



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

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS DE LA MINA**  
**DE SAL EN LA PARROQUIA SALINAS DEL CANTÓN**  
**GUARANDA.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

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

**AUTORA: SILVIA AMPARO JÁCOME ALBÁN**

**TUTORA: ING. PAOLA CHILUIZA MSc.**

Riobamba- Ecuador

2018

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACUTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS DE LA MINA DE SAL EN LA PARROQUIA SALINAS DEL CANTÓN GUARANDA”**, de responsabilidad de la señorita Silvia Amparo Jácome Albán, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Ing. Paola Chiluiza MsC.

**DIRECTORA DEL TRABAJO  
DE TITULACION**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing. Cristina Calderón MsC.

**MIEMBO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Silvia Amparo Jácome Albán soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

---

Silvia Amparo Jácome Albán

## **DEDICATORIA**

A Dios, por la sabiduría, fortaleza y perseverancia que me brindó en este camino para alcanzar mi meta.

A mis padres José y Margoth quienes con su cariño, paciencia, sacrificio y esfuerzo supieron comprenderme y motivarme a continuar sin importar las limitaciones, siempre me apoyaron.

A mi hermano José Luis por siempre motivarme, a mi sobrina Arelis que con sus ocurrencias me alegra la vida.

A mi abuelito Luis y a mis tíos Jorge y César por motivarme a continuar.

Tu mi persona especial, por tu amistad y cariño, por ser mi soporte y brindarme tu apoyo constante e incondicional.

A mis amigos, que juntos compartimos muchos momentos y experiencias que nunca se olvidara

## **AGRADECIMIENTO**

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas y brindarme la formación necesaria.

A los docentes y técnicos docentes aquellos que realmente han demostrado vocación y compromiso y han sabido llegar y motivar

A mi familia por su comprensión y estar siempre conmigo

A mis amigos que con sus consejos motivaron a continuar y hacer bien las cosas.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiii
SUMMARY .....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	xv

### CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Marco Conceptual.....	2
1.2.1. <i>Ambientes extremos</i> .....	2
1.2.2. <i>Ambientes Hipersalinos</i> .....	3
1.3. Microorganismos halófilos .....	4
1.4. Adaptación de bacterias a los ambientes salinos .....	5
1.4.1. <i>Osmoadaptación</i> .....	5
1.4.1.1. <i>Estrategia In salt citoplasma</i> .....	6
1.4.1.2. <i>Estrategia Low salt</i> .....	6
1.5. Modificación en la morfología.....	8
1.6. Métodos utilizados para la identificación de bacterias .....	8
1.6.1. <i>Métodos morfológicos</i> .....	8
1.6.1.1. <i>Características fenotípicas</i> .....	8
1.6.1.2. <i>Métodos basados en la tinción diferencial</i> .....	9
1.6.2. <i>Pruebas bioquímicas</i> .....	9
1.6.2.1. <i>Pruebas de lectura inmediata</i> .....	9
1.6.2.2. <i>Pruebas con lectura lenta</i> .....	9
1.7. Factores que afectan el crecimiento.....	10
1.7.1. <i>Composición del medio salino</i> .....	10
1.7.1.1. <i>Nitrógeno</i> .....	10
1.7.1.2. <i>Fósforo</i> .....	11

1.7.1.3.	<i>Azufre</i> .....	11
1.7.1.4.	<i>Magnesio</i> .....	11
1.7.1.5.	<i>Potasio:</i> .....	11
1.7.1.6.	<i>Nitratos, nitritos, sulfatos y calcio</i> .....	11
1.7.1.7.	<i>Sales Menores y Trazas</i> .....	12
1.7.1.8.	<i>Otros componentes</i> .....	12
1.7.2.	<b><i>Condiciones ambientales</i></b> .....	12
1.7.2.1.	<i>Temperatura</i> .....	12
1.7.2.2.	<i>pH</i> .....	12
1.7.2.3.	<i>Condiciones de oxígeno</i> .....	12
1.8.	<b>Clasificación taxonómica bacterias localizadas en ambientes salinos.</b> .....	13
1.8.1.	<b><i>Halobacterium</i></b> .....	13
1.8.2.	<b><i>Halococcus</i></b> .....	13
1.8.3.	<b><i>Chromohalobacter</i></b> .....	14
1.8.4.	<b><i>Halomonas</i></b> .....	15
1.8.5.	<b><i>Salinibacter</i></b> .....	16
1.8.6.	<b><i>Salinivibrio</i></b> .....	16
1.8.7.	<b><i>Marinobacter</i></b> .....	17
1.8.8.	<b><i>Pseudomonas</i></b> .....	17
1.8.9.	<b><i>Paracoccus</i></b> .....	18
1.8.10.	<b><i>Marinococcus</i></b> .....	19
1.8.11.	<b><i>Salinicoccus</i></b> .....	19
1.8.12.	<b><i>Staphylococcus</i></b> .....	20
1.8.13.	<b><i>Streptococcus</i></b> .....	20
1.9.	<b>Actividad biológica de halófilas y halotolerantes</b> .....	21
1.9.1.	<b><i>Solutos compatibles</i></b> .....	21
1.9.2.	<b><i>Biopolímeros</i></b> .....	22
1.9.2.1.	<b><i>Biosurfactantes</i></b> .....	22
1.9.2.2.	<b><i>Exopolisacaridos EPS</i></b> .....	22

1.9.2.3.	<i>Lectinas</i> .....	23
1.9.2.4.	<i>Bioplastico PHA</i> .....	23
1.9.3.	<i>Enzimas</i> .....	23

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	26
2.1.	<b>Hipótesis y especificación de las variables</b> .....	26
2.1.1.	<i>Hipótesis</i> .....	26
2.1.2.	<i>Variables</i> .....	26
2.1.2.1.	<i>Variable dependiente</i> .....	26
2.1.2.2.	<i>Variables Independientes</i> .....	26
2.2.	<b>Tipo y Diseño de Investigación</b> .....	26
2.3.	<b>Unidad de análisis</b> .....	26
2.4.	<b>Población de estudio</b> .....	26
2.4.1.	<i>Ubicación geográfica</i> .....	26
2.4.2.	<i>Descripción de la zona</i> .....	28
2.5.	<b>Tamaño de muestra</b> .....	28
2.6.	<b>Selección de la muestra</b> .....	30
2.7.	<b>Técnicas de recolección de datos</b> .....	30
2.7.1.	<i>Muestreo aguas superficiales</i> .....	30
2.7.2.	<i>Manejo y conservación de muestras</i> .....	31
2.7.2.1.	<i>Análisis físico-químico</i> .....	31
2.7.3.	<i>Caracterización microbiológica</i> .....	32
2.7.3.1.	<i>Preparación de medios</i> .....	32
2.7.3.2.	<i>Procesamiento de muestras In situ</i> .....	32
2.7.3.3.	<i>Preparación de diluciones ex situ</i> .....	33
2.7.4.	<i>Aislamiento de bacterias halófilas</i> .....	33
2.7.5.	<i>Caracterización morfológica</i> .....	33
2.7.5.1.	<i>Caracterización morfológica macroscópica</i> .....	33

2.7.5.2.	<i>Caracterización morfológica microscópica</i> .....	34
2.7.6.	<b><i>Caracterización bioquímica</i></b> .....	34
2.7.6.1.	<i>Pruebas de lectura inmediata</i> .....	34
2.7.6.2.	<i>Pruebas de lectura lenta</i> .....	35
2.7.7.	<b><i>Actividad enzimática</i></b> .....	37
2.7.7.1.	<i>Actividad aminolítica</i> .....	37
2.7.7.2.	<i>Actividad proteolítica: caseína</i> .....	37
2.7.7.3.	<i>Actividad lipolítica</i> .....	38

### **CAPÍTULO III**

3.	<b>MARCO DE RESULTADOS</b> .....	39
3.1.	<b>Resultados, análisis y discusión</b> .....	39
3.1.1.	<i>Evaluación de las características físico-químicas y microbiológicas del agua</i> .....	39
3.1.1.1.	<i>Procesamiento de datos</i> .....	42
3.1.2.	<i>Características morfológicas de los aislados bacterianos por Tinción Gram</i> .....	47
3.1.3.	<i>Características morfológicas, bioquímicas y enzimática</i> .....	48
3.1.4.	<i>Actividad enzimática</i> .....	56

	<b>CONCLUSIONES</b> .....	58
--	---------------------------	----

	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	60
--	------------------------------	----

### **BIBLIOGRAFIA**

### **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Clasificación de microorganismos extremófilos .....	3
<b>Tabla 2-1.</b> Clasificación microorganismos halófilos de acuerdo a las concentraciones de sal. ...	5
<b>Tabla 3-1.</b> Principales enzima extracelulares producidas por bacterias halófilas .....	23
<b>Tabla 4-1:</b> Ejemplo de géneros que hidrolizan enzimas de interés .....	25
<b>Tabla 1-2:</b> Coordenadas geográficas de la mina de Salinas .....	28
<b>Tabla 2-2:</b> Métodos utilizados para el análisis fisicoquímico de las muestras de agua .....	31
<b>Tabla 3-2:</b> Medio de cultivo TSA .....	32
<b>Tabla 4-2:</b> Medio de cultiva TSB.....	32
<b>Tabla 1-3:</b> Resultados de pH y Temperatura.....	39
<b>Tabla 2-3:</b> Resultados de los análisis físico-químicos .....	40
<b>Tabla 3-3</b> Caracterización de ambientes salinos respecto a la conductividad. ....	41
<b>Tabla 4.3:</b> Medias de UFC/mL por concentración.....	42
<b>Tabla 5.3:</b> Medias de UFC/mL por puntos de muestreo .....	43
<b>Tabla 6.3:</b> Medias de UFC/mL por concentración.....	44
<b>Tabla 7.3:</b> Medias de UFC/mL por puntos de muestreo .....	45
<b>Tabla 8.3:</b> Medias de UFC/mL por número de muestreo.....	46
<b>Tabla 9-3:</b> Total de bacterias aisladas .....	47
<b>Tabla 10-3:</b> Características morfológicas de acuerdo a la Tinción Gram. ....	47
<b>Tabla 11-3:</b> Características morfológicas, de bacilos Gram negativos .....	49
<b>Tabla 12-3:</b> Características morfológicas, de bacilos Gram negativos .....	50
<b>Tabla 13-3:</b> Características morfológicas de cocos Gram negativos.....	53
<b>Tabla 14-3:</b> Características bioquímicas y enzimáticas de cocos Gram negativos .....	53
<b>Tabla 15-3:</b> Características morfológicas y bioquímicas de cocos Gram positivos. ....	54
<b>Tabla 16-3</b> Características bioquímicas y enzimáticas de cocos Gram positivos. ....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS

<b>Figura 1-1:</b>	Solutos compatibles reportados en bacterias halófilas y halotolerantes.....	7
<b>Figura 1-2:</b>	Ubicación Geográfica de la mina .....	27
<b>Fotografía 2-2:</b>	Ubicación zona 1 .....	29
<b>Fotografía 3-2:</b>	Ubicación zona 2 .....	29
<b>Fotografía 4-2:</b>	Ubicación zona 3 .....	30

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Cantidad de UFC/mL vs Concentración de NaCl .....	42
<b>Gráfico 2-3:</b> Cantidad de UFC/mL vs Puntos de muestreo.....	43
<b>Gráfico 4-3:</b> Cantidad de UFC/mL vs Puntos de muestreo.....	45
<b>Gráfico 5-3:</b> Cantidad de UFC/mL vs N.- de muestreo. ....	46
<b>Gráfico 6-3:</b> Porcentaje de Bacterias aisladas.....	47
<b>Gráfico 7-3:</b> Porcentaje de bacilos y cocos aislados .....	48

## RESUMEN

Se caracterizaron cepas bacterianas halófilas débiles y moderadas, provenientes de la Mina de Sal ubicada en la parroquia Salinas Cantón Guaranda. Se escogieron 3 puntos de muestreo, un punto abierto y dos cerrados, de acuerdo a la disponibilidad del agua presente en los socavones. Las muestras de agua fueron inoculadas in situ como ex situ en medios nutritivos Tripteína Soya Caldo (TSB) y Tripteína Soya Agar (TSA) con diferentes concentraciones de NaCl: 1, 3, 10 y 15% (w/v). Para los aislamientos se realizaron diluciones seriadas, técnica de siembra en superficie y estriado, y las muestras se incubaron a 30°C en condiciones aerobias. Se aislaron 125 cepas bacterianas, habiéndose seleccionado 33 cepas que presentaban resultados semejantes en las pruebas de observación macroscópica, microscópica, pruebas bioquímicas y enzimáticas. El 75% de las cepas seleccionadas correspondieron a bacilos Gram negativos, 12% cocos Gram negativos y 12% cocos Gram positivos. En cuanto a la actividad enzimática, el 51% presentó actividad lipolítica, 30% proteolítica y el 18 % actividad aminolítica. Los resultados obtenidos muestran la posibilidad de la presencia de géneros como *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Salinivibrio*; *Pseudomonas*, *Salinibacter* *Paracoccus* *Salinococcus* y *Staphylococcus*. La mina de sal evaluada presenta valores de conductividad mayor a 70 000µS/cm, condición que corresponde a un ambiente hipersalino que esto estaría ligado al crecimiento de bacterias halófilas débiles (1 al 3% NaCl) y moderadas (3 al 15% NaCl), convirtiéndose en una importante fuente de diversidad microbiológica halófila en la serranía Ecuatoriana.

**Palabras clave:** <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <AMBIENTE HIPERSALINO> <BACTERIAS>, <HALÓFILOS MODERADOS >, <HALÓFILOS DÉBILES> <MINA DE SAL>, <SALINAS (PARROQUIA)>, <GUARANDA (CANTÓN)>

## SUMMARY

It was characterized weak and moderate halophilic bacterial strains, from the Salt Mine located in the Salinas parish, Guaranda canton. Three sampling points were chosen, one point open and two closed according to the availability of water in the holes. Water samples were inoculated in situ and ex-situ in nutrient medium Tripteína Soya Caldo (TSB) and Tripteína Soya Agar (TSA) with different concentrations of NaCl: 1, 3, 10 and 15% (w / v). For the insulations, serial dilutions were made, sowing technique on the surface and by fluting, the samples were incubated at 30 °C under aerobic conditions. 125 bacterial strains were isolated, of these, 33 strains were selected which presented similar results in the macroscopic and microscopic observation tests, biochemical and enzymatic tests. As a result of these 33 strains, it was obtained that 75% corresponded to Gram-negative bacilli, 12% Gram-negative cocci and 12% Gram-positive cocci. Regarding enzymatic activity, 51% presented lipolytic activity, 30% proteolytic and 18% aminolytic activity. The results obtained show the possibility of the presence of genera such as *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Salinivibrio*; *Pseudomonas*, *Salinibacter Paracoccus*, *Salinococcus*, and *Staphylococcus*. The evaluated salt mine has conductivity values greater than 70 000 $\mu$ S/cm, a condition that corresponds to a hypersaline environment, this would be linked to the growth of weak halophilic bacteria (1 to 3% NaCl) and moderate (3 to 15%, NaCl) becoming an important source of halophilic microbiological diversity in Ecuador's Sierra.

**Keywords:** <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <HIPERSALINE ENVIRONMENT <BACTERIA>, <MODERATE HALOPHILS>, <WEAK HALOPHILS> <SALT MINE>, <SALINAS (PARISH)>, <GUARANDA (CANTON)>

## INTRODUCCIÓN

### Identificación del Problema

Estudios realizados en Perú y Colombia demuestran la existencia de microorganismos tolerantes a condiciones extremas en minas de sal de Atacocha – Ayacucho y Zipaquirá respectivamente, con una altitud mayor a 3500 msnm, temperaturas que están en un rango de 2 a 11 °C, además de exponerse a sol intenso en el día y frío extremo por las noches; estos estudios comprueban la presencia de bacterias halófilas y halotolerantes de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*, con distinto potencial biotecnológico como la producción de enzimas hidrolíticas, proteasas, lipasas, expolisacáridos, biosurfactantes e inhibidores de los sistemas del quórum sensing (Arahal et al., 2007:p.60).

En la parroquia Salinas del cantón Guaranda, ubicada en los páramos del oeste del Chimborazo a 3600 msnm con variaciones de temperaturas que fluctúan entre los 6 a 12 °C, existen minas de sal de formación natural; con un rango entre 6.75 – 6.82 de pH, donde las muestras de agua salada de manantial se caracterizaban según su concentración de sal, en “manantiales femeninos o Huarmi Candu” con mayor contenido de sal y en “manantiales masculinos o cari” con una concentración regular de NaCl de 2.2% – 5.2 %, concentraciones de Calcio 1120-1352ppm, Potasio 1820-2130 ppm (Pomeroy, 1986, pp. 10-22)

Esta parroquia es un sitio turístico, donde los pobladores de la zona se dedican a la extracción de sal de manera artesanal, la que consiste en la recolección del agua de manantiales, esta agua es depositada sobre los mojados lechos de roca dura de sal o charcas, el punto en el que agua está lista para la cocción es probada colocando un huevo, si este flotaba estaba lista para la extracción. Una vez que se comprueba la concentración de la salinidad se almacena en recipientes de arcilla hasta su cocción. Se reporta que se cocinaban 14 galones de agua salada en menos de 7 horas, y se producían 25 libras de sal (Pomeroy, 1986, pp.12-14).

Investigaciones realizadas en el país se han enfocado exclusivamente en el perfil costanero, debido a la presencia de la empresa privada Ecuasal que se encarga de la producción de sal para consumo humano, industrial y agropecuario. Siendo necesario realizar un estudio para obtener información en minas de sal en condiciones como , temperatura y altitud de la serranía ecuatoriana y en la que se describan la distribución de comunidades bacterianas y la función que estas desempeñan en estos ecosistemas, como las que se encuentran en la parroquia Salinas del cantón Guaranda.

Por tal razón es necesario formularse la pregunta central ¿Existen bacterias halófilas en la mina de sal de la parroquia Salinas del cantón Guaranda?

## **Justificación**

Estudios a nivel mundial revelan la presencia de microorganismos halófilos y halotolerantes como hongos, actinomicetos y bacterias principalmente en condiciones ambientales extremas de salinidad. Las investigaciones realizadas en minas de sal de Colombia y Perú muestran la presencia de géneros bacterianos como *Halomonas* y *Chromohalobacter* que se desarrollan a temperaturas que fluctúan entre los 2 y 11 °C, bajo concentraciones de NaCl entre 3 y 5 % y pH entre 6–8.

De acuerdo con Ventosa y Nieto (1995) en la actualidad los microorganismos halófilos han despertado gran interés en el campo de la biotecnología, no solo por sus mecanismos de adaptación, sino porque sus requerimientos nutricionales son generalmente simples, la mayoría puede usar un amplio rango de compuestos como única fuente de carbono y energía y además que su capacidad para crecer a altas concentraciones de sal minimiza el riesgo de contaminación durante los procesos de producción.

Las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico debido a la producción de biopolímeros exopolisacáridos, biosurfactantes, liposomas, antibióticos y bioplástico; además de la producción de haloenzimas extra e intracelulares que se diferencian de las enzimas estándar porque son capaces de actuar a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad sin afectar su funcionalidad (Ramírez et al., 2004:pp.12-23).

Las enzimas producidas por microorganismos halófilos también se conoce como haloenzimas, las hidrolasas, proteasas, amilasas y lipasas poseen propiedades catalíticas de potencial aplicación industrial como aditivos para la fabricación de detergentes, elaboración de productos dietéticos, procesamiento de cuero, papel, alimentos, mecanismos de biocontrol de parásitos, así como, en la síntesis de enantiómeros puros de fármacos, biodegradación de residuos tóxicos, tratamiento de aguas residuales y contaminantes industriales (Barragán y Castillo, 2011:pp.45-54).

Al presentar tolerancia a concentraciones salinas, estas bacterias reducen los riesgos de contaminación en el laboratorio, lo que permite su explotación como fábricas celulares. Las proteasas pertenecen al grupo de enzimas industriales más importantes y constituyen alrededor del 60% del total de las ventas mundiales (Godfrey y West, 1996:pp.2-6).

La caracterización de bacterias halófilas en la mina de sal de la parroquia Salinas de Guaranda, pretende contribuir al conocimiento de ecosistemas microbianos salinos en la sierra ecuatoriana, que no han sido estudiados, con la posibilidad del aprovechamiento biotecnológico de enzimas y biopolímeros de los géneros de bacterias halófilas aisladas

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Caracterizar bacterias halófilas de la mina de sal de la parroquia Salinas del cantón Guaranda.

### **Objetivos Específicos**

- Evaluar características físico-químicas y microbiológicas del agua de la mina de sal
- Identificar los géneros de bacterias halófilas aisladas mediante pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas.
- Comprobar la actividad proteolítica de las bacterias halófilas encontradas.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1. Antecedentes

En ambientes salinos a nivel mundial se describen la presencia de bacterias halófilas extremas y moderadas según las concentraciones de sal al que son expuestas, estas han sido caracterizadas taxonómicamente. Según Ventosa et al.(1998) un gran número de investigaciones que se han desarrollado en aguas salinas de España, las bacterias halófilas moderadas mayormente registradas han sido aisladas de aguas talasosalinas como por ejemplo del mar muerto, yacimientos de agua natural, evaporíticos y lagos salinos alcalinos.

Investigaciones realizadas en la India por Gupta et al., (2015) en cuerpos de agua de formación natural se aislaron bacterias halófilas que mostraron crecimientos en concentraciones de NaCl al 8.7%, pH 7-8 y un rango de temperatura de 30- 37 °C, donde los géneros encontrados fueron *Halobacillus*, *Shewanella*, *Halomonas*, *Marinmonas*.

Roohi et al., (2012) aisló 21 cepas bacterianas halotolerantes y halófilas de las minas de sal de la región de Karak, que es un ambiente hipersalino, presentó un crecimiento en concentraciones de NaCl de 5% – 40% en un pH neutro, donde los géneros encontrados fueron *Thalassobacillus*, *Halomonas*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Terribacillus*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Staphylococcus* y *Virgibacillus*

Pfiffner et al., (1986) aisló más de 200 cepas de bacterias halófilas moderadas, capaces de crecer en las bolsas subterráneas de crudo y producir biopolímeros surfactantes resistentes a las condiciones ambientales de hipersalinidad. Así, se descubrió un método de obtención de ectoína e hidroxiectoína a partir de una cepa halófila moderada *Marinococcus*. Posteriormente se ha desarrollado un proceso industrial mejorado de obtención de ectoína a partir de una cepa de *H. elongata*.

Estudios realizados en Perú y Colombia demuestran la existencia de microorganismos tolerantes a condiciones extremas en minas de sal de Atacocha – Ayacucho y Zipaquirá respectivamente; en estas investigaciones se encontraron bacterias halófilas de los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Halanaerobium*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, etc siendo estos los más

representativos en la producción de enzimas hidrolíticas, proteasas, lipasas, nucleasas y biopolímeros. La mayoría de las haloenzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento provienen de bacterias halófilas moderadas (Arahal et al. 2007:p.60.)

Maturrano (2004) realizó una caracterización de la microbiota de las Salinas de Maras, un ambiente hipersalino de los andes de Perú; en esta investigación se determina el tipo de ambiente hipersalino y cual es el dominio de microorganismos presentes mediante técnicas moleculares; siendo las poblaciones del Dominio Archea mayoritarias frente al Dominio Bacteria.

Díaz (2011) estudió la composición de la comunidad bacterina de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risalda y Boyaca; en la que se aislaron en su mayoría microorganismos Gram negativos halotolerantes, además se estudió la composición iónica en las zonas determinadas para el muestreo como pueden afectar a las comunidades microbianas.

La investigación realizada en el Departamento Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, carrera Ingeniería en Biotecnología con autoría de Narváez Terán, Verónica Elizabeth ha desarrollado estudios que se han enfocado exclusivamente en el perfil costanero, como es el aislamiento de bacterias halófilas moderadas procedentes de las piscinas de ECUASAL en la provincia de Santa Elena, en la que se encontraron los géneros *Pseudomonas*, *Halomonas* *Aeromonas*, *Agrobacterium* como los predominantes por su actividad proteolítica.

## **1.2. Marco Conceptual**

### ***1.2.1. Ambientes extremos***

Lugar que presenta condiciones ambientales extremas, considerando parámetros físico-químicos como la temperatura, pH, salinidad, irradiación solar, presión hidrostática, potencial redox, actividad del agua, concentración de nutrientes y condiciones inusuales poco favorables. Los organismos que son capaces de tolerar condiciones extremas para su desarrollo son denominados como organismo extremófilos (Ventosa y Nieto, 1995:pp.85-87).

Los ambientes extremos existentes a nivel mundial, son fuentes de investigación para determinar la presencia de microorganismo los cuales se clasifican de acuerdo a las condiciones físico-químicas extremas donde se desarrollan como por ejemplo la siguiente tabla.

**Tabla 1-1:** Clasificación de microorganismos extremófilos

<b>EXTREMÓFILOS</b>	<b>CONDICIÓN</b>	<b>Especie</b>
Termófilos	Elevadas temperaturas >45 <95 °C	<i>Synechoccus lividis</i>
Pscrófilos	Bajas temperaturas >-17<10	<i>Polaromonas vacuolata</i>
Acidófilos	Bajo pH <5	<i>Cyanadium caldarium</i>
Alcalófilos	Elevado pH >9	<i>B. firmus</i>
Halófilos	Elevada salinidad 2 a 5 M de NaCl	<i>Salinivibrio costicola</i>
Barófilos	Elevada presión >100 atm.	<i>Shewanella benthica</i>
Metalófilos	Elevada concentración de metal altas concentraciones de Cu, As, Cd, etc.	<i>Ferroplasmic acidarmanus</i>
Radiófilo	Elevados niveles de radiación	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Microaerofilo	Crecimiento en <21% oxígeno	<i>Methanococcus jannaschi</i>

Fuente: Castillo, et al., 2005

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

### **1.2.2. Ambientes Hipersalinos.**

Son aquellos lugares que presentan una concentración salina elevada, generalmente superior a la de hábitats acuáticos marinos y oceánicos aproximadamente 3.5% de sales totales; en este tipo de ambiente no solo la concentración salina limita el crecimiento microbiano, sino factores como temperatura, pH, oxígeno disuelto (Oren, 2004).

De acuerdo con Sierra, (s.f., p.36) define los suelos salinos como aquellos que presentan concentraciones de sales solubles superior al 0.2%, extendiéndose por todo el mundo proceden de la meteorización de los minerales y rocas que constituyen la corteza terrestre; los principales elementos que constituyen la salinización de los suelos, aguas subterráneas y superficiales son calcio, magnesio, sodio, cloro, azufre y boro

En investigaciones realizadas por Grant y Ross, (1986) describen los ambientes hipersalinos como:

- Aguas atalasalinas o atalásicos estas se caracterizan por presentar predominio de iones sulfuro  $S^{2-}$  y magnesio  $Mg^{2+}$ , que resultan de la disolución de depósitos minerales de sales de origen continental. La composición iónica de este tipo de ambiente puede variar considerablemente, pues el predominio de unos u otros iones depende de la orografía, geología y las condiciones climáticas del lugar, además de presentar valores elevado de pH 10-11

- Aguas talasosalinas se caracterizan por presentar predominio de iones cloro  $\text{Cl}^-$  y sodio  $\text{Na}^+$  porque se derivan de la evaporación del agua de mar, un ejemplo de estos ambientes son los que son construidos por el ser humano para la obtención de sal común, además poseen un pH neutro o ligeramente alcalino

Younger, 2007; citado en Diaz, 2011, explica que los parámetros físicos químicos del agua permiten definir la procedencia encontrándose:

- Agua con predominio de iones calcio  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$  siendo típicas de acuíferos poco profundos que presentan recargas continuas de agua;
- Agua con predominio de iones magnesio  $\text{Mg}^{2+}$  y bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$  acuíferos poco profundos que presenta intrusión de agua de mar;
- Agua con predominio de magnesio  $\text{Mg}^{2+}$ , calcio  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonatos es típica de acuíferos poco profundos en donde hay presencia de dolomita  $\text{CaMgCO}_3$ ,
- Agua con predominio de sodio  $\text{Na}^+$  y sulfatos  $\text{SO}_4^{2-}$  resulta de la mezcla de aguas subterráneas antiguas ricas en sodio  $\text{Na}^+$  con aguas producidas durante la oxidación de pirita  $\text{FeS}_2$  o por evaporación de agua que previamente perdió el calcio  $\text{Ca}^{2+}$  y el bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$ , por precipitación de calcita  $\text{CaCO}_3$ ;
- Agua con alto contenido de calcio  $\text{Ca}^{2+}$  y cloro  $\text{Cl}^-$  es generada por la disolución de evaporitas de cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$ ;
- Agua rica en sodio  $\text{Na}^+$  y cloro  $\text{Cl}^-$  originada por agua de mar, por la disolución de halita  $\text{NaCl}$  o por la presencia de agua subterránea antiguas;
- Agua con alto contenido de Calcio  $\text{Ca}^{2+}$  y sulfatos  $\text{SO}_4^{2-}$ , que proviene de acuíferos sedimentados con alto contenido de gypsum  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y por aguas subterráneas afectadas por la oxidación de pirita y de otros minerales de azufre.

Según Thomas et al., (2014:pp.53-55) al evaluar los parámetros físico y químicos del agua como el pH, concentración de sólidos disueltos y conductividad permite clasificar el agua como hipersalina, mientras que la cantidad de cloruros, nitratos, nitritos, materia orgánica, hierro total, calcio, magnesio, potasio y sodio son necesarios para el crecimiento de bacterias halófilas.

### **1.3. Microorganismos halófilos**

Grupo de eucariotas y procariotas que requieren de elevadas concentraciones de sales para su desarrollo y crecimiento; presentando mecanismos de adaptación a las altas concentraciones salinas que consiste generalmente en la síntesis de compuestos orgánicos intracelulares compatibles con los procesos metabólicos celulares (Arahal et al. 2007:p.59).

Los microorganismos halófilos se han clasificado de acuerdo a las necesidades de NaCl para su crecimiento como se muestra la Tabla 2.1

**Tabla 2-1.** Clasificación microorganismos halófilos de acuerdo a las concentraciones de sal.

Clasificación	Concentración de NaCl % (p/v)	Ejemplos
Halófilos extremos	Crecimiento óptimo entre 15-32% 2.5 y 5.2 M	<i>Halobacterium salinarum</i>
Límite de halófilo extremo	Crecimiento óptimo entre 9.0-24% 1.5 y 4.0 M	<i>Halorhodospira halophila</i>
Halófilos moderados	Crecimiento óptimo entre 3 -15% 0.5 y 2.5 M	<i>Salinivibrio costicola</i>
Halófilos débiles	Crecimiento óptimo entre 1- 3% 0.2 y 0.5 M	<i>Tenuibacillus multivorans</i>
No Halófilos	Crecimiento óptimo menor que 1% < 0.2 M	<i>Escherichia coli</i>
Halotolerantes	Rango de crecimiento extendido sobre los 2.5 M puede considerarse extremadamente halotolerante.	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Oren, 2006, p.265

Realizado por: Silvia Jácome, 2018

#### 1.4. Adaptación de bacterias a los ambientes salinos

Investigaciones revelan dos mecanismos que han desarrollado los microorganismos halófilos para equilibrar su citoplasma osmóticamente con el medio salino.

##### 1.4.1. Osmoadaptación

Galinski, 1995; citado en Mata, 2011 se refiere a los cambios fisiológicos y genéticos que se producen frente a la escasa actividad del agua, en la cual las bacterias halófilas desarrollan esta característica para compensar la alta presión osmótica del medio.

#### 1.4.1.1. *Estrategia In- Salt citoplasma.*

Consiste en un equilibrio osmótico en las células manteniendo altas concentraciones intracelulares de iones inorgánicos como potasio  $K^+$ , sodio  $Na^+$ , y cloro  $Cl^-$  concretamente sal de cloruro de potasio KCl; como consecuencia el citoplasma está expuesto a una alta fuerza iónica. Los microorganismos que utilizan esta estrategia, es menos costosa pero requiere de un proceso más complejo desde el punto de vista evolutivo, ya que estas modificaciones incluyen un exceso de aminoácidos ácidos y pequeñas cantidades de aminoácidos hidrofóbicos, rodeándose la molécula de mayor cantidad de agua para compensar la escasa actividad del agua con el medio (Sleator y Hill, 2001:p.50)

#### 1.4.1.2. *Estrategia Low salt*

Mecanismo que han adoptado la mayoría de bacterias halófilas y halotolerantes que consiste en la acumulación de ciertos compuestos orgánicos altamente soluble en agua y de bajo peso molecular en su citoplasma, esto depende de la fuerza osmótica en la fase de crecimiento de cultivo, de la fuente de carbono y de la presencia de osmolitos en el medio cultivo (Smith et al., 1994; citado en Mata, 2006).

Los solutos compatibles incrementan la fuerza iónica intracelular y estabilizando la capa de hidratación de proteínas, al localizarse en zonas alejadas de la superficie molecular permitiendo una unión más fuerte con las moléculas del agua (Sleator y Hill, 2001:p.51)

La mayor flexibilidad y versatilidad de este mecanismo explica el hecho de que se encuentre mucho más extendido en la naturaleza, habiéndose observado también en hongos, plantas y animales, incluso en células humanas (Ventosa et al., 1998).

Existe una gran diversidad de solutos compatibles que se han reportado en bacterias halófilas y halotolerantes en cuanto a su naturaleza química. Como se indica en la Figura 1.1.

- Polioles: glicerol y arabitol.
- Azúcares y derivados: sacarosa, trehalosa, glucosiglicerol, sulfotrehalosa.
- Aminoácidos: prolina y glutamina.
- Derivados de aminoácidos: N-acetilisina, N-acetilornitina.
- Aminas cuaternarias: glicina betaína, dimetil glicina.



## **1.5. Modificación en la morfología**

El crecimiento de bacterias halófilas muestra alteraciones cuando son sometidas a concentraciones de salinidad y temperaturas extremas. Las modificaciones reportadas son estructurales en la pared y membrana celular específicamente en el tipo de fosfolípidos, proteínas y un tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos polares aportando consistencia a la membrana (Madigan, et al 2003).

Estas alteraciones son más representativas en bacterias halófilas moderadas Gram negativas con un aumento de los ácidos grasos ciclopropánicos, a costa de los insaturados, de los cuales se derivan (Ramírez et al., 2004).

## **1.6. Métodos utilizados para la identificación de bacterias**

Definido como un conjunto de técnicas y procedimientos que se emplea para determinar la identidad de un microorganismo; en los que se puede emplear un solo método o la combinación de varios métodos

### ***1.6.1. Métodos morfológicos***

#### ***1.6.1.1. Características fenotípicas***

Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas, tomando en consideración los siguientes aspectos.

- Forma: circular, rizoide, irregular, filamentosa.
- Borde: entero, ondulado, lobulado, filamentoso, ondeado, rizoide, irregular.
- Elevación: plana, elevada, convexa, umbonada.
- Superficie: lisa, rugosa.
- Pigmentos.
- Consistencia: seca, cremosa, viscosa.
- Luz transmitida: transparente, translúcida, opaca.
- Luz reflejada: opaca, brillante.

### *1.6.1.2. Métodos basados en la tinción diferencial.*

Tinción Gram: es uno de los métodos más empleados que permite clasificar a las bacterias, se basa en la coloración de los constituyentes químicos peptidoglucano y lipopolisacáridos de la pared celular, los dos grandes grupos bacterias Gram positivas que retienen el colorante permanece de color violeta y Gram negativas que no retiene el colorante (Tortora et al., 2007:p.70).

Además al emplear a tinción permite diferenciar características microbianas como:

- Forma: bacilos, cocos, filamentosos, etc.
- Tamaño: cortos, largos, etc.
- Disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.

### *1.6.2. Pruebas bioquímicas*

Permiten determinar características metabólicas y nutricionales, algunas de estas pruebas son técnicas rápidas en las que se evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía en segundos. Otras pruebas requieren el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 horas, con estas pruebas se detectan la mayoría de componente metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad del microorganismo (Fernández et al., 2010:p.4.).

#### *1.6.2.1. Pruebas de lectura inmediata*

- Catalasa: enzima presente en la mayoría de los microorganismo que poseen citocromos. Estas bacterias sintetizan catalasa, hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso, que se libera en forma de burbujas (Alvarez et al., 1990.).
- Oxidasa: microorganismos que poseen un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno. Las oxidasas catalizan la eliminación de hidrogeno de un sustrato pero solo utilizan oxigeno como aceptor de hidrogeno (MacFaddin, 2003, p. 344).

#### *1.6.2.2. Pruebas con lectura lenta*

De acuerdo a las técnicas del Manual Básico de Microbiología, 2003 se realiza las siguientes pruebas para la identificación de bacterias.

- **TSI Agar triple Azúcar Hierro:** Medio empleado para la diferenciación de bacilos entéricos Gram negativos, en base a la fermentación de los hidratos de carbono glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico
- **Citrato:** Medio empleado utilizado para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.
- **SIM Sulfuro-Indol-Movilidad:** Medio semisólido empleado para verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos; permite diferenciar miembros de la familia Enterobacteriacea.
- **Urea:** Medio utilizado para la identificación de microorganismos en base a la actividad ureásica.
- **Manitol:** Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos

## **1.7. Factores que afectan el crecimiento**

### **1.7.1. Composición del medio salino**

Todas las bacterias tienen requerimientos nutricionales indispensables para su crecimiento y producción de metabolitos por parte de los microorganismos, como las fuentes de energía, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, algunas sales oligoelementales y agua (Fernández et al., 2010:p.4.).

Dentro de los componentes del medio de cultivo para el desarrollo de bacterias halófilas, el cloruro de sodio NaCl es una de las sales de mayor proporción en comparación al magnesio  $Mg^{2+}$  que es suplementados al medio con sales de cloruro, sulfatos, nitratos; el potasio debe estar presente en concentraciones mayor al 2% (p/v) en forma de cloruro de potasio KCl porque mantiene el equilibrio osmótico en los ambientes salados. (Arahal et al. 2007).

#### **1.7.1.1. Nitrógeno:**

Es necesario en todos los organismos para la síntesis de aminoácidos, hidratos de carbono y lípidos, se puede proporcionar como  $NH_4Cl$ ,  $NaNO_3$ , o  $NH_4_2SO_4$  en el medio para favorecer el desarrollo de bacterias halotolerantes y halófilas (Schneegurt, 2012).

#### 1.7.1.2. Fósforo:

Es necesario en todos los microorganismos ya que está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos. La gran mayoría de los microorganismos utilizan fosfato inorgánico como fuente de fósforo, niveles bajos de fósforo limitan el crecimiento microbiano en medios acuáticos. (PRESCOTT et al., 2004 p. 103).

#### 1.7.1.3. Azufre:

Es necesario en los microorganismos porque es un componente estructural de los aminoácidos cisteína y metionina. El sulfato suele aparecer como un contraión para las sales de calcio, hierro, magnesio, nitrógeno y potasio (Sorokin et al., 2010)

#### 1.7.1.4. Magnesio:

Es necesario para los microorganismos como lo describe MacFaddin (2003, p.104) que, actúa como estabilizador de los ribosomas, membranas celulares y ácidos nucleicos; los requisitos para las sales de Mg son amplios entre los microorganismos halotolerantes y halófilos. El  $Mg^{2+}$  es un componente común de los medios microbiológicos.

#### 1.7.1.5. Potasio:

Es necesario en todos los organismos para la síntesis de proteínas según (Rodríguez- Valera et al., 1985:p110) si se añade KCl hasta el 2%, a los medios simulan al agua de mar concentrada existiendo crecimiento de los géneros *Halobacterium*, *Pseudomonas* y *Sarcina*

El magnesio y potasio son bioelementos secundarios esenciales, están involucrados en procesos que le permite a la bacteria soportar alta concentración de sal regulando la presión osmótica con el medio como es la acumulación de iones inorgánicos.

#### 1.7.1.6. Nitratos, nitritos, sulfatos y calcio

Son necesarios para llevar a cabo las rutas metabólicas generadoras y consumidoras de energía propia de la célula (Schneegurt, 2012, p.6).

Todos los microorganismos requieren elementos metálicos tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc y cobalto en mínimas cantidades que son medidas en parte por millón para el crecimiento según (PELCZAR et al., 1984)

#### *1.7.1.7. Sales Menores y Trazas:*

Los requerimientos de minerales traza serán llenados por contaminantes en los laboratorios químicos. Es probable que los minerales traza estén presentes en medios hechos de salmueras naturales, agua del grifo o sales solares.

#### *1.7.1.8. Otros componentes:*

Las vitaminas y otros factores de crecimiento han sido probados por su capacidad para estimular crecimiento en medios hipersalinos. Estos pueden suministrarse con la adición de extracto de levadura (Kauri et al., 1990).

### **1.7.2. Condiciones ambientales**

#### *1.7.2.1. Temperatura:*

Es uno de los parámetros más importantes para el desarrollo de los microorganismos halófilos y la producción de metabolitos. Las bacterias halófilas y halotolerantes se desarrollan en un rango de temperatura de 27°C a 40°C dependiendo de la especie la temperatura óptima 30 °C.

#### *1.7.2.2. pH:*

Las bacterias halófilas y halotolerantes generalmente crecen y se desarrollan en medios neutrófilos con pH de 6,8 a 7,5. Sin embargo, algunas anaerobias han reportado rangos entre 8-10, para mantener ese pH se emplea carbonatos. El establecimiento de un pH óptimo para la producción de metabolitos secundarios con potencial biotecnológico a nivel industrial (Garzón , 2015: p.29).

#### *1.7.2.3. Condiciones de oxígeno*

La mayoría de los microorganismos halófilos y halotolerantes son aerobios; en sistemas hipersalinos la solubilidad de oxígeno disminuye la salinidad en un 10%, 30% y 80% por ello es necesario considerar la aireación.

Lo anterior, confirma que la presencia o ausencia de oxígeno en el medio es un factor limitante para el aislamiento de diferentes géneros de bacterias halófilas y la síntesis de metabolitos (Kivistö y Karp, 2011: pp.114-124.)

## **1.8. Clasificación taxonómica de bacterias localizadas en ambientes salinos.**

### **1.8.1. *Halobacterium***

Dominio: Archea

División: Euryarchaeota

Clase: Halobacteria

Orden: Halobacteriales

Familia: Halobacteriaceae

Género: *Halobacterium*

Garrity et al., (2001). Describen al género *Halobacterium* como un halófilo obligado, bacilo Gram negativo, que requiere al menos del 12% de NaCl para su crecimiento; pueden sobrevivir a soluciones saturadas de salmuera; presentan movilidad con flagelos polares, algunas especies no móviles.

La mayoría de las especies son aerobios estrictos pero algunos exhiben crecimientos anaeróbicos facultativos, presentan un metabolismo quimioorganotrófico donde los carbohidratos pueden o no ser atacados sin la producción de gas visible. Los nitratos se reducen, ocasionalmente con la producción de gas, requieren de aminoácidos para su crecimiento son oxidasa y catalasa positiva.

Este género se desarrolla en un rango de temperatura de 35 - 50°C con un pH de 5.5 – 8.5. La mayoría de las especies son proteolíticas y estas constituyen una fracción variable de la población microbiana de salinas especialmente de ambientes talasosalinas que están presentes en depósitos de sal subterráneo.

### **1.8.2. *Halococcus***

Dominio: Archaea

División: Euryarchaeota

Clase: Halobacteria

Orden: Halobacteriales

Familia: Halobacteriaceae

Género: *Halococcus*

De acuerdo con Grant (2015), el género *Halococcus* se presenta en forma de cocos en pares, tétradas, sarcinas o grupos irregulares Gram negativos son halófilos estrictos ya que requieren concentraciones de al menos del 2.5 M de NaCl para el crecimiento, no presenta formación de esporas.

Son aerobios estrictos, presentan un metabolismo quimiorganotrofos, oxidasa y catalasa positiva, una característica interesante reportadas de las Halobacteriacea que las proteínas son ácidas y las enzimas se activan por la presencia de sal. Se desarrollan en una temperatura óptima de 30 a 40 °C y en un rango de pH de 6 a 9.

Pruebas de almidón y tween 80 son hidrolizados, mientras que la prueba de caseína no es hidrolizada. Están localizados en el agua de mar, lagos salinos, en minas de sal y en productos salinos (Legat et al., 2013).

Dentro de la familia de Halobacteriacea producen exoenzimas tales como proteasas, lipasas, amilasa y ADNsas.

### ***1.8.3. Chromohalobacter***

Dominio: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Oceanospirillales

Familia: Halomonadaceae

Género: *Chromohalobacter*

Ventosa (2015) describe al género *Chromohalobacter* como un halófilo moderado, bacilo recto o ligeramente curvo que se agrupan en cadenas cortas o en parejas Gram negativo que requiere de concentraciones del 8% - 10% de NaCl se ha reportado que pueden crecer hasta concentraciones del 30% de NaCl, presentan movilidad con flagelos polares y no existe formación de esporas.

Este género presenta una respiración aerobia un metabolismo quimioorganotrófico el ácido se produce aeróbicamente a partir de d-glucosa y otros azúcares. Los carbohidratos, aminoácidos y algunos polioles pueden servir como únicas fuentes de carbono la mayoría de las especies reducen nitratos; son catalasa positiva y oxidasa negativa

Este género se desarrolla en un temperatura óptima de 30 -37 °C con un pH de 7.5; las colonias son de color crema a marrón-amarillo pigmentado. En el manual de Bergeys describe que este género no hidrolizan de fenilalanina deaminasa, gelatina, almidón, tween 80, esculina, ADN y tirosina.

De este género se realizó el primer biorreactor utilizado para el crecimiento celular y acumulación interior de ectoína (Yin et al., 2014).

#### **1.8.4. *Halomonas***

Dominio: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Oceanospirillales

Familia: Halomonadaceae

Género: *Halomonas*

De acuerdo Vreeland (2015) el género *Halomonas* es un halófilo moderado bacilo recto o curvo Gram negativos que requieren concentraciones de 0.1% - 32.5% de NaCl, presentan movilidad por flagelos laterales polares o peritricos, no existe formación de endosporas

La tolerancia al NaCl se ve afectada por la temperatura de crecimiento más no por la fuente de carbono utilizada. La mayoría de las especies son aerobios y se reporta que algunos crecen en glucosa en condiciones anaerobias, presenta un metabolismo principalmente respiratorio; muestran catalasa y oxidasa positiva.

Crece a una temperatura óptima de 30 °C y en un rango de pH de 7,0 a 11. Las colonias son de color blanco o amarillo y se tornan de color marrón claro con el transcurso del tiempo, este género se encuentran en ambientes salinos en todo el mundo incluyendo instalaciones de solares salinos y estuarios marinos hipersalinos.

Las enzimas de este género muestran actividad máxima en una concentración del 10% de NaCl siendo los productos resultantes hidrolisis de almidón (Ventosa, 2004).

### **1.8.5. *Salinibacter***

Dominio: Bacteria

División: Bacteroidetes

Clase: Bacteroidetes

Orden: Bacteroidetes

Familia: Rhodothermaceae

Género: *Salinibacter*

Acorde con Song et al.,( 2015) el género *Salinibacter* es un halófilo extremo bacilo que se presenta en forma de varilla ligeramente curvado, Gram negativo, requieren concentraciones de al menos del 15% al 30% de NaCl para desarrollarse, presenta movilidad por medio de flagelos.

Son aerobios obligados con un metabolismo quimioheterótrofo el cual crece mejor a bajas concentraciones de sustratos los altos niveles de compuestos orgánicos pueden ser inhibido, los aminoácidos son los sustratos preferidos para el crecimiento, presentan catalasa y oxidasa positiva Crecen en un rango de temperatura de 30-40 °C con un rango de pH de 6.5- 8.0. Las colonias aisladas presentan un color rojo brillante/naranja pigmentado y amarillo.

### **1.8.6. *Salinivibrio***

Dominio: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Vibrionales

Familia: Vibrionaceae

Género: *Salinivibrio*

De acuerdo con Ventosa, (2015) el género *Salinivibrio* es un halófilo moderado bacilo en forma de varillas curvadas suelen presentarse de manera individual, en parejas y en ocasiones unidas por formas de S, Gram negativo; requieren de concentraciones de 2.5% al 10% de NaCl presentan movilidad por un flagelo polar no existe formación de esporas.

Son anaerobios facultativos con un metabolismo quimioorganotrofos el ácido se produce a partir de d-glucosa, gelatina es hidrolizada, pruebas de Voges-Proskauer y arginina descarboxilasa son positivos mientras que las prueba de indol, b-galactosidasa, lisina y ornitina descarboxilasa son negativas, presentan oxidasa y catalasa positiva.

Se desarrolla en un pH óptimo de 7.3 a 7.5, temperatura de 30 a 37 °C no requiere de factores de crecimiento. Las colonias son circulares, convexas, opacas lisas de color crema, mientras que los caldos son uniformemente turbios.

#### ***1.8.7. Marinobacter***

Dominio: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Alteromonadales

Familia: Alteromonadaceae

Género: *Marinobacter*

Bowman et al., (2015) describe al género *Marinobacter* como un halófilo moderado tiene forma de varilla Gram negativo, requiere concentraciones de 0.08 – 3.5 M NaCl para su crecimiento, presenta movilidad con un flagelos polares.

Este género presenta respiración aerobia con un metabolismo estrictamente respiratorio, oxidasa y catalasa positiva; se ha reportado que pueden crecer anaeróticamente por desnitrificación acoplada a la oxidación de un sustrato de carbono.

Este género se desarrolla en un rango de temperatura de 10 - 45 °C, pruebas bioquímicas como la urea y formación de ácido a partir de glucosa, licuefacción de gelatina e hidrólisis de almidón son negativas lipasa y tween 80 son positivas. Las colonias son circulares presentan pigmentos dependiendo de cada especies.

#### ***1.8.8. Pseudomonas***

Dominio: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Genero *Pseudomonas* es un bacilo Gram negativo con forma de varilla recta o ligeramente curvada, presenta movilidad por uno o varios flagelos polares ocasionalmente son inmóviles.

Presentan un metabolismo estrictamente respiratorio con oxígeno, en algunos casos el nitrato se puede utilizar como un aceptor alternativo de electrones (Madigan et al., 2003).

Dependiendo de las especies pueden tolerar concentraciones del 1% - 20% de NaCl. Algunas especies del género *Pseudomonas* presentan oxidasa positiva o negativa y catalasa positiva (Oren, 2004).

Tienen requerimientos nutritivos muy simples y crecen quimioorganotróficamente se desarrollan en un pH neutro y en un rango mesofílico de temperaturas. No presentan pigmentos fotosintéticos, pruebas indol y el rojo de metilo son siempre negativos. Carecen generalmente de enzimas hidrolíticos necesarios para degradar los polímeros en sus monómeros (Madigan et al., 2003).

Bacterias pertenecientes a este género han producido una proteasa extracelular la cual presenta una actividad óptima en un medio salino con concentración del 7.5% de NaCl (Ventosa, 2004).

#### **1.8.9. *Paracoccus***

Dominio: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: Alpha Proteobacteria

Orden: Rhodobacterales

Familia: Rhodobacteraceae

Género: *Paracoccus*

De acuerdo con DONOVAN et al., (2006) describen al género *Paracoccus* que se presenta en forma de cocos o cocobacilos que se les puede encontrar como células individuales, pares o racimos, Gram negativos, no presentan movilidad.

Especies de este género son aerobias crecen en una amplia gama de sustratos orgánicos y algunas son capaces de crecimiento anaeróbico. Presenta un metabolismo quimioorganotrófico que ocurren con una amplia variedad de compuestos orgánicos, los N-óxidos como nitrato, nitrito y óxido nitroso pueden ser utilizados como terminales aceptores de electrones, presentan oxidasa y catalasa positivas.

Crece en un rango de temperatura de 25 - 37 °C con un pH óptimo de 6.5 a 8.5. Las colonias están presentes en agar nutritivo después de 3 días de incubación son generalmente de 2- 4 mm

de diámetro, circular, lisa, convexa opacas; algunas especies forman pigmentos carotenoides muestran en pruebas bioquímicas de manitol positivo e indol negativo.

#### ***1.8.10. Marinococcus***

Dominio: Bacteria

División: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Marinococcus*

De acuerdo con Ventosa ,(2015) el género *Marinococcus* son células esféricas Gram positivas suelen presentarse en parejas o en aglomeraciones de tétradas, presentan movilidad con uno o dos flagelos, son halófilos moderados concentraciones del 5% a 20% de NaCl; no son formadores de esporas las especies de este género acumulan solutos osmóticos orgánicos

Presentan un metabolismo respiratorio aerobio estricto catalasa positiva. Las colonias son circulares y lisas brillantes, presentan pigmentos naranja, naranja amarillento o blanco cremoso. A este género se los puede encontrar en diferentes ambientes hipersalinos o salinos como agua de estanques, suelos salinos y agua de mar. Presenta un óptimo crecimiento a temperatura de 28 a 37 °C

#### ***1.8.11. Salinicoccus***

Dominio: Bacteria

División: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Salinicoccus*

De acuerdo con Ventosa, (2015) el género *Salinicoccus* es un halófilo moderado, células esféricas Gram positivas que suelen presentarse en parejas, tétradas o en grupo, no presenta movilidad, no son formadores de esporas. Su óptimo desarrollo en concentraciones del 4% - 10% NaCl. Presenta una respiración aerobia estricta, catalasa y oxidasa positiva.

Presenta un óptimo crecimiento en un rango de temperatura 30- 37 °C, un pH de 7-9.5. Las colonias son circulares lisas de color crema, blanco, amarilla, rosa y naranja o no presenta pigmentos. Este género de bacterias se ha localizado en agua, suelo y lagos salinos. Las especies de este género no producen enzimas hidrolíticos extracelulares.

#### ***1.8.12. Staphylococcus***

Dominio: Bacteria

División: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

De acuerdo con Schleifer, y Bell (2015) el género *Staphylococcus* son cocos que están presentes de manera individual, pares o tétradas de cadenas cortas Gram positivo; que se desarrollan en concentraciones mayores al 10% de NaCl, no presentan movilidad, limitada formación de cápsulas.

Son anaerobios facultativos pero si se encuentran en condiciones aerobias el crecimiento es rápido y abundante por lo general catalasa positiva y oxidasa negativa; tienen un metabolismo respiratorio fermentativo quimioorganótrofos. Para la mayoría de las especies el producto principal de la fermentación de glucosa es el ácido láctico en presencia de oxígeno los principales productos son ácido acético y dióxido de carbono.

#### ***1.8.13. Streptococcus***

Dominio: Bacteria

División: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Streptococcaceae

Género: *Streptococcus*

De acuerdo con Whiley et al.,( 2015) el género *Streptococcus*, se presentan como cocos con forma esféricos que se presentan en parejas o en cadenas Gram positivos, este género no presenta movilidad y no existe la formación de endosporas.

Particularmente todas las especies son anaerobios facultativos y algunos adicionalmente requieren de CO<sub>2</sub> para el crecimiento, presentan un metabolismo quimiorganotrofo con fermentación, los carbohidratos son fermentados produciendo principalmente ácido láctico pero no gas; catalasa negativa

### **1.9. Actividad biológica de halófilas y halotolerantes**

Las aplicaciones que se han encontrado para halófilos y halotolerantes son realmente sorprendente como una fuente potencial de productos de interés aplicado en diverso sectores de la industria Química, Farmacéutica, Alimenticia, Textil, etc (Meseguer, 2004)

#### **1.9.1. *Solutos compatibles:***

Son sustancias osmóticamente activas de bajo peso molecular que son altamente soluble en agua, alcoholes y aminoácidos. Son de gran importancia porque actúan como estabilizadores de biomoléculas como enzimas, ADN y membranas también actúan como agentes de protección al estrés celular y de enzimas de interés industrial. (Margesin y Schinner, F, 2001).

Estos compuestos han sido ampliamente estudiados por las características que presentan siendo los solutos compatibles más conocidos.

La ectoína que se encuentra comúnmente en bacterias halófilas heterotróficas aerobias. Es utilizado en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a la desecación, mejora biológica fijación de nitrógeno, en la recuperación de suelos áridos, además se ha empleado como estabilizador en la PCR, en enzimas como amilasas, lipasas, celulasas y proteasas (Galinski, 1995 citado en Díaz, 2011).

Glicina- betaína: presente en bacterias halófilas fototróficas, es empleado en plantas transgénicas como el maíz y tabaco genera resistencia a altas concentraciones de estrés abiótico.

La trehalosa presente en bacterias halotolerantes, empleado como un crioprotector durante la liofilización de biomoléculas su mecanismo consiste en remplazar a las moléculas de agua a través de las uniones polares de sus residuos; la trehalosa previene la desnaturalización de las proteínas y la fusión de membranas (González y Peña, 2002:p.142).

### **1.9.2. Biopolímeros**

Son macromoléculas sintetizadas mediante procesos biológicos; las bacterias halófilas tienen la capacidad de producir diferentes clases de biopolímeros como son los biosurfactantes, exopolisacáridos, liposomas, lectinas y bioplástico.

#### **1.9.2.1. Biosurfactantes:**

Son agentes tensoactivos que dan lugar a una disminución de la tensión superficial; estas moléculas contienen segmentos hidrosoluble y liposolubles; el análisis de biosurfactantes se lleva a cabo a través de actividad de emulsificación, formación de espuma, aumento de solubilidad y la movilidad de los compuestos orgánicos hidrófobos (Sarafin et al, 2014).

Son empleados en la remediación de suelos permitiendo una distribución uniforme de los fertilizantes, bioplaguicida como los biosurfactantes lipopéptidos que es producido por varias bacterias que exhiben actividad insecticida contra la mosca de fruta; además de ser utilizados en el tratamiento de aguas contaminadas con pesticidas e hidrocarburos, empleados en productos farmacéuticos, en el procesamiento de alimentos agentes antiadherentes, industria cosmética empleados como espumantes, limpiadores, repelentes de insectos, productos para el baño, soluciones para lentes de contacto, etc (Fakruddin, 2012).

Biosurfactantes en detergentes comerciales como el Lipopéptido Cíclico presentando capacidad de emulsión. Extracción de petróleo son empleados en los campos en la degradación por corrosión e incrustaciones; además de ser importantes en la refinación y la producción petroquímica por la reducción de tensión superficial (Fakruddin, 2012).

En los últimos años, estos se han estudiado porque se encontró que las biomoléculas poseen propiedades de importancia terapéutica y biomédica. En el campo farmacológico los biosurfactantes actúan como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anticancerígeno, inmunomodulador, antiadhesivo, antioxidantes y la terapia génica. Se reportan ejemplos de bacterias halófilas productoras de biosurfactantes como es el caso de *Oceanobacillus sp.*, *Bacillus subtilis* (Margesin y Schinner, F, 2001).

#### **1.9.2.2. Exopolisacáridos EPS:**

Una de las funciones más importantes de los EPS es la de proteger a la célula bacteriana frente a la desecación y fluctuaciones potenciales del agua actuando como reservorios de agua en

condiciones extremas, además de un efecto protector frente a agentes antimicrobianos y los cationes metálicos tóxicos (Roberson y Firestone, 1992 citados en Mata, 2006)

Esta capacidad de adsorber cationes tóxicos como cadmio, plomo, cobre, zinc y estroncio, puede ser empleado en la biorremediación de suelos contaminados, la que consiste en interacciones electrostáticas con grupos funcionales negativas por ello la capacidad de retener iones metálico.

#### 1.9.2.3. *Lectinas:*

Son proteínas selectivas que poseen la capacidad de enlazarse de forma específica a carbohidratos, son empleados como indicadores de modificaciones de la superficie celular para la detección de células malignas (Margesin y Schinner, F, 2001).

#### 1.9.2.4. *Bioplástico PHA*

Son poliésteres lineales producidos intracelularmente por algunos microorganismos como reserva de carbono y energía que, una vez extraídos de la célula, que presentan propiedades físicas similares a plásticos derivados del petróleo. Presenta varias ventajas como ser biodegradables, resistencia total al agua, son tolerados en tejidos humanos y de animales el cual puede ser empleado en la industria farmacéutica (Ventosa y Nieto, 1995)

### 1.9.3. *Enzimas*

La mayoría de las haloenzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento provienen de bacterias halófilas moderadas. Así, se han descrito varias hidrolasas de interés industrial del tipo amilasas, proteasas y lipasas mencionadas por Ramírez et al., (2004)

En la siguiente tabla se describen las principales enzimas producidas por bacterias halófilas

**Tabla 3-1.** Principales enzima extracelulares producidas por bacterias halófilas

<b>Enzima</b>	<b>Géneros de microorganismos halófilos y halotolerantes</b>
Proteasa: es el grupo más importante de enzimas industriales ampliamente utilizados como aditivos para el lavado de ropa,	<i>Bacillus, Halobacillus, Filobacillus,</i>

<p>industria farmacéutica, gestión de residuos y procesamiento de alimentos industria del curtido; debido a la estabilidad y propiedades de las proteasas halófilas que se les ha denominado como haloproteasa que pueden permanecer activas en presencia de NaCl y tolerar pH de 5- 10 y temperaturas de 40 a 75 °C (Moreno et al., 2013).</p>	<p><i>Chromohalobacter,</i> <i>Nesterenkonia,</i> <i>Virgibacillus,</i> <i>Salinivibrio,</i> <i>Salinicoccus,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Marinobacter</i></p>
<p>Amilasas: utilizados como aditivos para detergentes, industria textil, alimenticia, cervecera, tratamiento de aguas residuales, sacarificación de almidón; debido a su estabilidad y versatilidad que se han purificado a partir de halófilos moderados, exhiben actividad máxima cuando se encuentran en un pH de 6.5 – 7.5, en una temperatura óptima de 45 °C, presenta una actividad óptima a 0.25M NaCl (Moreno et al., 2013).</p>	<p><i>Bacillus</i> <i>Nesterenkonia,</i> <i>Micrococcu,</i> <i>Halomonas</i> <i>Halobacillus,</i> <i>Halothermothrix</i> <i>Streptomyces,</i> <i>Chromohalobacter</i> <i>Thalassobacillus</i></p>
<p>Lipasas: son empleadas para la producción de sustancias químicas finas, empleadas como aditivos en detergentes, industria de alimentos y papel.</p> <p>Cataliza la actividad en un amplio rango de pH y temperatura por lo tanto muestra un excelente comportamiento en la producción de ácidos grasos polinsaturados libres que tiene ventajas sobre otras lipasas convencionales (Rungaroon et al., 2016)</p> <p>La dificultad que se presenta al trabajar con estas enzimas es su baja estabilidad en los procesos.</p>	<p><i>Marinobacter,</i> <i>Salinivibrio,</i> <i>Salinicoccus,</i></p>

**Fuente:** (Moreno et al., 2013) y (Rungaroon et al., 2016)

**Realizado por:** Silvia Jácome

Estudios realizados en hábitats salinos del sur de España sobre enzimas producidas por bacterias moderadamente halófilas permitió la caracterización, debido a que cepas de estos géneros poseen el potencial de hidrolizar una amplia gama de polímeros, como se muestra en la siguiente tabla los géneros de bacterias que producen enzimas de interés (Ventosa, 2004,p.287)

**Tabla 4-1:** Ejemplo de géneros que hidrolizan enzimas de interés

<b>Género</b>	<b>Amilasas</b>	<b>DNAsas</b>	<b>Lipasas</b>	<b>Proteasas</b>	<b>Pullulanasas</b>
<i>Salinivibrio</i>	11	9	3	16	16
<i>Halomonas</i>	4	3	10	2	6
<i>Chromohalobacter</i>	0	0	2	0	0
<i>Bacillus- Salibacillus</i>	7	8	5	5	4
<i>Salinicoccus</i>	0	0	1	1	0
<i>Marinococcus</i>	0	0	1	0	0

**Fuente:** (Ventosa, 2004, p.287)

**Realizado por:** Silvia Jácome

## CAPÍTULO II

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1. Hipótesis y especificación de las variables**

##### *2.1.1. Hipótesis*

Existen bacterias halófilas en la mina de sal de la parroquia Salinas del cantón Guaranda

##### *2.1.2. Variables*

###### *2.1.2.1. Variable dependiente*

Presencia de bacterias halófilas.

###### *2.1.2.2. Variables Independientes*

Muestra de aguas provenientes de la mina de sal.

#### **2.2. Tipo y Diseño de Investigación**

La investigación es de tipo descriptivo-exploratorio debido a que se describe las condiciones ambientales, parámetros físicos-químicos y microbiológicos con el objetivo de encontrar microorganismos que toleren diferentes concentraciones de sal, y realiza un estudio independiente de cada características, con el fin de determinar el crecimiento de bacterias halófilas

#### **2.3. Unidad de análisis**

Agua superficial de las zonas seleccionadas de la mina de Salinas del catón Guaranda.

#### **2.4. Población de estudio**

Mina de sal de la parroquia Salinas

##### *2.4.1. Ubicación geográfica*

La mina surge de depósitos sedimentarios de origen marino de tipo evaporítico, está formado de minerales en su mayoría halita, que es un típico alocromático que cambia de color tanto por las impurezas químicas y mecánicas. Las aguas presentes en estos yacimientos reflejan la

composición iónica del agua de mar que son conocidas como las salmuera talasohalinas (Oren, 2006; citado en Díaz, 2011)

Salinas de Guaranda constituida por una de las minas más importantes de la Serranía que han sido utilizados para la extracción de sal de manera artesanal desde los años de 1950 por los pobladores de la zona., se encuentra limitada

- Norte: Provincia de Tungurahua y las parroquias Simiatug, Facundo Vela y San Luis de Pambil
- Sur: Parroquia Guanujo
- Este: Provincia de Chimborazo
- Oeste: Parroquia San Luis de Pambil y el Cantón Echeandía.



**Figura 1-2:** Ubicación Geográfica de la mina

**Fuente:** Google Maps. 2018

La mina de sal se encuentra ubicada en las siguientes coordenadas geográficas como muestra la tabla.

**Tabla 1-2:** Coordenadas geográficas de la mina de Salinas

<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>Altura (m)</b>
720347	9844345	3490
720256	9844321	3505
720249	9844330	3508
720293	9844288	3509
720348	9844300	3509

Realizado por: Silvia Jácome, 2017

#### **2.4.2. Descripción de la zona**

El clima y sus paisajes se encuentran marcados por la cercanía del volcán Chimborazo, siendo una zona de páramos que presentan las siguientes características

- Altitud: 3000-4000msnm
- Temperatura: 6 a 12 °C
- Precipitaciones: 1500 a 2000 mm
- Tipo de suelos: Inseptisoles Entisoles

La flora representativa en la parroquia y alrededores de la mina musgos, almohadillas, achupallas vegetación herbácea y ciertas manchas de bosques en las laderas más pronunciadas Dentro de los pajonales se encuentran arboles, arbustos de romrillo y mortiño ( Ecostravel, 2016.)

Uso actual del suelo: los pobladores de la parroquia se dedican a la agricultura, ganadería, pastoreo y la producción de lácteos, en los alrededores de la mina no se observa actividad agrícola ni ganadera, solamente actividad turística senderismos por los alrededores de la mina, la presencia de la Virgen de Aguacachi estatua que se encuentra ubicada sobre el centro y la producción de sal que la realizan algunos pobladores. (Morán, 2016)

#### **2.5. Tamaño de muestra**

Las muestras que se emplearon en esta investigación se recolectaron de tres zonas, localizadas dentro de la mina de sal de Salinas ver (ANEXO C). Las cuales fueron escogidas de acuerdo a la disponibilidad de agua presente en los sitios

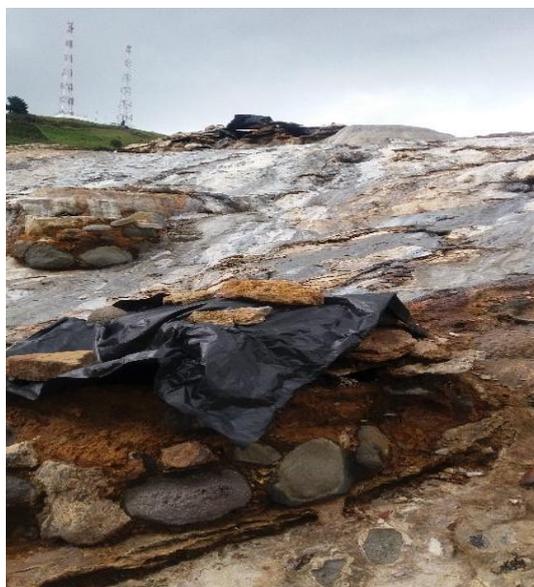
Zona 1: se encuentra localizada en la parte superior de la mina, con coordenadas (720308; 9844311) se caracteriza por tener la presencia de dos ojos de agua de formación natural.



**Fotografía 2-2:** Ubicación zona 1

**Realizado por:** Silvia Jácome, 2018

Zona 2: se encuentra localizada en la parte media de la mina, con coordenadas (720317; 9844320) (720319; 9844323) se caracteriza por la presencia de pozos realizados por habitantes de la zona, donde el agua proveniente de la zona 1 es llevada a estos, son cubiertos con plásticos para evitar que la lluvia disminuya la concentración de sal.



**Fotografía 3-2:** Ubicación zona 2

**Realizado por:** Silvia Jácome. 2018.

Zona 3 se encuentra localizada en la parte media y superior de la mina, con coordenadas (720268; 9844336) (720290; 9844327) presenta características similares a la zona 2.



**Fotografía 4-2:** Ubicación zona 3

**Realizado por:** Silvia Jácome. 2018.

## **2.6. Selección de la muestra**

Para la selección de la muestra se tomó en consideración el agua disponible en distintas zonas:

- Zona 1: Se tomó una muestra compuesta de 1250mL los 2 pozos abiertos
- Zona 2: Se tomó una muestra compuesta de 1250mL de 5 pozos cubiertos
- Zona 3: Se tomó una muestra compuesta de 1250mL de 4 pozos cubiertos.

El muestreo se realizó por triplicado en el mes de junio período de invierno, mes de agosto, y octubre período de verano, cada una de las zonas y se midió la temperatura y pH del agua. La caracterización físico-química se realizó de una muestra compuesta de un litro de agua por zona. Para la siembra ex situ se recolectó 250ml de agua en frascos estériles y la siembra se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias.

## **2.7. Técnicas de recolección de datos**

### **2.7.1. Muestreo aguas superficiales**

Según la norma INEN 2176 Técnicas de muestreo, se tomó una muestra compuesta de los pozos abiertos y otra de los pozos que se encuentran cubiertos, debido a que esto revela datos de composición promedio.

Para los análisis físicos y químicos, algunas determinaciones deben ser ejecutadas in situ como la medición de la temperatura y el pH con cintas colorimétricas, las muestras fueron tomadas entre

5 a 20 centímetros de profundidad y en la superficie dependiendo del tipo del pozo y el volumen de agua que se encuentre disponible.

## 2.7.2. Manejo y conservación de muestras

### 2.7.2.1. Análisis físico-químico

Según la norma INEN 2169 recomienda utilizar botellas ámbar de 1L la cual se debe llenar completamente y tapanla bien para que no exista aire sobre la muestra, el transporte se realiza en refrigeradores de campo cooler para mantener las muestras a una temperatura inferior a la que se recolecto. Las muestras se transportaron hasta el laboratorio de Servicios Ambientales de la UNACH donde fueron analizados los parámetros que se muestran en la Tabla 2-2.

**Tabla 2-2:** Métodos utilizados para el análisis fisicoquímico de las muestras de agua

PARÀMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO
pH	-	PE-LSA-O1
Conductividad	µs/cm	PE-LSA-O2
Nitratos	mg/L	STADARD METHODS 4500 NO <sub>3</sub> -E mod.
Nitritos	mg/L	STADARD METHODS 4500 NO <sub>2</sub> -B
Sulfatos	mg/L	STADARD METHODS 4500 SO <sub>4</sub> -E
Solidos Disueltos Totales	mg/L	STADARD METHODS 2540 –C
Calcio	mg/L	STADARD METHODS 3500 Ca 3111B
Cloruros	mg/L	STADARD METHODS 3500 - Cl E mod
Fósforo Total	mg/L	STADARD METHODS 4500 - P - E mod
Hierro	mg/L	STADARD METHODS 3500 Fe - 3111B
Magnesio	mg/L	STADARD METHODS 3500 Mg - 3111B
Potasio	mg/L	STADARD METHODS 3500 Na – B
Sodio	mg/L	STADARD METHODS 3500 K – B
Materia Orgánica	mg/L	MÉTODO INTERNO

Fuente: (Schneegurt, 2012) y (Oren, 2004)

Realizado por: Silvia Jácome. 2017

Se realiza un análisis inicial de los parámetros físico-químicos; para los análisis microbiológicos se realiza por triplicado.

### 2.7.3. Caracterización microbiológica

#### 2.7.3.1. Preparación de medios

Se preparó el medio de cultivo sólido TSA+ NaCl a diferentes concentraciones 1, 3, 10 y 15%, ya que este medio proporciona sustratos más simples de degradar, lo que favorece el crecimiento, con un período de incubación máximo de 5 días (Roohi et al., 2012) y (Garzón, 2015).

**Tabla 3-2:** Medio de cultivo TSA

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

**Realizado por:** Silvia Jácome 2018

Se preparó el medio de cultivo líquido TSB + NaCl a diferentes concentraciones 1, 3, 10 y 15%, se empleó tubos Falcón de 15mL en los cuales se agrega 9mL del caldo TSB.

**Tabla 4-2:** Medio de cultivo TSB

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

**Realizado por:** Silvia Jácome 2018

#### 2.7.3.2. Procesamiento de muestras *In situ*

El medio preparado TSB + NaCl es transportado en un cooler hasta los puntos de muestreo. Se tomó 1mL de agua de la muestra compuesta y se transfirió a los tubos Falcón, dicho proceso se realizó por triplicado para cada concentración. Los medios líquidos se mantienen en agitación a 200 rpm, son incubados a 30 °C durante 7 a 10 días controlados diariamente. Una vez que se observó turbidez en los tubos se procede a preparar diluciones seriadas de 1:10 alcanzándose diluciones hasta  $10^{-6}$  de solución de agua peptona se transfirió 0.1mL de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  sobre las placas de TSA+NaCl a la misma concentración del caldo se aplicó la siembra en superficie incubando a 30 °C por 72 horas hasta que se observó crecimiento en las placas y finalmente se realizó el conteo de colonias bacterianas (Arahal et al, 2007).

### 2.7.3.3. Preparación de diluciones ex situ

Con las muestras de agua procedentes de los pozos abiertos y cerrados, se preparó diluciones seriadas en una secuencia de 1:10 alcanzándose diluciones hasta  $10^{-3}$ , utilizando solución de agua de peptona una vez preparadas las diluciones, se transfirió 0.1mL de la dilución sobre las placas de TSA+ NaCl aplicando la siembra en superficie, se incubó las placas a temperatura de 30 °C durante 72 horas hasta que se observó crecimiento en las placas. Se realizó un recuento de colonias en placa con la dilución en la que se pueda contabilizar en un rango de 30 a 300 unidades formadoras de colonias UFC. Al ser mayor a 300 el número es demasiado elevado para hacer un recuento fiable y bajo 30 no tiene valor estadístico, para lo cual se emplea la siguiente fórmula (Camacho et al, 2009)

$$UFC \text{ ml de muestra} = \frac{\text{número de colonias} * \text{factor de dilución}}{\text{ml sembrados en placa}}$$

### 2.7.4. Técnica de aislamiento

Una vez que se realiza el recuento en placas por concentración y punto de muestreo, de acuerdo con Sanz (2011, p.20), se procedió a seleccionar entre los triplicados las colonias de bacterias que sean diferentes en sus características macroscópicas, se realizó el aislamiento que consiste en tomar la colonia que se encuentra más alejada de otras; una vez que se toma a la colonia con el asa circular transferir a una nueva placa con la misma concentración realizar la siembra en estriado incubar las placas a temperatura de 30 °C durante 72 horas hasta que se observe crecimiento en las placas, este proceso se puede repetir hasta obtener la pureza en los aislados en bacteriano.

Para la identificación de las cepas bacterianas, se seleccionan las que presentan semejanza en sus características macroscópicas como en su forma, color borde, consistencia; mientras que su morfología microscópicas se considera el tipo de tinción y forma; finalmente las pruebas bioquímicas de lectura rápida y lenta para la identificación de características metabólicas, después de haber realizados el aislamiento de los 3 muestreos.

### 2.7.5. Caracterización morfológica

#### 2.7.5.1. Caracterización morfológica macroscópica

Una vez obtenidos los aislados se procedió a realizar la descripción de las colonias de acuerdo a los siguientes aspectos descrito por

- Forma: circular, rizoide, irregular, filamentosa.
- Borde: entero, ondulado, lobulado, filamentoso, ondeado, rizoide, irregular.
- Elevación: plana, elevada, convexa, umbonada.
- Superficie: lisa, rugosa.
- Pigmentos
- Consistencia: seca, cremosa, viscosa.
- Luz transmitida: transparente, traslúcida, opaca.
- Luz reflejada: opaca, brillante.

#### *2.7.5.2. Caracterización morfológica microscópica.*

La caracterización microscópica se realizó por medio de tinción Gram. Para aplicar esta técnica de identificación Tortora et al., (2007) recomienda que se debe realizar con cultivos jóvenes, en etapa de crecimiento

Ésta consiste en preparar un frotis del microorganismo sobre un portaobjetos, y fijar el material pasando el portaobjetos tres veces sobre la llama del mechero. Cubrir el frotis con violeta de genciana, transcurrido un minuto, lavar con agua destilada, luego cubrir el preparado con lugol durante un minuto y eliminar los residuos con agua destilada, posteriormente colocar alcohol cetona durante 10 segundos, separando excedentes del colorante con agua destilada, finalmente colocar safranina durante un minuto y el preparado lavar con agua destilada y observar en el microscopio (Rodríguez et al., 2005:p.22)

#### *2.7.6. Caracterización bioquímica*

##### *2.7.6.1. Pruebas de lectura inmediata*

- Oxidasa

Consiste en tomar con un palillo de madera estéril la colonia aislada, la muestra se pone en contacto con la tira de oxidasa; Se consideró prueba positiva si existió viraje de color en la tira, de blanco a azul antes de los primeros 20-30 segundos, de lo contrario el resultado es negativo.

- Catalasa

Realizar un frotis de la colonia sobre un portaobjetos sin dejar secar, agregar una gota de agua oxigenada al 30% si se observa un burbujeo intenso inmediato se considera como positivo y si no hay ningún cambio negativo.

#### 2.7.6.2. Pruebas de lectura lenta

- **TSI Agar triple Azúcar Hierro**

Se preparó, esterilizó y dispensó en los tubos estériles 5ml en forma de pico de flauta tapar lo tubos con corchos estériles; a partir de un cultivo puro, con el asa de inoculación inocular el medio de cultivo, picando en el fondo y extender sobre la superficie del mismo, llevar a incubación a 35 -37 °C durante 24 y 48 horas finalmente observación e interpretación de los resultados (BRITANIA, 2001a).

1. Superficie alcalina/profundidad ácida Rojo /Amarillo K/A: El microorganismo solamente fermenta glucosa.
2. Superficie ácida/profundidad ácida Amarillo/Amarillo A/A: El microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
3. Superficie alcalina/profundidad alcalina Rojo/Rojo K/K: El microorganismo no es fermentador de azúcares.
4. La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

- **Citrato**

Se preparó, esterilizó y dispensó en los tubos estériles 5ml en forma de pico de flauta tapar los tubos con corchos estériles a partir de un cultivo puro, con el asa de inoculación estriar la superficie de medio de cultivo, llevar a incubación a 35 -37 °C durante 24 y 48 algunos microorganismos pueden requerir hasta 7 días de incubación horas finalmente observación e interpretación de los resultados (BRITANIA, 2001b).

- Positivo: Crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta
- Negativo: Ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.

- **SIM Sulfuro-Indol-Movilidad**

Se preparó, esterilizó y dispensó en los tubos estériles 5ml en forma vertical tapar lo tubos con corchos estériles a partir de un cultivo puro, con el asa de inoculación inocular el medio de cultivo por punción profunda utilizando aguja de inoculación recta; inocular el centro del tubo, y la punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie, llevar a incubación a 35 -37 °C durante 24 y 48 horas finalmente observación e interpretación de los resultados (BRITANIA, 2001c).

### **Movilidad**

Resultado positivo: Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.

Resultado negativo: Crecimiento solamente en la línea de siembra.

### **Producción de H<sub>2</sub>S:**

Resultado positivo: Ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio

Resultado negativo: El medio permanece sin cambio de color

### **Prueba indol:**

Se agregó al medio de cultivo 3 a 5 gotas del reactivo de Kovac

Resultado positivo: Color rojo

Resultado negativo: El color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento.

- **Urea**

Se preparó, esterilizó y dispensó en los tubos estériles 5ml en forma de pico de flauta tapar los tubos con corchos estériles a partir de un cultivo puro sembrar un inculo denso del microorganismo, llevar a incubación a 35 -37 °C durante 24 y 48 horas; y para aquellos microorganismos que hidrolizan lentamente la urea incubar hasta 72 horas finalmente observación e interpretación de los resultados (BRITANIA, 2001d).

- Microorganismos que hidrolizan la urea: el medio de cultivo es de color rosado-rojizo.
- Microorganismo que no hidrolizan la urea el medio permanece del mismo color.

- **Manitol**

Se preparó, esterilizó y dispensó las cajas Petri, a partir de un cultivo puro, con el asa de inoculación inocular el medio de cultivo en superficie, llevar a incubación a 35 -37 °C durante 24 y 48 horas finalmente observación e interpretación de los resultados (BRITANIA, 2001e).

- Microorganismos fermentadores de manitol: colonias de color amarillos rodeadas o no de un halo amarillo
- Microorganismos no fermentadores de manitol: colonias del color del medio, rojas rodeadas o no de halo rojizo púrpura.

Las pruebas de caracterización bioquímicas se realizaron a las cepas bacterianas que presentaron en sus características microscópicas de tinción Gram negativa y la forma de bacilo, mientras que las cepas bacterianas que presentaron forma de cocos Gram positiva y negativa se realizó únicamente pruebas de lectura inmediata como es la oxidasa y catalasa; y prueba de lectura lenta como el manitol. Puesto que estas pruebas permiten la identificación de microorganismo a través de claves diferenciales (Alvarez et al., 1990.).

#### **2.7.7. Actividad enzimática**

Para la actividad enzimática, una vez terminados los aislamientos de los 3 muestreos se procedió a realizar una selección de las cepas que presentan características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas semejantes. Seleccionadas las cepas se procede a realizar la actividad enzimática.

##### **2.7.7.1. Actividad aminolítica**

Se comprobó la actividad aminolítica preparando el medio TSA+NaCl adicionando 2.5 g/L de almidón soluble de yuca, se incubó durante 96 horas a 35 °C después de la incubación se agrega 3 a 5mL de la solución de lugol, la que permite evidenciar la presencia de halos de hidrólisis alrededor de las colonias (Garzón, 2015).

##### **2.7.7.2. Actividad proteolítica: caseína**

Se comprobó actividad proteolítica preparando el medio TSA+NaCl adicionando 10% (v/v) de leche descremada, se incubó durante 96 horas a 35 °C; para la interpretación de los resultados se determinó cualitativamente la formación de halos de aclaramiento de proteólisis en el agar (Haki y Rakshit, 2003).

### *2.7.7.3. Actividad lipolítica*

Para la comprobación de actividad proteolítica se preparó el medio TSA+NaCl se adicionó 2mL de aceite de oliva, 2mL de tween 80 y 10 gotas de vitamina A en 100mL de agua destilada se incubó durante 96 horas a 35 °C; para la interpretación de los resultados se determinó cualitativamente la formación de halos de aclaramiento alrededor de las colonias, en contraste con el resto del medio que permanece turbio (Thomson et al., 1999).

## CAPITULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS

#### 3.1. Resultados, análisis y discusión

##### 3.1.1. Evaluación de las características físico-químicas y microbiológicas del agua

De acuerdo a las 3 zonas de muestreo, los resultados de pH y temperatura se muestran en la Tabla 1-3.

**Tabla 1-3:** Resultados de pH y Temperatura

ZONA	pH	Temperatura
P.A-1	7.3	12
P.C-2	8	9.8
P.C-3	8	9.5

Realizado por: Silvia Jácome 2018

La zona 1 (P.A-1) tiene un pH ligeramente alcalino debido a que proviene de un ojo de agua superficial de formación natural y este se encuentra en constante movimiento; mientras que las zonas cubiertas 2 (P.C-2) y 3 (P.C-3) presentaron un pH alcalino debido a que el agua interactúa con la roca de mina, esta al ser de origen mineral aporta al agua sales sódicas, sulfatos y cloruros aumentando el pH. Madigan, et al. (2003) describe que las especies bacterianas pueden desarrollarse en intervalos de 5.5 a 8, por lo tanto el agua de la mina es un ambiente propicio para el desarrollo de bacterias

Los valores de pH obtenidos concuerdan con los resultados reportados en minas de sal en Pakistan, España, Perú y Colombia con valores que se encuentran en un rango de 6.5 a 8.9; al estar presente facilita el desarrollo de bacterias halófilas (Pérez, 2014).

Los resultados de la caracterización físico química del agua se presentan en la Tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Resultados de los análisis físico-químicos

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	P.A-1	P.C-2	P.C-3
<b>pH</b>	-	PE-LSA-O1	7.43	8.7	8.21
<b>Conductividad</b>	µs/cm	PE-LSA-O2	85500	30800	115600
<b>Nitratos</b>	mg/L	STADARD METHODS 4500 NO <sub>3</sub> -E mod.	35.4	5.5	16.6
<b>Nitritos</b>	mg/L	STADARD METHODS 4500 NO <sub>2</sub> -B	0.052	0.018	0.018
<b>Sulfatos</b>	mg/L	STADARD METHODS 4500 SO <sub>4</sub> -E	340	130	180
<b>Solidos Disueltos Totales</b>	mg/L	STADARD METHODS 2540 -C	43270	18440	57890
<b>Calcio</b>	mg/L	STADARD METHODS 3500 Ca 3111B	146.12	74.61	128.09
<b>Cloruros</b>	mg/L	STADARD METHODS 3500 - CI E mod	21837	11344	60974
<b>Fósforo Total</b>	mg/L	STADARD METHODS 4500 - P - E mod	2.4	1	2.1
<b>Hierro</b>	mg/L	STADARD METHODS 3500 Fe - 3111B	0.85	0.05	0.1
<b>Magnesio</b>	mg/L	STADARD METHODS 3500 Mg - 3111B	53.72	48.31	66.32
<b>Potasio</b>	mg/L	STADARD METHODS 3500 Na - B	38.46	32.8	47.56
<b>Sodio</b>	mg/L	STADARD METHODS 3500 K - B	148.63	133.38	189.05
<b>Materia Orgánica</b>	mg/L	MÉTODO INTERNO	5.19	4.5	6.72

Fuente: UNACH. 2017

Realizado por: Silvia Jácome 2018

Se observa en los resultados obtenidos, no existe diferencia significativa entre cada punto, ya que el agua procede de un mismo origen, la cual es depositada en diferentes puntos, la diferencia entre valores de concentración se debe a diferencias físicas como la exposición solar, tamaño de los pozos y profundidad, que influyen en la evaporación y por lo tanto en la concentración en cada parámetros.

Con los resultados de los parámetros físico-químicos realizados se logró identificar qué tipo de ambiente salino es la mina. De acuerdo LaBaugh, 1989; citado en Diaz, 2011 el agua continental

se clasifica por su alto contenido iónico (sólidos disueltos totales) la Mina de Salinas al tener como valores por puntos superior a los 10g/L, esta se convierte en agua salina.

Otro de los parámetros que nos permite categorizar a los ambientes salinos es la conductividad eléctrica como se muestra la siguiente tabla

**Tabla 3-3** Caracterización de ambientes salinos respecto a la conductividad.

Ambientes salinos	Conductividad
Oligosalinos	800–8.000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$
Mesosalinos	8.000–30.000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ,
Polisalinos	30.000–45.000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$
Eusalinos	45.000–60.000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$
Hipersalinos	mayor a 60.000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )

Fuente: LaBaugh, 1989 citado en Diaz

Realizado por: Silvia Jácome 2018

Con los valores obtenidos de conductividad eléctrica en los análisis, se realizó la categorización P.A-1 con un valor de 85 500  $\mu\text{s/cm}$  corresponde a un ambiente hipersalinos, P.C-2 con un valor de 30 800  $\mu\text{s/cm}$  corresponde a un ambiente polisalino y el P.C-3 con un valor de 115 600  $\mu\text{s/cm}$  corresponde a un ambiente hipersalino. Este tipo de ambientes se ha descrito en investigaciones realizados en Colombia por Garzón, 2015; donde los valores de conductividad son mayores a 60000  $\mu\text{s/cm}$ ; en Perú por Maturrano, 2004 que los describe como ambientes hipersalinos

Los resultados de los análisis es consistente con la investigación de Oren (2006) en la que se clasifica a los ambientes hipersalinos como Talasohalino y Atalashalinos; la mina de Salinas en Guaranda evidencia ser un ambiente Talasohalino; considerando el promedio de las 3 zonas donde se realizó el muestreo, se presentó un pH neutro o ligeramente alcalino de 8.1 y predominio de iones de sodio  $\text{Na}^+$  157.02 mg/L y cloro  $\text{Cl}^-$  31385 mg/L con respecto a los cationes magnesio  $\text{Mg}^{2+}$  57.45 mg/L o calcio  $\text{Ca}^{2+}$  116.273 mg/L. Los ambientes talasohalinos se han descrito por Maturrano (2004) y Pérez, (2014)

Se observa que los resultados obtenidos en los P.2-C y P.3-C son diferentes a pesar de tener similitudes como su origen y la técnica de muestreo. En el P.2-C existe una disminución significativa en la concentración parámetros como, sólidos disueltos totales, calcio, cloruros sodio y magnesio; la posible causa para que exista una disminución en la concentración de los parámetros mencionados es la existencia de infiltraciones de agua, tamaño del pozo, cantidad de agua, exposición solar en cada pozo lo que interfiere en los resultados obtenidos.

Resulta interesante el origen marino de estas minas, pese a que su ubicación geográfica 3500 msnm y 450 km distancia con respecto al Océano Pacífico; tengan características en su composición iónica de salinas solares costeras, esto se puede relacionar con la existencia de yacimientos subterráneos de halita.

### 3.1.1.1. Procesamiento de datos

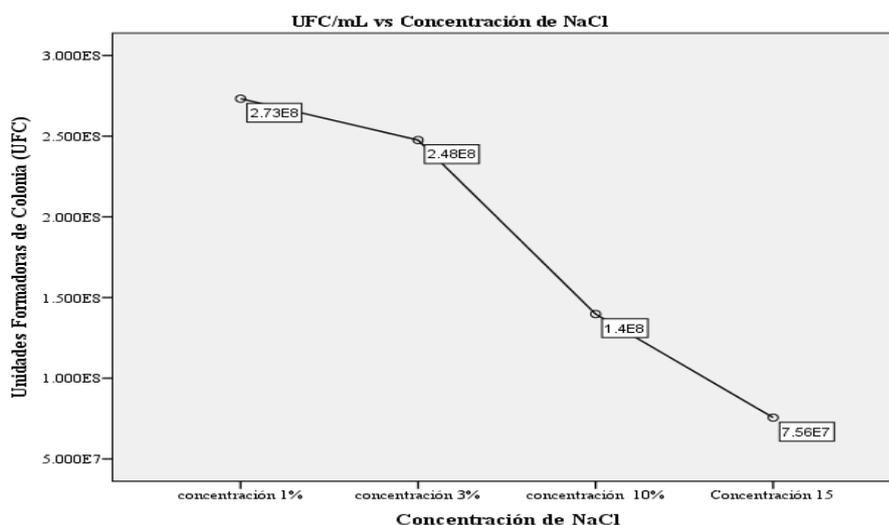
- Conteo de UFC (In.situ)

Para el procesamiento de datos se utilizó como variable el recuento de unidades formadoras de colonias por mL para cada concentración en los tres muestreos realizados. Con ayuda del software estadístico IBM SPSS versión 19, se determinó en qué zona y a qué concentración existió mayor crecimiento.

**Tabla 4.3:** Medias de UFC/mL por concentración

Concentración de NaCl	Valores medias de UFC/mL
1%	$2.73 \cdot 10^8$
3%	$2.48 \cdot 10^8$
10%	$1.4 \cdot 10^8$
15%	$7.56 \cdot 10^7$

Realizado por: Silvia Jácome. 2018



**Gráfico 1-3:** Cantidad de UFC/mL vs Concentración de NaCl

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

En el Gráfico 1-3 se observa una disminución progresiva de las UFC/mL conforme se incrementa la concentración de NaCl en el medio de cultivo. El mayor promedio de UFC/mL se registró a la concentración de NaCl del 1% con una media de  $2,8 \times 10^8$ , esto se debe a que los microorganismos

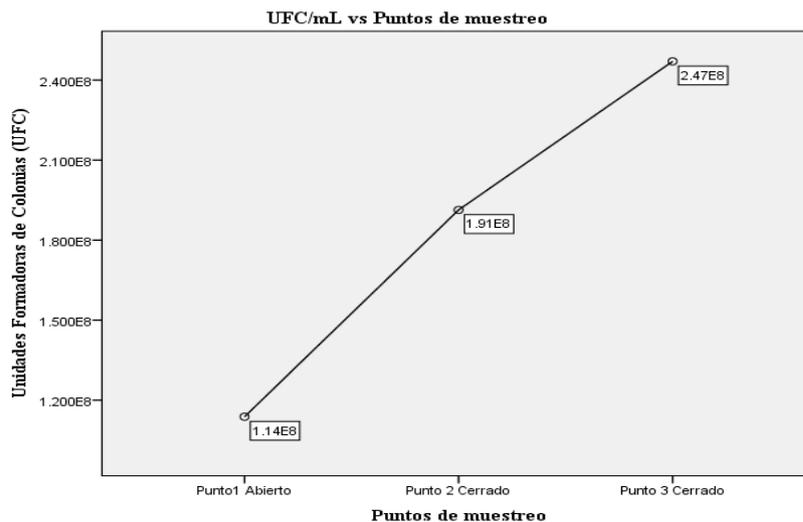
al estar expuesto a concentraciones bajas toleran y pueden adaptarse sin dificultad alguna, ya que a esta concentración se encuentran la mayoría de bacterias presentes en agua dulce (Oren, 2006).

Mientras que a una concentración del 15% el promedio de UFC/mL disminuye a  $7,6 \times 10^7$  esto se debe que al aumentar la concentración limita el crecimiento de microorganismos que no son halófilos moderados debido a las modificaciones morfológicas en su membrana como un incremento de ácidos grasos ciclopropánicos (Ramírez et al., 2004).

**Tabla 5.3:** Medias de UFC/mL por puntos de muestreo

Puntos	Valores medias de UFC/mL
Punto 1 Abierto	$1.14 \times 10^8$
Punto 2 Cerrado	$1.91 \times 10^8$
Punto 3 Cerrado	$2.47 \times 10^8$

Realizado por: Silvia Jácome. 2018



**Gráfico 2-3:** Cantidad de UFC/mL vs Puntos de muestreo

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

En el gráfico 2-3 describe un aumento de colonias con respecto a los puntos de muestreo; en el punto 3 se observa que existió mayor número de UFC/mL lo que concuerda con estudios realizados por Schneegurt (2012) donde, la cantidad magnesio  $Mg^{2+}$  y potasio  $K^{1+}$  están implicados en procesos de adaptación lo que les permite a las bacterias soportar altas concentraciones de sal, puesto que regulan la presión osmótica en el medio. En este punto la concentración de magnesio Mg (66.32 mg/L) y potasio K (47.56 mg/L) es superior respecto a los demás puntos de muestreo.

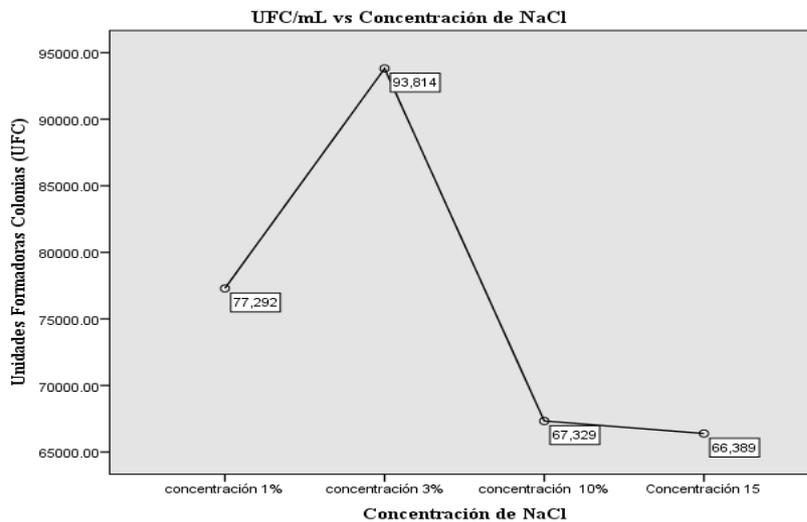
Otro de los parámetros que influyen en el incremento de UFC /mL en el P.C-3 es la elevada concentración de sodio Na; el sodio que interviene en procesos de osmoadaptación (Sleator y Hill, 2001:p.50)

- Conteo UFC (Ex Situ)

**Tabla 6.3:** Medias de UFC/mL por concentración

Concentración de NaCl	Valores medias de UFC/mL
1%	$7.73 \cdot 10^4$
3%	$9.38 \cdot 10^4$
10%	$6.73 \cdot 10^4$
15%	$6.64 \cdot 10^4$

Realizado por: Silvia Jácome. 2018



**Gráfico 3-3:** Cantidad de UFC/mL vs concentración de NaCl

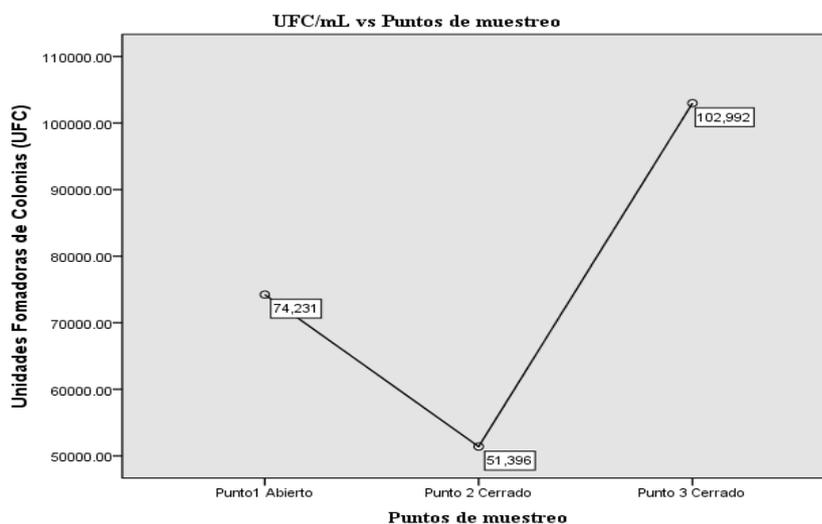
Realizado por: Silvia Jácome. 2018

En el Gráfico 3-3 se observa que las UFC/mL tienen un comportamiento variable al estar expuestos a distintas concentraciones de NaCl. al 3% se observa que existe mayor promedio de UFC/mL con una media de  $9.4 \times 10^4$ ; esto se debe a que los microorganismos presentes en las muestras de agua se han adaptado para desarrollarse a dicha concentración en el medio TSA; una de las posibles causas para que no exista mayor crecimiento en la concentración de NaCl al 1% no logren adaptarse en el medio y no se produzca su desarrollo, mientras que a la concentración del 10% y 15% el promedio de UFC/mL disminuye a  $6.6 \times 10^4$ , debido ya que se limita el crecimiento solamente halófilos moderados

**Tabla 7.3:** Medias de UFC/mL por puntos de muestreo

Puntos	Valores medias de UFC/mL
Punto 1 Abierto	$7.42 \cdot 10^4$
Punto 2 Cerrado	$5.14 \cdot 10^4$
Punto 3 Cerrado	$1.03 \cdot 10^5$

Realizado por: Silvia Jácome. 2018



**Gráfico 4-3:** Cantidad de Unidades Formadoras vs Puntos de muestreo

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

En el Gráfico 4-3 describe un aumento del promedio de UFC/mL por puntos de muestreo; siendo el punto 3 con mayor promedio; lo que es consistente con lo descrito en el Gráfico 2-3.

En el P.C-2 se observa la disminución  $5.14 \cdot 10^4$  el promedio de UFC/mL respecto a los 2 puntos de muestreo; una de las posibles causas son los resultados obtenidos de los análisis de los parámetros físico-químicos en los cuales se observa que la concentración de magnesio Mg y potasio K es menor respecto al P.C-3 influyendo así en el crecimiento.

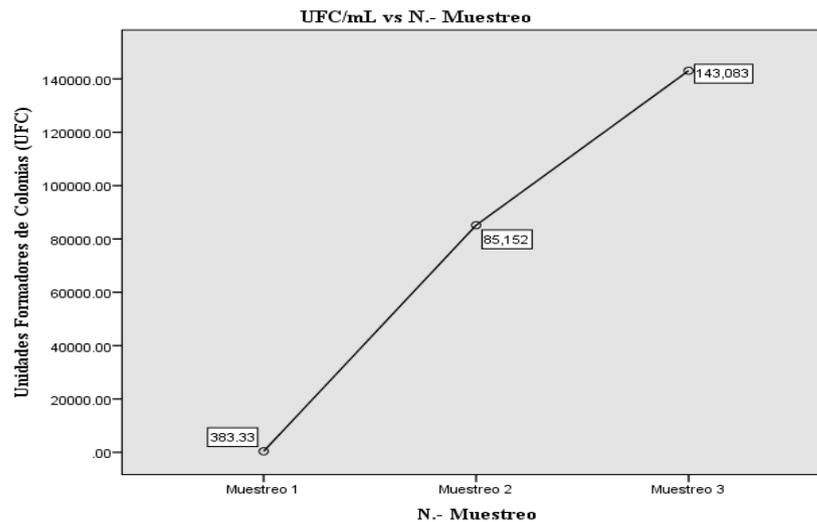
Otro de los factores que influyen en el crecimiento microbiano es la técnica de muestreo utilizada ya que las bacterias crecen mejor en el muestreo in situ debido a que se les proporciona todos los requerimientos nutricionales para su desarrollo, lo que no sucede con las bacterias del muestreo Ex situ que deben soportar condiciones de crecimiento más exigentes.

- Conteo UFC N.- de muestreos.

**Tabla 8.3:** Medias de UFC/mL por número de muestreo

Muestreo	Valores medias de UFC/mL
Muestreo 1	383
Muestreo 2	$8.52 \cdot 10^4$
Muestreo 3	$1.43 \cdot 10^5$

Realizado por: Silvia Jácome. 2018



**Gráfico 5-3:** Cantidad de UFC vs N.- de muestreo.

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

En el gráfico 5-3 describe el promedio de UFC/mL por el número de muestreo realizado, siendo el muestreo número 3, con una media de  $1.4 \times 10^5$  UFC/mL el más representativo debido que las condiciones ambientales para este fueron favorables con respecto al muestreo número 1 que se presenta con una media de  $3.8 \times 10^4$  y las condiciones ambientales no fueron favorables una fuerte lluvia y viento dificultó el muestreo lo que provocaría que las muestras de agua se produzca una dilución en la concentración y por ende una disminución en el número de UFC/mL.

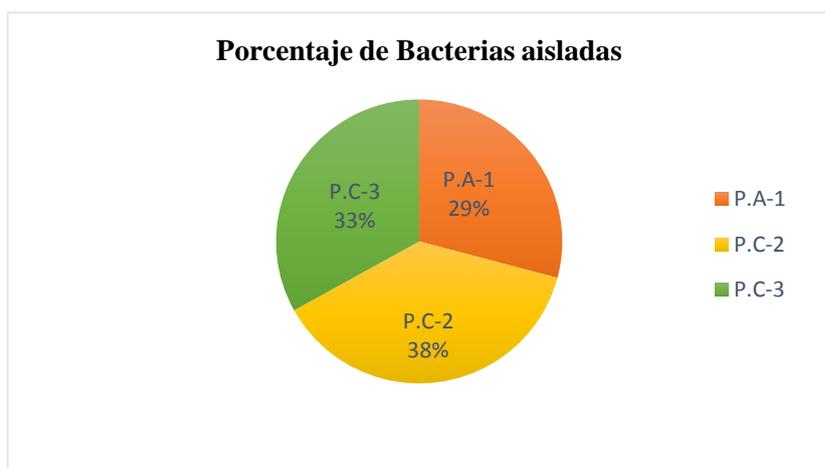
### Aislamiento de bacterias Halófilas

Se lograron aislar 125 cepas bacterianas de la mina de Salinas, de las cuales el 37% corresponden al P.C-2 y el 34% al P.C-3; en estos puntos existió mayor crecimiento debido a las características físico-químicas de las muestras de agua; mientras que el P.A-1 representa el 29%. En la Tabla 3-3 se muestran las cepas aisladas en cada punto de acuerdo a la concentración de sal usada.

**Tabla 9-3:** Total de bacterias aisladas

Concentración de NaCl	P.A-1	P.C-2	P.C-3	Total
1%	11	10	8	29
3%	8	14	13	35
10%	9	12	8	29
15%	9	10	13	32
<b>Total</b>	37	46	42	125

Realizado por: Silvia Jácome. 2018.



**Gráfico 6-3:** Porcentaje de Bacterias aisladas

Realizado por: Silvia Jácome. 2018.

### 3.1.2. Características morfológicas de los aislados bacterianos por Tinción Gram

En la Tabla 10-3 se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de Tinción Gram en los aislados bacterianos.

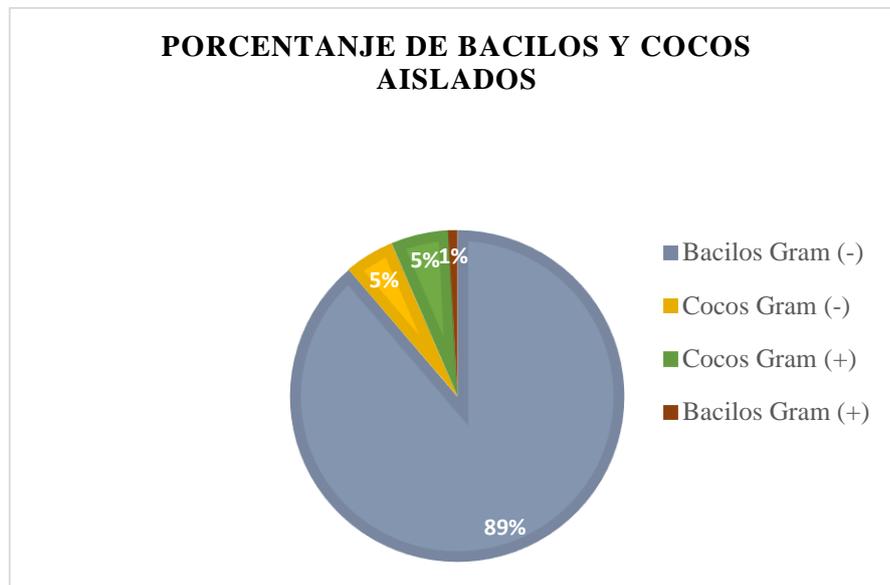
**Tabla 10-3:** Características morfológicas de acuerdo a la Tinción Gram.

Concentración de NaCl	Bacilos Gram -	Cocos Gram -	Cocos Gram +	Bacilos Gram +	Total
1%	24	2	3	0	29
3%	31	2	1	1	35
10%	29	0	0	0	29
15%	27	2	3	0	32
Total	111	6	7	1	125

Realizado por: Silvia Jácome

Mediante tinción Gram se identificaron bacterias Gram positivas y negativas. El 94% corresponden a bacterias Gram negativas de las cuales: el 89 % son bacilos y el 5% cocos, el 6%

restante corresponde a bacterias Gram positivas, siendo el 1% bacilos y el 5% cocos. Los resultados se observan en el Gráfico 6-3.



**Gráfico 7-3:** Porcentaje de Bacilos y Cocos aislados

**Realizado por:** Silvia Jácome. 2018.

La presencia mayoritaria de bacterias Gram negativas se debe a la composición lipídica que estos microorganismos presentan en su membrana celular. Según Ramírez et al., (2004) las bacterias halófilas moderadas presentan alteraciones en la membrana por un aumento de los ácidos grasos ciclopropánicos. Este resultado concuerda con lo mencionado por Ventosa, et al. (2007), donde las bacterias aisladas de muestras de aguas hipersalinas en su mayoría son bacterias Gram negativas aerobias.

De las 125 cepas aisladas (Ver Anexo D), se escogieron 33 cepas por sus semejanzas en morfología macroscópicas, pruebas bioquímicas y nutricionales para su identificación, 25 fueron bacilos Gram negativos, 4 cocos Gram positivos y 4 cocos Gram negativos.

### **3.1.3. Características morfológicas, bioquímicas y enzimáticas.**

En la Tabla 11-3 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas y nutricionales para los 25 bacilos Gram negativos.

**Tabla 11-3:** Características morfológicas, de bacilos Gram negativos

Morfología Macroscópica								
CONCENTRACIÓN	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA
Punto 1								
1%	P.1-1-2	C	E	M	C	L.B	V	O
1%	P.1-3-2 Cr-Cl	C	E	Cr	C	L.B	V	O
3%	P.1-2-2 N	C	E	B	C	L.B	Cr	O
3%	P.1-3	C	O	Cr	C	L.B	V	O
3%	P.1-2-2 Nb	C	E	N	C	L.B	V	O
10%	P.1-1-3	C	E	Cr	C	L.B	V	O
10%	P.1-3-2	C	E	Cr	C	L.B	Cr	O
15%	P.1-3	C	E	M	C	L.B	V	O
15%	P.1-1-3	C	E	Cr	C	L.B	V	O
Punto 2								
1%	P.2-3	C	E	Cr	C	L.B	V	O
1%	P.2-1	C	E	A	C	L.B	V	O
3%	P.2-3-3	C	E	M	C	L.B	V	O
3%	P.2-2-3	C	E	A	C	L.B	V	O
10%	P.2-3	C	E	B	C	L.B	Cr	O
10%	P.2-3-2	C	O	Cr	C	L.B	V	Tr
15%	P.2-2	C	E	M	C	L.B	V	O
15%	P.2-1-2	C	E	Cr	C	L.B	Cr	Tr
Punto 3								
1%	P.3-2-2	C	E	Cr	C	L.B	V	Tr
3%	P.3-3 Cr	C	E	Cr	C	L.B	V	Tr
3%	P.3-1-2	C	E	Cr	C	L.B	Cr	Tr
10%	P.3-1-3	C	O	Cr	C	Erizada	Cr	Tr
10%	P.3-3-3	C	E	Cr	C	L.B	V	O
10%	P.3-1-2	C	E	Cr	C	L.B	V	Tr
15%	P.3-2-3	C	E	Cr	C	L.B	Cr	Tr
15%	P.3-3	C	E	N	C	L.B	V	O

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

Forma: C=Circular

Borde: E=Entero; O=Ondulado

Color: Cr= Cr; M=Melón; N=Naranja; B=Blanco; A=Amarillo

Superficie: L.B=lisa brillante; E=Erisada

Consistencia: V= viscosa; Cr= Cremosa

Luz transmitida: Tr=Translucida; O=Opaca

La Tabla 11-3 muestra que se seleccionaron 25 cepas para su identificación, el 20% corresponden a cepas que crecen a concentraciones de NaCl del 1%; el 28% a concentraciones de NaCl del 3% siendo a estas dos concentraciones bacterias halófilos débiles, el 28% a concentraciones NaCl del 10% y el 24% a concentraciones de NaCl del 15% corresponde halófilos moderados

El 100% presentan forma circular; el 88% bordes enteros y el 12 % bordes ondulados. El 60% son de color crema, 16% melón y el 8% presentan colores blancos, naranjas y amarillos respectivamente. El 96% presenta superficie lisa brillante y el 4% erizada. En cuanto a consistencia, el 72% fue viscosa y el 28% cremosa y a luz transmitida el 68% fueron opacas y el 32% translucidas. Estas características concuerdan con investigaciones realizadas por (Canales et al., 2014) y (Flores-Fernández et al., 2014)

**Tabla 12-3:** Características morfológicas, de bacilos Gram negativos

CONCENTRACIÓN	PUNTOS	Bioquímica					Nutricional					
		OXIDASA	CATALASA	CITRATO	UREA	TSI	SIM			ALMIDON	CASEINA	LIPIDOS
							Movilidad	indol	H2S			
1%	P.1-1-2	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
1%	P.1-3-2 Cr-Cl	(-)	(-)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3%	P.1-2-2 N	(+)	(+)	(+)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
3%	P.1-3	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
3%	P.1-2-2 Nb	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
10%	P.1-1-3	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10%	P.1-3-2	(+)	(+)	(-)	(+)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
15%	P.1-3	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
15%	P.1-1-3	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
1%	P.2-3	(+)	(+)	(+)	(-)	K/A	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
1%	P.2-1	(-)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
3%	P.2-3-3	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
3%	P.2-2-3	(-)	(+)	(-)	(-)	A/A+	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
10%	P.2-3	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
10%	P.2-3-2	(+)	(+)	(+)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15%	P.2-2	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
15%	P.2-1-2	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
1%	P.3-2-2	(+)	(+)	(+)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
3%	P.3-3 Cr	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
3%	P.3-1-2	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
10%	P.3-1-3	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

10%	P.3-3-3	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
10%	P.3-1-2	(-)	(-)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15%	P.3-2-3	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
15%	P.3-3	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

**Realizado por:** Silvia Jácome. 2018

K/A: El microorganismo solamente fermenta glucosa.

A/A: El microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.

K/K: El microorganismo no es fermentador de azúcares.

+: La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.

Los resultados de las pruebas determinan que el 100% bacilos Gram negativos, las pruebas de lectura inmediata oxidasa el 80% de las cepas tienen reacción positiva con un cambio de coloración en la tira mientras que el 20% no presentó cambio de coloración. Con la prueba catalasa el 92% tuvo reacción positiva con formación de burbujas y el 8% no presentó ningún cambio.

Con los resultados obtenidos a partir de la caracterización macroscópica, microscópicas pruebas bioquímicas y enzimáticas se puede establecer que estas cepas bacterianas probablemente pertenecen a los siguientes géneros:

#### *Halomonas*

Este género corresponde al 16% del total de los aislados y se caracteriza por, tolerar concentraciones del 1%, 3%, 10% y el 15% de NaCl. Presentó características morfológicas macroscópicas como colonias circulares color crema, blancas o amarillas, superficie lisas brillantes, cremosas (no formadoras de endosporas), bacilos Gram negativos, catalasa y oxidasa positiva, pruebas bioquímicas como citrato, urea, glucosa, lactosa, H<sub>2</sub>S son variables dependiendo la especie; indol, negativo; las bacterias de este género hidrolizan el almidón. Lo que concuerda con lo descrito por Vreeland, (2015).

#### *Chromohalobacter*

Este género presente en 4% del total de los aislados presenta tolerancia a concentraciones del 10% y 15% de NaCl macroscópicamente se muestra como colonias circulares de color crema o amarillas, superficie lisas brillantes cremosas, bacilos Gram negativos, oxidasa negativa y catalasa positiva, pruebas bioquímicas presenta movilidad, H<sub>2</sub>S y urea negativa, indol y citrato son pruebas bioquímicas variables dependiendo la especie y la glucosa no está determinado. Las bacterias de este género no hidrolizan almidón, caseína y tween 80, lo que concuerda con la descripción de Ventosa, (2015).

*Pseudomonas:*

Género presente en un 24% del total de los aislados que muestra características como, tolerar concentraciones de 1%, 3%, 10% y 15% de NaCl, macroscópicamente se muestra como colonias circulares con bordes enteros, superficie lisa brillante; bacilos Gram negativos que presenta movilidad, dependiendo de la especie, oxidasa puede ser positiva o negativa, catalasa positiva pruebas bioquímica indol negativos. Estas descripciones concuerdan con Ventosa, (2004)

*Marinobacter:*

Este género presente en un 12% del total de los aislados presenta características como, tolerancia a concentraciones del 1%, 3%, 10% y 15% de NaCl macroscópicamente se muestra como colonias circulares con borde entero, superficie lisa brillante son de color crema, amarilla, naranja, bacilos Gram negativos presenta movilidad, oxidasa catalasa positiva, pruebas bioquímicas urea negativa, no utiliza glucosa, hidrolisis de almidón, lipasa tween 80 positiva. Estas características son consistente con Bowman et al., (2015).

*Salinivibrio:*

Este género presente en un 12% del total de los aislados presenta características como, tolerancia a concentraciones del 3% y 10% de NaCl macroscópicamente se muestra como colonias circulares, superficie lisa brillante, color crema elevación convexa, luz transmitida opaca, bacilos Gram negativo, oxidasa y catalasa positiva, prueba bioquímica indol negativa. Concuerda con lo descrito con el Manual de Bergeys, (2015)

*Salinibacter*

Este género corresponde al 16% del total de los aislados muestran características como, tolera concentraciones 15%, macroscópicamente se muestra como colonias circulares, superficie lisa brillante, color crema, melón, bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positiva, características son consistentes con Song et al., (2015)

No se logró identificar los generos del 16 % de las cepas bacterianas restantes, porque las características macroscópicas y bioquímicas que presentan. No coinciden con las descritas en investigaciones realizadas en ambientes hipersalinos.

**Tabla 13-3:** Características morfológicas de cocos Gram negativos.

<b>Morfología Macroscópica</b>								
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>PUNTOS</b>	<b>FORMA</b>	<b>BORDE</b>	<b>COLOR</b>	<b>ELEVACION</b>	<b>SUPERFICIE</b>	<b>CONSISTENCIA</b>	<b>LUZ TRANSMITIDA</b>
1%	P.2-2-3	C	E	N	C	L.B	V	O
3%	P.2-3-2 Cr	C	E	Cr	C	L.B	V	O
15%	P.3-2	C	E	Cr	E	L.B	V	O
15%	P.3-3.1	C	E	Cr	E	L.B	V	O

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

Forma: C=Circular

Borde: E=Entero

Color: Cr= Cr; N=Naranja

Elevación: C=Convexa; E=Elevada

Superficie: L.B=lisa brillante

Consistencia: V= viscosa

Luz transmitida: O=Opaca

En la tabla 13-3 se seleccionaron 4 cepas bacterianas para la identificación; sus características morfológicas macroscópicas en forma corresponden al 100% circular y 100% con borde entero; en lo que respecta al color el 75 % crema y el 25% naranja; elevación 50% convexa y el 50% elevada; superficie, consistencia y luz transmitida el 100% son lisas brillantes; en cuanto a consistencia el 100% viscosas y luz transmitida el 100% son opacas.

**Tabla 14-3:** Características bioquímicas y enzimáticas de cocos Gram negativos.

<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>PUNTOS</b>	<b>Bioquímica</b>			<b>Enzimática</b>		
		<b>OXIDASA</b>	<b>CATALASA</b>	<b>MANITOL</b>	<b>ALMIDON</b>	<b>CASEINA</b>	<b>LIPIDOS</b>
1%	P.2-2-3	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3%	P.2-3-2 Cr	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
15%	P.3-2	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
15%	P.3-3.1	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

El 100% son cocos Gram negativos, las pruebas de lectura inmediata muestran que el 75% se presenta como oxidasa negativa y el 25 % como oxidasa positiva; la prueba de catalasa determina que el 100% tiene una reacción positiva.

En base a los resultados obtenidos de las características morfológicas macroscópicas, pruebas bioquímicas de lectura inmediata y enzimática se puede establecer que estas cepas bacterianas probablemente pertenecen a este género

*Paracoccus*

Este género presente en un 25% del total de los aislados muestran características como, circulares color crema, elevación convexas, superficie lisa brillante opacas; cocos Gram negativos, oxidasa y catalasa positiva prueba bioquímica como el manitol es variable dependiendo de la especie (DONOVAN et al, 2006).

No se logró identificar los géneros del 75 % de las cepas bacterianas restantes, porque porque las características macroscópicas y bioquímicas que presentan no coinciden con las descritas en investigaciones realizadas en ambientes hipersalinos.

**Tabla 15-3:** Características morfológicas y bioquímicas de cocos Gram positivos.

Morfología Macroscópica								
CONCENTRACIÓN	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA
1%	P.2-3-2 NT	C	E	N	C	L.B	V	O
15%	P.3-2- Ama	C	E	Cr	C	L.B	V	O
15%	P.3-3-2	C	E	Cr	C	L.B	Cr	Tr
15%	P.3-3 Cr	C	E	Cr	E	L.B	V	O

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

Forma: C=Circular

Borde: E=Entero

Color: Cr= Cr; N=Naranja

Elevación: C=Convexa; E=Elevada

Superficie: L.B=lisa brillante

Consistencia: V= viscosa; Cr= cremosa

Luz transmitida: O=Opaca; Tr=Translucida

La tabla 15.3 muestra que se seleccionaron 4 cepas bacterianas para la identificación; sus características morfológicas macroscópicas en forma el 100% son circular, 100% con borde entero; el color el 75 % crema y el 25% naranja; elevación 75% convexa y el 25% elevada; superficie el 100% son lisas brillantes, consistencia 75% son viscosas y el 25 % cremosas; luz transmitida el 75% son opacas y el 25% translucidas.

**Tabla 16-3** Características bioquímicas y enzimáticas de cocos Gram positivos.

CONCENTRACIÓN	PUNTOS	BIOQUÍMICA			ENZIMÁTICA		
		OXIDASA	CATALASA	MANITOL	ALMIDON	CASEINA	LIPIDOS
1%	P.2-3-2 NT	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
15%	P.3-2- Ama	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
15%	P.3-3-2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
15%	P.3-3 Cr	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)

Realizado por: Silvia Jácome. 2018

Respecto a las pruebas bioquímicas el 100% son cocos Gram positivos, las pruebas y de lectura inmediata oxidasas, el 75% son oxidasa positiva y el 25 % negativa; respecto a catalasa el 100% son positivas.

Con los resultados obtenidos de la morfología macroscópica, prueba bioquímica y nutricional se puede establecer que estas cepas bacterianas probablemente pertenecen a estos géneros.

### *Salinococcus*

Este género presente en un 25% del total de los aislados muestran características como tolerancia a concentraciones del 15% NaCl, macroscópicamente se muestra como colonias circulares de color crema, blanco, amarillo, rosa y naranja, cremosa (no formadores de esporas) no presenta movilidad, catalasa y oxidasa positiva, no producen enzimas hidrolíticos extracelulares

### *Staphylococcus*

Este género presente en un 75% del total de los aislados muestran características como tolerancia concentraciones del 1 y 15% de NaCl, macroscópicamente se muestra como colonias circulares de color crema, blanco, no presentan movilidad, catalasa positiva y oxidasa negativa.

Además del dominio de bacterias halófilas moderadas se presume la presencia de microorganismos pertenecientes al dominio Archaea como los géneros *Halococcus* y *Halobacterium* por la descripción macroscópica de sus colonias, pruebas bioquímicas y enzimáticas. Las investigaciones realizados por Maturrano (2004) en ambientes hipersalinos Talasohalinos indican que el dominio con mayor presencia son las Archaea.

#### **3.1.4. Actividad enzimática**

Con respecto a la prueba de actividad enzimática realizada a los posibles géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Salinibacter*, *Salinivibrio*, *Paracoccus*, *Salinococcus* y *Staphylococcus*.

Se obtuvo que el 18% presenta actividad amilolítica positiva, es decir que poseen enzimas amilasas que hidrolizan el almidón; en el medio transcurridas las 96 horas a 30 °C se observó la formación de un halo de aclaramiento que rodea a las colonia después de añadir gotas de solución de yodo; esto resultado concuerda con Amoozegar et al., (2003).

El 14.4% podría pertenecer al género *Halomonas*, ya que estas en sus características enzimáticas hidrolizan el almidón, mientras que el 3.6% restante corresponden al género *Pseudomonas*, del cual se reporta investigaciones, que especies perteneciente a este género producen amilasas en depósitos salinos de España por Moreno et al., (2013) y en investigaciones realizadas en Perú por Canales et al., (2014).

Se obtuvo que el 30% presenta actividad proteolítica sobre la caseína, rompiendp los enlaces peptídicos de las proteínas generando aminoácidos y péptidos, en el medio transcurridas las 96 horas a 30°C se observó la formación de un halo de aclaramiento que rodea a la colonias (Haki y Rakshit, 2003).

El 3% podría pertenecer a los géneros *Halomonas*, *Marinobacter*, *Salinivibrio*, *Salinibacter*, debido a las características bioquímicas que poseen y en investigaciones realizadas; el 10% corresponde al género *Pseudomonas*, que según investigaciones realizadas por Sánchez et al.,

(2004) en Perú demuestra que es el género presente mayor actividad proteolítica respecto a otros géneros.

El 9% perteneciente al género *Staphylococcus* se reportan investigaciones acerca de la hidrólisis de caseína realizada por Arvidson (1973). Mientras tanto un 9% de cepas bacterias aisladas presentan hidrólisis de caseína pero no se logra determinar al género que corresponde porque sus características bioquímicas y enzimáticas no son consistentes con los posibles géneros encontrados.

Finalmente, el 51% presenta actividad lipolítica positiva, donde las lipasas hidrolizan los triacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos y glicerol; transcurridas las 96 horas a 30°C se observó la formación de un halo de aclaramiento que rodea a las colonias; con cuerda con (Thomson et al., 1999).

Se presume que el 6% de *Halomonas*, y 3% de *Chromohalobacter* producen lipasas, por las características bioquímicas descritas por (Arahal y Ventosa, 2006) donde la presencia de lipasas es variable dependiendo de las especies, presentes en ambientes hipersalinos. El 6% que pertenecen al género *Marinobacter*, que hidrolizan lipasas según descripciones realizadas Bowman et al., (2015). El 12% pertenecientes al género *Salinibacter*, 6% de *Salinivibrio* y 3% de *Salinicoccus*, poseen la capacidad de hidrolizar lípidos, esto es consistente con lo expuesto por Rungaroon et al., (2016) y Ventosa, (2004).

El 3% pertenece al género *Paracoccus*, que presenta actividad lipolítica esto concuerda con estudios realizados por Pan et al., (2014) en sedimentos del océano Pacífico, en el cual las bacterias que pertenecen a este género hidrolizan tweens 20, 40, 60 y 80. El 9% perteneciente al género *Pseudomonas* hidrolizan lípidos, ya que presentan características bioquímicas que favorecen, además de ser uno de los microorganismos más estudiado a nivel mundial, se ha dividido de acuerdo a la secuencia de sus aminoácidos (Navarro, 2012).

Finalmente el 3% pertenece al género *Staphylococcus*, las características bioquímicas que presentan estos microorganismos favorecen a que estos puedan hidrolizar lípidos en los sustratos, ya que poseen dos clases de lipasas: trigliceridasas y fosfolipasas (Chans, 2002)

Se observa que existe un predominio de la actividad enzimática proteolítica y lipolítica con respecto a actividad amilolítica, estos resultados son consistentes con una investigación realizada en Rumania por Cojoc et al. (2009)

De las 33 cepas bacterianas aisladas el 45.5% corresponde a bacterias halófilas débiles resistentes a concentraciones de NaCl de 1, 3%, mientras que el 54.5% a halófilas moderadas concentraciones de NaCl de 3, 15%

## CONCLUSIONES

El agua proveniente de la mina de Salinas presentó características físico-químicas como un valor promedio en pH de 8.1, temperatura de 11°C., conductividad mayor a 70 000µS/cm; de acuerdo a esto se determinó que la mina es un ambiente Hipersalino - Talasohalino con predominio de iones de sodio Na<sup>+</sup> 157.02 mg/L y cloro Cl<sup>-</sup> 31385 mg/L, propicio para el desarrollo de bacterias halófilas.

La presencia de iones magnesio Mg<sup>2+</sup>, potasio K<sup>+</sup>, sodio Na<sup>+</sup> y cloruros Cl<sup>-</sup> influyen en procesos de osmoadaptación estrategia In-salt, lo que les permite a las bacterias soportar altas concentraciones de sal; en el P.3-C se evidencia que a mayor concentración de estos iones mayor número de UFC/mL respecto a los demás puntos.

Se aisló un total de 125 cepas bacterianas de las cuales el 89% correspondieron a bacilos Gram negativos, 5% cocos Gram negativos, 1% bacilos Gram positivos y 5 % cocos Gram positivos.

Se seleccionaron 33 cepas para su identificación, de las cuales el 45.5% corresponden a bacterias halófilas débiles (NaCl. 1%- 3%) y el 54.5% restante a bacterias halófilas moderadas (NaCl: 3%-15%)

El 75% de las 33 cepas seleccionadas corresponden a bacilos Gram negativos. Los posibles géneros encontrados de acuerdo a las características morfológicas, pruebas bioquímicas y enzimáticas son: *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Salinivibrio*; *Pseudomonas* y *Salinibacter*; el 12% cocos son Gram positivos correspondientes a posibles géneros como: *Salinococcus*, *Staphylococcus* y 12% cocos Gram negativos con un posible género: *Paracoccus*

De las 33 cepas bacterianas aisladas el 18% presenta actividad aminolítica, siendo el género *Halomonas* con un 14.4% el más representativo; el 30% demostró actividad proteolítica sobre caseína, siendo el posible género con mayor actividad *Pseudomonas* con un 10% seguido de *Staphylococcus* con un 9%. Finalmente, el 51% actividad lipolítica, con un predominio del género *Salinibacter* (12%) y *Pseudomonas* (9%)

## **RECOMENDACIONES**

Continuar con estudios enfocados en la recolección y aislamiento de microorganismos extremófilos, con el objetivo de estandarizar técnicas de aislamientos

Verificar la presencia de los géneros mencionados aplicando técnicas moleculares

Estudiar la actividad enzimática de las bacterias halófilas encontradas para buscar una potencial aplicación biotecnológica.

## BIBLIOGRAFIA

**ALVAREZ et al.** *Manual de técnicas en microbiología clínica*. Madrid - España :Garsi, 1990, pp. 115.

**AMOOZEGAR, M, et al.** "*Production of amylase by newly isolated moderate halophile, Halobacillus sp. strain MA-2*". Brunswick-Germany: Microbiol Methods, 2003. [Consulta: 11 enero 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/5331055\\_Production\\_of\\_amylase\\_by\\_newly\\_isolated\\_moderate\\_halophile\\_Halobacillus\\_sp\\_strain\\_MA-2](https://www.researchgate.net/publication/5331055_Production_of_amylase_by_newly_isolated_moderate_halophile_Halobacillus_sp_strain_MA-2)

**ARAHAL, R, et al.** "Bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas Salinas de Atacocha-Ayacucho". *Ciencia e investigación* [en línea], 2007, (Perú) 10(1), pp. 59-61.[Consulta: 8 febrero 2017]. ISSN 1561-0861. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/4955>

**ARAHAL, D. y VENTOSA, A.** "The Family Halomonadaceae" Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. [Consulta: 11 febrero 2018]. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1\\_235](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_235)

**ARVIDSON, S.** "Hydrolysis of casein by three extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*, strain v8". *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology* [en línea], 1973, 81B(5), pp. 538-544. [Consulta: 1 febrero 2018]. ISSN 1600-0463. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1973.tb02239.x>

**BARRAGÁN, B, et al.** "Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos" *Sistemas Ambientales* [En línea], 2011, (México DF) Vol. 4 (2), pp. 2 - 5 [Consulta: 17 marzo 2017]. Disponible en :<https://es.scribd.com/doc/196257329/Aplicaciones-Biotecnológicas-de-Microorganismos-Halófilos>

**BOWMAN, John; y MCMEEKIN, Thomas.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Marinobacter* [en línea]. Tasmania: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 10 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01094>

**CAMACHO, A, et al.** *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos Cuenta en placas de bacterias* [en línea]. México: Facultad de Química UNAM, 2009. [Consulta: 15 abril 2017]. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa\\_6527.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf)

**CANALES, P, et al.** "Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas". *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 2014, (Colombia) 16(2), pp. 150-157. [Consulta: 10 enero 2018]. ISSN 1909-8758. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/43763>

**CASTILLO, F, et al.** *Biotecnología ambiental*. Madrid-España: TÉBAR, 2005. [Consulta: 30 abril 2017]. Disponible en : <https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&pg=PA379&dq=microorganismos+extremofilos&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjusvXx3JHZAhVPs1kKHesKAm8Q6AEIJjAA#v=onepage&q=microorganismos%20extremofilos&f=false>

**CHANS, G.** *Bacteriología y Virología para CEFA Staphylococcus*. España: Departamento de Bacteriología y Virología, 2002. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>

**COJOC, R, et al.** "Extracellular hydrolytic activities of halophilic microorganisms isolated from Balta Albă salt lake". *Romanian Society of Biological Sciences* [en línea], 2009, (Rumania) 2009, , Vol. 14(5). pp. 4658-4664. [Consultado: 18 enero 2018]. Disponible en: <https://www.rombio.eu/rbl5vol14/7.pdf>

**DÍAZ CARDENAS, Carolina.** "Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Rislada y Boyaca" (tesis).(Doctoral) Pontificia Univerisdad Javeriana, Bogotá, Colombia. : 2011. pp. 16-17. [Consulta: 10 mayo 2017 ] Disponible en : <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/1562>

**DONOVAN, Kelly; et al. . 2006.** *The Prokaryotes The Genus Paracoccus* [en línea]. New York .USA : Springer, 2006. [Consulta: 3 diciembre 2017]. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_12](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_12)

**EDGERTON, ME y BRIMBLECOMBE, P.** "Thermodynamics of halobacterial environments". *Can J Microbiol* [en línea], 1981, (s.l.) 27(9), pp. 899-909. ISSN 0008-4166. [Consulta: 29 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7306878>

**ECOSTRAVEL.** [En línea]. Guaranda: 2016. [Consulta: 7 julio 2017]. Disponible en : <http://www.ecostravel.com/ecuador/ciudades-destinos/salinas-guaranda.php>

**FAKRUDDIN, Ms.** "Biosurfactant: Production and Application". *Petroleum & Environmental Biotechnology* [en línea]. 2012, (Bangladesh) 1(1), pp. 3-4. [Consulta: 16 de enero 2018].

Disponible en: <https://www.omicsonline.org/biosurfactant-production-and-application-2157-7463-3-124.pdf>

**FERNÁNDEZ, A, et al.** "Procedimientos en Microbiología Clínica". *Seimc* [en línea]. 2010, (España) 1, pp. 4-5. [Consulta: 26 de mayo 2017]. ISBN 978-84-614-7932-0. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a>.

**FLORES, M, et al.** "Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico". *Ciencia e investigación* [en línea], 2010, (Perú) 13(1), pp. 42-44. [Consulta: 9 diciembre 2017]. ISSN 1609-9044. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3224/269>

**FLORES, M, et al.** "Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las salinas de pilluana San Martín". *Ciencia e investigación* [en línea], 2014, (Perú) 13(2), pp. 87-01. [Consulta: 9 enero 2018]. ISSN 1609-9044. Disponible en : <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3232>

**GALINSKI, E.** "Osmoadaptacion in bacteria". *Adv Microb Physiol* [en línea], 1995, (Germany) 37(1), pp. 272-328. [Consulta: 2 abril 2017]. ISSN 0065-2911 . Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8540423>

**GARRITY, G, et al.** *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria* Phylum All. *Euryarchaeota phy nov* [en línea]. New York-USA: Springer, 2001. [Consulta: 29 diciembre 2017]. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_17)

**GARZÓN RUBIANO, Vivian.** Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia [en línea] (tesis) (Doctoral) Universidad de la Sabana, Colombia. 2015. pp. 45-67. [Consulta: 2017-06-15]. Disponible en:

**GARRITY, G, et al.** *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. s.l The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria [en línea]. New York-USA: Springer US, 2005. [Consultada: 29 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.springer.com/la/book/9780387241449#reviews>

**GODFREY, T y WEST, S.** *Introduction to industrial enzymology. Industrial enzymology* [en línea]. London-UK: Mac. Millan Press, 1996. [Consulta: 8 enero 2018]. Disponible en: <http://www.oalib.com/references/7725250>

**GONZÁLEZ, J. y PEÑA, A.** "Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii*". *Latinoamericana de Microbiología* [en línea], 2002, (México) 44(3), pp. 147-156. [Consulta: 3 abril 2017]. Disponible en : [http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2002/mi02-3\\_4g.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2002/mi02-3_4g.pdf)

**GRANT, W.D. y ROSS, H.** The ecology and taxonomy of halobacteria. *Elsevier* [en línea], 1986, (Reino Unido) 9(15), pp. 9-15. ISSN 1574-6968. [Consulta: 30 mayo 2017]. Disponible en: [https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/femsre/2/1-2/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01836.x/2/2-1-2-9.pdf?Expires=1496188787&Signature=YPPMV0amuU-tOcy8wqhP1MYS5i1X3SivYsCV0KQhe0TM5Szep9yKcKfA5Yt9ZtA46Ov-SZwQhVkygeZvXNucsLM07U6yBGMi](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/femsre/2/1-2/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01836.x/2/2-1-2-9.pdf?Expires=1496188787&Signature=YPPMV0amuU-tOcy8wqhP1MYS5i1X3SivYsCV0KQhe0TM5Szep9yKcKfA5Yt9ZtA46Ov-SZwQhVkygeZvXNucsLM07U6yBGMi)

**GRANT, W.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Halococcus* [en línea]. Leicester-UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 3 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00484>

**GUPTA et al.** "A diverse group of halophilic bacteria exist in Lunsu, a natural salt water body of Himachal Pradesh". *Springer Open*, vol 4, n° 1 (2015), (India) pp.45-49

**KAURI, T, et al.** Nutrition of the Halophilic Archaeobacterium, *Haloferax volcani*. *Systematic and Applied Microbiology* [en línea], 1990, (Canada) 13(1), pp. [Consulta:13 agosto 2017]. ISSN 0723-2020. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202011801748>

**KIVISTÖ, AT y KARP, MT.** "Halophilic anaerobic fermentative bacteria". *Biotechnol* [en línea], 2011, (Finlandia) 152(4), pp.114-124. [Consulta: 23 mayo 2017]. ISSN 0168-1656 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804793>

**LABORATORIOS BRITANIAS S.A.** *Christensen Medio Urea Agar Base* [en línea], 2001, (Argentina). [Consulta: 16 noviembre 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02109%20REV%2001-CHRISTENSEN%20MEDIO..pdf>

**LABORATORIOS BRITANIAS S.A.** *SIM MEDIO* [en línea], 2001, (Argentina). [Consulta: 16 noviembre 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02131%20REV%2001-SIM%20MEDIO.pdf>

**LABORATORIOS BRITANIAS S.A.** *Simmons Citrato Agar* [en línea], 2001, (Argentina). [Consulta: 16 noviembre 2017]. Disponible en:

<http://www.britanialab.com/productos/B02132%20REV%2001-SIMMONS%20CITRATO%20AGAR.pdf>

**LABORATORIOS BRITANIAS S.A.** *TSI Agar (Triple Sugar Iron Agar)* [en línea], 2001, (Argentina). [Consulta: 16 noviembre 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02134%20REV%2001-TSI%20AGAR.pdf>

**LEGAT, A, et al.** "Properties of Halococcus salifodinae, an Isolate from Permian Rock Salt Deposits, Compared with Halococci from Surface Waters". *Open Access Journal* [en línea], 2013, (Austria) 13(1), pp. 244-259. [Consulta: 26 diciembre]. ISSN 2075-1729. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187196>

**MADIGAN, M, et al.** *Brock biología de los microorganismos*. 10 ed. México : PEARSON. pp. 392.

**MARGESIN, R. Y SCHINNER, F.** "Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology". *Extremophiles* [en línea], 2001, ( Austria) 5(2), pp. 73-83. [Consulta: 24 noviembre 2017]. ISSN 1431-0651. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11354458>

**MATA GÓMEZ, Juan Antonio.** Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger [en línea] (tesis) (Doctoral), Universidad de Granada, España. 2006. pp. 9-21.[Consulta: 2017-05-04]. Disponible en: <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/16115946.pdf>

**MATURRANO HERNÁNDEZ, Abelardo.** Caracterización de la microbiota de las Salinas de Maras, un ambiente hipersalino de los andes de Perú [en línea] (tesis) (Doctoral) Universidad de Alicante, España. 2004. pp. 11 [Consulta: 2017-05.] Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/11475>.

**McFADDIN, J.** *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Buenos Aires- Argentina: Medica Panamericana , 2003. [Consulta: 30 julio 2017]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&pg=PA344&dq=oxidasa+prueba+bioquimica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjb6Kqaq\\_PXAhUCSyYKHcxNCIMQ6AEIJTAA#v=onepage&q=oxidasa%20prueba%20bioquimica&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&pg=PA344&dq=oxidasa+prueba+bioquimica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjb6Kqaq_PXAhUCSyYKHcxNCIMQ6AEIJTAA#v=onepage&q=oxidasa%20prueba%20bioquimica&f=false)

**MESEGUER, Inmaculada.** "Los microorganismos Halófilos y su potencial aplicado en la biotecnología". *Ciencia e Investigación* [en línea], 2004, (España) 7(2), pp. 13-17. [Consulta: 4 enero 2018]. ISSN 1561-0861. Disponible en: [revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/3363/2790](http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/3363/2790)

**MORÁN, JOSÉ** *Salinas de Guaranda, un balcón donde asomarse a los Andes* [en línea]. El Telégrafo . 28 de Octubre de 2016. [Consulta: 12 junio 2017]. Disponible en : <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/ecuador/3/salinas-de-guaranda-un-balcon-donde-asomarse-a-los-andes>

**MORENO , M, et al.** "Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes". *Life* [en línea], 2013, (España) 3(1), pp. 38-50. [Consulta: 4 enero 2018]. ISSN 2075-1729. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187191/>

**NAVARRO, M.** "Enzimas lipolítica bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales" .*um.es* [en línea], 2012, (España) 28(1), pp. 45. [Consulta: 4 febrero 2018]. Disponible en: <http://188711-681591-1-SM.pdf>

**NTE INEN 2176: 2013.** *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo.*

**NTE INEN 2169:2013.** *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras*

**OREN, Aharon.** *Halophilic Microorganisms and their Environments.* Jerusalem : KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, 2004. [Consulta: 4 enero 2018]. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/0-306-48053-0\\_12](https://doi.org/10.1007/0-306-48053-0_12)

**OREN, Aharon.** *Life at High Salt Concentrations.* New York : Springer Berlin Heidelberg, 2013. [Consulta: 10 diciembre 2017]. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0\\_57](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_57)

**PAN, J. et al.** "Paracoccus sediminis sp. nov., isolated from Pacific Ocean marine sediment" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], 2014, (China), 64(1), pp. 2512-2515. [Consulta: 4 febrero 2018]. Disponible en: [http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/64/8/2512\\_ajs051318.pdf?expires=1519584472&id=id&accname=guest&checksum=A6522287D01CC0919AB116E30F58755F](http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/64/8/2512_ajs051318.pdf?expires=1519584472&id=id&accname=guest&checksum=A6522287D01CC0919AB116E30F58755F)

**PANREAC QUIMICA S.A.** *Manual Básico de Microbiología* [en línea]. España, 2003. [Consulta: 30 agosto 2017]. Disponible en: <https://ricarducatse.files.wordpress.com/2012/01/manual-de-medios-de-cultivos.pdf>

**PIFFNER, S, et al.** "Isolation of Halotolerant, Thermotolerant, Facultative Polymer-Producing Bacteria and Characterization of the Exopolymer". *American Society for Microbiology* [en línea], 1986, (Florida) 51(6), pp. 1224-1229. [Consulta: 12 octubre 2017]. ISSN 0099-2240. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347080>

**PELCZAR, M. y CHAN, E.** *Elementos de microbiología*. México : McGRAW-HILL , 1984, pp. 35-37.

**POMEROY, Cheryl.** *La sal en las culturas andinas* . Quito : Abya-Yala, 1986. pp. 10-21.

**PRESCOTT, L, et al.** *Microbiología*. Quito. Madrid : McGRAW-HILL INTERAMERICANA, 2004, pp. 103-104.

**RAMÍREZ, N, et al.** "Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [en línea], 2004, (Caracas) 24(1), pp. 12-23. [Consulta:]. ISSN 1315-2556. Disponible en: [http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562004000100004&nrm=iso](http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100004&nrm=iso)

**RODRIGUEZ-VALERA, F, et al.** "Variation of Environmental Features and Microbial Populations with Salt Concentrations in a Multi-Pond Saltern". *Microbial Ecology* [en línea], 1985, (España) 11(2), pp. 107-115. ISSN 1432-184X. [Consulta: 6 mayo 2017]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Antonio\\_Ventosa/publication/258502656\\_Rodriguez-Valera\\_F\\_Ventosa\\_A\\_Juez\\_G\\_Imhoff\\_JF\\_Variation\\_of\\_environmental\\_features\\_and\\_microbial\\_populations\\_with\\_salt\\_concentrations\\_in\\_a\\_multi-pond\\_saltern\\_Microb\\_Ecol\\_11\\_107-115/](https://www.researchgate.net/profile/Antonio_Ventosa/publication/258502656_Rodriguez-Valera_F_Ventosa_A_Juez_G_Imhoff_JF_Variation_of_environmental_features_and_microbial_populations_with_salt_concentrations_in_a_multi-pond_saltern_Microb_Ecol_11_107-115/)

**RODRÍGUEZ, E, et al.** *Bacteriología General Principios y prácticas de laboratorio* [en línea] Costa Rica : Universidad de Costa Rica , 2005. [Consulta: 23 marzo 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&printsec=frontcover&dq=bacteriolog%C3%ADa+general+principios+y+practicas+de+laboratorio&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwictZigy6TUAhWJ6SYKHWxoB8UQ6AEIITAA#v=onepage&q=bacteriolog%C3%ADa%20general%20principios%20>

**RUNGAROON , W, et al.** "Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology". *AIMS Microbiology* [en línea], 2016, (Bangkok) 2(1), pp. 42-54. [Consulta: 12 noviembre 2017]. Disponible en: <http://www.aimspress.com/journal/microbiology>

**SANCHEZ, T, et al.** "Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros". *Revista Peruana de Biología* [en línea], 2004, (Perú)

11(2), pp. 3-6. ISSN. 1727-9933 [Consulta: 30 enero 2018]. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/2454>

**SARAFIN, Y, et al.** "Kocuria marina BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India". *Saudi Journal of Biological Sciences* [en línea], 2014 (India) 21(6) [Consulta: 18 enero 2018]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4250494/>

**SANZ CERVERA, Susana.** *Prácticas de microbiología* [en línea]. Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de la Rioja. España, 2011. [Consulta: 30 julio 2017]. Disponible en: <https://fundacion.unirioja.es/productos/view/226/Practicas-de-Microbiologia>

**SCHLEIFER, K. y Bell, J.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Staphylococcus* [en línea] Germany: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 21 enero 2018]. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00569>

**SCHNEEGURT, Mark.** *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* [en línea]. Dordrecht-Holanda: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2012. [Consulta: 27 abril 2017]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/279359598\\_Media\\_and\\_Conditions\\_for\\_the\\_Growth\\_of\\_Halophilic\\_and\\_Halotolerant\\_Bacteria\\_and\\_Archaea](https://www.researchgate.net/publication/279359598_Media_and_Conditions_for_the_Growth_of_Halophilic_and_Halotolerant_Bacteria_and_Archaea)

**SIERRA, Carlos.** *SALINIDAD DE LOS SUELOS DEL NORTE CHICO* [en línea]. INIA Intihuasi. Atacama : Tierra Adentro, s.f. [Consulta: 12 abril 2017]. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR25770.pdf>

**SLEATOR, R. y HILL, C.** "Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence". *FEMS Microbiol Rev* [en línea], 2001, (England) 26 (1), pp.49-71. ISSN 0168-6445. [Consulta: 20 noviembre 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007642>

**SONG, Y, et al.** *Bacteroides. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [en línea]. Los Angeles- USA : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 8 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00238>

**SOROKIN, D, et al.** "Thiohalobacter thiocyanaticus gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from hypersaline lakes, that utilizes thiocyanate". *Int J Syst Evol Microbiol* [en línea], 2010, (Rusia) 60(2), pp. 444-450. ISSN 1466-5026. [Consulta: 20 agosto 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654366>

**THOMSON, C, et al.** "Detection and measurement of microbial lipase activity: a review". *Crit Rev Food Sci Nur* [en línea], 1999, (Canada) 39(2), pp.169-173 .ISSN 1040-8398. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198753>

**THOMAS, C, et al.** "Archaeal populations in two distinct sedimentary facies of the subsurface of the Dead Sea". *Marine Genomics* [en línea], 2014, (Suiza) 17, pp. 53-62. [Consulta: 24 mayo 2017]. ISSN: 1874-7787. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224966>

**TORTORA, GERARD J, et al.** *Introducción a la Microbiología*. Novena . Madrid España: Panamericana, 2007. pp. 70-71.

**VENTOSA, A. y NIETO, J.** "Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], 1995, (España) 11(1), pp. 86-94.[Consulta: 14 mayo 2017]. ISSN 1573-0972. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00339138>

**VENTOSA, A, et al.** Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* [en línea], 1998, (España) 2(3), pp. 297- 304. [Consulta: 3 mayo 2017]. ISSN 1431-0651. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9783177>

**VENTOSA, A, et al.** *Microbiology of Extreme Soils*. Berlín-Alemania : Springer, 2007, [Consulta: 15 enero 2018]. Disponible en: <http://en.bookfi.net/s/?q=974B368B177DD411D4BDF0DF5CDD4E2C&e=1&t=0>

**VENTOSA, A.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Marinococcus* [en línea]. España: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 29 diciembre 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00538/references>

**VENTOSA, A.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Vibrionales* [en línea]. España: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta:3 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.obm00091>

**VENTOSA, A.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Chromohalobacter* [en línea]. España: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 3 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01189>

**VENTOSA, A.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Salinicoccus* [en línea]. España: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 10 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00568>

**VENTOSA, A.** *Halophilic Microorganisms* [en línea] Sevilla- España : Springer, 2004. [Consulta: 3 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.springer.com/gp/book/9783540009269>

**VREELAND, H.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Halomonas* [en línea]. West Chester-USA : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 28 diciembre 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01190>

**WHILEY, R. y HARDIE, J.** *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Streptococcus* [en línea]. London- UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. [Consulta: 3 enero 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00612>

**YIN, J, et al.** "Halophiles, coming stars for industrial biotechnology". *Biotechnol Adv* [en línea], 2014, (England) 33(7), pp. 1433-1442 [Consulta: 10 enero 2018]. ISSN 0734-9750. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447783>

**YOUNGER, P.** *GROUNDWATER in the Environment: an introduction* [en línea]. Oxford UK : Garsington Road, 2007. ISBN-10:1-4051-2143-2. [Consulta: 23 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.amazon.com/Groundwater-Environment-Introduction-Paul-Younger/dp/1405121432>

## ANEXOS

### Anexo A. Archivo fotográfico



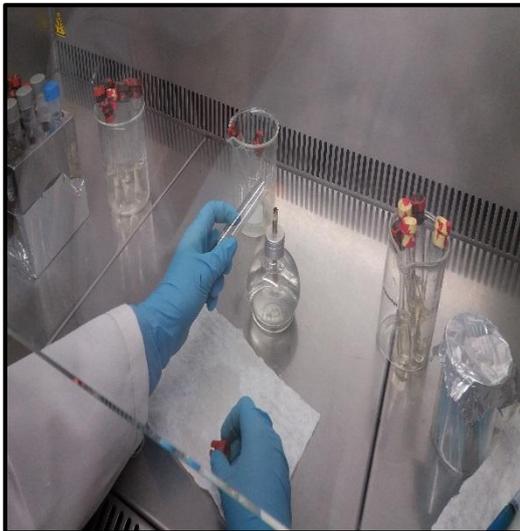
**Fotografía 1A:** Mina de sal Salinas-Guaranda



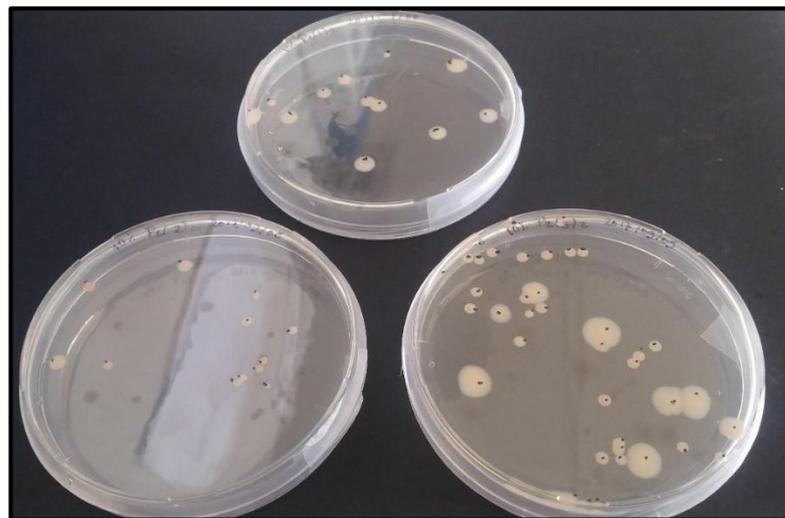
**Fotografía 2A:** Medición de temperatura y pH puntos de muestreo.



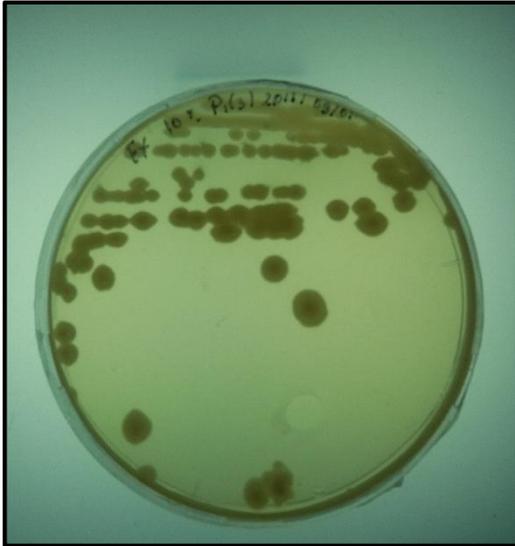
**Fotografía 3A:** Preparación siembra EX-SITU



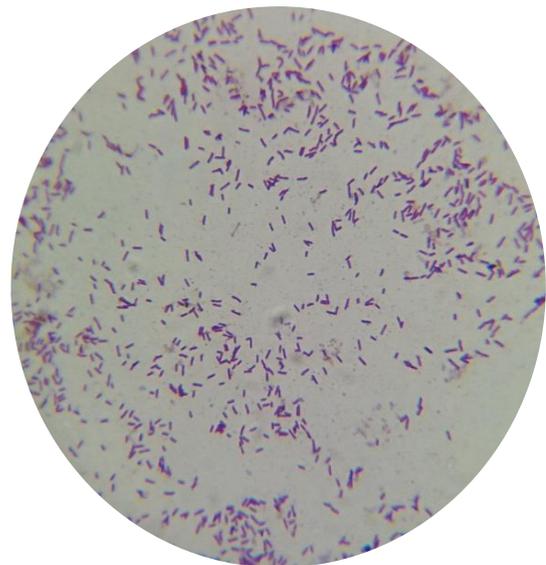
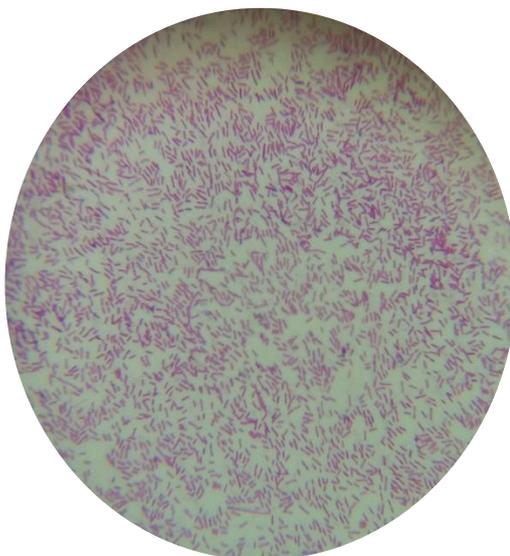
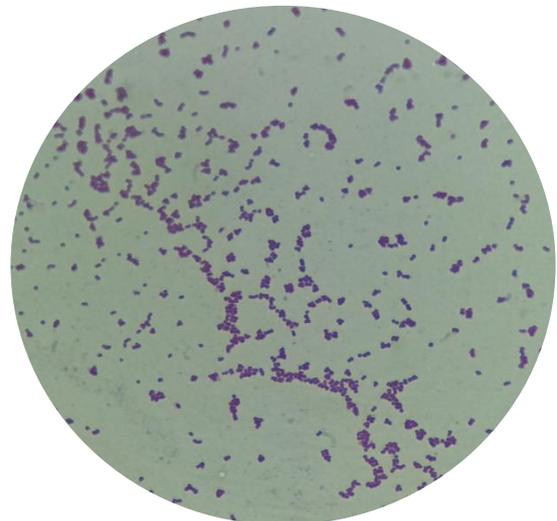
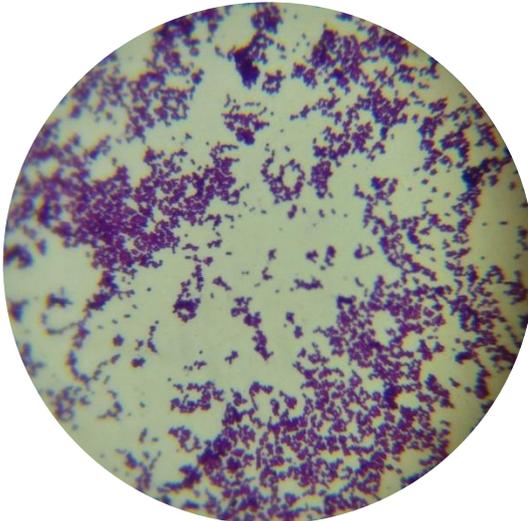
**Fotografía 4A:** Preparación de diluciones y siembra en superficie.



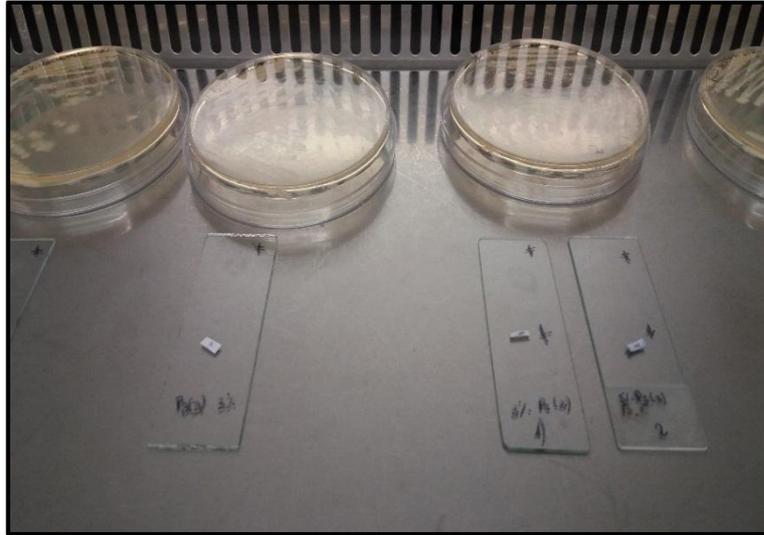
**Fotografía 5A:** Conteo de UFC/mL



**Fotografía 6A:** Aislamiento de bacterias



**Fotografía 7A:** Tinción Gram Cocos Gram positivos, negativos y Bacilos negativos



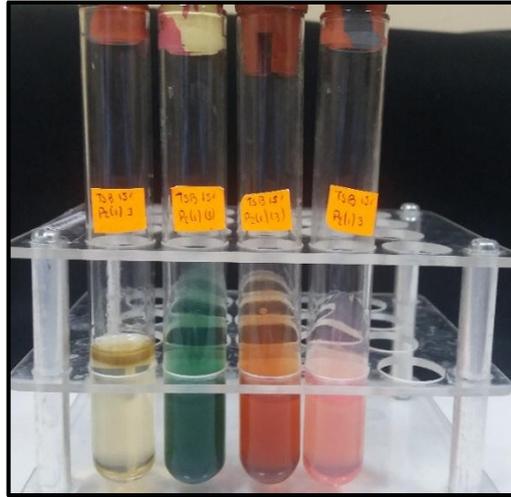
**Fotografía 8A:** Pruebas oxidasa y catalasa



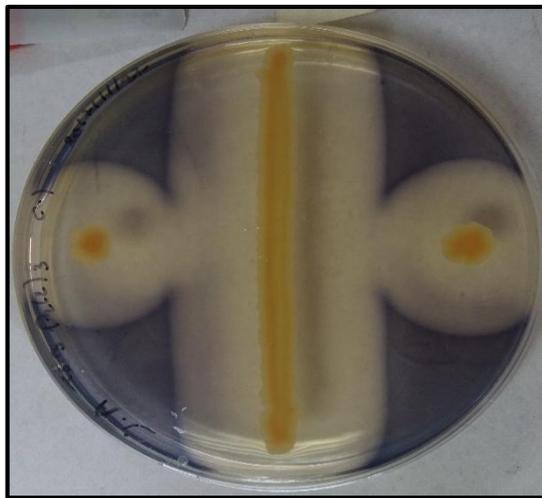
**Fotografía 9A:** Preparación pruebas bioquímicas.



**Fotografía 10A:** Lectura pruebas bioquímicas P.3 (1) (2) 10% SIM, citrato, TSI y urea.



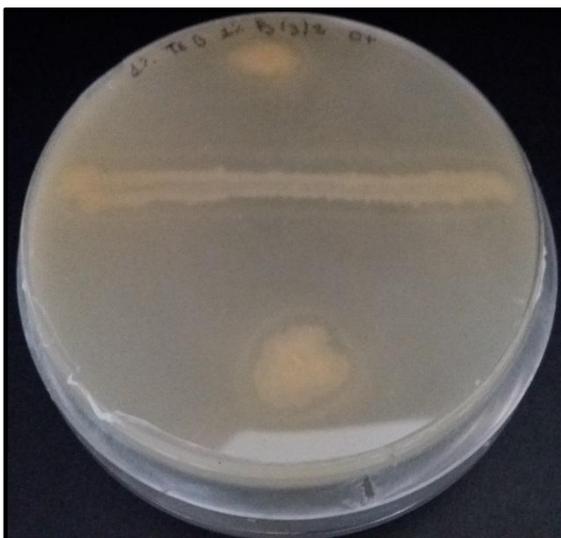
**Fotografía 11A:** Lectura pruebas bioquímicas P.2 (1) (3) 15% SIM, citrato, TSI y urea.



**Fotografía 11A:** Prueba enzimática amilasas medio TSA+almidón



**Fotografía 12A:** Prueba enzimática proteasa medio TSA+leche descremada



**Fotografía 13A:** Pruebas enzimática lipasa medio TSA+ aceite de oliva



**Fotografía 14A:** Posibles género *Halomonas*



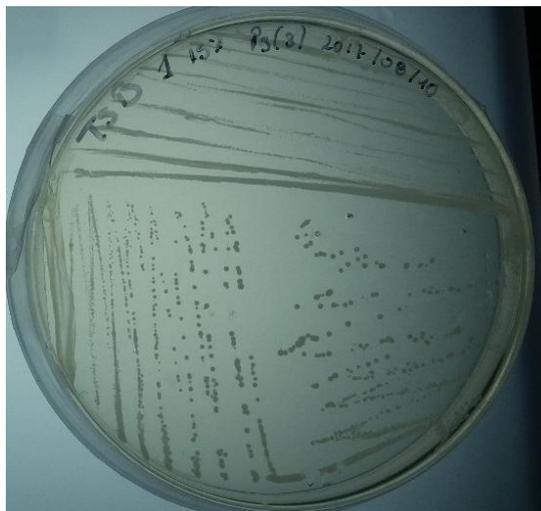
**Fotografía 15A:** Posibles género *Salinibacter*



**Fotografía 16A:** Posibles género *Salinivibrio*



**Fotografía 17A:** Posibles género *Marinobacter*



**Fotografía 18A:** Posibles género *Chromolobacter*



**Fotografía 19A:** Posibles género *Pseudomonas*



**Fotografía 20A:** Género *Staphilococcus*

## ANEXO B ANÁLISIS AGUA ZONAS DE MUESTREO



### LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



N° SE: 086-17

#### INFORME DE ANALISIS

**NOMBRE:** Silvia Jácome **INFORME N°** 083- 17  
**EMPRESA:** Proyecto de Tesis ESPOCH **N° SE:** 083-17  
**DIRECCIÓN:** Los Álamos **FECHA DE RECEPCIÓN:** 22 - 06 -17  
**TELÉFONO:** 0988346166 **FECHA DE INFORME:** 29 - 06 - 17  
**NÚMERO DE MUESTRAS:** 3, Agua natural, Salinas, Guaranda **TIPO DE MUESTRA:**  
**IDENTIFICACIÓN:**

MA - 216-17	P1	Agua
MA - 217-17	P2	Agua
MA - 218-17	P3	Agua

El laboratorio se responsabiliza solo del análisis, no de las muestras.

#### RESULTADO DE ANÁLISIS

MA - 216-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
pH	-	PE-LSA-01	7,43	+/- 0,08	22 - 06 - 17
Conductividad	µS/cm	PE-LSA-02	85500	+/- 8 %	22 - 06 - 17
* Nitratos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 NO <sub>3</sub> - E mod.	35,4	N/A	22 - 06 - 17
* Nitritos	mg/l	STANDARD METHODS 4500-NO <sub>2</sub> - B	0,052	N/A	22 - 06 - 17
* Sulfatos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 SO <sub>4</sub> -E	340	N/A	22 - 06 - 17
* Sólidos Disueltos Totales	mg/l	STANDARD METHODS 2540 - C	43270	N/A	22 - 06 - 17
* Calcio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Ca 3111B	146,12	N/A	22 - 06 - 17
* Cloruros	mg/l	STANDARD METHODS 3500 - Cl E mod	21837	N/A	22 - 06 - 17
* Fósforo Total	mg/l	STANDARD METHODS 4500 - P - E mod	2,40	N/A	22 - 06 - 17
* Hierro	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Fe - 3111B	0,85	N/A	22 - 06 - 17
* Magnesio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Mg - 3111B	53,72	N/A	22 - 06 - 17
* Potasio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Na - B	38,46	N/A	22 - 06 - 17
* Sodio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 K - B	148,63	N/A	22 - 06 - 17
* Materia orgánica	mg/l	METODO INTERNO	5,19	N/A	22 - 06 - 17

-Los resultados de este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).  
-Se prohíbe la reproducción parcial de este informe sin la autorización del laboratorio.

Página 1 de 3

L.S.A. Campus Máster Edison Riera Km 1 ½ vía a Guano Bloque Administrativo.

FMC2101-01



# LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



N° SE: 086-17

MA - 217-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
pH	-	PE-LSA-01	8,70	+/- 0,08	22 - 06 - 17
Conductividad	µS/cm	PE-LSA-02	30800	+/- 8 %	22 - 06 - 17
* Nitratos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 NO <sub>3</sub> - E mod	5,5	N/A	22 - 06 - 17
* Nitritos	mg/l	STANDARD METHODS 4500-NO <sub>2</sub> - B	0,018	N/A	22 - 06 - 17
* Sulfatos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 SO <sub>4</sub> -E	130	N/A	22 - 06 - 17
* Sólidos Disueltos Totales	mg/l	STANDARD METHODS 2540 - C	18440	N/A	22 - 06 - 17
* Calcio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Ca 3111B	74,61	N/A	22 - 06 - 17
* Cloruros	mg/l	STANDARD METHODS 3500 - Cl E mod	11344	N/A	22 - 06 - 17
* Fósforo Total	mg/l	STANDARD METHODS 4500 - P - E mod	1,00	N/A	22 - 06 - 17
* Hierro	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Fe - 3111B	0,05	N/A	22 - 06 - 17
* Magnesio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Mg - 3111B	48,31	N/A	22 - 06 - 17
* Potasio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Na - B	32,80	N/A	22 - 06 - 17
* Sodio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 K - B	133,38	N/A	22 - 06 - 17
* Materia orgánica	mg/l	METODO INTERNO	4,50	N/A	22 - 06 - 17

MA - 218-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
pH	-	PE-LSA-01	8,21	+/- 0,08	22 - 06 - 17
Conductividad	µS/cm	PE-LSA-02	115600	+/- 8 %	22 - 06 - 17
* Nitratos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 NO <sub>3</sub> - E mod	16,6	N/A	22 - 06 - 17
* Nitritos	mg/l	STANDARD METHODS 4500-NO <sub>2</sub> - B	0,018	N/A	22 - 06 - 17
* Sulfatos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 SO <sub>4</sub> -E	180	N/A	22 - 06 - 17
* Sólidos Disueltos Totales	mg/l	STANDARD METHODS 2540 - C	57890	N/A	22 - 06 - 17
* Calcio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Ca 3111B	128,09	N/A	22 - 06 - 17
* Cloruros	mg/l	STANDARD METHODS 3500 - Cl E mod	60974	N/A	22 - 06 - 17
* Fósforo Total	mg/l	STANDARD METHODS 4500 - P - E mod	2,10	N/A	22 - 06 - 17
* Hierro	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Fe - 3111B	0,10	N/A	22 - 06 - 17
* Magnesio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Mg - 3111B	66,32	N/A	22 - 06 - 17
* Potasio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 Na - B	47,56	N/A	22 - 06 - 17

-Los resultados de este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).  
-Se prohíbe la reproducción parcial de este informe sin la autorización del laboratorio.

FMC2101-01

Página 2 de 3

L.S.A. Campus Máster Edison Riera Km 1 ½ vía a Guano Bloque Administrativo.



## LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



N° SE: 086-17

* Sodio	mg/l	STANDARD METHODS 3500 K - B	189,05	N/A	22 - 06 - 17
* Materia orgánica	mg/l	METODO INTERNO	6,72	N/A	22 - 06 - 17

**MÉTODOS UTILIZADOS:** Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, STANDARD METHODS 21ª EDICIÓN y métodos HACH adaptados del STANDARD METHODS 21ª EDICIÓN.

**RESPONSABLES DEL ANÁLISIS:**

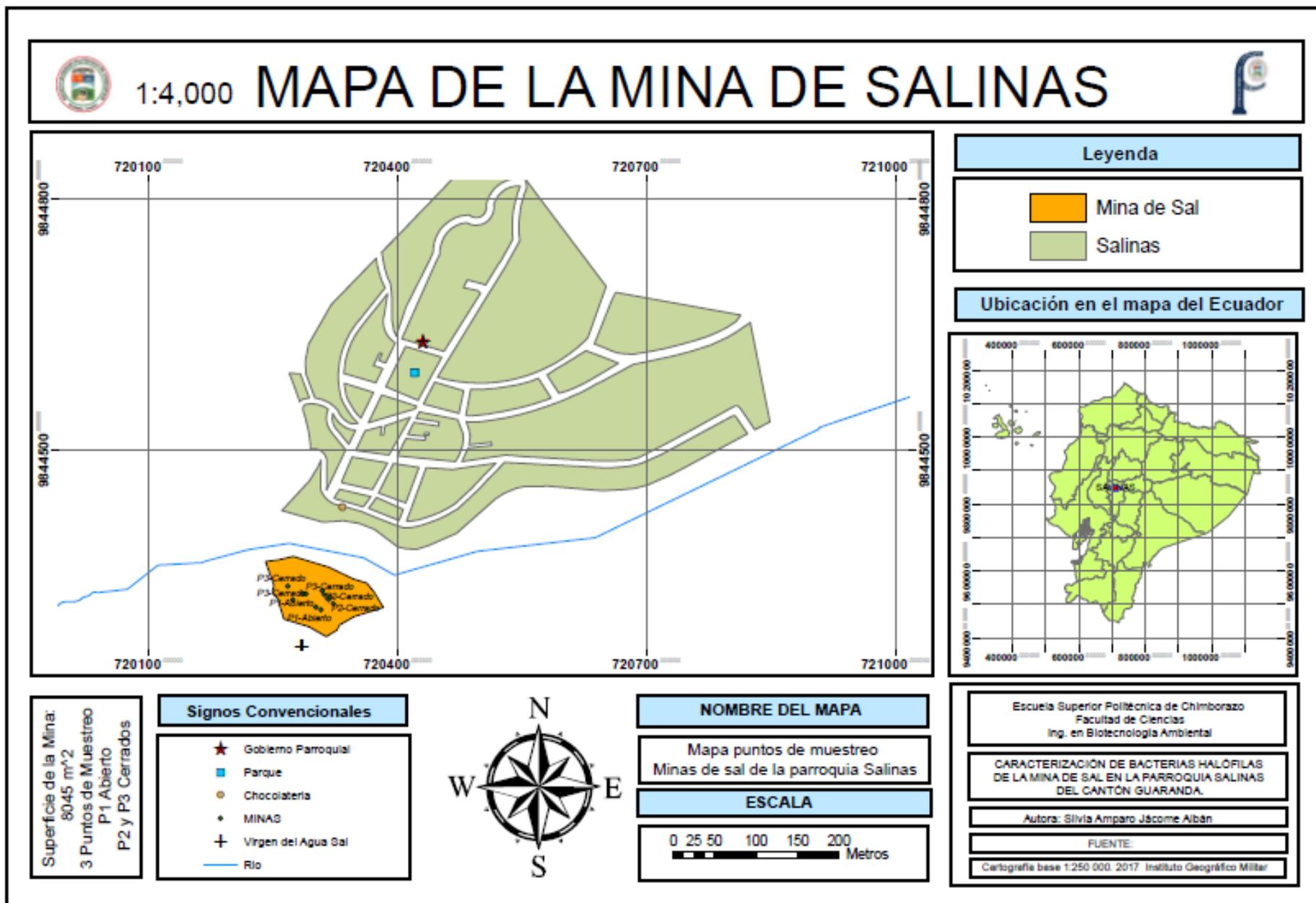
Dr. Juan Carlos Lara  
Benito Mendoza T., Ph.D.



Dr. Juan Carlos Lara R.  
TECNICO L.S.A.

-Los resultados de este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).  
-Se prohíbe la reproducción parcial de este informe sin la autorización del laboratorio.

Anexo C: Mapa Mina de Salinas



## Anexo D: Características macroscópicas, pruebas bioquímicas

**Tabla 1D:** Primer muestreo In- situ

PRIMER MUESTREO IN-SITU			DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA							CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA								
ZONA	CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	CITRATO	UREA	TSI	SIM		
																Movilidad	indol	H2S
1	1%	P.1-2	Circular	Ondulado	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.1-1	Circular	Ondulado	Amarilla-N	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(+)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)
		P.1-2 Am	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(+)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)
	10%	P.1-1	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/k	(+)	(-)	(-)
		P.1-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.1-1	Irregular	ondulado	Crema-B	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	k/k	(-)	(-)	(-)
P.1-2		Irregular	ondulado	Crema-B	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/k	(+)	(-)	(-)	
2	1%	P.2-1 N	Circular	entero	Naranja	elevada	Rugosa	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	K/K + H2S	(-)	(-)	(-)
		P.2-1 A	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
	3%	P.2-1 A	Circular	Entero	Cema-N	Elevada	Rugosa	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(-)	(-)	(+)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-1 Cr	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucidas	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.2-2 Cr	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(+)	(+)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.2-2 N	Circular	Entero	Naranja	Elevada	Rugosa	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	10%	P.2-1	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	k/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-1.1	Circular	Entero	Crema-B	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(-)	(-)	(-)	k/K	(-)	(-)	(-)
15%	P.2-1	Puntiforme	Entero	Crema-B	Convexa	Rugosa	Viscosa	Translucidas	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	k/K	(-)	(-)	(-)	

		P.2-2	Circular	Entero	Crema-B	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(-)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
3	1%	P.3-3	Circular	Entero	Crema	Convexo	Lisa Brillante	Viscosa	Translucidas	Bacilos (-)	(-)	(+)	(+)	(-)	A/A + gas	(-)	(-)	(-)
	3%	P.3-1	Circular	Entero	Crema	Convexo	Lisa Brillante	Viscosa	Translucidas	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
		P.3-3 Cr	Circular	Entero	Crema	Convexo	Lisa Brillante	Viscosa	Translucidas	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(-)	(-)	(-)
	10%	P.3-2	Irregular	Ondulado	Crema	Elevada	Rugosa	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)

**Tabla 2D:** Primer muestreo Ex- situ

PRIMER MUESTREO EX-SITU		DESCRIPCION MACROSCÓPICA								CARACTERIZACION BIOQUIMICA								
ZONA	CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	CITRATO	UREA	TSI	SIM		
																Movilidad	Indol	H2S
1	1%	P.1-2	Circular	Ondulado	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	3%	P.1-3	Circular	Ondulado	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
	10%	P.1-3	Circular	Entero	Naranja	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.1-3	Circular	Entero	Melón	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
2	1%	P.2-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/A	(+)	(-)	(-)
	3%	P.2-1	Circular	Ondulado	crema	plana	seca	cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	10%	P.2-3	Circular	Entero	Crema B	Convexa	Lisa Brillante	cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.2-2	Circular	Entero	Crema-N	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
3	1%	P.3-3	Circular	Ondulado	Crema	Convexa	opaca	Viscosa	Opaca	Filamentos (-)	(+)	(-)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.3-3	Circular	Entero	Naranja	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	10%	P.3-1	Circular	Ondulado	Crema	Convexa	lisa brillante	viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	15%	P.3-3	Circular	Entero	Naranja	Convexa	lisa brillante	viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)

**Tabla 3D:** Segundo muestreo In- situ

SEGUNDO MUESTREO IN-SITU			DESCRPCIÓN MACROSCOPICA							CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA								
ZONA	CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	CITRATO	UREA	TSI	SIM		
																Movilidad	indol	H2S
1	1%	P.1-2-2 Irre	Irregular	Ondulado	Crema	Plana	Rugosa	Seca	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.1-3-2 Cr Cla	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.1-3-2 Cre Osc	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.1-2-2 N	Circular	Entero	Crema-Bla	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
	10%	P.1-2-2 Cr	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.1-3-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.1-1-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.1-2-2	Circular	Entero	crema	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
2	1%	P.2-1-2 Pr	Circular	Entero	Crema	plana	Lisa brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	A/A	(-)	(-)	(-)
		P.2-1-2 B1	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.2-3-3 N	Circular	Entero	Crema-N	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
		P.2-3-2 B	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	10%	P.2-1-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-2-2	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa brillante	viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-3-2	Circular	ondulado	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
	15%	P.2-3-2	Circular	ondulado	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
P.2-1-2		Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	
3	1%	P.3-2-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
	3%	P.3-1-2	Circular	Entero	Crema -Tr	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)

		P.3-2-2	Circular	Entero	Blanca	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.3-3-2 A1	Circular	Entero	amarilla	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	10%	P.3-1-2	Circular	Entero	Crema -Tr	Convexa	lisa brillante	viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
		P.3-2-2	Circular	Entero	Crema -Tr	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.3-2-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(-)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)

**Tabla 4D:** Segundo muestreo Ex- situ

SEGUNDO MUESTREO EX-SITU			DESCRPCIÓN MACROSCOPICA							CARACTERIZACIÓN ENZIMATICA								
ZONA	CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	CITRATO	UREA	TSI	SIM		
																movilidad	indol	H2S
1	1%	P.1-1-2	Circular	Entero	Naranja	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.1-2-2 Cr2	Circular	Entero	Amarilla	Umbilicada	Lisa brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.1-2-2 Nb	Circular	Entero	Melón	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.1-2-2 Ni	Circular	Entero	Naranja-I	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	10%	P.1-3-2 Cr	Circular	Entero	Blanca	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.1-1-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	erizada	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
P.1-2-2		Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	
2	1%	P.2-1-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.2-3-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	3%	P.2-2-2 Cr	Circular	Entero	Blanco	Convexa	Lisa brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	10%	P.2-2-2	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(-)	(-)	(-)

15%	P.2-3-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	
	P.2-1-2 B	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(-)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	
	P.2-2-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(-)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)	
3	1%	P.3-3-2 R	Circular	Entero	Rosado I	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.3-2-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.3-3-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	10%	P.3-1-2	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
15%	P.3-2-2 Cr	Circular	Entero	Blanca	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	

**Tabla 5C:** Tercer muestreo In- situ

TERCER MUESTREO IN-SITU		DESCRPCIÓN MACROSCOPICA								CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA								
ZONA	CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	CITRATO	UREA	TSI	SIM		
																Movilidad	indol	H2S
1	1%	P.1-1-3 Ama	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(+)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.1-2-3	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.1-3-3	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(+)	(-)	(-)
	10%	P.1-3-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.1-3-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
2	1%	P.2-1-3 T	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(+)	(+)	(-)	A/A+ Gas	(+)	(-)	(-)
	3%	P.2-1-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-2-3 Ama	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	A/A + Gas	(+)	(-)	(-)
		P.2-3-3 M	Circular	Entero	Melón	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
10%	P.2-1-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)	

		P.2-2-3	Circular	Entero	Melón	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-3-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.2-1-3	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-2-3	Circular	Entero	Crema-Tr	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
3	1%	P.3-3-3	Circular	Entero	Crema-Tr	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(+)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.3-1-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(-)	(-)	(-)
	10%	P.3-1-3	Circular	Ondulado	Crema	Convexa	erizada	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.3-3-3 M	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.3-1-3	Circular	Ondulado	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.3-2-3	Circular	Entero	Crema-Tr	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	k/k	(-)	(-)	(-)

**Tabla 6D:** Tercer muestreo Ex- situ

TERCER MUESTREO IN-SITU			DESCRPCIÓN MACROSCOPICA							CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA								
ZONA	CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	CITRATO	UREA	TSI	SIM		
																Movilidad	Indol	H2S
1	1%	P.1-3-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.1-2-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	10%	P.1-1-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.1-2-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	15%	P.1-1-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	A/A	(-)	(-)	(-)
		P.1-3-3	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
2	1%	P.2-3-3	Circular	Ondulado	Blanca	Pulvinada	Rugosa	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)

	3%	P.2-2-3	Circular	Ondulado	Amarillo	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.2-3-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	10%	P.2-2-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	15%	P.2-1-3	Circular	Entero	Crema-Tr	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
3	1%	P.3-3-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	3%	P.3-1-3	Circular	Entero	Amarillo	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
		P.3-2-3	Circular	Entero	Crema	Pulvinada	Rugosa	Cremosa	Opaca	Bacilos (+)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(-)	(-)	(-)
	10%	P.3-2-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
	15%	P.3-2-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)
		P.3-3-3	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Bacilos (-)	(+)	(+)	(-)	(-)	K/K	(+)	(-)	(-)

**Tabla 7C:** Total Cocos Gram negativos

			DESCRPCIÓN MACROSCOPICA						CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA			
CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	MANITOL
1%	P.2-2-3	Circular	Entero	Naranja	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Cocos (-)	(-)	(+)	(+)
	P.3-1-3	Circular	Entero	Translucida	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Cocos (-)	(-)	(-)	(-)
3%	P.2-1-2 Am	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	Cocos (-)	(+)	(+)	(-)
	P.2-3-2 Cr	Circular	Entero	Crema	Convexa	Lisa brillante	Viscosa	Opaca	Cocos (-)	(+)	(+)	(-)
15%	P.3-2	Circular	Entero	Crema	Elevada	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Cocos (-)	(-)	(+)	(-)
	P.3-3.1	Circular	Entero	Crema	Elevada	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Cocos (-)	(-)	(+)	(+)

**Tabla 8D:** Total Cocos Gram positivos

			DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA						CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA			
CONCENTRACION	PUNTOS	FORMA	BORDE	COLOR	ELEVACION	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA	TINCION GRAM	OXIDASA	CATALASA	MANITOL
1%	P.1-2-2 Cr 2	Circular	Entero	Blanca	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Cocos (+)	(+)	(+)	(-)
	P.2-3-2 NT	Circular	Entero	Naranja	Convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Cocos (+)	(-)	(+)	(+)
	P.3-3-2	Circular	Entero	Crema-Tra	convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	cocos (+)	(+)	(+)	(-)
3%	P.3-2-3	Circular	Entero	Crema - Tra	convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Translucida	Cocos (+)	(+)	(+)	(-)
15%	P.3-3 Cr	Circular	Entero	Crema	Elevada	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	Cocos (+)	(-)	(+)	(+)
	P.3-2- Ama	Circular	Entero	Crema	convexa	Lisa Brillante	Viscosa	Opaca	cocos (+)	(-)	(+)	(+)
	P.3-3-2	Circular	Entero	Crema	convexa	Lisa Brillante	Cremosa	Translucida	cocos (+)	(+)	(+)	(-)