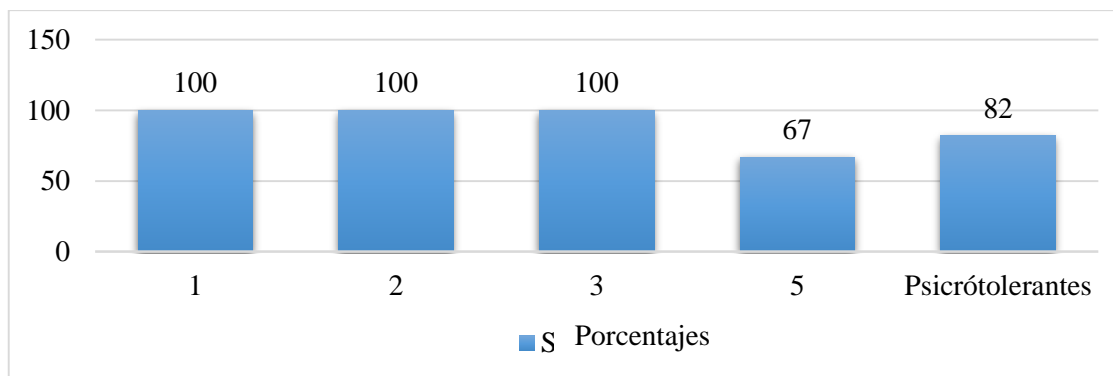


Gráfico 8-3: Porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPL mayor o igual a 1,50 por fuente termal en el tratamiento con agua termal.

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

Las fuentes termales 1, 2 y 3 son las que mayor porcentaje tienen de aislados bacterianos que poseen un índice de potencia lipolítica mayor o igual a 1,50 en el tratamiento con agua termal, con un valor del 100%.

Comparando el tratamiento de agua termal se concluye que el mayor porcentaje de aislados bacterianos que poseen un índice de potencia proteolítica y lipolítica mayor o igual a 1,50, se registra en la fuente termal 1 con un valor del 75% y 100% respectivamente.

4.4.1. ANOVA del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT

Tabla 12-3: Factores intersujetos del IP en medio con AD y AT a una temperatura de 35 °C

VARIABLES	Actividad		Fuente o Grupo					Medio Utilizado	
	Proteolítica	Lipolítica	1	2	3	5	Psicrotolerantes	Agua destilada	Agua termal

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

Tabla 13-3: ANOVA del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT.

Variable	Significancia (p)
Actividad	0,003
Fuente	0,257
Medio utilizado	0,011
Fuente * Medio utilizado	0,002

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

H₀: No existen diferencias en el índice de potencia enzimática con $p \geq 0,05$

H_a: Existen diferencias en el índice de potencia enzimática con $p < 0,05$

Se concluye que no hay diferencias significativas en el IP entre las fuentes termales, mientras que, entre las fuentes termales en conjunto con el medio utilizado, así como evaluando individualmente el medio utilizado existen diferencias significativas.

Con este análisis estadístico se comprueba que existe un gran contraste cuando se prepara un medio agar con agua destilada y con agua termal, y que a pesar de ser el mismo aislado bacteriano puede exhibir un comportamiento diferente en las actividades enzimáticas evaluadas cuando se utiliza el AT o AD para la preparación del medio agar.

4.4.2. Prueba de rango múltiple Tukey del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT.

Tabla 14-3: Comparaciones múltiples del IP de actividad proteolítica y lipolítica de los aislados bacterianos del medio con AD y AT por fuente termal.

Comparación entre Fuentes Termales o Grupos		Significancia (p)
1	2	0,008
	3	0,001
	5	0,239
	Psicotolerantes	0,320
2	3	0,931
	5	0,414
	Psicotolerantes	0,312
3	5	0,119
	Psicotolerantes	0,081
5	Psicotolerantes	1,000

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

H₀: No existe diferencia significativa en el IP de los aislados bacterianos con $p \geq 0,05$

H_a: Existe diferencia significativa en el IP de los aislados bacterianos con $p < 0,05$

Con esta Prueba de rango múltiple Tukey se comprueba que existen diferencias en el índice de potencia de los aislados bacterianos de la fuente termal 1 con la fuente 2 y de la fuente termal 1 con la fuente 3.

4.5. Evaluación microscópica de los aislados bacterianos.

Tabla 15-3: Evaluación microscópica de los aislados bacterianos del medio LD+AD.

Fuente	Aislado Bacteriano	Gram	Forma
1	2	-	Cocos
	5	-	Cocos
	7	-	Bacilos
	8	-	Cocos
	10	-	Bacilos
	14	-	Bacilos
2	16	-	Bacilos
	17	-	Bacilos
	19	-	Cocos
	20	-	Cocos
	21	-	Bacilos
	22	+	Bacilos
	23	-	Bacilos
	24	-	Bacilos
	25	-	Bacilos
	27	-	Bacilos
	30	-	Bacilos
	31	+	Bacilos
3	34	-	Bacilos
	35	-	Bacilos
	40	-	Bacilos
	41	-	Cocos
	43	-	Bacilos
	47	-	Bacilos
	48	-	Cocos
5	49	-	Bacilos
	50	+	Bacilos
	51	-	Bacilos
	52	+	Cocos
	53	+	Bacilos
	54	+	Bacilos
	55	-	Bacilos
	57	+	Bacilos
	58	+	Bacilos
	59	-	Bacilos
	60	-	Bacilos
	61	+	Cocos

	62	-	Bacilos
	63	-	Bacilos
Psicrotolerantes	65	-	Bacilos
	66	-	Bacilos
	67	-	Bacilos
	68	-	Bacilos
	70	+	Cocos
	71	+	Bacilos
	73	-	Bacilos
	74	-	Bacilos
	76	-	Bacilos
	77	-	Bacilos
	79	+	Bacilos

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

Tabla 16-3: Evaluación microscópica de los aislados bacterianos del medio LD+AT y MM+AT.

Fuente	Aislado Bacteriano	Gram	Forma
1	1	+	Cocos
	2	-	Bacilos
	3	-	Bacilos
	4	-	Bacilos
2	6	-	Bacilos
	7	+	Bacilos
	8	-	Bacilos
	9	+	Bacilos
	10	-	Bacilos
	11	-	Bacilos
	12	-	Cocos
	13	-	Bacilos
	14	-	Bacilos
	15	-	Bacilos
	16	-	Bacilos
	17	-	Bacilos
	18	-	Cocos
	19	-	Bacilos
	20	-	Bacilos
	3	21	-
22		-	Cocos
24		-	Bacilos
27		+	Bacilos
5	29	-	Bacilos
	30	-	Bacilos

	31	-	Cocos
	32	+	Cocos
	33	+	Bacilos
	34	-	Bacilos
	35	+	Cocos
	36	-	Cocos
	37	-	Bacilos
	38	-	Bacilos
	39	-	Cocos
	40	+	Bacilos
	41	-	Bacilos
	42	-	Bacilos
	43	-	Bacilos
	44	+	Bacilos
Psicrotolerantes	45	+	Bacilos
	46	+	Bacilos
	47	-	Cocos
	49	-	Cocos
	51	-	Bacilos
	52	-	Bacilos
	53	+	Bacilos
	54	-	Bacilos
	58	-	Bacilos
	59	-	Bacilos
	60	+	Cocos

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

Tabla 17-3: Total de aislados bacterianos Gram + y Gram -

GRAM	Total de aislados bacterianos
+	26
-	74

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

De los 100 aislados bacterianos seleccionados, el 74% fueron identificados como Gram -, mientras que el 26% fueron Gram +.

En contraste Córdova (2010: p. 70) reporta un 88% de clones Gram - y 12% clones Gram + en su estudio realizado en el balneario Yanayacu en la provincia del Cañar, siendo estos porcentajes mayores con respecto a los clones Gram - y menores en Gram + reportados en este trabajo investigativo. Sin embargo, en los dos casos se obtiene mayor porcentaje de bacterias Gram negativas.

Tabla 18-3: Total de aislados bacterianos según su forma.

Forma	Total de aislados bacterianos
Cocos	22
Bacilos	78

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

De los 100 aislados bacterianos seleccionados, el 78% fueron identificados como bacilos, mientras que el 22% fueron cocos.

A diferencia Córdova (2010: p. 70) reporta un 68% de clones identificados como bacilos y 32% clones identificados como cocos en su estudio realizado en el balneario Yanayacu en la provincia del Cañar, siendo estos porcentajes menores con respecto a los bacilos y mayores en cocos reportados en este trabajo investigativo. No obstante, al igual que este trabajo la población más común fueron los bacilos.

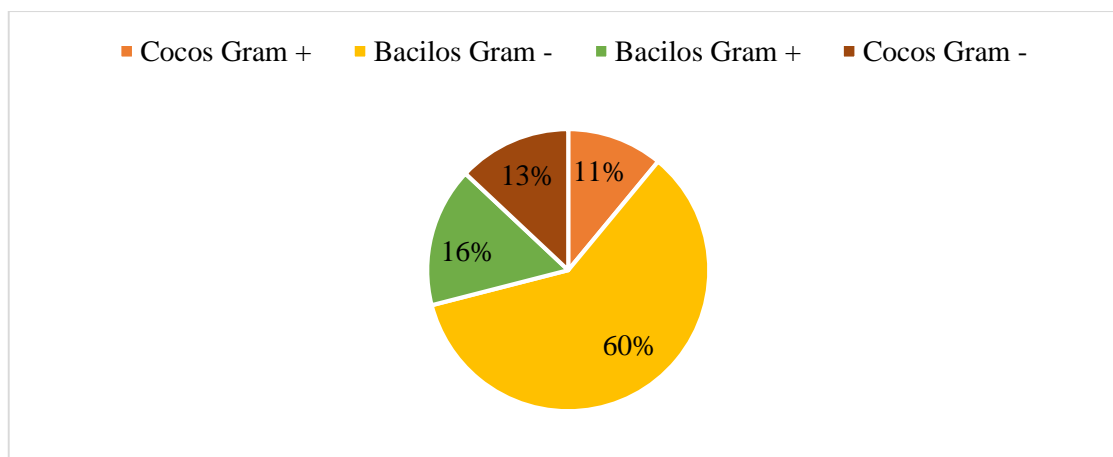


Gráfico 9-3: Porcentaje de aislados bacterianos según su forma y diferenciación entre Gram + y Gram -

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

De los 100 aislados bacterianos seleccionados, el 60% fueron identificados como bacilos Gram -, mientras que el 16% fueron bacilos Gram +, seguido del 13% que fueron cocos Gram - y por último el 11% como cocos Gram +.

A diferencia Córdova (2010: p. 60) reporta el 68% fueron identificadas como Bacilos Gram -, mientras que el 12% fueron Bacilos Gram +, seguido del 20% que fueron cocos Gram + y por último el 0% como cocos Gram - en su estudio realizado en el balneario Yanayacu en la provincia del Cañar, siendo estos porcentajes mayores con respecto a los bacilos Gram - y cocos Gram +, mientras que menores en cocos Gram - y bacilos Gram + reportados en este trabajo investigativo.

4.6. Evaluación macroscópica y pruebas bioquímicas.

Tabla 19-3: Evaluación macroscópica y pruebas bioquímicas de los clones bacterianos aislados.

Medio con	Agua termal					Agua Destilada				
Aislado	3	10	21	38	54	5	17	25	60	66
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Forma	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Cocos	Bacilos	Bacilos	Cocos	Bacilos
Color	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Amarillo	Crema	Crema	Amarilla	Crema
Tamaño(cm)	0,7	0,4	0,5	0,6	0,7	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6
Manitol	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Catalasa	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Urea	-	+	+	-/+	-/+	-/+	-	+	-/+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
SH₂	-	+	-/+	-	-/+	-	-	+	-	+
Movilidad	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Indol	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

Los clones bacterianos aislados a los cuales se les realizó la Tinción Gram y las pruebas bioquímicas fueron identificados como:

Tabla 20-3: Género de los clones bacterianos aislados.

Clon Bacteriano Aislado	Género
3	<i>Haemophilus</i>
10	<i>Proteus</i>
21	<i>Proteus</i>
38	<i>Gardnerella</i>
54	<i>Plesiomonas</i>
5	<i>Psychrobacter</i>
17	<i>Haemophilus</i>
25	<i>Campylobacter</i>
60	<i>Micrococcus</i>
66	<i>Campylobacter</i>

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.

El género *Haemophilus* encontrado en este trabajo, según estudios de Gómez, Cabrera & Cravioto (1991: pp. 1-5), y Escajadillo (2014: p. 3) posee actividad lipolítica y proteolítica. Además, Paullier, & Munyo (2013: pp. 1-3) menciona que este género es un patógeno común oportunista en humanos, por lo que se justifica que resista la temperatura de 35 °C y que se encuentre en las fuentes termales 1 y 2 muestreadas, puesto que el ser humano las usa recreativamente.

El género *Proteus* encontrado en este trabajo en la fuente 3, según estudios de Gómez et al (2006: p. 47) y Dinorín (2012: p. 93) posee actividad lipolítica y proteolítica. A su vez este género fue reportado por Naranjo & Pambabay (2015: p. 55) en su estudio microbiológico de las aguas termales reina del rosario de Cununyacu, parroquia Pilahuín, por lo que podemos decir que puede ser encontrada en este ambiente acuático.

El género *Gardnerella* encontrado en este trabajo en la fuente 5, según estudios de Loza & Jiménez (2006: pp. 15-20) y Espinosa et al, (2005: pp. 3-6) posee actividad lipolítica y proteolítica, a su vez según Trujillo (2017: p. 16) este género es un patógeno en humanos los cuales presentan una temperatura parecida a la registrada en las fuentes de agua termal de los Ilinizas.

El género *Plesiomonas* registrado en este trabajo en el grupo de psicotolerantes, según estudios de Ponce et al, (2005: p. 2) posee actividad lipolítica y proteolítica, además en el estudio realizado por Rodríguez & Antillón (1989: pp. 1-5) se menciona que es un género propio del ambiente acuático.

El género *Psychrobacter* registrado en este trabajo en la fuente 1, según estudios de García López, (2011: p. 38) posee actividad proteolítica y a su vez García López menciona que este género es un organismo patógeno en animales.

El género *Campylobacter* registrado en este trabajo en la fuente 3 y en el grupo de psicrotolerantes, según estudios de Castrillón, Palma, & Macín, (2011: pp. 232-235) tiene actividad proteolítica, además Ruiz (2015: p. 31) menciona que son organismos que pertenecen a los medios acuáticos.

El género *Micrococcus* registrado en este trabajo en la fuente 5, según estudios de Odu & Akujobi (2012: pp. 1-6) posee actividad proteolítica, así mismo Benavides Campaña (2017: p. 119) identifica a este género en las aguas termales de la comunidad Cunuyacu ubicadas en la parroquia Pastocalle.

CONCLUSIONES

La evaluación física de las fuentes termales de los Ilinizas mostró una temperatura y pH máximo de 30,6 °C y 6,6 respectivamente. La temperatura ambiente del lugar fue de 6 °C, la diferencia entre la temperatura promedio total de todas las fuentes termales y la temperatura ambiente es de 22 °C por lo que se concluye que las fuentes muestreadas son aguas termales.

Se aislaron 48 colonias bacterianas por fuente termal, además de un grupo de bacterias psicrotolerantes, en total se obtuvieron 288 aislados bacterianos los cuales se estabilizaron 3 veces en medio PCA+AD y PCA+AT.

Se realizaron pruebas de degradación de tributirina y caseína a los aislados bacterianos en tratamientos con medio PCA+AD y PCA+AT, evaluando que la mayor parte de aislados bacterianos presentaron halos de degradación en las pruebas de caseína con ambos tratamientos, mientras que en presencia de tributirina la actividad fue mucho menor, por lo cual, se modificó las pruebas de tributirina bajando su concentración de grasas.

El mayor índice de potencia proteolítica corresponde al clon 47 del grupo de psicrotolerantes con un valor de 3,86 y el mayor índice de potencia lipolítica corresponde al clon 15 de la fuente 2 con un valor de 2,33. Con el análisis estadístico se comprobaron las diferencias en el índice de potencia por cada fuente termal muestreada, demostrándose además que en los medios con agua termal se obtiene una mayor actividad enzimática tanto proteolítica como lipolítica, lo cual comprueba que en el agua termal existen factores que favorecen el crecimiento bacteriano.

Se aislaron géneros bacterianos correspondientes a *Haemophilus*, *Proteus*, *Gardnerella*, *Plesiomonas*, *Psychrobacter*, *Campylobacter* y *Micrococcus*.

RECOMENDACIONES

En la toma de muestras se debe procurar no afectar el sitio o zona de muestreo con el fin de que cada muestra sea representativa del lugar.

Con la finalidad de una fácil identificación y seguimiento de cada aislado bacteriano, se recomienda el uso de una plantilla numerada.

Para la realización de los análisis estadísticos se debe procurar usar un software como el programa SPSS IBM.

BIBLIOGRAFÍA

Anwar, A.; & Saleemuddin, M. “Alkaline proteases: a review”. *Revista Bioresource technology* [en línea], 1998 (Ámsterdam- Netherlands), 64 (3), pp. 175-183. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085249700182X>

Atlas, R. M., & Bartha, R. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4ª ed. Madrid-España: Pearson-Addison Wesley, 2002, pp. 15-20.

Benavides Campaña, C. L. *Análisis microbiológico de las aguas termales en la comunidad Cunuyacu ubicado en la parroquia Pastocalle perteneciente a la provincia de Cotopaxi* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador, 2017, p. 88. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6932/1/56T00735.pdf>

Calero, Ana Julissa Naquiche, et al. “Caracterización de dos bacterias termófilas (BP-2 Y BP-4) con capacidad proteolítica aislados en los géiseres de Candarave, Tacna-Perú”. *Ciencia & Desarrollo* [en línea], 2017 (Ciudad de México- México), (19), pp. 49-53. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/CYD/article/view/412/363>

Canganella, Francesco; Wiegel, Juergen. “Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond”. *The Science of Nature- Naturwissenschaften* [en línea], 2011 (Berlín- Alemania), 98(4), pp. 253-279. Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00114-011-0775-2>

Carrascal, A., Páez, A., & Burbano, M. *Manual de laboratorio: microbiología de alimentos*. Bogotá- Colombia: Centro editorial javeriano CEJA, 2003, pp. 5-10.

Carrión Espín, Mayra Alejandra. *Las aguas termales y su impacto en el desarrollo turístico de la parroquia San Juan de Pastocalle del cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Humanas y de la Educación. Ambato- Ecuador, 2014, p. 3. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6755/1/FCHE-TH-160.pdf>

Castrillón Rivera, Laura Estela; Palma Ramos, Alejandro; Macín Cabrera, Susana. “Papel de la lactoferrina en enfermedades periodontales”. *Revista odontológica mexicana* [en línea], 2011 (Ciudad de México- México), 15(4), pp. 231- 238. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-199X2011000400005&script=sci_arttext

Daniele, Angela, et al. “Actividad lipolítica de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa LN, aislada de las aguas termales de Las Trincheras, estado Carabobo, Venezuela”. *Revista Ciencia* [en línea], 2011 (Caracas- Venezuela), 19(3), pp. 173-180. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/10017/10004>

Dinorín Téllez Girón, Jabel. *Evaluación de la actividad de lipasas a partir de cultivos de microorganismos aislados de suelos y su aplicación en la transesterificación de aceites de desecho* [en línea] (Tesis)(Maestría). El Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada. Tepatitlán- México, 2012, p. 93. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/6935/1/TESIS%20JABEL%20DINORIN%20TELLEZ%20GIRON.pdf>

Escajadillo, Jesús Ramón. *Oídos, nariz, garganta y cirugía de cabeza y cuello*. 4^a ed. Ciudad de México- México: Editorial El Manual Moderno, 2014, pp. 3.

Espinosa, Ivette, et al. “Caracterización bioquímica y antigénica de diferentes aislamientos de *Gardnerella vaginalis*” [en línea], 2005 (La Habana- Cuba). *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 24(2), pp. 1-8. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v24n2/ibi03205.pdf>

Flores Orbe, Jeniffer Alexandra; Salazar Herrera, Tania Yadira. *Elaboración de una guía didáctica de la reserva ecológica los Ilinizas para el área de campismo y recreación del laboratorio de interpretación turística para la carrera de ingeniería en ecoturismo de la uacaren de la Universidad Técnica de Cotopaxi, (fase ii)* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad Técnica de Cotopaxi, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Latacunga- Ecuador, 2014, pp. 9-11. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2612/1/T-UTC-00148.pdf>

García López, Isabel, et al. *Incidencia y caracterización de *Psychrobacter* spp en alimentos de origen animal* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad de León, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, 2011, p. 38. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/810/2009GARC%C3%8DA%20L%C3%93PEZ%20ISABEL.pdf?sequence=1>

Gómez, Patricia; Cabrera, Roberto; Cravioto, Alejandro. “*Haemophilus Influenzae* B: Una revisión sobre los determinantes de patogenicidad y de la respuesta inmune a la infección”. *Revista Salud Pública de México* [en línea], 1991 (Ciudad de México- México), 33(5), pp. 504-512. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/106/10633508.pdf>

González Bacerio, Jorge; Rodríguez Hernández, Jairo; Monte Martínez, Alberto. “Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial”. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 2010 (Bogotá - Colombia), 12(1), pp. 124-140. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15574/38075>

Granados, L., et al. *Evaluación de la actividad proteolítica y amilolítica de actinomicetes termofílicos aislados a partir de pilas de compost* [en línea] (Tesis)(Maestría). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá- Colombia, 2003, pp. 25-26. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>

Guayllasaca, Ramos; Elizabeth, Yesenia. *Estudio microbiológico de las aguas termales del balneario turístico Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal perteneciente a la provincia de Cañar* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba- Ecuador, 2015, p. 22. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4463/1/56T00570%20UDCTFC.pdf>

Haki, G. D., & Rakshit, S. K. “Developments in industrially important thermostable enzymes: a review”. *Revista Bioresource technology* [en línea], 2003 (Ámsterdam- Netherlands), 89(1), pp. 17-34. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852403000336>

Lee, C. W., et al. “Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables de aguas costeras tropicales”. *Revista Ciencias Marinas* [en línea], 2009 (California- Estados Unidos), 35(2), pp. 153-167. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v35n2/v35n2a3.pdf>

Loza Orozco, M. E., & Jiménez Marcos, G. (2006). *Incidencia de rotura prematura de membranas en gestantes con Gardnerella vaginalis diagnosticado mediante muestra de papanicalaou durante el control pre natal y efecto del tratamiento. Instituto Nacional Materno Perinatal* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Lima- Perú, 2006, p. 15-20. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1146/1/Jimenez_mg.pdf

Martínez, R. H. (2006). *Producción y caracterización de un extracto proteolítico termoestable* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México- México, 2006, pp. 5-6. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI14181.pdf>

Mast Group Ltd. *Plate count agar* [en línea], 2017, Londres-Reino Unido. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU342_SPA.pdf

Méndez Flores, A. *Aguas termales* [blog]. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/853>

Montaño N, Sandoval A. Camargo S, Sánchez J. “Los microorganismos: pequeños gigantes”. *Revista Elementos* [en línea], 2010 (Ciudad de México- México), 77(1), pp. 15-23. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf>

Naranjo Pambabay, M. *Estudio microbiológico de las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu, parroquia Pilahuin, provincia Tungurahua.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba- Ecuador, 2015, p. 55. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/4508/1/56T00572%20UDCTFC.pdf>

Navas L, Amadío A, Fuxan I, & Zandomeni R. “ Identificación de genes codificantes de enzimas de interés industrial en una cepa de bacteria termofílica aislada de aguas termales de Salta (Argentina).”, *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, [en línea], 2014 (Buenos Aires, Argentina), 40(1), pp. 46-53. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86430499009>

Odu N. “Protease production capabilities of *Micrococcus luteus* and *Bacillus* species isolated from abattoir environment”, *Journal of Microbiology Research*. [en línea], 2012, (Abuya, Nigeria), 2(5), pp. 1-6. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <http://article.sapub.org/10.5923.j.microbiology.20120205.03.html>

Oliart Ros, Manresa Presas Á. & Sánchez Otero M. “Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico.”, *CienciaUAT*, ., [en línea], 2016, (Victoria, México), 11(1), pp. 79-90. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582016000200079&script=sci_arttext#B3

Olivas E. *Manual de prácticas de microbiología I y II y parasitología.*, Buenos Aires- Argentina: UACJ, 2014, pp 40 -48.

Ollis y cols. *The hydrolase.* Verschueren, K. H. G. and Goldman, Ciudad de México- México, 1992, p.5.

Pascual Dominguez M. *Aislamiento y purificación de metabolitos de (*Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum*) con potencial nematocida.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad autónoma agraria antonio narro, Saltillo – México, 2013, p. 48, [Consulta: 05 abril 2018].

Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1538/AISLAMIENTO%20Y%20PURIFICACION%20DE%20METABOLITOS%20DE%20%28Bacillus%20licheniformis%20y%20Trichoderma%20harzianum%29%20CON%20POTENCIAL%20NEMATICIDA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Paullier M., & Munyo A. “Patología otológica frecuente.”, *Puesta al día en O.R.L.* [en línea], 2013 (Montevideo, Uruguay), pp. 1-3 [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://www.tendenciasenmedicina.com/Imagenes/imagenes42/art_22.pdf

Pazmiño Flores Y. *Evaluación de la eficiencia de las bacterias lipolíticas de rumen de vaca para la degradación de aguas residuales con grasas y aceites.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador, 2016, pp. 9-11. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/6254#sthash.x0Sqlz8Y.dpuf>

Ponce C., Armenteros A., Villoch C, Montesdeoca N, & Carreras J. “Evaluación de riesgos microbiológicos y químicos de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda.”, *Unidad de Análisis y Tendencias en Salud, La Habana*, [en línea], 2005, (La Habana - Cuba), p.2, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/rtv0505.pdf

Puente E. *Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico.* [en línea] (Tesis) (Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid., Madrid- España, 2011, p 40. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/6774/39834_Ferreras_Puente_Eloy_Roberto.pdf?sequence=1

Pulido H, et al, *Análisis y diseño de experimentos.* Ciudad de México-México: McGraw-Hill, 2004, pp 16-18.

Ramírez N, Serrano J, & Sandoval H. “Microorganismos extremófilos, actinomicetos halófilos en México”. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, [en línea], 2006, (Ciudad de México- México), p. 37. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>

Ramírez S. “Las fronteras de la vida desde la perspectiva de los extremófilos” . *Inventio, la génesis de la cultura universitaria en Morelos* [en línea], 2010, (Camberra - Australia) (11)., pp. 56-66. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3235770.pdf>

Reed C, et al. *Protein adaptations in archaeal extremophiles.* Archaea- México, 2013 pp. 1-14.

Rodríguez, & Antillón . “*Aeromonas spp.* y *Plesiomonas shigelloides* en bivalvos, cieno y aguas del Golfo de Nicoya, Costa Rica”. *Revista de biología tropical*. [en línea], 1989, (San José- Costa Rica), pp. 1-5, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/23618/23820>

Rojas Triviño . *Conceptos y práctica de microbiología general*. Bogotá- Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2011, pp. 26-40

Rubiano Labrador *Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios lipolíticos, preteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza Boyacá*. [en línea] (Tesis)(Maestría) Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá- Colombia, 2006, pp. 25-26, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8265/tesis249.pdf?sequence=1>

Ruiz M. *Detección y caracterización de Campylobacter procedentes de animales, alimentos y agua residual*. [en línea] (Tesis)(Maestría) Universidad complutense de madrid. Madrid-España, 2015, p. 31, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870199X2011000400005&script=sci_arttext

Sarmiento F, Peralta R, & Blamey J. “Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends”. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, [en línea], 2015 (Santiago, Chile) p. 3. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2015.00148/full>

Schlegel G. *General microbiology*. 7ed. New York- Estados Unidos: Cambridge University Press, 1993, pp. 15-20.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. *Introducción a la microbiología*, 2007, Buenos Aires - Argentina: Ed. Médica Panamericana.

Trujillo García, M. *Biofilms microbianos*. [en línea] (Tesis)(Doctoral). Universidad de la laguna. San Cristóbal de La Laguna – España, 2017, p. 16. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5023/biofilms_microbianos.pdf?sequence=1

Villamil Cajoto, et al, “Neumonía comunitaria por *Proteus mirabilis*”. In *Anales de Medicina Interna*. [en línea], 2006, (Madrid- España), p. 47 [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992006000300016