



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CLONES DE
BACTERIAS PSICRÓFILAS O PSICROTOLERANTES DE LAS
LAGUNAS CUYUC Y COLAY PERTENECIENTES AL SISTEMA
LACUSTRE DE ATILLO”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: ANDREA CAROLINA CERDA MOROCHO

YOLANDA PAMELA PÉREZ VÉLEZ

DIRECTORA: Ing. ANA RAFAELA PACURUCU REYES

Riobamba – Ecuador

2020

©2020, Andrea Carolina Cerda Morocho y Yolanda Pamela Pérez Vélez

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

Nosotras, **Andrea Carolina Cerda Morocho** y **Yolanda Pamela Pérez Vélez** declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El Patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 17 de febrero de 2020



Andrea Carolina Cerda Morocho

060392651-0

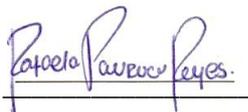


Yolanda Pamela Pérez Vélez

050405969-2

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 titulación: Tipo Proyecto de Investigación “ **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CLONES DE BACTERIAS PSICRÓFILAS O PSICROTOLERANTES DE LAS LAGUNAS CUYUC Y COLAY PERTENECIENTES AL SISTEMA LACUSTRE DE ATILLO**”, realizado por las señoritas **ANDREA CAROLINA CERDA MOROCHO** y **YOLANDA PAMELA PÉREZ VÉLEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Catherine Paulina Cabrera Escobar PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 _____	17-02-2020
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 _____	17-02-2020
Dra. Verónica Lucía Caballero Serrano MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 _____	17-02-2020

DEDICATORIA

A mis padres Leonidas y Janneth quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y sacrificio. A mis hermanos José Miguel y Adrian por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas. A todas las personas que me han apoyado, así como a todos mis amigos que han hecho que este trabajo se realice con éxito, especialmente a Pame por ser mi amiga y compañera en este trabajo.

A todos ustedes con mucho amor y cariño.

Caro

A Dios por bendecirme y por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. A mis padres Edgar y Sonia por su amor y apoyo incondicional en todo momento y por enseñarme a valorar las oportunidades que me presenta la vida, les debo mucho y ahora me toca a mí corresponderles. A mis hermanos Roberto, Edgar, David y Stefany por compartir conmigo buenos y malos momentos. A mis sobrinos Cristopher, Brittany, Merlia y Romina porque llenan de alegría cada día de mi vida, les quiero mucho. A mi familia en general, por sus palabras de aliento para seguir adelante a pesar de las adversidades que se puede presentar en la vida. A Cristian por siempre brindarme su apoyo, por motivarme a seguir adelante y por creer en mi capacidad. A Carito por ser amiga y compañera, por haber formado un equipo de trabajo para lograr esta meta. Y por último deseo dedicar este momento tan importante e inolvidable; a mí misma, por no dejarme vencer en ningún momento.

A todos ustedes con amor y cariño.

Pame

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirnos en todo momento, por su infinito amor y bondad, por darnos salud, por ser el apoyo y fortaleza para cumplir nuestras metas y objetivos anhelados.

Gracias a nuestros padres por ser un pilar fundamental y grandes ejemplos de constancia y superación, por confiar y creer en nuestras expectativas, por brindarnos su apoyo, amor y cariño para luchar y no rendirnos en ningún momento de nuestra vida universitaria.

A los docentes de la Escuela de Ciencias Químicas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por compartir sus conocimientos a lo largo de nuestra carrera profesional y por formarnos como futuros profesionales con ética y moral.

A la Facultad de Ciencias Pecuarias por permitirnos hacer uso de las instalaciones, equipos y materiales del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Animal.

A la Ing. Rafaela Pacurucu por ser una excelente persona y brindarnos su apoyo incondicional en la culminación de nuestro trabajo de investigación.

Al Biólogo. Gerardo Medina, por su constante apoyo, enseñanza y confianza en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Verónica Caballero por su apoyo en nuestro trabajo de investigación.

Finalmente agradecemos a todos nuestros amigos por apoyarnos cuando más lo necesitábamos, por extender sus manos en momentos difíciles de manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

Caro y Pame

TABLA DE CONTENIDO

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

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Antecedentes de la investigación.....	5
1.2. Marco conceptual.....	6
<i>1.2.1. Bioprospección.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Microbiota del agua.....</i>	<i>6</i>
1.2.2.1. Microbiota en hábitat de agua dulce.....	7
1.2.2.2. Microbiota en hábitat marino.....	7
<i>1.2.3. Microbiota del suelo.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.4. Ambientes extremos.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.5. Microbiota en ambientes extremos.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.6. Microorganismos extremófilos.....</i>	<i>9</i>
1.2.6.1. Microorganismos psicrófilos.....	9
1.2.6.2. Microorganismos psicrotolerantes.....	10
<i>1.2.7. Adaptaciones de microorganismos a condiciones de bajas temperaturas.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.8. Importancia de los microorganismos psicrófilos de interés biotecnológico.....</i>	<i>12</i>
1.2.10.1. Enzimas psicrófilas.....	13
1.2.11.1. Identificación fenotípica.....	13
1.2.12.1. Prueba de actividad proteolítica.....	15

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.....	18
2.1. Diseño Experimental.....	18
<i>2.1.1. Tipo y diseño de la investigación.....</i>	<i>18</i>
<i>2.1.2. Unidad de Análisis.....</i>	<i>18</i>

2.2.	Metodología	18
2.2.1.	<i>Lugar de muestreo</i>	18
2.2.2.	<i>Obtención de la muestra</i>	20
2.2.3.	<i>Toma de muestras</i>	20
2.2.4.	<i>Caracterización físico-química de las muestras</i>	21
2.2.5.	<i>Composición de las unidades experimentales</i>	21
2.2.5.1.	<i>Preparación de medios de cultivo utilizados</i>	21
2.2.5.2.	<i>Aislamiento microbiano</i>	23
2.2.5.3.	<i>Aislamiento, selección y número de cepas bacterianas</i>	23
2.2.6.	<i>Determinación de la actividad lipolítica y proteolítica</i>	23
2.2.6.1.	<i>Inoculación de las cepas bacterianas</i>	23
2.2.6.2.	<i>Medición del índice de potencia de actividad enzimática</i>	23
2.2.6.3.	<i>Aislamiento por agotamiento de las bacterias</i>	24
2.2.7.	<i>Caracterización microscópica y macroscópica de los clones bacterianos</i>	24
2.2.7.1.	<i>Microscópica</i>	24
2.2.7.2.	<i>Macroscópica</i>	24
2.2.8.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	25
2.2.8.1.	<i>Catalasa</i>	25
2.2.8.2.	<i>Oxidasa</i>	25
2.2.8.3.	<i>Ureasa</i>	25
2.2.8.4.	<i>Citrato</i>	26
2.2.9.	<i>Prueba de sensibilidad antibiótica</i>	26
2.2.9.1.	<i>Medición de los halos de inhibición</i>	27
2.2.9.2.	<i>Análisis estadístico de la resistencia a antibióticos</i>	27

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	28
3.1.	Caracterización físico-química de las muestras	28
3.2.	Número de colonias bacterianas	29
3.3.	Determinación del índice de potencia de actividad enzimática	33
3.4.	Evaluación microscópica de los de los clones bacterianos	39
3.5.	Evaluación bioquímica de los clones bacterianos	41
3.6.	Pruebas de sensibilidad antibiótica	44
	CONCLUSIONES	49
	RECOMENDACIONES	51
	BIBLIOGRAFÍA	

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento y reproducción	10
Tabla 1-2: Medios de cultivo utilizados.....	21
Tabla 2-2: Medio de cultivo Agar PCA	21
Tabla 3-2: Medio de cultivo Mueller-Hinton.....	22
Tabla 4-2: Medio de cultivo Agar Urea Base	25
Tabla 5-2: Medio de cultivo Agar Citrato de Simmons	26
Tabla 1-3: Caracterización físico-química de las muestras de agua	28
Tabla 2-3: Caracterización física de las muestras de suelo y sedimentos	29
Tabla 3-2: Número de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCA.....	30
Tabla 4-3: Número de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCAld.....	33
Tabla 5-3: Determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) de los clones bacterianos en el medio PCAld	34
Tabla 6-3: Porcentaje de clones bacterianos con IPP mayor o igual a 1.5 en el medio PCAld	36
Tabla 7-3: Determinación del índice de potencia de actividad lipolítica (IPL) de los clones bacterianos en el medio PCAao.....	37
Tabla 8-3: Porcentaje de clones bacterianos con un IPL mayor o igual a 1.5 en el PCAao	38
Tabla 9-3: Evaluación microscópica de los clones bacterianos del medio PCAld	39
Tabla 10-3: Evaluación microscópica de clones bacterianos del medio PCAao.....	40
Tabla 11-3: Total de clones bacterianos Gram + y Gram -.....	40
Tabla 12-3: Evaluación bioquímica de las pruebas catalasa, oxidasa, ureasa y citrato de los clones bacterianos del medio PCAld	42
Tabla 13-3: Evaluación bioquímica de las pruebas catalasa, oxidasa, ureasa y citrato de los clones bacterianos del medio PCAao.....	42
Tabla 14-3: Evaluación total de clones bacterianos en catalasa, oxidasa, ureasa y citrato	43
Tabla 15-3: Resistencia antibiótica de los clones bacterianos del medio PCAld.....	44
Tabla 16-3: Resistencia antibiótica de los clones bacterianos del medio PCAao	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Antibiograma disco-placa.....	17
Figura 1-2: Lagunas Cuyuc y Colay.....	19
Figura 1-3: Diagrama de cajas de efectos de los antibióticos en clones bacterianos.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1-3: Número de colonias a las 72 horas en medio agar PCA	30
Grafico 2-3: Número de colonias bacterianas a las 72 horas en medio agar PCAI	32
Grafico 3-3: Número de colonias bacterianas a las 72 horas en medio agar PCAId	33
Grafico 4-3: Porcentaje de clones bacterianos con un IPP mayor o igual a 1.5 por cada muestra en el medio PCAId	36
Grafico 5-3: Porcentaje de clones bacterianos con un IPL mayor o igual a 1.5 por cada muestra en el medio PCAao	38
Grafico 6-3: Porcentaje de clones bacterianos según su forma y tinción.....	41
Grafico 7-3: Porcentaje de clones bacterianos sometidos de pruebas bioquímicas positivas y negativas.....	44
Grafico 8-3: Sensibilidad de los clones bacterianos a antibióticos.....	46

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
- ANEXO B:** LUGAR DE MUESTREO
- ANEXO C:** SIEMBRA DE CEPAS BACTERIANAS
- ANEXO D:** RECUENTO DE CEPAS BACTERIANAS
- ANEXO E:** CEPAS BACTERIAS ESTABILIZADAS
- ANEXO F:** DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA Y PROTEOLÍTICA
- ANEXO G:** MEDICIÓN DEL ÍNDICE DE POTENCIA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
- ANEXO H:** AISLAMIENTO DE CLONES
- ANEXO I:** CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE CLONES BACTERIANOS
- ANEXO J:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS I
- ANEXO K:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS II
- ANEXO L:** ANTIBIOGRAMA
- ANEXO M:** ANOVA SOFTWARE ESTADÍSTICO R
- ANEXO N:** PRUEBA TUKEY SOFTWARE ESTADÍSTICO R
- ANEXO O:** DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE POTENCIA DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (IPP)
- ANEXO P:** DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE POTENCIA DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (IPL)

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de titulación fue aislar y caracterizar bacterias psicrófilas o psicrotolerantes de las Lagunas Cuyuc y Colay pertenecientes al Sistema Lacustre de Atillo; se recolectaron cuatro muestras compuestas de agua y cuatro de suelo y sedimentos. Se realizó la medición de pH y temperatura in-situ en cada punto de muestreo, y en laboratorio se inocularon las muestras por la técnica de siembra en superficie en placas con medio PCA, PCA suplementado con agua de la laguna y PCA suplementado con leche descremada, realizando un recuento de las colonias a las 72 horas de incubación a 10°C, 19°C y 37°C. Se seleccionaron 432 colonias bacterianas y se repicaron 3 veces sucesivamente hasta su estabilización durante 120 horas. Se realizaron pruebas enzimáticas proteolíticas y lipolíticas en medio agar PCA suplementado con leche descremada y aceite de oliva, respectivamente a 80 colonias bacterianas para determinar el índice de potencia enzimática. Se realizó tinción Gram, pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, ureasa y citrato, y pruebas de resistencia antibiótica mediante el método de Kirby-Bauer a 31 clones bacterianos. La mayoría de clones bacterianos presentaron un alto índice de actividad proteolítica con respecto a la lipolítica y se obtuvo 20 bacilos Gram negativos y 11 cocos Gram positivos y en base a las pruebas bioquímicas los clones bacterianos podrían pertenecer a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Micrococos*, *Aeromonas*. Además los clones resultaron más sensibles a Oxitetraciclina y menos sensibles a Penicilina. Los clones bacterianos puros encontrados demostraron que pueden sobrevivir en ambientes extremos por lo que se recomienda profundizar su estudio para la aplicación en procesos biotecnológicos.

Palabras claves: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>
<PSICRÓFILOS> <PSICROTOLERANTES> <ACTIVIDAD ENZIMÁTICA>
<RESISTENCIA ANTIBIÓTICA> <CEBADAS (PARROQUIA)>



SUMMARY

This degree work is aimed to isolate and characterize psychrophilic or psychrotolerant bacteria from Cuyuc and Colay Lagoons belonging to the Atillo lake System; Four water, soil composite samples and sediments were collected. In-situ pH and temperature measurement was performed at each sampling point, and in the laboratory the samples were inoculated by surface seeding technique on plates with PCA medium, PCA supplemented with lagoon water and PCA supplemented with skim milk, performing a colony count at 72 hours of incubation at 10 ° C, 19 ° C and 37 ° C. 432 bacterial colonies were selected and replicated 3 times successively until stabilization for 120 hours. Proteolytic and lipolytic enzymatic tests were performed in PCA agar medium supplemented with skim milk and olive oil, respectively to 81 bacterial colonies to determine the enzyme potency index. Gram staining, biochemical tests of catalase, oxidase, urease and citrate, and antibiotic resistance tests were performed using the Kirby-Bauer method to 31 bacterial clones. The majority of bacterial clones had a high rate of proteolytic activity with respect to lipolytic and 20 gram-negative bacilli and 11 gram-positive cocci were obtained and based on biochemical tests the bacterial clones could belong to the genera *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*. In addition, the clones were more sensitive to Oxytetracycline and less sensitive to Penicillin. The pure bacterial clones found showed that they can survive in extreme environments, so it is recommended to deepen the study for its application on biotechnological processes.

Keywords: <ENGINEERING TECHNOLOGY AND SCIENCES>
<PSYCHROPHILES> <PSYCHROTOLERANTS> <ENZYMATIC ACTIVITY>
<ANTIBIOTIC RESISTANCE> <CEBADAS (PARISH)>



INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

La investigación en microorganismos presentes en ambientes extremos, en especial bacterias, hongos (en particular levaduras) y microalgas se ha incrementado considerablemente en los últimos años, debido a sus características especiales, propiedades de sus enzimas y múltiples adaptaciones que presentan un gran potencial a nivel biotecnológico (D. Garzón, 2013).

Los ambientes extremos representan un mayor porcentaje en la Biosfera; los océanos, lagos y en especial zonas de alta montaña poseen temperaturas por debajo de 0°C, esto contribuye a un interés especial debido a que son hábitats donde proliferan microorganismos adaptados al frío. Las aguas presentes en ambientes de alta montaña presentan variaciones en temperatura, pH, tensión de oxígeno, transparencia y condiciones nutricionales durante todo el año (Andrade, 2017).

Las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes que se han descrito con más frecuencia son bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros *Moritella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio* y *Desulfuromonas*; por otra parte los géneros de bacterias Gram positivas más frecuentes son *Arthrobacter* y *Micrococcus* (Carrión, 2014; Oliart et al., 2016).

La amplia aplicación de las enzimas producidas por las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes se ha llevado a cabo en las industrias alimentarias, farmacéutica, peletera, textil, producción de detergente, biotransformación y biología molecular incrementando la especificidad y la actividad catalítica de las enzimas de ser estables a condiciones extremas (Oliart et al., 2016, pp. 79–90 & Andrade, 2017, pp. 26-28).

La labor investigativa realizadas por los centros de educación superior en el país es impredecible, es por eso que universidades ecuatorianas como la Universidad de Guayaquil, Universidad Técnica de Ambato y la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo han desarrollado trabajos investigativos sobre las características fenotípicas de estos microorganismos, los mismos que se adaptan a temperaturas bajas aproximadamente de 10°C o inferior y máxima de 20°C.

Las Lagunas Cuyuc y Colay se consideran como un espacio territorial del Ecuador apropiado para aislar este tipo de bacterias, por encontrarse en pisos altitudinales con ecosistema de páramo, bosque andino, y bosque húmedo montano, además poseen una altura y temperatura de 3470 msnm, 9°C y 3440 msnm, 11°C, respectivamente; el valle en el que se sitúan las lagunas, está

rodeado por cerros altos de pendientes pronunciadas donde es posible observar la cordillera oriental, la irregularidad del suelo, la flora, la fauna asociada y cauces de agua más pequeños que les confieren ciertas características especiales como su forma elipsoidal. Representan una de las mayores fuentes de agua en el Ecuador formando parte del Sistema Lacustre de Atillo en las estribaciones de la cordillera oriental del Parque Nacional Sangay (GADM Cantón Guamote, 2014).

Justificación de la investigación

Las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes poseen un alto potencial biotecnológico; por esto varios investigadores mencionan que el estudio de estas bacterias ha despertado un gran interés debido a sus propiedades y adaptaciones fisiológicas que presentan en las membranas citoplasmáticas, además aportan en procesos que se desarrollan a nivel celular (Villalta, 2013, p. 79).

El estudio de psicrófilos y psicrotolerantes toma relevancia debido a la capacidad de estos de encontrarse en anabiosis y mantener su sistema metabólico activo; la adaptación a condiciones extremas permite que estos microorganismos encuentren la manera de desarrollarse óptimamente y puedan producir enzimas para catalizar las reacciones metabólicas (Moreno, 2017).

Los sistemas Lacustres de alta montaña poseen características óptimas para el crecimiento de estas bacterias a diferencia de los ecosistemas de baja altitud, el sitio de estudio constituye una de las fuentes de agua más importante del Ecuador, debido a su dimensión y clima aproximado de 9°C a 11°C. En particular estos ambientes, de agua dulce no poseen gran cantidad de información sobre la microbiota encontrada, sin embargo, la diversidad genética de estas zonas es extraña pues es más heterogénea que la de ambientes salinos (Chávez, 2014, p. 218). La biodiversidad disminuye con el aumento progresivo de la latitud, con esto llegando a registros mínimos en las zonas con condiciones más extremas, esto se atribuye a un gradiente de temperatura y humedad (Andrade, 2017).

Conocer si la vida es metabólicamente activa a temperaturas bajas es fundamental para definir el papel ecológico de las bacterias psicrófilas en las lagunas ya mencionadas anteriormente, a razón de que las células metabólicamente activas participan en procesos bioquímicos (Horikoshi, 2011).

El aislamiento y caracterización de las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes contribuyen en una investigación importante para la determinación de propiedades y características particulares que presentan las mismas, además de enzimas extracelulares que éstas producen, presentando un gran potencial económico en procesos bioquímicos con la incrementación de la especificidad y la

actividad catalítica con propiedades más exactas, rápidas y amigables con el ambiente (Oliart et al., 2016, pp. 79–90).

Objetivos

General

- Aislar y caracterizar clones de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes de las Lagunas Cuyuc y Colay pertenecientes al Sistema Lacustre de Atillo.

Específicos

- Evaluar las características físico-químicas de las muestras de agua, suelo y sedimentos de las Lagunas Cuyuc y Colay.
- Aislar clones de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes en las muestras de agua, suelo y sedimentos recolectadas en las Lagunas Cuyuc y Colay.
- Caracterizar clones de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes mediante pruebas microscópicas, macroscópicas y bioquímicas.
- Determinar el índice de potencia de la actividad enzimática de proteasas y lipasas en clones de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes.
- Evaluar la resistencia a antibióticos que presentan los clones de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Existe un interés creciente por el estudio de los extremófilos, así se refleja en el estudio de Demirjian et al., (2001) en donde se señala que estos microorganismos eran explorados por pocos grupos de investigación en todo el mundo.

Hace algunos años se afirmaba que la vida solo existía en ambientes con valores normales de temperatura, pH, presión y salinidad (Castillo et al., 2005). Entre estos, se considera a la temperatura como uno de los factores principales que influyen tanto en el crecimiento como en la supervivencia de los microorganismos, es decir a temperaturas muy bajas o muy altas no se desarrollan, no obstante, las temperaturas óptimas de crecimiento varían entre cada grupo de microorganismos y evidencian las temperaturas de sus hábitats naturales (Madigan et al., 2010).

El estudio de psicrófilos o psicrotolerantes es de mucho interés debido a la capacidad de encontrarse en anabiosis y mantener su sistema metabólico activo, la microbiota que se encuentra en los glaciales, considerados como repositorio natural de material biológico con características propias de cada era geológica, pueden producir enzimas que funcionen óptimamente en temperaturas bajas y que podrían inactivarse en temperaturas moderadas (Madigan et al., 2010).

En un estudio realizado en ecosistemas glaciares de la Antártida se obtuvo 141 bacterias y 11 actinomicetos en cultivo puro en tres diferentes muestras ambientales, de los cultivos bacterianos solo un 9.2% fueron considerados como psicrófilos, mientras el 55.33% como psicrotolerantes (D. Garzón, 2013, p. 122).

Villalta (2013) obtuvo cuatro cepas provenientes de diferentes muestras Antárticas de las cuales 3 fueron psicrófilas (4-20°C) y 1 fue psicrotolerante (4-33°C), es decir, estableció que las cepas psicrófilas aisladas son capaces de producir enzimas a 20°C y la cepa psicrotolerante a 33°C.

La adaptación al frío que presentan ciertos microorganismos permite su desarrollo, mientras que las adaptaciones a nivel fisiológico y molecular permiten su reproducción, además la transformación de su membrana lipídica, síntesis de proteínas, síntesis de expo-polisacáridos y síntesis de enzimas a temperaturas bajas (Fullana, 2014, p. 132).

Moreno (2017) caracterizó morfológicamente diferentes colonias y concluyó que tienen la capacidad de crecer en un rango de temperatura de 4°C a 37°C y con la producción de exopolisacáridos le permitió realizar el aislamiento de 19 colonias bacterianas originarias de la Laguna Amarilla del Nevado el Altar.

Los ambientes fríos representan aproximadamente el 85% del planeta, por lo que gran cantidad de bacterias, levaduras y algas se han desarrollado en estos sitios y hoy en día son conocidos como microorganismos extremófilos o extremotolerantes, pues han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a condiciones en las que los seres humanos no podrían (Moreno, 2017). En la actualidad estos microorganismos son de gran interés debido a que ofrecen enzimas con estabilidad térmica y velocidades de reacción que no se consiguen con enzimas químicas (Demirjian et al., 2001).

El desarrollo de la presente investigación complementa los conocimientos acerca de las bacterias psicrófilas o psicrotolerantes que presentan actividad enzimática de proteasas y lipasas, además de la evaluación de la resistencia a antibióticos para la aplicación a nivel biotecnológico en los próximos estudios.

1.2. Marco conceptual

1.2.1. Bioprospección

Es el estudio de la biodiversidad con el fin de explorar nuevos recursos biológicos mediante la búsqueda sistemática de compuestos químicos, biomoléculas, microorganismos o genes con potencial biotecnológico, es decir, la bioprospección es el estudio de ambientes pocos explorados que se encuentran en condiciones ambientales particulares o extremas (Cimera Estudios Aplicados, 2013).

1.2.2. Microbiota del agua

La microbiota del agua presenta numerosos microorganismos como virus, bacterias, algas, protozoos y hongos microscópicos dependiendo del tipo de hábitat, además en este medio la gran mayoría de microorganismos se movilizan por medio de flagelos u otros mecanismos (Tortora et al., 2007).

La microbiota del agua se puede encontrar como microbiota de hábitat de agua dulce y microbiota en hábitat marino (Atlas & Bartha, 2002).

1.2.2.1. Microbiota en hábitat de agua dulce

En este hábitat se puede encontrar microorganismos que varían según la oscilación vertical en la que se encuentran, penetración de la luz, temperatura y concentración de oxígeno. Esta microbiota está representada por bacterias fotoautótrofas especialmente de lagos y estanques de los géneros *Pseudomonas*, *Clostridium* y bacterias metanógenas y productoras de sulfuro de hidrógeno, también existen hongos adheridos a sustratos orgánicos de los géneros *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*. Asimismo, algas verdes dinoflageladas y diatomeas en su mayoría, protozoos ameboides, ciliados y flagelados de las especies *Paramecium*, *Didinium*, *Vorticella* y *Amoeba* (Atlas & Bartha, 2002; Madigan et al., 2010).

1.2.2.2. Microbiota en hábitat marino

En este hábitat se puede encontrar bacterias Gram negativas y móviles que por lo general son aerobias o anaerobias facultativas de los géneros *Pseudomonas* o *Vibrio* y bacterias Gram positivas del género *Bacillus*. Las poblaciones fúngicas encontradas en ecosistemas marinos son levaduras de los géneros *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, y *Cryptococcus*, también se puede encontrar algas especialmente pardas (Atlas & Bartha, 2002).

1.2.3. Microbiota del suelo

La microbiota del suelo posee una gran variedad de microorganismos, debido a las características que posee se desarrollan microcolonias en las partículas del mismo, los microorganismos presentes en el suelo. En general la microbiota del suelo es más abundante que la microbiota del agua (hábitat marino y de agua dulce) (Atlas & Bartha, 2002).

Participan en funciones específicas de procesos biogeoquímicos de la materia, así como en la degradación de la materia orgánica por medio de microorganismos heterótrofos. Los microorganismos aislados del suelo pueden ser virus, bacterias, hongos, algas y protozoos, y de estos los géneros más predominantes de bacterias y hongos son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucorensis*. El suelo es considerado un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos comprendido por microhábitats factibles para poblaciones alóctonas del suelo (Atlas & Bartha, 2002).

1.2.4. *Ambientes extremos*

Los ambientes extremos se consideraban como inhabitados a causa de las diferentes condiciones físico-químicas de ciertos factores como la temperatura, pH, salinidad o presión, convirtiéndolos en lugares inhóspitos para el desarrollo de diferentes organismos, sin embargo, ciertos organismos lograban desarrollarse en estas condiciones debido a su gran potencial bioactivo (D. Garzón, 2013, p. 122).

Los ambientes fríos y calientes, profundidades marinas, regiones polares y lugares de alta montaña, se caracterizan principalmente por poseer rangos de temperaturas que oscilan entre 15°C hasta -20°C conformando así un conjunto denominado ambientes extremos (Castillo et al., 2005).

Se pueden encontrar ecosistemas con características particulares está el ambiente de alta montaña que presenta una variedad de temperatura que no supera los 15°C y precipitaciones de 1000 mm debido a su altitud, estos ambientes de alta montaña presentan cuerpos de agua dulce con una gran diversidad de microorganismos que se adaptan a las condiciones propias de su entorno y que se relacionan con la síntesis de ciertos productos naturales poco comunes (Moreno, 2017).

1.2.5. *Microbiota en ambientes extremos*

No todos los microorganismos que se presentan en hábitats convencionales, corresponden a extremófilos, de hecho, éste es un grupo bastante reducido debido a que subsisten en inhóspitas. Estos microorganismos producen enzimas y compuestos distintos a los demás microorganismos, lo que les facilita realizar lo mismo que hacen todos los demás microorganismos, pero en hábitats extremos. A nivel industrial se considera importante debido a los procesos con requerimientos de temperaturas muy bajas o muy altas; o su vez concentraciones extremas de salinidad o alcalinidad (Argenbio, 2015).

Los ambientes fríos predominan en las regiones polares y en la mayor parte de los océanos, en estos los microorganismos crecen lentamente y sus poblaciones son inferiores a la de las zonas templadas, además se puede encontrar microorganismos barófilos y psicrófilos en su mayoría. Por otra parte, existen ambientes muy calientes en los que se encuentra microbiota termófila e hipertermófila especialmente bacterias encontradas en zonas de actividad volcánica, fuentes termales o hidrotermales submarinas, mientras que en los hábitats de fuentes hidrotermales submarinas, la temperatura en su mayoría supera los 100 °C y se puede encontrar microorganismos especialmente bacterias que toleran estas temperaturas e incluso bacterias que

poseen temperatura óptima de crecimiento entre 105 y 110 °C. En las fuentes termales sulfurosas también se puede encontrar microorganismos como arqueas de la especie *Sulfolobus acidocalcarius* que crecen en ambientes ácidos con un pH inferior a 2 y que participan en la formación de ácido sulfúrico a partir de la oxidación microbiana del azufre elemental (Atlas & Bartha, 2002).

1.2.6. Microorganismos extremófilos

Los extremófilos son microorganismos que se desarrollan en condiciones inhóspitas debido a que toleran y sobreviven a condiciones ambientales extremas, además requieren para poder llevar a cabo su crecimiento. Los microorganismos extremófilos son de mucho interés en procesos enzimáticos debido a que han desarrollado sus propios mecanismos para tolerar y sobrevivir a temperaturas extremas, pH ácido y básico, altas concentraciones de radiación, salinidad y metales, asimismo otras condiciones naturales (Ramírez et al., pp. 56–71).

El límite máximo de temperatura a la que los organismos pueden encontrarse en diferentes hábitats aún no se conoce, pero se cree que por encima de 150°C ningún organismo vivo podría evitar la ruptura de los enlaces químicos que forman parte del material genético (ADN) (Ramírez et al., pp. 56–71).

1.2.6.1. Microorganismos psicrófilos

Los psicrófilos son aquellos microorganismos que pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5°C, su temperatura óptima de crecimiento es de 15°C, aunque en su mayoría crecen en un rango de 20°C hasta menos de 0°C. Los ambientes más habitados por estos organismos son las regiones polares, montañas altas, profundidades del océano, ambientes subterráneos, en donde han desarrollado mecanismos de adaptación para llevar a cabo sus diferentes funciones metabólicas a bajas temperaturas (Ramírez et al., pp. 56–71).

Bacterias extremófilas

Las bacterias psicrófilas se encuentran en las superficies glaciares o de zonas nevadas presentan un color distintivo (verde o rojo) debido a que se encuentran en biotopos con alta concentración de sales y altas presiones barométricas (Madigan et al., 2010).

Entre los géneros más representativos de los microorganismos psicrófilos están las bacterias Gram negativas *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Polaromona*, *Prychroflexus*, *Polaribacter*, *Moritella*, *Vibrio* y *Pseudomonas*; mientras que las bacterias Gram positivas están las del género *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus* (Ramírez et al., pp. 56–71).

También se conocen bacterias psicrófilas quimioorganótrofas que habitan en el Antártico y que presentan la temperatura más baja de crecimiento de todos los microorganismos, una de las bacterias es la *Polaromonas vacuolata* con una temperatura óptima de crecimiento de 4°C e incapaz de sobrevivir a temperaturas superiores a 12°C (Castillo et al. 2005, p.384).

1.2.6.2. Microorganismos psicrotolerantes

Los psicrotolerantes son microorganismos que crecen a 0°C, pero tienen temperaturas óptimas de 20°C hasta 40°C, éstos se pueden aislar de aguas y suelos de climas templados, además de carnes, vegetales, leche o productos derivados y de frutas almacenadas en refrigeración (Castillo et al. 2005, p.384).

Las especies de *Aeromonas* suelen ser psicrotolerantes y heterofermentadoras que se encuentran asociadas con la alteración de alimentos proteicos frescos cuando el desarrollo de estos microorganismos aerobios obligados está limitado (Carrillo y Audisio 2007, p.19-30).

Los diferentes organismos en función de su temperatura de crecimiento y reproducción se clasifican de la siguiente manera:

Tabla 1-1: Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento y reproducción

Tipo	Microorganismo	Enzimas	Aplicación
Termófilos	<i>Bacillus sp.</i>	Proteasas	Producción de detergentes, panificación, hidrólisis de alimentos y bebidas.
	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Glucosilhidrolasas (amilasas, celulasas, glucoamilasas)	Elaboración de textiles, almidón, celulasas y pectinas.
	<i>Trichoderma sp.</i>	Quitinasa	Transformación de quitina para uso alimenticio y farmacéutico.
	<i>Bacillus sp.</i>	Xilasas	Blanqueamiento de papel.
	<i>Geobacillus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>	Lipasas, esterasas	Curtiembre, producción de detergentes, biosíntesis y biocatálisis en disolventes orgánicos,

			modificación de grasas y lácteos.
	<i>Thermus aquaticus</i>	ADN polimerasas, deshidrogenasas	Biología molecular (PCR) y en reacciones de óxido – reducción.
Psicrófilos o psicrotolerantes	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Proteasas	Producción de detergentes e industrias de alimentos.
	<i>Cytophaga sp.</i> <i>Vibrio sp.</i>	Lipasas, deshidrogenasas, amilasas	Producción de detergentes, biosensores, cosméticos e industrias de alimentos.
Halófilos	<i>Halobacterium sp.</i>	Proteasas	Anabolismo de péptidos.
	<i>Haloarcula sp.</i>	Deshidrogenasas	Biocatálisis en disolventes orgánicos.
Alcalófilos	<i>Bacillus sp.</i>	Proteasas, celulasas	Elaboración de detergentes e industrias de alimentos.
Acidófilos	<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Amilasas, glucoamilasas	Producción de almidón
	<i>Desulfurolobus sp.</i>	Proteasas, celulasas y oxidasas	Composición de alimentos y desulfuración del carbono.

Fuente: Oliart, Manresa y Sánchez 2016.

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

1.2.7. *Adaptaciones moleculares de microorganismos a condiciones de bajas temperaturas*

La adaptación de los microorganismos a diferentes condiciones ambientales extremas permite el desarrollo de sus constituyentes celulares y de habilidades bioquímicas (Soria et al., 2010). El potencial de los microorganismos psicrófilos de desarrollarse en ambientes permanentemente fríos, se debe a que incorporan en sus procesos la disminución de la actividad enzimática, de la fluidez de membrana, de la transcripción, traducción y división celular, además de la desnaturalización de enzimas y creación de hielo intracelular con el fin de adaptarse a entornos extremos (D'Amico et al. 2006, p.385).

Los microorganismos psicrófilos producen enzimas que funcionan de forma óptima en ambientes muy fríos, pero con frecuencia se desnaturalizan o se inactivan a temperaturas moderadas, esto se debe a que en ambientes fríos las enzimas activadas presentan más hélices y menos hojas en su estructura secundaria a diferencia de las enzimas que son inactivadas a temperaturas bajas, es decir, la flexibilidad proteica depende de la cantidad de hélices de enzimas activas en ambientes fríos, además presentan mayor cantidad de aminoácidos polares y menor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos para que la proteína se mantenga flexible y enzimáticamente activa a bajas temperaturas (D'Amico et al. 2006, p.385).

1.2.8. Importancia de los microorganismos psicrófilos como productores de sustancias de interés biotecnológico

La importancia de los microorganismos psicrófilos radica en las proteínas estructurales y enzimas metabólicas responsables de las propiedades inhabituales de estos, los mismos que presentan un enorme interés en la industria biotecnológica, por ejemplo, para la biocatálisis en la síntesis de polímeros, productos farmacéuticos, agroquímicos y detergentes sin presentar ningún tipo de alteración durante sus procesos (Castillo et al., 2005).

1.2.9. Aislamiento selectivo de bacterias psicrófilas

Las bacterias se cultivan en medios de cultivo con nutrientes y composición variada, la selección del medio de cultivo depende del objetivo del estudio. La inoculación permite aislar bacterias que forman diversas colonias para posteriormente transferir una sola colonia a un nuevo medio de cultivo y obtener el desarrollo de un cultivo puro bacteriano (Olivas & Alarcón, 2011).

El aislamiento de bacterias psicrófilas a partir de muestras naturales se realiza especialmente en ambientes fríos que presentan temperaturas menores a 0°C hasta los 20°C, a través de medios de cultivos sólidos, semisólidos o líquidos complementados con concentraciones mínimas de vitaminas y cofactores. Las placas son incubadas de dos a cuatro semanas hasta que las colonias se tornen visibles debido al crecimiento lento de los microorganismos (Correa, 2013, p. 188).

Mediante el aislamiento selectivo de microorganismos de una comunidad microbiana se puede obtener un solo tipo de bacterias (clon puro), para esto se proporcionan requerimientos nutricionales de temperatura y pH de acuerdo a su hábitat natural (Madigan et al., 2010).

1.2.10. Enzimas extremófilas

Las enzimas extremófilas son capaces de optimizar sus interacciones con solventes adyacentes o frente a la influencia de factores externos como metabolitos, cofactores y solutos compatibles. (Nuñez, 2015)

La gran biodiversidad de los microorganismos extremófilos y su capacidad para sintetizar proteínas (extremoenzimas) que funcionen bajo condiciones extremas ha generado un gran interés biotecnológico en los procesos industriales sustentables, ya que estas enzimas son extremadamente termoestables y generalmente resistentes a la acción de agentes desnaturizantes

o a la exposición a valores extremos de pH, es decir, el desarrollo de procesos biotecnológicos utilizando microorganismos extremófilos y las enzimas provenientes de ellos, ofrece una alternativa viable en el desarrollo sustentable. (Oliart et al., 2016, pp. 79–90)

1.2.10.1. Enzimas psicrófilas

Las enzimas psicrófilas son aquellas que se activan a condiciones de bajas temperaturas, entre las que se puede encontrar están las proteasas, lipasas, amilasas y celulasas, las mismas que son investigadas para su uso industrial, como en la producción de detergentes, degradación de polímeros, clarificación de los zumos de frutas o en el tratamiento de quesos. Además, presentan un gran potencial aplicativo en las instalaciones de piscicultura (piscifactorías), agricultura, criopreservación, criocirugía y en el almacenamiento de alimentos (Castillo et al., 2005). Estas enzimas aumentan la flexibilidad en su estructura para compensar el efecto de congelación de los ambientes fríos y así producir resultados diferentes de acuerdo al tipo de sustrato empleado (D'Amico et al. 2006).

1.2.11. Métodos de identificación microbiana

Los métodos de identificación microbiana permiten cuantificar y establecer especies microbianas que habitan en una muestra, la correcta identificación está determinada por el uso de colonias únicas procedentes de cultivos puros, es decir, la utilización de un solo tipo de microorganismo (Castillo et al., 2005).

1.2.11.1. Identificación fenotípica

En la actualidad la identificación bacteriana se efectúa a través de técnicas tradicionales, que se basan en características fenotípicas (microscópicas y macroscópicas) de cultivos puros (Fernández et al., 2010, pp. 1–52).

Caracterización microscópica

El estudio microscópico mediante tinción indica la forma, modo de agruparse, estructura de las células y su tamaño. Las tinciones más utilizadas son la del azul de metileno y la de Gram (Fernández et al., 2010, pp. 1–52).

La tinción Gram es un procedimiento que considera el uso de dos colorantes, el principio se basa en las características de la pared celular que presentan las bacterias para otorgar propiedades propias a cada microorganismo y permitir la clasificación en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas (López Jácome et al., 2014, pp. 10–18)

Caracterización macroscópica

Esta caracterización se basa en la identificación colonial de cultivos frescos y axénicos, y se identifica por medio del tamaño, forma, consistencia, elevación y además por el color que presentan en un medio de cultivo específico (V. M. Garzón, 2015, pp. 9–16).

Tabla 2-1: Morfología microbiana

	Detalle	Clasificación
Morfología de las colonias	Por su forma	Circular Puntiforme Irregular Rizoide Fusiforme
	Por su borde	Entero Ondulado Lobulado Filamentoso
	Por su elevación	Plana Convexa Elevada
	Por su superficie	Lisa Rugosa Plegada
	Por su consistencia	Cremosa Membranosa Viscosa

Fuente: Garzón 2015.

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Caracterización Bioquímica

Se basa en un conjunto de pruebas bioquímicas que permiten determinar las características metabólicas de las bacterias para su identificación en género y especie mediante la presencia de enzimas preformadas, algunas de estas pruebas son métodos cortos con tiempos que varían entre unos segundos hasta unas pocas horas, mientras que otras pruebas precisan el crecimiento del microorganismo con una incubación anticipada de 18 a 48 horas (Fernández et al., 2010, pp. 1–52).

Prueba catalasa

La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Fernández et al., 2010, pp. 1–52).

Prueba oxidasa

Esta prueba determina la presencia de enzimas oxidasas, mismas que activan la oxidación del citocromo, que produce agua o peróxido de hidrógeno según el tipo de especie bacteriana mediante la reducción de oxígeno molecular. La presencia de oxidasa está ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrogeno que se produce por la reducción del oxígeno (Fernández et al., 2010, pp. 1–52).

Prueba Citrato

Esta prueba determina si un microorganismo puede emplear el citrato como fuente única de carbono y compuestos amoniacales como fuente única de nitrógeno en sus procesos metabólicos, provocando alcalinización en el medio. La prueba es positiva cuando existe un cambio de color de verde a azul (Fernández et al., 2010, pp. 1–52).

Prueba Ureasa

Esta prueba determina si el microorganismo es capaz de desplegar urea conformando dos moléculas de amoniac por medio de la enzima ureasa, la prueba es positiva cuando existe viraje de color tornándose el medio fucsia (Fernández et al., 2010, pp. 1–52).

1.2.12. Pruebas de actividad enzimática

1.2.12.1. Prueba de actividad proteolítica

Se basa en la degradación de proteínas, mediante la enzima proteasa que al ponerse en contacto con la caseína (proteína de la leche) le confiere el color blanco alrededor del crecimiento microbiano (D. Garzón, 2013).

1.2.12.2. Prueba de actividad lipolítica

Se basa en la capacidad que tienen ciertas bacterias para degradar ácidos grasos y glicerol, mediante la acción de la enzima lipasa (D. Garzón, 2013).

1.2.13. Prueba de resistencia a antibióticos

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se realizan mediante el antibiograma que sirve para El antibiograma es utilizado en pruebas de sensibilidad bacteriana para determinar la sensibilidad de una cepa bacteriana ciertos antibióticos, este estudio se lo realiza *in vitro* y es un requisito importante para la evaluación de la eficacia in vivo de cualquier tratamiento antibiótico (Universidad de Salamanca, 2018).

1.2.13.1. Concentración Mínima Inhibidora (CMI)

La CMI mide la sensibilidad que tiene una bacteria ante cierto antibiótico, es decir, es la mínima cantidad de antibiótico que impide el crecimiento de cualquier microorganismo ante condiciones estandarizadas. La CMI brinda información sobre la sensibilidad de las bacterias a antimicrobianos, S (sensible), I (intermedia) y R (resistente) (Universidad de Salamanca, 2018).

Se puede medir o calcular de forma semicuantitativa la CIM mediante diferentes técnicas o métodos de laboratorio como se detallan a continuación:

- Difusión en agar: Disco placa y E test.
- Dilución: Medio sólido y Medio líquido (micro/macrodilución).
- Mecanizados y Automatizados.

1.2.13.2. Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se considera a la CMB como la menor cantidad de antimicrobiano que puede destruir hasta el 99.9% de una muestra inoculada en condiciones normalizadas (Universidad de Salamanca, 2018).

1.2.13.3. Método por difusión en agar: Disco-placa

También conocido como método de Kirby-Bauer, añade el antibiótico a discos de papel de filtro y aunque es un método meramente cualitativo, debido a la comodidad, economía y fiabilidad, es uno de los más utilizados. Se debe inocular el microorganismo en una o varias placas de agar y se colocan los discos de antimicrobianos heterogéneos, posteriormente se incuban las placas en un lapso de 16 a 24 horas para observar el crecimiento de los microorganismos con relación a los antibióticos.

Los resultados permiten valorar el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y de esta manera se sabe si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente a cada uno de los antibióticos (Universidad de Salamanca, 2018).



Figura 1-1: Antibiograma disco-placa.

Fuente: Universidad de Salamanca, 2018.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Diseño Experimental

2.1.1. *Tipo y diseño de la investigación*

El tipo de investigación es experimental y exploratoria. Experimental, debido a que se actuó constantemente sobre el objeto de estudio de nuestra investigación, en lo que respecta a las bacterias de las muestras de agua, suelo y sedimentos de las Lagunas Cuyuc y Colay, con su respectiva actividad enzimática y resistencia a antibióticos.

- Por el método de investigación: Cuantitativa
- Según el objetivo: Básica
- Según el nivel de profundización en el objeto de estudio: Descriptiva.
- Según la manipulación de variables: Experimental
- Según el tipo de inferencia: Hipotética-deductiva
- Según el periodo temporal: Transversal

2.1.2. *Unidad de Análisis*

La unidad de análisis corresponde a las muestras de agua, suelo y sedimentos recolectadas de las Lagunas Cuyuc y Colay pertenecientes al Sistema Lacustre Lagunas de Atillo, Parque nacional Sangay, Cantón Guamote, parroquia Cebadas, provincia de Chimborazo.

2.2. Metodología

2.2.1. *Lugar de muestreo*

2.2.1.1. *Parque Nacional Sangay*

En el año 1975 el Parque Nacional Sangay fue creado como una reserva ecológica contuyente del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), en 1979 es categorizado como parque nacional. Comprende 517.765 hectáreas que se encuentran distribuidas en las provincias de Chimborazo, Tungurahua, Morona Santiago y Cañar. El parque se extiende en la cordillera oriental, rodeado por tres volcanes el Tungurahua, Sangay y el extinto volcán El Altar. Su clima fluctúa en un rango de 6 a 24°C obedeciendo al rango altitudinal en el que se encuentre, mismo que varía entre los 1000 msnm y 5320 msnm. Aquí se ha logrado identificar un total de 327 lagunas, entre los que destacan los sistemas lacustres de Ozogoche, del Altar y las lagunas de Atillo, Sardinayacu, Culebrillas, Negra, así como las aguas termales El Placer (MAE, 2014).

2.2.1.2. *Lagunas de Cuyuc y Colay*

Las Lagunas de Cuyuc y Colay se encuentran ubicadas en las inmediaciones del Parque Nacional Sangay a 90 – 91.5 km de Riobamba, provincia de Chimborazo, tienen un marco impresionante lleno de vegetación natural propia del bosque andino. Constituyen una de las fuentes de agua más importante del Ecuador, se destacan por su gran extensión y su clima aproximado de 9°C a 10°C, estas lagunas en sus pisos altitudinales presentan un ecosistema de páramo, bosque andino, y bosque húmedo montano que posee una altura de 3470 msnm (PDyOT Cebadas, 2015).



Figura 1-2: Lagunas Cuyuc y Colay.

Fuente: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

El sitio de colecta de las muestras de agua, suelo y sedimentos de las Lagunas Cuyuc y Colay, se encuentra ubicado en las inmediaciones del Parque Nacional Sangay, en la comunidad de Atillo, provincia de Chimborazo.

2.2.2. Obtención de la muestra

El muestreo se realizó en el mes de julio 2019, bajo el criterio de la toma de 4 muestras compuestas de agua y 4 de suelo y sedimentos, formadas por 4 submuestras cada una, esto con el fin de tener ejemplares de la microbiota del área.

2.2.3. Toma de muestras

Muestras de agua

Para la toma de muestras se realizó un muestreo al azar, se utilizaron frascos de vidrio de 450 ml con tapas, limpios y estériles. Cada frasco fue enjuagado al menos tres veces con el agua de las Lagunas, tomando la muestra en contra de la corriente, una vez tomada la muestra (250 ml) se verificó que se llenen las $\frac{3}{4}$ partes del frasco para que se permita la oxigenación de la muestra. Las muestras de agua recolectadas se etiquetaron con las letras A1, A2, A3 y A4 (Instituto Ecuatoriano de Normalización 2013) .

Muestras de suelo y sedimentos

Se realizó un muestreo al azar y se tomó aproximadamente 25 g de muestra en el caso del suelo, con la ayuda de espátulas estériles, se procedió a retirar la primera capa de suelo (5 cm de profundidad) y con la misma espátula se tomó la muestra y se depositó en el frasco de vidrio estéril.

Para el muestreo de sedimentos se procedió a retirar la capa superficial del sedimento con una espátula estéril y luego se procedió a recoger la muestra en el frasco de vidrio estéril.

Cabe mencionar que, por el difícil acceso al lugar de muestreo y la forma de las lagunas, se tomaron dos muestras de suelo (S1 y S2) y las otras dos de sedimentos (SS1 y SS2) (Centro Nacional de Sanidad Ambiental, 2018; ISO 10381-2: Soil quality-Sampling-Part 2: Guidance on sampling techniques, 2002).

Una vez obtenidas las muestras se procedió al sellado de cada frasco para evitar la contaminación de la muestra. Se realizó el traslado de las muestras en un cooler para conservarlas hasta la realización de los ensayos de laboratorio (Centro Nacional de Sanidad Ambiental, 2018; Instituto Ecuatoriano de Normalización 2013, ISO 10381-2: Soil quality-Sampling-Part 2: Guidance on sampling techniques, 2002).

2.2.4. Caracterización físico-química de las muestras

Se midió el pH, la temperatura de las muestras de agua, suelo y sedimentos, in-situ; la conductividad eléctrica fue el único parámetro medido ex-situ.

2.2.5. Composición de las unidades experimentales

2.2.5.1. Preparación de medios de cultivo utilizados

El agar empleado fue PCA (Plate Agar Count); éste se utilizó tanto en su formulación original como suplementado con agua de la laguna, leche descremada y aceite de oliva, respectivamente.

Tabla 1-2: Medios de cultivo utilizados

Tratamiento	Agar	Codificación
	PCA	PCA
	PCA + Agua de la laguna	PCAI
	PCA + Leche descremada	PCAIld
	PCA + Aceite de oliva	PCAao

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Agar PCA

Se utilizó el medio Agar PCA (Plate Agar Count) y, mismo que está conformado por triptona, extracto de levadura, glucosa y agar, su preparación se realizó colocando 23.5 g de medio por cada litro de agua destilada. La esterilización del medio se realizó en un frasco de vidrio termorresistente de 500 ml con tapa hermética.

Tabla 2-2: Medio de cultivo Agar PCA

Ingrediente	Concentración g/L
Hidrolizado pancreático de caseína (Triptona)	5.0
Extracto de levadura	2.5
Glucosa	1.0
Agar	15.0

Fuente: Bioser, 2019.

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Agar PCA suplementado con agua de la laguna

La preparación de este medio fue similar a la del medio PCA, se utilizó el mismo medio y la misma cantidad por cada litro de agua, este medio se realizó con la finalidad de determinar si existen nutrientes en el agua de las lagunas capaces de facilitar el crecimiento de las bacterias en el medio. La esterilización del medio se realizó en un frasco de vidrio termorresistente de 500 ml con tapa hermética.

Agar PCA suplementado con leche descremada

Se utilizó leche descremada en polvo, la preparación se realizó en un matraz Erlenmeyer, en el que se procedió a disolver 20 g/L de leche descremada en $\frac{1}{4}$ del volumen total a prepararse; en otro matraz de colocó la masa equivalente de agar PCA para el volumen faltante ($\frac{3}{4}$), luego se procedió a esterilizar en el autoclave en un frasco de vidrio termorresistente de 500 ml con tapa hermética y finalmente en condiciones asépticas se mezcló homogéneamente. (López & Soria, 2018)

Agar PCA suplementado con aceite de oliva

Se utilizó 20 ml de aceite de oliva, 23.5 g agar PCA, 100 gotas de vitamina A y 20 ml de tween 80 con 1000 ml de agua destilada. La preparación se realizó en un matraz Erlenmeyer y se agitó hasta lograr una mezcla homogénea, luego se procedió a esterilizar en la autoclave en un frasco termorresistente de vidrio de 500 ml con tapa hermética. (López & Soria, 2018)

Medio de cultivo Mueller-Hinton

Se utilizó el medio Agar Mueller-Hinton, mismo que está conformado por extracto de carne bovina, hidrolizado de ácido de caseína, almidón y agar, su preparación se realizó colocando 38 g de medio por cada litro de agua destilada. La esterilización del medio se realizó en un frasco de vidrio termorresistente de 500 ml con tapa hermética.

Tabla 3-2: Medio de cultivo Mueller-Hinton

Ingrediente	Concentración g/L
Extracto de carne bovina	1.0
Hidrolizado de ácido de casina	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0

Fuente: Microkit, 2016.

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

2.2.5.2. *Aislamiento microbiano*

Muestras de agua, suelo y sedimentos

Se realizaron diluciones seriadas en orden 10 hasta 10^{-3} , utilizando el método de siembra en superficie para la inoculación por duplicado de la dilución 10^{-3} , a un solo volumen (100 μ l), en cajas Petri con medio agar PCA, PCA1 y PCA1d.

2.2.5.3. *Aislamiento, selección y número de cepas bacterianas*

Cada tratamiento se incubó a 10 °C, 19 °C y 37 °C, y posteriormente se realizó el recuento a las 72 horas.

Se seleccionaron 432 colonias bacterianas considerando su morfología y se realizó una siembra por punción tanto en agar PCA como en agar PCA1d, diferenciando mediante una cuadrícula cada punto para facilitar el recuento (48 puntos por caja). La incubación se realizó a 10 °C, 19 °C y 37 °C durante 24 horas. Realizando un total de 3 repiques hasta obtener cepas estabilizadas.

2.2.6. *Determinación de la actividad lipolítica y proteolítica*

2.2.6.1. *Inoculación de las cepas bacterianas*

Por cada temperatura se inocularon las colonias bacterianas seleccionadas mediante una siembra por picadura o punción en cajas Petri con medio PCAao y PCA1d. Una vez inoculadas las cepas se procedió a colocarlas a temperatura ambiente por duplicado con el propósito de medir el índice de potencia IP. Además, se realizó un control de las cepas bacterianas en medio PCA sin suplementación.

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

Se identificaron clones bacterianos mediante la formación de halos de inhibición en el medio PCAao y PCA1d, cabe mencionar que los clones provenían de incubaciones a 10°C, 19°C y 37°C, pero se mantuvieron a 19°C tras haber determinado que ésta fue la temperatura óptima de crecimiento. La temperatura fue elegida debido a que los mismos clones crecieron tanto a 10°C como a 19°C.

El índice de potencia se midió de dividiendo el diámetro del halo de hidrólisis para el diámetro de la colonia. (Rodríguez et al., 2006, pp. 349–354)

Ecuación 1. Índice de potencia (IP)

$$IP = \frac{\text{Diámetro del halo de hidrólisis}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

2.2.6.3. *Aislamiento por agotamiento de las bacterias*

Se seleccionaron los clones bacterianos que presentaron el mayor halo de hidrólisis lipolítico y proteolítico en los medios PCAao y PCAld; posteriormente se efectuó el aislamiento por agotamiento mediante el uso de un asa de siembra con el fin de obtener colonias aisladas para la caracterización macroscópica, microscópica, bioquímica y las pruebas de resistencia a antibióticos.

2.2.7. *Caracterización microscópica y macroscópica de los clones bacterianos*

2.2.7.1. *Microscópica*

En 31 clones bacterianos se realizó una Tinción Gram. La prueba se basó en la realización de un frotis en un portaobjetos con cada uno de los clones y la adición de agua destilada, luego se fijó la muestra con calor y se añadió cristal violeta como colorante primario, a continuación, lugol como mordiente, seguido de la adición de alcohol para de color las bacterias Gram negativas y finalmente se colocó safranina para teñir las Gram negativas. Se agregó aceite de inmersión y se procedió a observar en el microscopio (López Jácome et al., 2014).

2.2.7.2. *Macroscópica*

Se realizó una observación directa de las características de los 31 clones aislados por agotamiento, considerando principalmente el color, borde, forma y tamaño. Las colonias con morfología análoga fueron agrupadas.

2.2.8. Pruebas bioquímicas

2.2.8.1. Catalasa

Se tomó un inóculo de cada clon aislado con la ayuda de un asa de siembra estéril, se procedió a depositar el inóculo en el portaobjetos y se añadió una gota de agua oxigenada (H_2O_2). Finalmente se observó la presencia o no de burbujas para catalogar la prueba como positiva o negativa (F. Rodríguez, 2018a).

2.2.8.2. Oxidasa

Se tomó un inóculo de cada clon aislado con la ayuda de un asa de siembra estéril y se procedió a extender el inóculo en la zona reactiva de la tira de oxidasa. Finalmente se observó el cambio o no de coloración (azul) de la tira para catalogar la prueba como positiva o negativa (Laboquimia, 2018).

2.2.8.3. Ureasa

Se preparó medio agar Base Urea de Christen conformado por peptona, glucosa, cloruro de sodio, hidrógeno fosfato sódico, fosfato di-hidrogenado de potasio, fenol rojo y agar. Adicionalmente se preparó solución de urea disolviendo 29 g de urea por cada 100 ml de agua destilada; se autoclavó el agar y la solución, y homogenizó para posteriormente colocar la mezcla en cajas Petri. Se procedió a sembrar por el método de agotamiento con la ayuda de un asa de siembra estéril. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y se observó si hubo o no cambio de coloración del medio a fucsia para catalogar la prueba como positiva o negativa (F. Rodríguez, 2018b).

Tabla 4-2: Medio de cultivo Agar Urea Base

Ingrediente	Concentración g/L
Peptona	1.0
Glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato mono-sódico	1.20
Fosfato mono-potásico	0.80
Fenol rojo	0.012
Agar	15.00

Fuente: Neogen, 2019.

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

2.2.8.4. *Citrato*

Se preparó medio agar Citrato de Simmons conformado por sulfato de magnesio, di-hidrógeno fosfato de amonio, hidrógeno di-fosfato de potasio, citrato de sodio, cloruro de sodio. Se colocó en tubos de ensayo en forma inclinada, luego se procedió a tomar un inóculo de los clones y se sembró en el medio mediante la técnica de siembra de placa a tubo. Finalmente se incubó durante 72 horas a 37°C y se observó si hubo o no cambio de coloración para catalogar la prueba como positiva o negativa.

Tabla 5-2: Medio de cultivo Agar Citrato de Simmons

Ingrediente	Concentración g/L
Sulfato de magnesio	0.20
Fosfato mono-amónico	1.0
Fosfato di-potásico	1.0
Citrato de sodio	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Azul de bromotimol	0.08
Agar	15.00

Fuente: Britania, 2019.

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

2.2.9. *Prueba de sensibilidad antibiótica*

Se seleccionaron 31 clones de bacterias aislados y se expusieron a cuatro antibióticos utilizando la técnica de Kirby-Bauer o difusión en disco. Se utilizó el medio de cultivo Mueller-Hinton, se prepararon 31 tubos de ensayo esterilizados para los clones bacterianos, con la ayuda de asas estériles se toma una muestra de los clones y se colocan en 10 ml de agua destilada hasta que alcancen una escala 0.5 de McFarland. A partir de los tubos de ensayo con la ayuda de hisopos estériles se procedió a inocular mediante la técnica siembra por estrías.

Se esperó a que la superficie del medio sembrado se seque 10 minutos y se procedió a colocar 4 discos de diferentes antibióticos sobre la superficie del medio de cultivo con la ayuda de pinzas estériles y se presionó hasta lograr un contacto uniforme (Bernal & Guzmán, 1984).

Los antibióticos utilizados fueron:

- Oxitetraciclina (OXI)
- Penicilina (PEN)
- Gentamicina (GEN)

- Cefalexina (CFL)

Finalmente se colocaron las muestras a 37°C y se esperó 24 horas para ver resultados (Hernández, 2018).

2.2.9.1. Medición de los halos de inhibición

Se midió el diámetro de los halos incluyendo los 6 mm del disco, tomando en cuenta que una lectura de 6 mm indica que no existe inhibición, la lectura fue facilitada con la ayuda de una regla sobre una superficie oscura bajo luz reflejada (Bernal & Guzmán, 1984).

2.2.9.2. Análisis estadístico de la resistencia a antibióticos

Se realizó un ANOVA simple y un análisis Tukey, mediante el cual se elaboró un diagrama de cajas para evaluar la incidencia de los antibióticos en los clones bacterianos.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. Caracterización físico-química de las muestras

Los resultados obtenidos de las muestras de agua, suelo y sedimentos de las Lagunas Cuyuc y Colay, evaluados in-situ y ex-situ, se detallan a continuación:

Las muestras de agua en los diferentes puntos de muestreo presentaron valores de pH que fluctuaron entre 6 y 7. La muestra A2 tuvo el mayor valor de pH correspondiente a 6.6, mientras que la muestra A1 presentó el menor valor correspondiente a 6.1. En cuanto a la temperatura, la muestra A1 mostró el mayor valor correspondiente a 10.6°C y la muestra A4 con el menor valor de 8.9°C. En cuanto a la CE, la muestra A2 tuvo el mayor valor correspondiente a 76.2 μ Siems/cm, mientras que la muestra A3 tuvo el menor valor correspondiente a 68.8 μ Siems/cm (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Caracterización físico-química de las muestras de agua

Muestra	$\overline{\text{pH}}$	$\overline{\text{T}^{\circ}\text{C}}$	$\overline{\text{CE}}$ (μ Siems/cm)
A1	6.1	10.6	70.1
A2	6.6	10.2	76.2
A3	6.5	9.2	68.8
A4	6.3	8.9	74.5

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Las muestras de suelo y sedimentos en los diferentes puntos de muestreo presentaron valores de pH en un rango entre 6 y 7. La muestra S2 tuvo un pH correspondiente a 7.1, siendo la más alcalina, mientras que la muestra SS1 presentó el menor valor correspondiente a 6.1. En cuanto a la temperatura la muestra S1 mostró el mayor valor correspondiente a 9.9°C y la muestra SS1 con el menor valor de 9.3°C. La diferencia entre la temperatura promedio de las muestras de agua fue de 9.7°C y de las muestras de suelo y sedimentos fue de 9.6°C (Tabla 2-3).

Tabla 2-3: Caracterización física de las muestras de suelo y sedimentos

Muestra	pH	T°C
SS1	6.1	9.3
SS2	6.4	9.8
S3	6.3	9.9
S4	7.1	9.4

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

La temperatura ambiente del lugar de estudio fue de 10.5°C, en similitud con lo establecido en estudios de las lagunas, que indican que las mismas tienen una temperatura ambiente entre 9°C y 11°C (PDyOT Cebadas, 2015).

Los valores registrados concuerdan con información general preliminar acerca de los sistemas lacustres donde se menciona que los valores de pH tienen a presentar un rango entre 6.5 y 7.5 si no se ven afectados debido a la poca intervención humana (Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales, 2018).

3.2. Número de colonias bacterianas

Una vez realizada la siembra en superficie por duplicado e incubadas las muestras a 10°C, 19°C y 37°C durante 72 horas, existió crecimiento bacteriano en las tres temperaturas mencionadas independientemente del medio de cultivo utilizado (PCA, PCAI, PCAId), por lo que mediante criterios de selección se pudo evidenciar el crecimiento de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes.

Existió diferencia en el número de colonias en las tres temperaturas debido a el metabolismo lento que poseen las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes, mismas que forman colonias visibles en un rango de 3 a 10 días a un rango de temperatura de 7 a 12°C (Morita, 1975; Witter, 1961).

3.2.1. Medio agar PCA

La muestra A1 de agua a 19°C presentó el mayor número de colonias bacterianas con un total de 271 colonias, esta muestra fue recolectada cercana a la vía de acceso por lo que se puede relacionar la mayor carga bacteriana de esta muestra a la posible presencia de materia orgánica procedente de la actividad humana, mientras que en la muestra A3 de agua a 37°C presentó el menor número de colonias con un total de 2 colonias, por lo que se presume que la alta temperatura influyó en el crecimiento de las colonias (Tabla 3-4).

La muestra SS2 de sedimentos a 10°C presentó el mayor número de colonias bacterianas con un total de 86 colonias, esta muestra fue recolectada en una zona cercana a las orillas de la laguna por lo que se puede relacionar la mayor carga bacteriana a esto y a la temperatura de incubación en el laboratorio favoreciendo el crecimiento de las bacterias. En la muestra S2 de suelo a 37°C se presentó el menor número de colonias bacterianas con un total de 4 colonias, esta muestra fue recolectada a una mayor altitud en comparación con las otras muestras por lo que el menor número de colonias puede deberse a la poca intervención humana en el medio, además de la temperatura a la que fue sometida en laboratorio (Tabla 3-2).

Tabla 3-2: Número de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCA

Número de colonias							
Punto de muestro	Muestras de agua			Punto de muestreo	Muestras de suelo y sedimento		
	10°C	19°C	37°C		10°C	19°C	37°C
A1	78	271	74	SS1	51	36	10
A2	76	54	37	SS2	86	18	14
A3	182	119	2	S1	15	7	13
A4	90	95	224	S2	12	8	4
TOTAL	426	539	337	TOTAL	164	69	41

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Como se puede observar en el Gráfico 1-3, existió un mayor número de colonias en las muestras de agua, con un notario crecimiento en la muestra A1 a 19°C con respecto a las demás. El menor número de colonias se observó en la muestra S2 a 37°C.

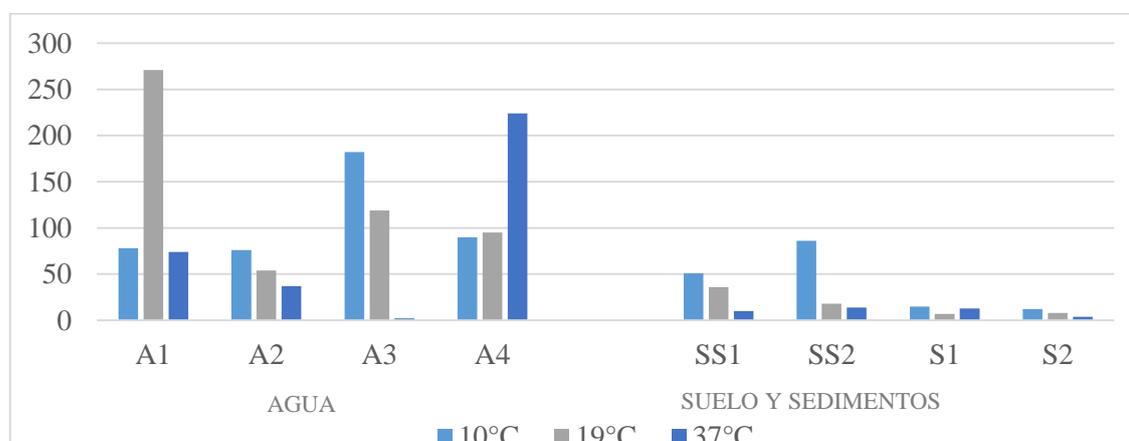


Gráfico 1-3: Número de colonias a las 72 horas en medio agar PCA

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

3.2.2. Medio agar PCAI

La muestra A3 de agua a 19°C presentó el mayor número de colonias bacterianas con un total de 96 colonias, esta muestra fue recolectada en una zona con mayor vegetación por lo que se puede relacionar la mayor carga bacteriana de esta muestra a la posible presencia de materia orgánica procedente de insectos y vegetación del lugar, mientras que en la muestra A4 de agua a 10°C presentó el menor número de colonias con un total de 4 colonias, por lo que se presume que no todas las bacterias se adaptaron a las condiciones de laboratorio y a la falta de carga orgánica presente en el lugar donde fue recolectada la muestra (Tabla 3-3).

La muestra SS1 de sedimentos a 10°C presentó el mayor número de colonias bacterianas con un total de 30 colonias, esta muestra fue recolectada en el acceso principal a las lagunas por lo que se puede relacionar la mayor carga bacteriana de esta muestra a la posible presencia de materia orgánica procedente de la actividad humana, mientras que en la muestra S1 de suelo a 37°C presentó el menor número de colonias con un total de 2 colonias, por lo que se presume que no todas las bacterias se adaptaron a las condiciones de laboratorio y a la poca adaptabilidad de las bacterias de crecer a altas temperaturas cuando su hábitat natural se encuentra a una mayor altitud en comparación con las otras muestras (Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Número de las colonias bacterias que crecieron en medio agar PCAI

Número de colonias							
Punto de muestro	Muestras de agua			Punto de muestreo	Muestras de suelo y sedimento		
	10°C	19°C	37°C		10°C	19°C	37°C
A1	51	73	22	SS1	30	12	5
A2	58	52	29	SS2	6	17	11
A3	79	96	45	S1	19	10	2
A4	4	74	50	S2	28	6	9
TOTAL	192	295	146	TOTAL	83	45	27

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Como se puede observar en el Gráfico 2-3, existió un mayor número de colonias en las muestras de agua, con un notario crecimiento en la muestra A3 a 19°C con respecto a las demás. El menor número de colonias se observó en la muestra de suelo S1 a 37°C.

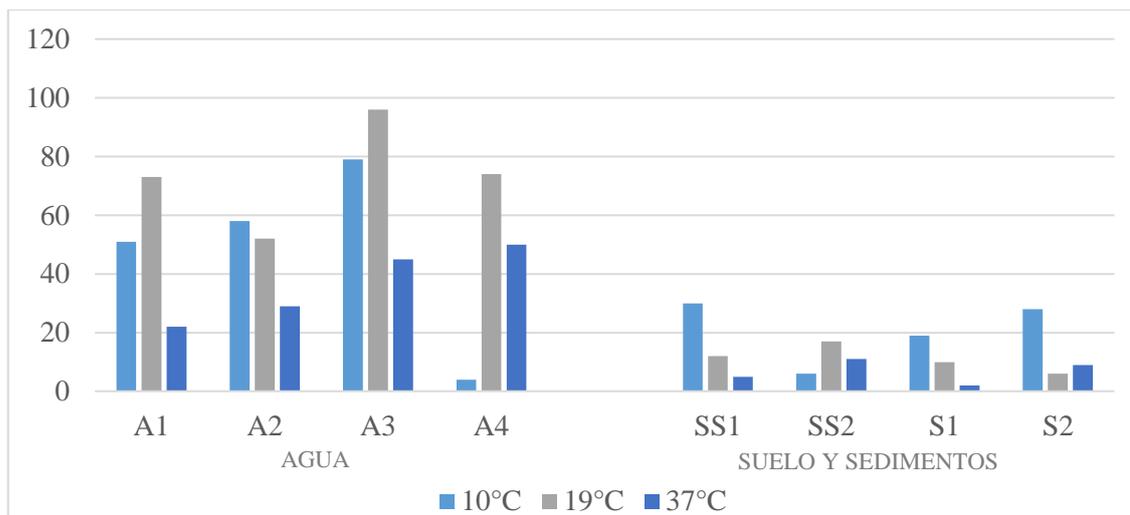


Grafico 2-3: Número de colonias bacterianas a las 72 horas en medio agar PCAI

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Al observar el bajo crecimiento bacteriano a 10°C, 19°C y 37°C con el medio de cultivo PCAI, en comparación con el crecimiento en los otros dos medios, se decidió no tomar en cuenta estas colonias bacterianas para las próximas experimentaciones a nivel de laboratorio.

3.2.3. Medio agar PCAId

La muestra A2 de agua a 37°C presentó el mayor número de colonias bacterianas con un total de 224 colonias, las bacterias de esta muestra se podrían considerar como psicrotolerantes por su temperatura de crecimiento, además se considera que la muestra presentó mayor carga orgánica por el lugar en la que se tomó; mientras que en la muestra A4 de agua a 10°C presentó el menor número de colonias con un total de 31 colonias, por lo que se presume la influencia de la ubicación del punto de muestreo, un sitio aguas adentro donde existe escasa presencia de sedimento y por lo tanto es un ambiente más oligotrófico aún.

La muestra S2 de suelo a 37°C presentó el mayor número de colonias bacterianas con un total de 91 colonias, las bacterias de esta muestra se podrían considerar como psicrotolerantes e incluso son capaces de sintetizar la proteína de la leche (caseína). La muestra SS1 de sedimentos a 10 °C presentó el menor número de colonias con un total de 5 colonias, mismo que se puede relacionar al sitio de muestreo ya que este es de difícil acceso por lo que no existe mayor intervención humana.

Tabla 4-3: Número de las colonias bacterianas que crecieron en medio agar PCAld

Número de colonias							
Punto de muestro	Muestras de agua			Punto de muestreo	Muestras de suelo y sedimento		
	10°C	19°C	37°C		10°C	19°C	37°C
A1	105	117	34	SS1	42	5	8
A2	67	98	224	SS2	34	51	18
A3	90	80	48	S1	23	15	7
A4	31	161	75	S2	34	24	91
TOTAL	293	456	381	TOTAL	133	95	124

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Como se puede observar en el Gráfico 3-3, existió un mayor número de colonias en las muestras de agua, con un notario crecimiento en la muestra A3 a 37°C con respecto a las demás. El menor número de colonias se observó en la muestra SS1 a 19°C.

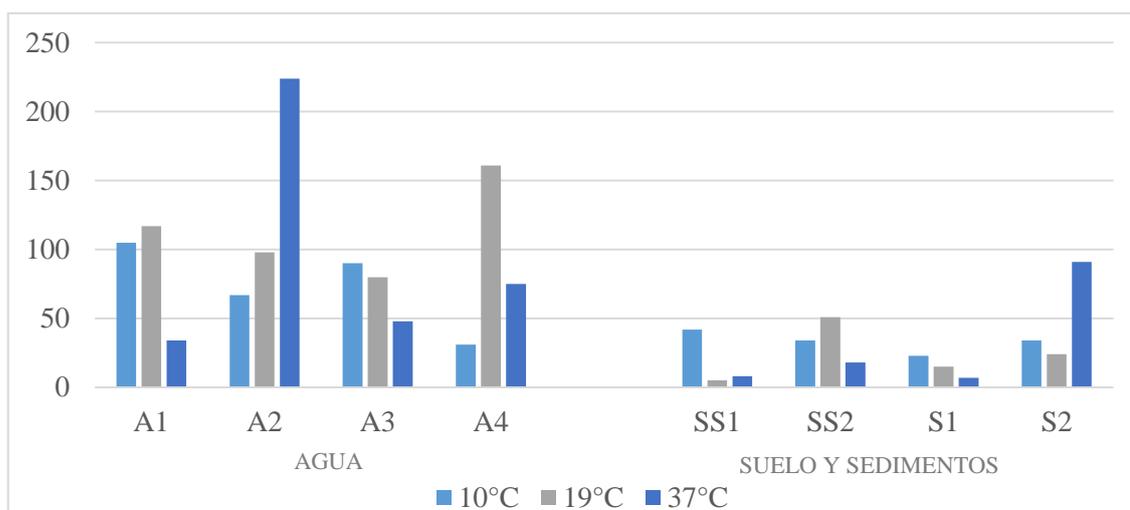


Gráfico 3-3: Número de colonias bacterianas a las 72 horas en medio agar PCAld

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

3.3. Determinación del índice de potencia de actividad enzimática

Los resultados del cálculo del índice de potencia tanto de actividad proteolítica como lipolítica, se detalla a continuación:

3.3.1. Actividad proteolítica

En las muestras de agua, el mayor IPP registrado de los clones bacterianos psicrófilos es el de la muestra A1 a 10°C correspondiente a CB9, con un IPP de 2.9; en la muestra A2, CB16 demostró un IPP de 2.3; en la muestra A3, CB1 presentó un IPP de 2.1; en la muestra A4, CB1 y CB3 registraron un IPP de 2.1. Por último, dentro de los psicrotolerantes el mayor IPP es de 1.3 que pertenece CB1 de la muestra A2 (Tabla 5-3).

A nivel de suelo y sedimento el mayor IPP registrado de los clones bacterianos psicrófilos es el de la muestra SS1 correspondiente a CB16 con un valor de 1.2; en la muestra SS2, CB6 con un IPP de 2.3; en la muestra S2, CB11 con un IPP de 2.1. Por último, dentro de los psicrotolerantes el mayor IPP es de 1.1 que pertenecen CB14, CB9 y CB11 de las muestras SS1 y S1 respectivamente (Tabla 5-3).

Tabla 5-3: Determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) de los clones bacterianos en el medio PCA1d

Temperatura	Muestras	Clon bacteriano	IP
10°C	A1	CB9	2.9
19°C		CB6	2.1
		CB8	1.6
		CB9	2.2
		CB11	1.7
		CB14	2.7
37°C	A2	CB1	1.3
10°C		CB3	1.2
		CB9	1.1
		CB11	1.4
		CB3	2.1
		CB4	1.5
		CB14	1.6
		CB16	2.3
		19°C	CB8
		CB6	1.3
37°C	A3	CB8	1.1
10°C		CB1	2.1
19°C		CB3	1.8

		CB8	1.4
		CB11	1.7
		CB14	2.6
		CB1	3.3
10°C	A4	CB3	2.1
		CB1	2.1
19°C		CB6	1.2
		CB14	2.0
		CB16	1.3
		CB16	1.7
		CB1	1.5
37°C	SS1	CB14	1.1
10°C		CB14	1.3
		CB16	1.2
19°C		CB1	1.3
		CB1	1.4
		CB6	1.5
		CB11	1.4
10°C	SS2	CB1	1.4
19°C		CB1	1.4
		CB3	2.0
		CB6	2.3
	CB8	1.5	
37°C	S1	CB9	1.1
		CB11	1.1
10°C	S2	CB8	2.0
19°C		CB11	2.1
		CB14	1.8
		CB16	1.7
	CB9	1.7	

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Aunque la muestra A1 de agua y la muestra S2 de suelo presentaron un mayor número de clones bacterianos (6 de 6) y (5 de 5), todos con un IPP $\geq 1,5$, los valores máximos del IPP fueron obtenidos en los clones bacterianos provenientes de la muestra A3 de agua y la muestra SS2 de sedimento (Tabla 6-3).

Tabla 6-3: Porcentaje de clones bacterianos con IPP mayor o igual a 1.5 en el medio PCAld

Muestra	Total de clones psicrófilos	Número de clones bacterianos con un IP \geq 1,5	%	Total de clones psicrotolerantes	Número de clones bacterianos con un IP \geq 1,5	%
A1	6	6	100	-	-	-
A2	7	4	67	2	-	-
A3	6	5	83	1	-	-
A4	7	5	71	-	-	-
SS1	6	1	17	1	-	-
SS2	5	3	60	-	-	-
S1	-	-	-	1	-	-
S2	5	5	100	-	-	-

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Como se puede observar en el Gráfico 4-3 el porcentaje de clones bacterianos con IPP mayor a 1.5 es el de las muestras A1 y S2 de agua y suelo respectivamente. Además, no se encontraron clones bacterianos clasificados como psicrotolerantes con un IPP mayor a 1.5.

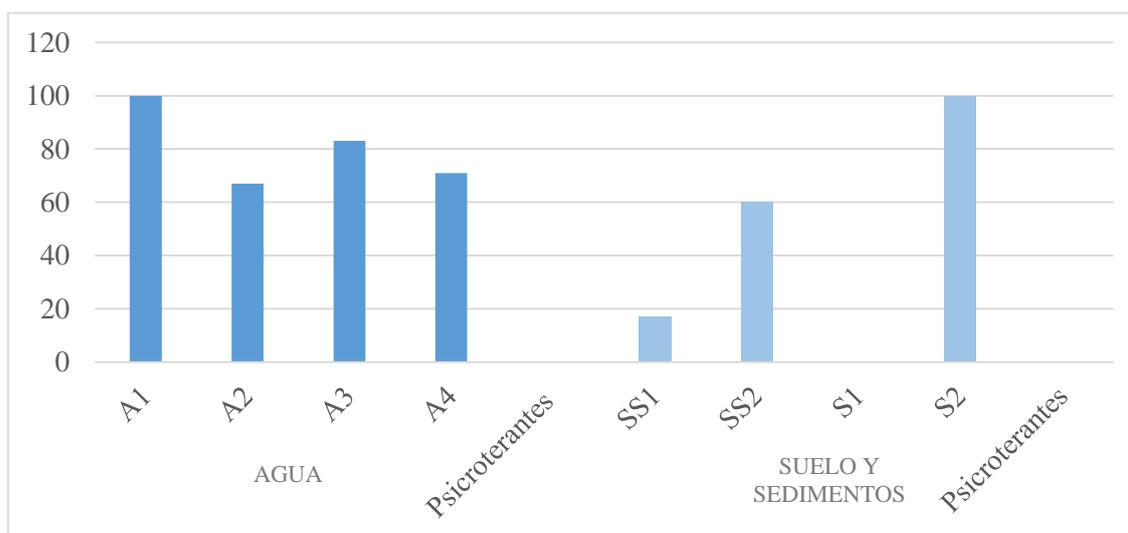


Gráfico 4-3: Porcentaje de clones bacterianos con un IPP mayor o igual a 1.5 por cada muestra en el medio PCAld

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

3.3.2. Actividad Lipolítica

En las muestras de agua, el mayor IPL registrado de los clones bacterianos psicrófilos de la muestra A1 es el correspondiente a CB8, con un IPP de 2.7; en la muestra A2, CB8 demostró un IPL de 1.8; en la muestra A3, CB9 presentó un IPP de 2.0; en la muestra A4, CB14 registró un

IPL de 1.5. Por último, dentro de los psicotolerantes el mayor IPL es de 1.7 que pertenece a CB3 de la muestra A2 (Tabla 7-3).

A nivel de suelo y sedimento, el mayor IPL registrado de los clones bacterianos psicrófilos de la muestra SS1 es el correspondiente a CB14 y CB11 con un valor de 1.8; en la muestra SS2, CB1 con un IPL de 1.8; en la muestra S2, CB16 con un IPL de 1.7. Por último, dentro de los psicotolerantes el mayor IPL es de 2.0 que pertenece a CB16 de la muestra S1 (Tabla 7-3).

Tabla 7-3: Determinación del índice de potencia de actividad lipolítica (IPL) de los clones bacterianos en el medio PCAao

Temperatura	Muestras	Clon bacteriano	\bar{IP}
10°C	A1	CB9	1.4
19°C		CB6	1.7
		CB8	2.7
		CB3	1.7
		CB14	2.5
		CB2	1.5
37°C	A2	CB3	1.7
10°C		CB8	1.8
		CB11	1.2
		CB14	1.3
		CB6	1.4
37°C	A3	CB3	1.1
19°C		CB8	1.3
		CB9	2.0
		CB3	1.7
19°C	A4	CB14	1.5
37°C		CB14	1.6
37°C	SS1	CB14	1.4
10°C		CB14	1.8
		CB16	1.5
19°C		CB6	1.5
		CB11	1.8
10°C	SS2	CB1	1.6
19°C		CB1	1.8
		CB8	1.7
		CB3	1.5
37°C	S1	CB9	2.0
10°C	S2	CB6	1.3
		CB8	1.3
19°C		CB11	0.8
		CB14	1.5
		CB16	1.7
		CB11	1.6

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Aunque los valores máximos del IPL fueron obtenidos en los clones bacterianos provenientes de las muestras A1 de agua y muestra S1 de suelo, las muestras A4, SS1 y SS2 presentaron un mayor número de clones aislados bacterianos (2 de 2), (4 de 4) y (4 de 4) respectivamente con $IPP \geq 1.5$ que corresponde al 100%, de igual manera los psicrotolerantes también presentaron un mayor número de clones bacterianos (Tabla 8-3).

Tabla 8-3: Porcentaje de clones bacterianos con un IPL mayor o igual a 1.5 en el medio PCAao

Muestra	Total de clones psicrófilos	Número de clones bacterianos con un $IP \geq 1.5$	%	Total de clones psicrotolerantes	Número de clones bacterianos con un $IP \geq 1.5$	%
A1	6	5	83	-	-	-
A2	4	1	25	1	1	100
A3	3	2	67	1	-	-
A4	1	1	100	1	1	100
SS1	4	4	100	1	-	-
SS2	4	4	100	-	-	-
S1	-	-	-	1	1	100
S2	6	3	50	-	-	-

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Como se puede observar en el Gráfico 5-3 el porcentaje de clones bacterianos con IPP mayor a 1.5 es el de las muestras A1 y S2 de agua y suelo respectivamente. Además, no se encontraron clones bacterianos clasificados como psicrotolerantes con un IPP mayor a 1.5.

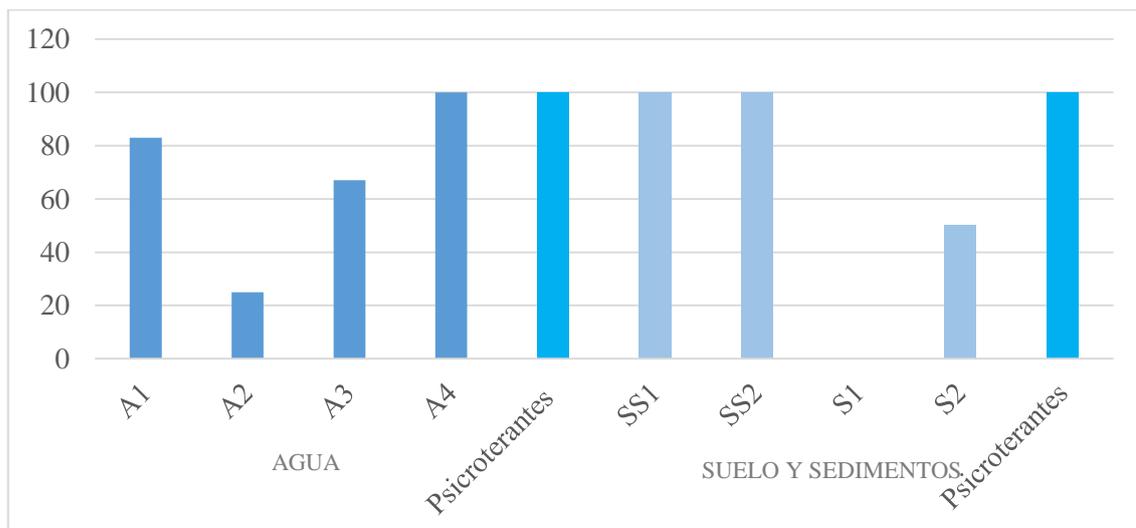


Gráfico 5-3: Porcentaje de clones bacterianos con un IPL mayor o igual a 1.5 por cada muestra en el medio PCAao

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Se ha comprobado que existen bacterias psicrófilas con actividad proteolítica en gran proporción, que además se desarrollan a bajas temperaturas. Estas poseen enzimas capaces de degradar proteínas como la caseína (Espejo & Pérez, 1978).

3.4. Evaluación microscópica de los clones bacterianos

Del total de clones bacterianos se seleccionaron 31 clones, basándose en sus características fenotípicas diferentes. De este grupo 28 clones fueron considerados como psicrófilos, mientras que los 3 restantes como psicotolerantes. Los clones bacterianos en su mayoría presentan forma irregular, con bordes ondulados y filamentosos, de color blanco y crema cuando son incubadas a una temperatura de 37°C, pero al incubarlas a 10°C y 19°C las bacterias presentan cambios en su coloración, puede ser que la temperatura sea un factor que influye en la morfología. La generación de pigmentos observables en los clones se hizo evidente al someter a diferentes cambios de temperaturas, pues los clones produjeron pigmentos violeta, amarillo, verde, rosado y verde amarillo (Tablas 9-3 y 10-3).

Tabla 9-3: Evaluación microscópica de los clones bacterianos del medio PCAld

Muestra	Temperatura	Clon	Gram	Tipo	Forma	Borde	Color	Diámetro de colonia (cm)
A1	19°C	CB11	-	Bacilos	Circular	Redondeado	Amarillo	1.9
	19°C	CB14	+	Cocos	Irregular	Ondulado	Violeta	1.9
A2	37°C	CB1	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Blanco	0.3
	10°C	CB11	+	Cocos	Irregular	Filamentoso	Blanco	0.6
	10°C	CB14	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Verde amarillo	1.8
A3	19°C	CB1	-	Bacilos	Puntiforme	Redondeado	Crema	0.8
	10°C	CB1	+	Cocos	Irregular	Ondulado	Amarillo	1.4
	19°C	CB3	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Amarillo	0.9
	19°C	CB11	-	Bacilos	Irregular	Filamentoso	Crema	1.2
	19°C	CB14	-	Bacilos	Circular	Redondeado	Amarillo	0.7
A4	19°C	CB1	+	Cocos	Irregular	Ondulado	Crema	1.4
SS1	19°C	CB6	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Crema	1.6
	10°C	CB16	+	Cocos	Irregular	Ondulado	Amarillo	0.9
SS2	19°C	CB1	+	Cocos	Puntiforme	Redondeado	Crema	1.1
	19°C	CB3	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Verde	1.9
	19°C	CB8	-	Bacilos	Circular	Redondeado	Rosado	2.2
S1	37°C	CB11	+	Cocos	Puntiforme	Redondeado	Crema	2.3
S2	19°C	CB11	-	Bacilos	Irregular	Filamentoso	Crema	1.2

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Tabla 10-3: Evaluación microscópica de los clones bacterianos del medio PCAao

Muestra	Temperatura	Clon	Gram	Tipo	Forma	Borde	Color	Diámetro de colonia (cm)
A1	19°C	CB8	-	Bacilos	Irregular	Redondeado	Crema	0.7
A2	19°C	CB6	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Crema	1.3
	10°C	CB11	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Blanco	1.4
	19°C	CB3	-	Bacilos	Puntiforme	Redondeado	Amarillo	1.4
	37°C	CB3	+	Cocos	Irregular	Ondulado	Blanco	0.7
A3	19°C	CB14	-	Bacilos	Irregular	Filamentoso	Crema	0.9
	37°C	CB14	+	Cocos	Irregular	Ondulado	Crema	1.4
A4	19°C	CB1	-	Bacilos	Circular	Redondeado	Crema	1.6
	19°C	CB3	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Amarillo	1.4
	19°C	CB8	+	Cocos	Irregular	Filamentoso	Blanco	0.6
	10°C	CB1	-	Bacilos	Irregular	Ondulado	Crema	1.8
SS1	10°C	CB8	+	Cocos	Puntiforme	Redondeado	Crema	1.3
	19°C	CB16	-	Bacilos	Irregular	Filamentoso	Blanco	1.6

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

En la Tabla 11-3 se observa el porcentaje de cocos y bacilos obtenido de la evaluación microscópica de los 31 clones bacterianos seleccionados de los medios PCAld y PCAao, 20 fueron identificados como bacilos Gram (-), representando el 64.52%, mientras que 11 fueron cocos Gram (+) siendo el 35.48% del total.

Tabla 11-3: Total de clones bacterianos Gram + y Gram -

Gram	Tipo	Total de clones bacterianos	Porcentaje de clones bacterianos
+	Cocos	11	35.48%
-	Bacilos	20	64.52%

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

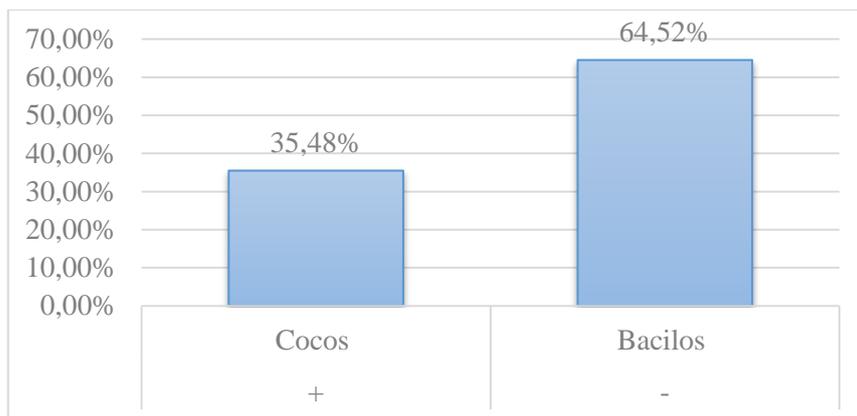


Grafico 6-3: Porcentaje de clones bacterianos según su forma y tinción

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Moreno (2017, p.47) reporta 18 bacilos Gram (-) representando el 94.74% y 1 coco Gram positivo siendo el 5.6% del total en su estudio realizado en la Laguna Amarilla que pertenece al Nevado el Altar de la provincia de Chimborazo, representando un mayor número de clones Gram (-). Sin embargo, en los dos estudios se reportan en mayor cantidad bacterias Gram (-), estos resultados coinciden con bibliografía encontrada donde se menciona que la mayoría de bacterias que se encuentran en ambientes fríos son Gram (-) (Carrillo & Audisio, 2007, p. 27).

Algunas bacterias producen pigmentos para protegerse frente a la luz visible y el ultravioleta cercano debido a que a medida que la altura se va haciendo mayor la radiación va aumentando. La pigmentación amarilla, naranja y roja se debe a carotenoides presentes en *Micrococcus*, la azul se debe a indigoina presente en *Pseudomonas* y la violeta se debe a violaicina presente en *Aeromonas* (Schlegel, 1997, pp. 84-88).

La selección de clones bacterianos para las pruebas bioquímicas y de resistencia a antibióticos fue realizada en base a la temperatura de crecimiento, tomando en cuenta solamente los clones que crecieron a 19°C.

3.5. Evaluación bioquímica de los clones bacterianos

Las pruebas de identificación preliminar y lectura inmediata más utilizadas en evaluaciones bioquímicas son la prueba de catalasa y oxidasa, mientras que las pruebas lentas con lectura de 10 a 48h más utilizadas por su economía son las pruebas con la utilización de ureasa y citratos (Bou et al., 2011, p. 601).

Tabla 12-3: Evaluación bioquímica de las pruebas catalasa, oxidasa, ureasa y citrato de los clones bacterianos del medio PCAld

Muestra	Temperatura	Clon aislado	Catalasa	Oxidasa	Ureasa	Citrato
A1	19°C	CB11	+	+	+	+
	19°C	CB14	+	+	+	-
A2	37°C	CB1	+	+	-	+
	10°C	CB11	-	-	+	-
	10°C	CB14	+	+	-	+
A3	19°C	CB1	+	-	+	+
	10°C	CB1	+	+	+	-
	19°C	CB3	+	+	-	-
	19°C	CB11	-	+	+	-
	19°C	CB14	-	-	-	-
A4	19°C	CB1	+	+	-	-
SS1	19°C	CB6	+	-	-	-
	10°C	CB16	+	+	+	+
SS2	19°C	CB1	-	-	+	-
	19°C	CB3	+	+	-	+
	19°C	CB8	+	+	-	+
S1	37°C	CB11	+	+	+	+
S2	19°C	CB11	+	+	-	+

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

Tabla 13-3: Evaluación bioquímica de las pruebas catalasa, oxidasa, ureasa y citrato de los clones bacterianos del medio PCAao

Muestra	Temperatura	Clon bacteriano	Catalasa	Oxidasa	Ureasa	Citrato
A1	19°C	CB8	+	-	+	+
A2	19°C	CB6	+	+	+	+
	10°C	CB11	+	-	+	-
A3	19°C	CB3	+	+	-	+
	37°C	CB3	-	-	-	+
A4	19°C	CB14	+	-	-	-
	37°C	CB14	+	+	+	+
SS2	19°C	CB1	-	-	+	+
	19°C	CB3	+	-	+	-
	19°C	CB8	-	+	+	-
	10°C	CB1	+	+	-	-
S2	10°C	CB8	-	-	+	+
	19°C	CB16	+	+	+	+

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

La prueba bioquímica de la catalasa es utilizada para identificar bacterias con la enzima catalasa capaz de descomponer peróxido de hidrógeno de los géneros *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. La prueba de oxidasa es utilizada para identificar bacterias con enzimas oxidasas capaces de los géneros *Pseudomona*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *neisseria* y *Enterobacter*. La prueba de citrato es utilizada para identificar bacterias capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono y crecimiento con alcalinidad de los géneros *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Rhanella*. La prueba ureasa es utilizada para la identificación de bacterias con la enzima ureasa capaz de desdoblar urea en dos moléculas de amoníaco de los géneros *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Oligella*, *Peptostreptococcus* y *Streptococcus* (MacFaddin, 2003, pp. 35–387).

Los resultados obtenidos en las Tablas 13-3 y 14-3 se cotejaron con información bibliografía en donde se obtiene que los clones bacterianos podrían pertenecer a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*.

En la tabla 14-3 se puede observar el porcentaje de clones bacterianos con respuesta positiva y negativa a las pruebas bioquímicas, siendo el porcentaje mayor de catalasa positiva.

Tabla 14-3: Evaluación total de clones bacterianos en catalasa, oxidasa, ureasa y citrato

Prueba bioquímica	Resultado	Evaluación total de clones bacterianos	Porcentaje de clones bacterianos
Catalasa	+	23	74.19%
	-	8	25.81%
Oxidasa	+	20	64.52%
	-	11	35.48%
Ureasa	+	18	58.06%
	-	13	41.94%
Citrato	+	18	58.06%
	-	13	41.94%

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

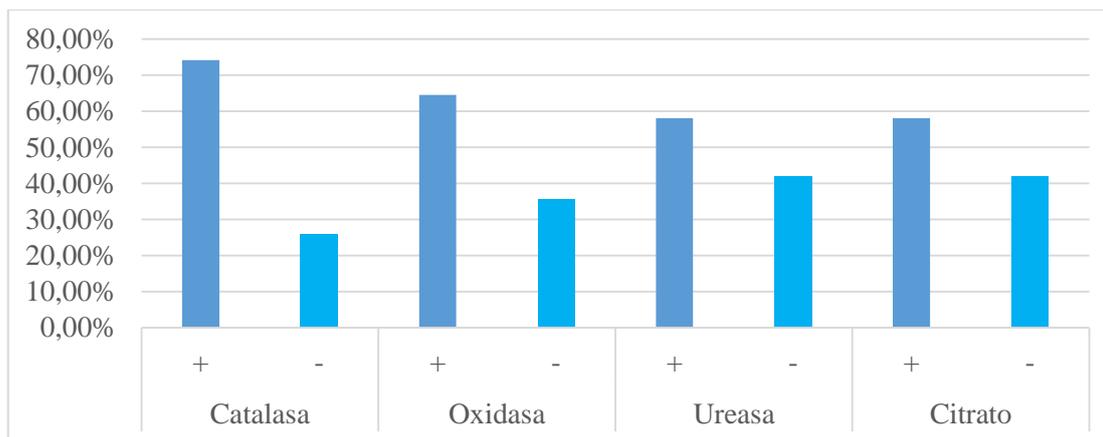


Grafico 7-3: Porcentaje de clones bacterianos sometidos de pruebas bioquímicas positivas y negativas

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

3.6. Pruebas de sensibilidad antibiótica

Los antibióticos utilizados fueron seleccionados según su comportamiento en bacterias Gram (+) y Gram (-), los antibióticos Penicilina (PEN) y Oxitetraciclina (OXI) son ampliamente utilizados para bacterias Gram (+), mientras que los antibióticos Gentamicina (GEN) y Cefalexina (CFL) son ampliamente utilizados en bacterias Gram (-). Es importante mencionar que los antibióticos son utilizados tanto para Gram (+) como para Gram (-), la diferencia radica en su potencial de acción (Bernal & Guzmán, 1984).

En la tabla 19-3 se puede observar el efecto de los antibióticos PEN, GEN, CFL y OXI en los clones bacterianos en el medio PCAld se evidenció en ocho clones sensibles a CFL y OXI, y resistentes a PEN y GEN. Además cinco clones fueron sensibles a GEN y OXI, y resistentes a PEN y CFL, mientras que cinco clones fueron sensibles a todos los antibióticos evaluados.

Tabla 15-3: Resistencia antibiótica de los clones bacterianos del medio PCAld

Muestra	Temperatura	Clon bacteriano	Antibióticos			
			PEN	GEN	CFL	OXI
A1	19°C	CB11	S	S	S	S
	19°C	CB14	S	S	S	S
A2	37°C	CB1	R	R	S	S
	10°C	CB11	R	R	S	S
	10°C	CB14	R	S	R	S
A3	19°C	CB1	R	R	S	S
	10°C	CB1	S	S	S	S
	19°C	CB3	R	S	R	S
	19°C	CB11	R	S	R	S
	19°C	CB14	S	S	S	S
A4	19°C	CB1	R	R	S	S
	19°C	CB6	R	R	S	S

S1	10°C	CB16	R	R	S	S
S2	19°C	CB1	R	S	R	S
	19°C	CB3	R	S	R	S
	19°C	CB8	R	R	S	S
SS1	37°C	CB11	R	R	S	S
SS2	19°C	CB11	S	S	S	S
S: Sensible R: Resistente OXI: Oxitetraciclina PEN: Penicilina GEN: Gentamicina CFL: Cefalexina						

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

En la tabla 16-3 se puede observar el efecto de los antibióticos PEN, GEN, CFL y OXI en los clones bacterianos en el medio PCAao se evidenció en tres clones sensibles a CFL y OXI, y resistentes a PEN y GEN. Además ocho clones fueron sensibles a GEN y OXI, y resistentes a PEN y CFL, un clon fue sensible a PEN y GEN, y resistente a CFL y OXI, mientras que un clon fue sensible a todos los antibióticos evaluados.

Tabla 16-3: Resistencia antibiótica de los clones bacterianos del medio PCAao

Muestra	Temperatura	Clon bacteriano	Antibióticos			
			PEN	GEN	CFL	OXI
A	19°C	CB8	R	S	R	S
B	19°C	CB6	R	S	R	S
	10°C	CB11	R	R	S	S
C	19°C	CB3	R	S	R	S
	37°C	CB3	S	S	S	S
D	19°C	CB14	S	S	R	R
	37°C	CB14	R	S	R	S
2	19°C	CB1	R	S	R	S
	19°C	CB3	R	S	R	S
	19°C	CB8	R	R	S	S
	10°C	CB1	R	S	R	S
4	10°C	CB8	R	R	S	S
	19°C	CB16	R	S	R	S
S: Sensible R: Resistente OXI: Oxitetraciclina PEN: Penicilina GEN: Gentamicina CFL: Cefalexina						

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

En el Gráfico 8-3 se observa que el 54.84% de los clones fueron sensibles al menos a dos antibióticos, siendo estos Gram (-), mientras que el 35.46% fueron sensibles al menos a un antibiótico, siendo estos Gram (+). El 9.68% de los clones fueron sensibles a todos los antibióticos a pesar de ser Gram (-).

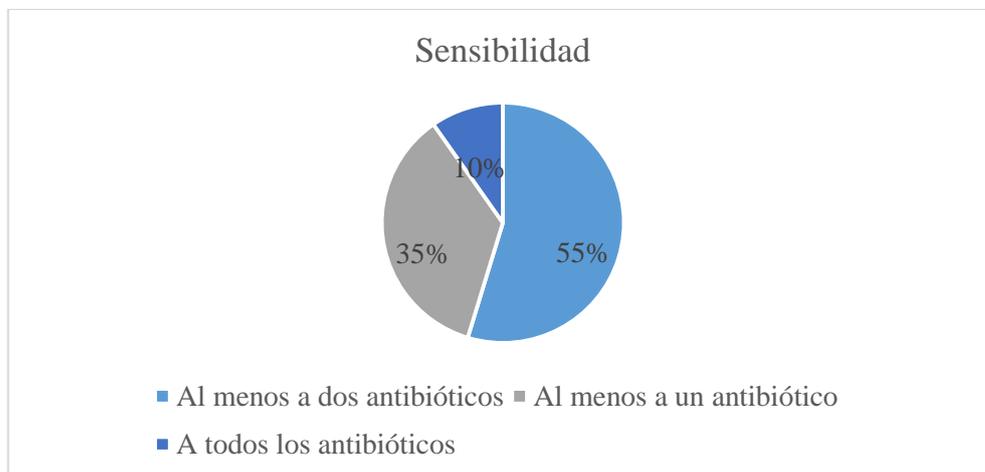


Gráfico 8-3: Sensibilidad de los clones bacterianos a antibióticos

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

La resistencia antimicrobiana se presenta por diversos mecanismos que son prevalentes en bacterias Gram (+) y Gram (-), estos corresponden a sistemas enzimáticos de degradación o modificaciones estructurales de la pared celular o del sitio blanco en el citoplasma o ADN (Fica, 2014). Las bacterias Gram (-) producen enzimas capaces de degradar antibióticos por lo que son consideradas más resistentes que las Gram (+) (Celis et al., 2017).

El género *Pseudomonas* en este estudio podría pertenecer a un psicrófilo que crece a una temperatura de 19°C y según UNAM, 2018, es un bacilo Gram (-), presenta sensibilidad a GEN y resistencia a PEN y OXI. Además según estudios de Guzmán, 2016, presenta actividad proteolítica, citrato, oxidasa, ureasa y catalasa positiva, y puede encontrarse en ambiente de agua, suelo, plantas, frutas y vegetales.

El género *Enterobacter* encontrado en el presente trabajo podría pertenecer a un psicrófilo que crece a una temperatura de 19°C y según estudios de Carroll et al., 2010, es un bacilo Gram (-), producen citrato y catalasa positiva, oxidasa negativa. A su vez Medina et al., 2016, demuestra que este género presenta mayor grado de resistencia a CFL y OXI.

El género *Serratia* encontrado en este estudio podría pertenecer a un psicrófilo que crece a una temperatura de 19°C y según estudios de MSDSONline, 2017, es un bacilo Gram (-) con

pigmentación rojo o rosado, se encuentra en agua, suelo y plantas, resistente a PEN y presenta actividad proteolítica.

El género *Flavobacterium* encontrado en este trabajo podría pertenecer a un psicrófilo que crece a una temperatura de 19°C y según estudios de León et al., 2009, es un bacilo Gram (-), sensible a GEN y OXI, se encuentra en ambientes de agua, suelo y plantas, produce catalasa y oxidasa.

El género *Micrococcus* encontrado en este estudio podría pertenecer a un psicrófilo que crece a una temperatura de 10°C y según estudios de Seija, 2017, es un coco Gram (+), presenta catalasa y oxidasa positiva, es resistente a PEN, además presenta actividad proteolítica.

El género *Aeromonas* encontrado en este trabajo podría pertenecer a un psicrotolerante por lo que se justifica que resiste la temperatura de 37°C y según estudios de Silva O, 2011, es un bacilo Gram (-), presenta catalasa, oxidasa y citrato positivo, ureasa negativa. Además según Castro et al., 2002, posee actividad proteolítica y lipolítica, pigmentación violeta, es sensible a OXI, resistente a PEN y CFL, los microorganismos de este género son considerados autóctonos del medio acuático o se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats naturales como ríos, lagos, suelo, mar, etc.

En la figura 1-3 se observa el diagrama de cajas que fue utilizado para presentar los efectos de los antibióticos sobre los clones bacterianos aislados, a continuación los resultados:

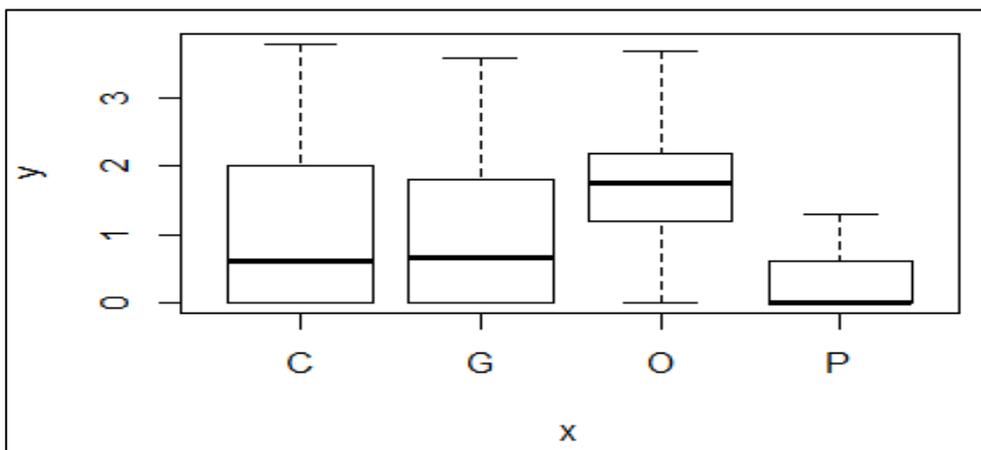


Figura1-3: Diagrama de cajas de efectos de los antibióticos en clones bacterianos.

Realizado por: Cerda Carolina., Pérez Pamela, 2019.

En el diagrama de cajas se puede observar que los clones bacterianos producen mayor resistencia al antibiótico PEN, mientras que ante el antibiótico OXI se produce menor resistencia.

La media del efecto en los clones bacterianos de PEN es de 0.48 cm, de CFL es de 0.93, de GEN es de 1.04 y de OXI es de 1.90.

Mediante análisis en el software estadístico R, se puede deducir que existe al menos un antibiótico que produce diferente efecto sobre los clones bacterianos aislados, en este caso la PEN que produce mayor resistencia por parte de los clones y la OXI es la que produce menor resistencia.

Los clones CB11 y CB14 de la muestra A1, CB14 de la muestra A3 de agua y CB11 de la muestra S1 de suelo son sensibles a todos los antibióticos estudiados.

CONCLUSIONES

Mediante la evaluación de las características físico-químicas de las muestras de agua, suelo y sedimento de las Lagunas Cuyuc y Colay se establecen los siguientes valores en promedio: pH 6.4, temperatura 9.7°C; conductividad eléctrica 72.4 μ Siems/cm de las muestras de agua; mientras que en las muestras de sedimento y suelo se tuvo los siguientes valores en promedio: pH 6.6 y temperatura 9.6 °C.

Se obtuvo un total de 31 clones bacterianos provenientes de las muestras de agua, sedimento y suelo de las Lagunas Cuyuc y Colay, seleccionados en base a la morfología de las colonias y a su grado de desarrollo en un rango térmico de 10°C a 37°C.

Los clones bacterianos fueron caracterizados fenotípicamente, obteniéndose bacilos Gram negativos en mayor proporción con respecto a coco Gram positivos; en las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa se obtuvo resultados positivo en mayor proporción, mientras que para ureasa y citrato se tuvo resultados tanto positivo como negativo en igual proporción; la resistencia antibiótica en bacilos Gram (-) es predominantemente enzimática, esto hace que las bacterias produzcan enzimas capaces de degradar el antibiótico por una serie de reacciones tomándolo del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior para evitar que llegue al sitio de acción (Tafur et al., 2008), mientras que en cocos Gram (+) es predominantemente de tipo estructural en la pared celular o en componentes citosólicos como los ribosomas (Fica, 2014).

El mayor IPP de las muestras de agua corresponde al CB9 del grupo de psicrófilos, con un valor de 2.9, mientras que dentro de los psicrotolerantes el mayor IPP es de 1.3 que pertenece al CB1. En el caso de las muestras de suelo y sedimento, el mayor IPP corresponde al CB6 del grupo de los psicrófilos, con un valor de 2.3, mientras que dentro de los psicrotolerantes el mayor IPP es de 1.1 que pertenecen a los CB14, CB9 y CB11. El mayor IPL de las muestras de agua corresponde al CB8 con un valor de 2.7 del grupo de psicrófilos, dentro de los psicrotolerantes el mayor IPL es de 1.7 que pertenece al CB3. En el caso de las muestras de suelo y sedimento, el mayor IPL corresponde a los CB11 con un valor de 2.1 del grupo de psicrófilos, mientras que dentro de los psicrotolerantes el mayor IPL es de 2.0 que pertenece al CB16.

Los clones bacterianos presentaron mayor resistencia a la Penicilina y menor sensibilidad a la Oxitetraciclina, esto podría deberse a que la resistencia antibiótica está relacionada con mutaciones en genes cromosomales o con la transferencia de elementos genéticos extracromosomales como son los plásmidos (Celis et al., 2017), la mayoría de las bacterias poseen

plásmidos que les confieren ciertas propiedades fenotípicas para adaptarse a un medio, estos plásmidos contienen genes que codifican enzimas capaces de degradar algunos antibióticos generando una presión selectiva para mantener a la bacteria resistente e inducir una transferencia horizontal de genes de resistencia (Betancor et al., 2008).

RECOMENDACIONES

Procurar no afectar significativamente la zona de muestreo para obtener muestras representativas del lugar.

Crear una base de datos en bioprospección de Sistemas Lacustres.

Es necesaria la creación de inventarios genéticos a partir de los clones bacterianos aislados para posteriores estudios biotecnológicos y ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

ATLAS, R. y BARTHA, R., *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 14ª ed. Madrid España. 2002, pp.329-376.

ANDRADE, L. Cultivo y utilización de microorganismos fotosintéticos psicrófilos obtenidos de la Laguna de La Caldera en Parque Nacional de Sierra Nevada para su potencial utilización en biotecnología. [en línea], 2017. [Consulta: 15 diciembre 2019]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/26529580.pdf>.

ARGENBIO. Los extremófilos. [en línea], 2015. [Consulta: 28 diciembre 2019]. Disponible en: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=192>.

BERNAL, M. y GUZMÁN, M.“El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer”. *Biomédica* [en línea], 1984, (Colombia) 15(1), pp. 112-121. [Consulta: 10 de agosto 2019]. ISSN 0120-4157. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891/1917>

BETANCOR, L., GADEA, M. y FLORES, K. Genética Bacteriana. *Instituto de Higiene. Universidad de la República*, 2008, vol. 30, no. 4, pp. 35-56.

BIOSER. Plate Count Agar (PCA). *Bioser* [en línea], 2019. [Consulta: 28 enero 2020]. Disponible en: <https://www.bioser.com/productos/plate-count-agar-pca-129p/>.

BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J.A. y VALDEZATE, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2011, vol. 29, no. 8, pp. 601-608.

BRITANIA. Simmons Citrato Agar. *Laboratorio Britania* [en línea], 2019. [Consulta: 28 enero 2020]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a29779bd2be8.pdf.

CARRILLO, L. y AUDISIO, M.C. *Manual de Microbiología de Alimentos* [en línea], 2007. S.l.:s.n. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/0%20portada%20m anual.pdf>.

CARROLL, K., HOBDEN, J., MILLER, et. al. Bacilos gramnegativos entéricos (Enterobacteriaceae). *Microbiología Médica* [en línea], 2010, 25ª. México., pp. 213-225. ISBN

978-607-15-1270-0. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1837§ionid=128954408>.

CASTILLO, F., ROLDÁN, M., BLASCO, R., HUERTAS, M., CABALLERO, F., MORENO, C. y LUQUE, M. *Biotecnología Ambiental* [en línea], 2005. Primera. Madrid: s.n. ISBN978-84-7360-395-9. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/392554178/Biotecnologia-a-Ambiental-de-Francisco-Castillo>.

CASTRO, G., AGUILERA, Ma.G., GIONO, S., HERNÁNDEZ, C., RODRÍGUEZ, M., SOLER, L., APARICIO, G. y FIGUERAS, M.J. El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México?, 2002, vol. 22, no. 4, pp. 206-216.

CELIS, Y., RUBIO, V. y CAMACHO, M. Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2017, vol. 19, no. 2, pp. 105-117. ISSN 0123-3475.

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AMBIENTAL Metodología para la Toma de Muestra de Microorganismos Altamente Patógenos en Las Matrices Ambientales Aire, Agua y Suelo/Sedimento. [en línea], 2018. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España: s.n., pp. 70-74. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-f06e501959>.

CHÁVEZ, C. *Inventario ornitológico y su incidencia en el ecoturismo en Santa Rosa Parroquia Químiag Cantón Riobamba Provincia de Chimborazo durante el año Septiembre 2010-Marzo 2011* [en línea], 2014. Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/2610/1/MA-ECO-953.pdf>.

CIMERA ESTUDIOS APLICADOS. *Bioprospecciones en ambientes acuáticos extremos* [en línea]. 2013. S.l.: s.n. Disponible en: <http://www.cimera.es/en/bioprospecciones-en-ambientes-acuaticos-extremos/>.

CORREA, J.F. *Comparación de la biodiversidad de hongos psicrófilos y psicrótrofos presentes en ecosistemas glaciares de la Antártida y el Chimborazo* [en línea], 2013. Am: Universidad Técnica de Ambato. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6632/1/BQ%2041.pdf>.

D'AMICO, S., COLLINS, T., MARX, J.-C., FELLER, G. y GERDAY, C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. [en línea], 2006, vol. 7, no. 4. DOI 10.1038/sj.embor.7400662. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1456908/>.

DEMIRJIAN, D., MORÍS, F. y CASSIDY, C. Enzymes from extremophiles., 2001, pp. 144-151.

DÍAZ, C. *Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyaca* [en línea], 2011. Bogotá, Colombia: s.n. Disponible en:
extension://oemmnclbldboiebfnladdacbfmadadm/https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis719.pdf.

ESPEJO, J. y PÉREZ, D. Estudio comparativo entre el método estándar y la técnica mejorada con SMCA para la detección y recuento de bacterias proteolíticas. *Archivos de zootecnia*, 1978, vol. 27, no. 107, pp. 291-300.

FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, C., SAÉZ, J. y VALDEZATE, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2010, pp. 1-52. ISSN 978-84-614-7932-0.

FICA, A. Resistencia antibiótica en bacilos Gram negativos, cocáceas Gram positivas y anaerobios. Implicancias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 2014, vol. 25, no. 3, pp. 432-444. ISSN 0716-8640. DOI 10.1016/S0716-8640(14)70060-4.

FULLANA, N. *Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura* [en línea], 2014. Uruguay: Universidad de la República. Disponible en: <http://www.iau.gub.uy/wp-content/uploads/2018/11/Fullana-2014.pdf>.

GADM CANTÓN GUAMOTE. *PD y OT GUAMOTE* [en línea], 2014. S.l.: s.n. Disponible en: <http://www.gadguamote.gob.ec/concejocantonal/plan-de-desarrollo-y-ordenamiento-territorial/1595-pd-y-ot-guamote/file.html>.

GARZÓN, D. *Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida* [en línea], 2013. Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3179/1/BQ37.pdf>.

GARZÓN, V.M. *Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia.* [en línea], 2015. Chía, Colombia: Universidad de La Sabana. Disponible en:
<https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/22883/Vivian%20Marcela%20Garz%c3%b3n%20Rubiano%20%28tesis%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

GRUPO DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. Características físicas y organolépticas. *Ambientum* [en línea], 2018. Disponible en: https://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/aguas/caracteristicas_fisicas_y_organolepticas.asp.

GUZMÁN, A. *Identificación de Pseudomona Aeruginosa en el equipo de anestesia inhalatoria en 20 clínicas y hospitales veterinarios de la ciudad de Quito mediante estudios microbiológicos* [en línea], 2016. Quito: Universidad de las Américas. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/5247/5/UDLA-EC-TMVZ-2016-02.pdf>.

HERNÁNDEZ, M. Antibiograma - Prácticas de Microbiología. [en línea], 2018. [Consulta: 29 enero 2020]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/estudio-de-la-sensibilidad-a-antimicrobianos/antibiograma>.

HORIKOSHI, K. *Extremophiles Hand* [en línea], 2011. Japón: s.n. Disponible en: <http://bio-engineering.ir/wp-content/uploads/2017/03/Extremophiles-handbook.pdf>.

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *NTE INEN 2169:2013 Agua. Calidad del Agua. Muestreo. Manejo y Conservación de muestras* [en línea], 2013. S.l.: s.n. Disponible en: <http://www.trabajo.gob.ec/wp-content/uploads/2012/10/NTE-INEN-2169-AGUA.-CALIDAD-DEL-AGUA.-MUESTREO.-MANEJO-Y-CONSERVACION%20DE-MUESTRAS.pdf>.

INTERNATIONAL STANDARD. *ISO 10381-2: Soil quality-Sampling-Part 2: Guidance on sampling techniques* [en línea], 2002. S.l.: s.n. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10381:-2:ed-1:v1:en>.

LABOQUIMA. Tiras de la Oxidasa para microbiología. *Laboquimia* [en línea], 2018. Disponible en: http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/PANREAC_Tiras_de_la_oxidasa.pdf.

LEÓN, J., ÁVALOS, R. y PONCE, M. *Flavobacterium psychrophilum y su patología en alevines de Onchorhynchus mykiss del centro piscícola El Ingenio, Huancayo, 2009*, pp. 117-124.

LÓPEZ, J. y SORIA, L., 2018. *Evaluación prospectiva de la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las aguas termales de Los Ilinizas, Provincia de Cotopaxi.* [en línea], 2018. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10419/1/236T0389.pdf>

LÓPEZ JÁCOME, L.E., HERNÁNDEZ DURÁN, M., COLÍN CASTRO, C.A., ORTEGA PEÑA, S., CERÓN GONZÁLEZ, G. y FRANCO CENJADAS, R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 2014, vol. 3, no. 1, pp. 10-18.

MACFADDIN, J.F., 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. S.l.: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-1572-3.

MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER, J. *Biología de los Microorganismos* [en línea], 2010. 13a. edición. S.l.: s.n. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/128794514/Biologia-de-los-Microorganismos-Brock-10ed-pdf>.

MAE. Parque Nacional Sangay. *Ministerio del Ambiente* [en línea], 2014. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-sangay/>.

MEDINA, C., MORALES, S. y NAVARRETE, M., 2016. Resistencia Antibiótica de Enterobacterias Aisladas de monos (Ateles, Callicebus y Logothrix) en Semicautiverio en un centro de Rescate, Perú. , pp. 418-426.

MICROKIT. Mueller Hinton Agar. *Microkit: Medios de Cultivo* [en línea], 2016. [Consulta: 28 enero 2020]. Disponible en: <http://www.medioscultivo.com/mueller-hinton-agar/>.

MORENO, L. *Caracterización de cepas bacterianas de la Laguna Amarilla perteneciente al nevado El Altar en la provincia de Chimborazo* [en línea], 2017. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7877/1/236T0302.pdf>.

MORITA, R., 1975. Psychrophilic Bacteria. , pp. 144-167.

MSDSONLINE. Serratia spp. *MSDSonline-Free Safety Data Sheet Index* [en línea], 2017. [Consulta: 6 enero 2020]. Disponible en: <https://www.msdsonline.com/resources/sds-resources/free-safety-data-sheet-index/serratia-spp/>.

NEOGEN. Urea Agar Base. *Foodsafety* [en línea], 2019. Disponible en: <https://foodsafety.neogen.com/en/urea-agar-base>.

NUÑEZ, P. Microorganismos extremófilos: enzimas y aplicaciones. *Prezi* [en línea], 2015. Disponible en: https://prezi.com/casrg1_ld_xz/microorganismos-extremofilos-enzimas-y-aplicaciones/.

OLIART, R.M., MANRESA, Á. y SÁNCHEZ, M.G., 2016. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. , pp. 79-90. ISSN 2007-7521.

OLIVAS, E. y ALARCÓN, L. *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología básica y microbiología de alimentos* [en línea], 2011. S.l.: s.n. Disponible en: <http://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011297.pdf>.

PDyOT CEBADAS. *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial Cebadas* [en línea], 2015. S.l.: s.n. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/0660818930001_PDyOT%20Consolidado_final_29-10-2015_23-07-05.pdf.

RAMÍREZ, J. y AYALA, M., 2014. Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria*, vol. 15, no. 12, pp. 1-13. ISSN 1607 - 6079.

RAMÍREZ, N., SERRANO, J.A. y SANDOVAL, H. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. , 2006, vol. 36, no. 3, pp. 56-71. ISSN 1870-0195.

RODRÍGUEZ, F. Prueba de la Catalasa. *Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico* [en línea], 2018a. Disponible en: <https://www.franrzm.com/prueba-de-la-catalasa/>.

RODRÍGUEZ, F. Prueba de la ureasa. *Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico* [en línea], 2018b. Disponible en: <https://www.franrzm.com/prueba-de-la-ureasa/>.

RODRÍGUEZ, Z., BOUCOURT, R., RODRÍGUEZ, J., ALBELO, N. y NUÑEZ, O. Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. *F.R.*, 2006, vol. 40, pp. 349-354. ISSN 0034-7485.

SCHLEGEL, H. *Microbiología general* [en línea], 1997. Barcelona: Ed. Omega. ISBN 978-84-282-1030-0. Disponible en: <https://biolprocariotas.files.wordpress.com/2010/03/microbiologia-general.pdf>.

SEIJA, V. *Cocos Gram Positivos: Aspectos prácticos* [en línea], 2017. S.l.: s.n. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>.

SILVA O., F. *Aeromonas spp.* *Revista chilena de infectología*, 2011, vol. 28, no. 2, pp. 157-158. ISSN 0716-1018. DOI 10.4067/S0716-10182011000200008.

SORIA, V., SOLARI, A., CABOT, S., VARELA, H. y LOPERNA, L. Evaluación de bacterias Antárticas como potenciales productoras de lipasas de interés industrial. *Scribd* [en línea], 2010.

Disponible en: <https://es.scribd.com/document/33014692/Evaluacion-de-bacterias-Antarticas-como-potenciales-productoras-de-lipasas-de-interes-industrial>.

TAFUR, J.D., TORRES, J.A. y VILLEGAS, M.V. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio*, 2008, vol. 12, no. 3, pp. 227-232. ISSN 0123-9392.

TORTORA, G., FUNKE, B. y CASE, C., 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9ª: s.n.

UNAM. Pseudomonas spp. (Diferente de B. Mallei y B. Pseudomallei). *Bioseguridad* [en línea], 2018. Disponible en:

http://depa.fquim.unam.mx/bioseguridad/agentes/bacterias/bac_pseudo.html.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. Práctica 6: Antibiograma. *Microbiología general y bucal*. [en línea], 2018. Disponible en:

http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html.

VILLALTA, J. *Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile (Continente Antártico)* [en línea], 2013. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Disponible en:

http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3917/1/Estudio%20polifásico%20de%20bacterias%20psicrófilas%20colectadas%20en%20la%20isla%20Greenwich%20c%20Bah%C3%ADa%20Chile%20_Villalta%20Jose.pdf.

WITTER, L. Psychrophilic Bacteria-A Review. *Journal od Dairy Science*, 1961, vol. 44, no. 6, pp. 983-1015.

ANEXOS

ANEXO A: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

a)



b)



c)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela </p>	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO		
a. Peso de Agar PCA. b. Disolución de PCA en agua destilada. c. Calentamiento del preparado.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			1	1:1	09/07/2019

ANEXO B: LUGAR DE MUESTREO

d)



e)



f)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela </p>	LUGAR DE MUESTREO		
d. Lagunas Cuyuc y Colay. e. Muestreo de agua. f. Muestro de sedimentos.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			2	1:1	10/07/2019

ANEXO C: SIEMBRA DE CEPAS BACTERIANAS

g)



h)



i)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela </p>	SIEMBRA DE CEPAS BACTERIANAS		
g. Plaqueo en cajas Petri. h. Siembra directa en superficie. i. Siembra en superficie con dilución 10^{-3}	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			3	1:1	10/07/2019

ANEXO D: RECUENTO DE CEPAS BACTERIANAS

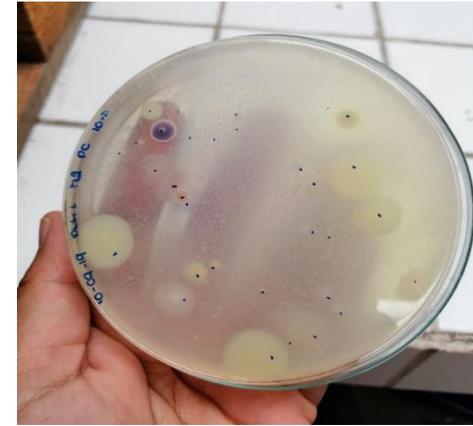
j)



k)



l)



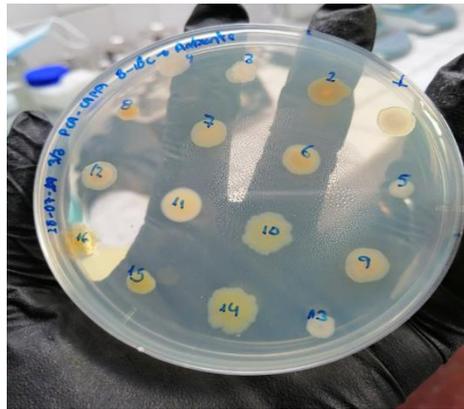
NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela	RECUENTO DE CEPAS BACTERIANAS		
j. UFC en medio PCA+AD. k. UFC en medio PCA+AL. l. UFC en medio PCA+LD.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			4	1:1	15/07/2019

ANEXO E: CEPAS BACTERIAS ESTABILIZADAS

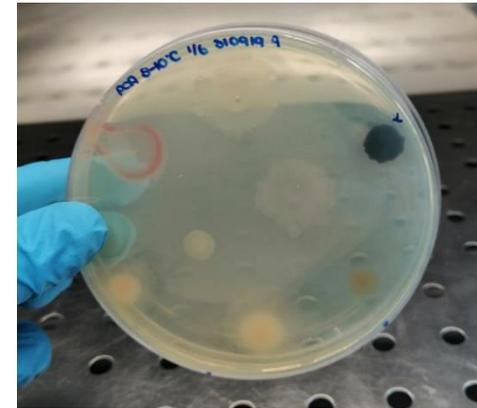
m)



n)



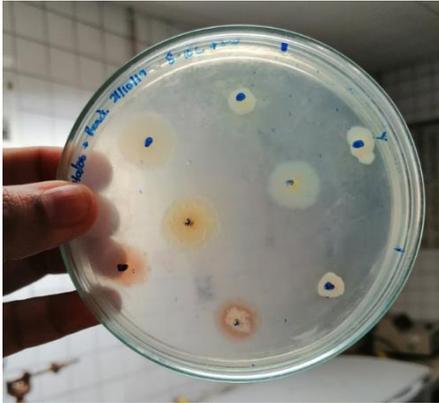
o)



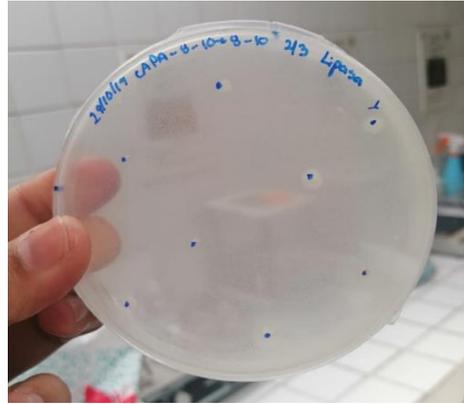
NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela </p>	CEPAS BACTERIANAS ESTABILIZADAS		
m. Primer repique (48 puntos). n. Segundo repique (16 puntos). o. Tercer repique (8 puntos).	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			5	1:1	18/07/2019

ANEXO F: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA Y PROTEOLÍTICA

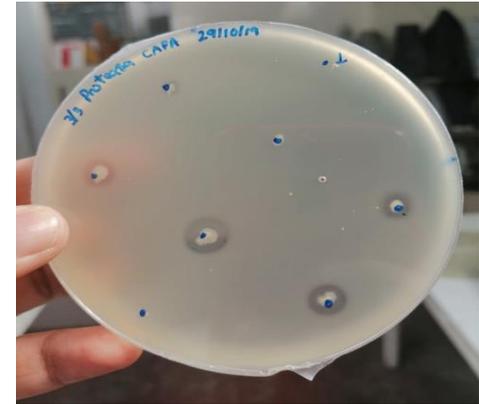
p)



q)



r)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela </p>	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA Y PROTEOLÍTICA		
p. Reactivación de halos. q. Actividad lipolítica r. Actividad proteolítica.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			6	1:1	21/10/2019

ANEXO G: MEDICIÓN DEL ÍNDICE DE POTENCIA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

s)



t)



u)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela </p>	MEDICIÓN DEL ÍNDICE DE POTENCIA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA		
s. Control para comparar el índice de potencia. t. Medición del índice de potencia lipolítica. u. Medición del índice de potencia proteolítica.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			7	1:1	29/10/2019

ANEXO H: AISLAMIENTO DE CLONES

v)



w)



x)



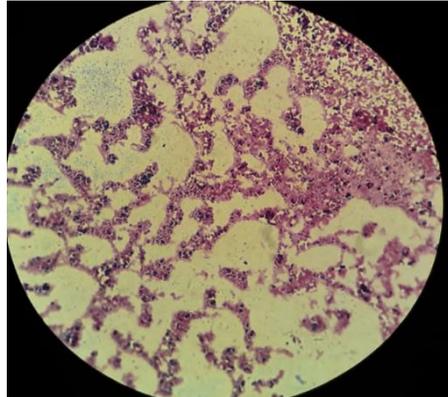
NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela	AISLAMIENTO DE CLONES		
v. Selección de cepa bacteriana. w. Siembra por agotamiento en estrías. x. Cepa bacteriana aislada.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
		8	1:1	05/11/2019	

ANEXO I: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE CLONES BACTERIANOS

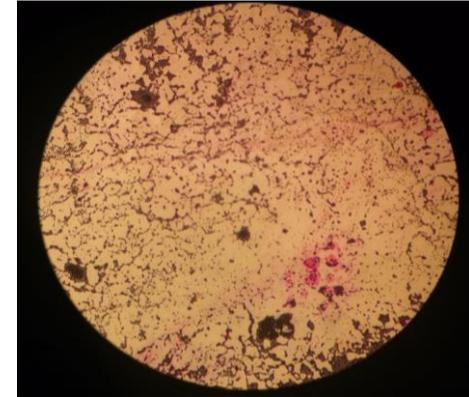
y)



z)



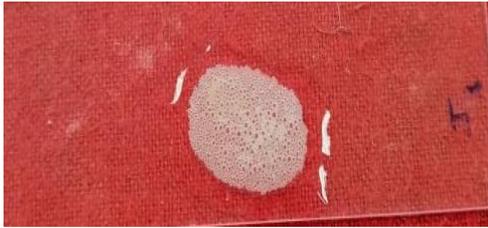
aa)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p align="center"> ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela </p>	CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE CLONES BACTERIANOS		
y. Observación en el microscopio. z. Cocos positivos. aa. Bacilos negativos.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			9	1:1	08/11/2019

ANEXO J: PRUEBAS BIOQUÍMICAS I

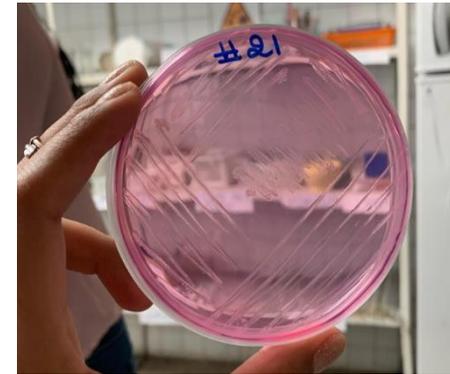
bb)



cc)



dd)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela</p>	PRUEBAS BIOQUÍMICAS I		
bb. Prueba catalasa positiva. cc. Prueba oxidasa positiva. dd. Prueba ureasa positiva.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
			10	1:1	11/11/2019

ANEXO K: PRUEBAS BIOQUÍMICAS II

ee)



ff)



gg)



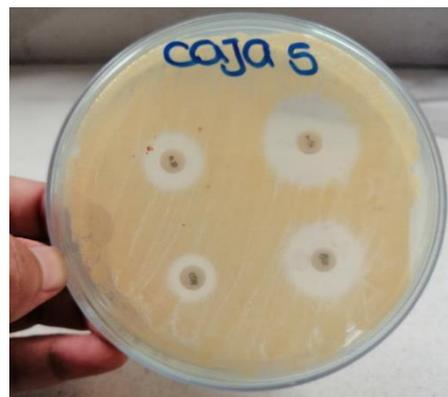
NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela	PRUEBAS BIOQUÍMICAS II		
ee. Prueba ureasa negativa. ff. Inoculación prueba citrato. gg. Prueba citrato positiva (izquierda) y negativa (derecha).	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar		LÁMINA	ESCALA	FECHA
		11	1:1	11/11/2019	

ANEXO L: ANTIBIOGRAMA

hh)



ii)



jj)



NOTAS:	CATEGORIA DEL DIAGRAMA:	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO	ANTIBIOGRAMA		
hh. Ubicación de discos de antibióticos. ii. Sensibilidad a todos los antibióticos. jj. Sensible a dos antibióticos y resistente a dos antibióticos.	<input type="checkbox"/> Aprobado <input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Certificado <input type="checkbox"/> Por aprobar <input type="checkbox"/> Información <input type="checkbox"/> Por calificar	FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL ELABORADO POR: Cerda Morocho Andrea Carolina Pérez Vélez Yolanda Pamela	LÁMINA	ESCALA	FECHA
			12	1:1	12/11/2019

ANEXO M: ANOVA SOFTWARE ESTADÍSTICO R

```
> regresion <- aov (SENSIBILIDAD~ANTIBIOTICO)
> summary(regresion)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
ANTIBIOTICO  3  35.56  11.855  13.56 1.71e-07 ***
Residuals 100  87.42   0.874
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Realizado por: Cerda Morocho, Carolina y Pérez Vélez, Pamela, 2019.

ANEXO N: PRUEBA TUKEY SOFTWARE ESTADÍSTICO R

```
> TukeyHSD(regresion,"ANTIBIOTICO")
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = SENSIBILIDAD ~ ANTIBIOTICO)

$ANTIBIOTICO
      diff      lwr      upr    p adj
G-C -0.1076923 -0.7852180  0.569833409 0.9757387
O-C  0.8538462  0.1763204  1.531371871 0.0073869
P-C -0.7923077 -1.4698334 -0.114781975 0.0150448
O-G  0.9615385  0.2840127  1.639064178 0.0019199
P-G -0.6846154 -1.3621411 -0.007089668 0.0466589
P-O -1.6461538 -2.3236796 -0.968628129 0.0000000
```

Realizado por: Cerda Morocho, Carolina y Pérez Vélez, Pamela, 2019.

**ANEXO O: DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE POTENCIA DE ACTIVIDAD
PROTEOLÍTICA (IPP)**

Temperatura	Muestra		Clon bacteriano	Halo de la colonia (cm)	Halo de hidrólisis (cm)	IP	<u>IP</u>
10°C	Agua	A	CB9	1.2	3.2	2.7	2.9
				1.1	3.4	3.1	
			CB6	0.9	2.4	2.7	2.1
				1.2	1.9	1.6	
			CB8	1.2	2.2	1.8	1.6
				1.7	2.3	1.4	
19°C			CB9	0.8	2.2	2.8	2.2
				1.2	1.9	1.6	
			CB11	1.1	1.6	1.5	1.7
				0.7	1.4	2.0	
			CB14	1.3	4.4	3.4	2.7
				0.2	0.4	2.0	
37°C		B	CB1	2.1	2.7	1.3	1.3
				2.3	2.9	1.3	
			CB3	2.3	2.6	1.1	1.2
				3.1	3.8	1.2	
	CB9		1.8	2.1	1.2	1.1	
			1.6	1.8	1.1		
	CB11		1.2	1.6	1.3	1.4	
			1.3	1.8	1.4		
10°C	CB3		0.5	0.9	1.8	2.1	
			0.9	2.2	2.4		
			0.6	1.1	1.8	1.5	
			2.4	2.9	1.2		
	CB14	0.7	0.9	1.3	1.6		
		0.8	1.6	2.0			
	CB16	0.2	0.5	2.5	2.3		
		0.6	1.3	2.2			
19°C	CB8	0.9	1.2	1.3	1.4		
		0.9	1.4	1.6			
	CB6	3.1	4.2	1.4	1.3		
		3.6	4.4	1.2			
37°C	C	CB8	2.3	2.6	1.1	1.1	

				2.1	2.4	1.1	
10°C			CB1	1.4	1.9	1.4	2.1
				0.4	1.1	2.8	
19°C			CB3	0.9	1.7	1.9	1.8
				1.3	2.2	1.7	
			CB8	1.2	1.8	1.5	1.4
				1.6	2.1	1.3	
			CB11	1.8	3.6	2.0	1.7
				1.9	2.8	1.5	
			CB14	0.7	1.6	2.3	2.6
				1.1	3.2	2.9	
CB1	0.8	2.3	2.9	3.3			
	0.7	2.6	3.7				
10°C		D	CB3	1.1	2.0	1.8	2.1
				0.9	2.2	2.4	
			CB1	1.7	3.8	2.2	2.1
				1.4	2.8	2.0	
19°C		D	CB6	1.9	2.2	1.2	1.2
				1.6	1.9	1.2	
			CB14	0.3	0.8	2.7	2.0
				0.9	1.2	1.3	
			CB16	1.4	1.9	1.4	1.3
				2.1	2.6	1.2	
			CB16	0.7	1.2	1.7	1.7
				0.8	1.3	1.6	
CB1	1.9	2.5	1.3	1.5			
	1.1	1.8	1.6				
37°C	Suelo y Sedimentos	1	CB14	2.3	2.5	1.1	1.1
				3.1	3.5	1.1	
10°C			CB14	1.4	1.7	1.2	1.3
				1.2	1.6	1.3	
CB16			1.9	2.2	1.2	1.2	
			1.6	1.9	1.2		
19°C			CB1	1.6	1.9	1.2	1.3
				0.4	0.6	1.5	
			CB1	0.9	1.2	1.3	1.4
				1.3	1.9	1.5	

			CB6	1.9	2.6	1.4	1.5		
				2.1	3.6	1.7			
			CB11	2.8	3.5	1.3	1.4		
				1.6	2.4	1.5			
10°C		2	CB1	1.9	2.2	1.2	1.4		
					1.2	1.9		1.6	
19°C				CB1	1.4	1.7	1.2	1.4	
					1.3	2.0	1.5		
				CB3	2.3	4.2	1.8	2.0	
					0.9	1.9	2.1		
					CB6	0.4	0.6	1.5	2.3
						0.9	2.7	3.0	
				CB8	2.2	3.9	1.8	1.5	
					3.7	4.5	1.2		
37°C		3	CB9	2.5	2.8	1.1	1.1		
					2.5	2.7		1.1	
				CB11	2.3	2.5	1.1	1.1	
					3.1	3.5	1.1		
10°C		4	CB8	0.7	1.7	2.4	2.0		
					3.9	6.2		1.6	
19°C				CB11	0.6	1.2	2.0	2.1	
					0.7	1.5	2.1		
				CB14	1.3	1.8	1.4	1.8	
					0.7	1.5	2.1		
					CB16	0.7	1.2	1.7	1.7
						1.1	1.9	1.7	
					CB9	0.9	1.5	1.7	1.7
						0.7	1.2	1.7	

Realizado por: Cerda Morocho, Carolina y Pérez Vélez, Pamela, 2019.

**ANEXO P: DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE POTENCIA DE ACTIVIDAD
PROTEOLÍTICA (IPL)**

Temperatura	Muestra		Clon bacteriano	Halo de la colonia (cm)	Halo de hidrólisis (cm)	IP	<u>IP</u>
10°C	Agua	A	CB9	1.9	2.7	1.4	1.4
				1.7	2.4	1.4	
19°C			CB6	0.9	1.7	1.9	1.7
				1.4	2.1	1.5	
19°C			CB8	0.7	1.4	2.0	2.7
				0.5	1.7	3.4	
19°C			CB3	1.3	1.9	1.5	1.7
				0.7	1.4	2.0	
19°C		CB14	0.8	1.4	1.8	2.5	
			0.4	1.3	3.3		
19°C		CB2	1.3	2.2	1.7	1.5	
			2.4	2.9	1.2		
37°C		B	CB3	1.3	2.4	1.8	1.7
1.2				1.9	1.6		
10°C			CB8	0.6	0.8	1.3	1.8
				0.4	0.9	2.3	
10°C	CB11		1.4	1.7	1.2	1.2	
			1.1	1.4	1.3		
19°C	CB14		1.4	1.9	1.4	1.3	
			1.3	1.5	1.2		
19°C	CB6		1.8	2.3	1.3	1.4	
			1.3	1.9	1.5		
37°C	C	CB3	1.4	1.6	1.1	1.1	
1.3			1.5	1.2			
19°C		CB8	1.2	1.6	1.3	1.3	
			1.4	1.7	1.2		
19°C		CB9	0.7	1.6	2.3	2.0	
			0.8	1.4	1.8		
19°C		CB3	1.6	2.8	1.8	1.7	
			0.9	1.4	1.6		
19°C	D	CB14	0.9	1.3	1.4	1.5	

				0.8	1.2	1.5	
37°C			CB14	0.9	1.1	1.2	1.6
				0.7	1.3	1.9	
37°C			CB14	1.1	1.7	1.5	1.4
				1.2	1.5	1.3	
10°C		1	CB14	0.7	1.3	1.9	1.8
				0.6	1.1	1.8	
			CB16	0.8	1.0	1.3	1.5
				0.5	0.9	1.8	
19°C		1	CB6	1.3	1.9	1.5	1.5
				1.5	2.2	1.5	
			CB11	0.9	1.4	1.6	1.8
				1.2	2.5	2.1	
10°C		2	CB1	0.6	1.0	1.7	1.6
				0.7	1.1	1.6	
19°C		2	CB1	0.4	0.6	1.5	1.8
				0.8	1.6	2.0	
			CB8	0.8	1.3	1.6	1.7
				0.7	1.2	1.7	
37°C		3	CB9	1.2	2.1	1.8	2.0
				1.3	2.9	2.2	
10°C		4	CB6	1.2	1.5	1.3	1.3
				1.4	1.8	1.3	
			CB8	1.3	1.8	1.4	1.3
				1.5	1.9	1.3	
19°C		4	CB11	1.9	0.8	0.4	0.8
				1.7	2.1	1.2	
			CB14	0.6	0.9	1.5	1.5
				0.8	1.2	1.5	
			CB16	0.7	1.2	1.7	1.7
				0.8	1.4	1.8	
CB11	1.3	2.0	1.5	1.6			
	1.5	2.4	1.6				

Realizado por: Cerda Morocho, Carolina y Pérez Vélez, Pamela, 2019.