

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON RESISTENCIA A BAJAS TEMPERATURAS DE LA LAGUNA TOBAR DONOSO EN LA COMUNA PIÑÁN DE LA PROVINCIA DE IMBABURA

CHARACTERIZATION OF BACTERIAL STRAINS WITH RESISTANCE TO LOW TEMPERATURES FROM THE TOBAR DONOSO LAGOON IN THE PIÑÁN COMMUNE OF THE IMBABURA PROVINCE

¹ Gordillo-Vásquez, Joselyn	joselynlizethgv@gmail.com
² Peñafiel-Muñoz Erika	erikita2101@gmail.com

¹ Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

² Investigador independiente, Ibarra, Ecuador.

* E-mail: joselynlizethgv@gmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizaron las colonias bacterianas extremófilas de la laguna Tobar Donoso en la comuna Piñán de la provincia de Imbabura, para ello se desarrolló el aislamiento de cepas bacterianas en el medio de crecimiento Plate Count Agar (PCA) mediante la técnica de vertido en placa y los cultivos fueron incubados a 10, 20 y 37 grados centígrados (°C) durante 120, 48 y 24 horas respectivamente, evidenciando el crecimiento de 19 colonias contables representativas, mismas que fueron sometidas a una caracterización macroscópica y aplicadas la técnica de tinción Gram para establecer una clasificación más específica. Estas colonias fueron purificadas en el mismo medio de cultivo e inoculadas por estriado y posterior a ello fueron sometidas a pruebas bioquímicas y enzimáticas; en base al comportamiento demostrado por cada cepa bacteriana se seleccionó a 5 con un perfil característico del género *Pseudomonas* y fueron evaluadas en presión selectiva en un medio mínimo Bushnell Haas con diversas concentraciones de hidrocarburos cuyo crecimiento fue evaluado por medio de densidad óptica a 600 nm. Los resultados arrojaron un porcentaje mayoritario de crecimiento a 10 y 20°C por lo que se determina la existencia de microorganismos psicrófilos en la laguna Tobar Donoso con un elevado potencial enzimático; además se demostró mayor resistencia al benceno en una concentración de 2% por parte de las colonias de 10°C, en tanto que, en diésel al 1% la cepa más tolerable corresponde a un aislamiento de 37°C. Los microorganismos psicrófilos de la laguna Tobar Donoso presentaron una elevada capacidad enzimática y una resistencia no significativa a hidrocarburos; sin

embargo, es importante continuar realizando estudios de microorganismos extremófilos en Ecuador.

Palabras clave: *Microbiología, Bioprospección, Psicrófilos, Presión selectiva, Hidrocarburos.*

ABSTRACT:

The aim of the current research was to characterize the extremophilic bacterial colonies of Tobar Donoso lagoon, located in Piñán rural community, Imbabura province. For this, it was necessary to isolate the bacterial strains in the Plate Count Agar (PCA) growth medium using the pour-plate technique; the cultures were incubated at 10, 20 and 37 degrees Celsius (°C) during 120, 48 and 24 hours respectively; thus, it was possible to evidence the growth of 19 representative colonies, which were exposed to macroscopic characterization. On the other hand, it was necessary to apply the Gram staining technique to establish a more specific classification. These colonies were purified in the same culture medium and inoculated by streaking, then they were exposed to biochemical and enzymatic tests. Based on the behavior reflected by each bacterial strain, 5 strains with a genus *Pseudomonas* characteristic profile were selected and evaluated under selective pressure in a Bushnell Haas minimum medium at different concentrations of hydrocarbons, whose growth was evaluated by means of optical density at 600 nm. The results revealed a higher growth percentage at 10 and 20°C, this allowed determining the existence of psychrophilic

microorganisms in the Tobar Donoso lagoon with a high enzymatic potential. In addition, a greater resistance to benzene at a concentration of 2% was demonstrated by the 10°C colonies, while for diesel at 1%, the most tolerable strain corresponds to an isolation of 37°C. The psychrophilic microorganisms of the Tobar Donoso lagoon reflected a high enzymatic capacity and a non-significant resistance to hydrocarbons; however, it is important to conduct permanent studies on extremophilic microorganisms in Ecuador.

Keywords: *Microbiology, Bioprospection, Psychrophiles, Selective pressure, Hydrocarbons.*

1. INTRODUCCIÓN

Estudios revelan la predominancia de ambientes fríos en la biósfera ocupando alrededor del 85% de la misma, dentro de los cuales se destacan zonas polares, océanos y cuerpos hídricos de alta montaña que constituyen un hábitat óptimo para bacterias, algas y hongos psicrófilos. Estos microorganismos en la actualidad constituyen un foco central de investigación debido al desarrollo de mecanismos biológicos de supervivencia que se traducen como un elevado potencial biotecnológico especialmente por la producción enzimática óptima a bajas temperaturas captando así el interés de la industria farmacéutica, petrolera, alimentaria, entre otras. La capacidad de los psicrófilos y psicrotolerantes para sobrevivir y desarrollarse en ambientes fríos que oscilan entre 0-15°C responde a una serie de adaptaciones como el incremento en la despolarización de sus membranas y por ende, la disminución del transporte de nutrientes por medio de ellas, la reducción de los procesos de reproducción celular por la minimización de los niveles de traducción y principalmente logran sobrevivir por la modificación del plegamiento proteico que impide la desnaturalización de proteínas (1).

La investigación de psicrófilos adquiere mayor importancia debido a los constantes hallazgos tales como la capacidad de reducción de metales pesados, específicamente Hierro (III) y Manganeseo (IV) por una bacteria psicrófila de géneros *Shewanella putrefaciens* aisladas en la Antártida, en dicho trabajo se manifiesta la eficiencia de transformación de hierro férrico a hierro ferroso y la transferencia de electrones de Mn (IV) convirtiéndolo en Mn(II) (2). Por otro lado, la industria alimentaria fija su atención en el microorganismo *Polaromonas vacuolata* procedente del océano Antártico cuya temperatura óptima de desarrollo es 4°C, debido a la necesidad de enzimas capaces de realizar funciones catalíticas a temperaturas muy bajas en funciones de procesamiento de alimentos (3).

Ecuador es un país con una amplia gama de lagunas de alta montaña que se caracterizan por la existencia de fluctuaciones de temperatura a lo largo del año, por lo

que también se presentan cambios en las condiciones nutricionales; sin embargo, existe la problemática de que estos ecosistemas son muy poco estudiados a nivel microbiológico, a pesar de tener un importante aporte a nivel biotecnológico con un enfoque especial en el ámbito de la bioprospección; tal es el caso de la Laguna Tobar Donoso de la comuna de Piñán en la provincia de Imbabura, por lo que se considera un repositorio natural de material biológico por explorar y con una aplicación importante en el campo de la biotecnología. Por otro lado, la actividad petrolera en el país se desarrolla a gran escala y, por tanto, los problemas de contaminación del agua subterránea son cada vez más frecuentes, para su remediación se emplean surfactantes químicos que alteran la composición natural del agua; por ello, el uso de biosurfactantes es más favorable por las características de biodegradabilidad que presentan y por la efectividad que demuestran al actuar en ambientes extremos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Laguna Tobar Donoso de la provincia de Imbabura a 3242 m de altura y forma parte de la Reserva Ecológica Cotacachi Cayapas, la población de estudio corresponde a las colonias bacterianas presentes en las muestras de agua procedentes del cuerpo lacustre. Esta investigación es de tipo exploratoria-explicativo debido a que pretende indagar sobre un tema poco estudiado en el Ecuador, se considera explicativo ya que analiza las características principales de las colonias bacterianas de dicho cuerpo hídrico y se detalla el comportamiento de estos microorganismos ante la exposición a hidrocarburos; por otro lado, se desarrolló un diseño experimental puro aplicado a las muestras de agua de la Laguna Tobar Donoso en el cual se identifica variables independientes (temperatura y composición del medio de cultivo) evaluando la respuesta en variables dependientes (supervivencia a bajos niveles de temperatura y resistencia a hidrocarburos contenidos en el medio de cultivo). La metodología de investigación se llevó a cabo en 6 etapas.

Análisis físico-químico

La recolección de muestras se realizó en base a las consideraciones e indicaciones estipuladas en la Norma Técnica Ecuatoriana 2176, para la presente investigación se tomaron muestras puntuales de tipo manual recogidas en la superficie, para tal fin se seleccionaron tres puntos de muestreo por duplicado cuya toma se efectuará en recipientes ámbar evitando interferencias causadas por la exposición a la luz (4). Inicialmente se realizó un análisis in situ determinando los parámetros de temperatura, pH y conductividad medidos en la Laguna Tobar Donoso en los tres puntos de muestreo mediante un multiparámetro digital EZ-9908 que arroja los valores de forma automática y mediante equipos como el colorímetro, turbidímetro o procesos de titulación se establecieron en el

laboratorio los parámetros de color, turbiedad, dureza y alcalinidad.

Análisis microbiológico

El análisis de la diversidad microbiológica se realizó empleando el medio de cultivo Agar Plate Count (PCA), puesto que constituye un medio altamente enriquecido favorable para el crecimiento de bacterias aerobias de aguas naturales (5). Posterior a ello, se inoculó por triplicado a partir de un juego de diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁴ garantizando la consecución de un número contable de colonias; la siembra fue codificada considerando el punto de muestreo, temperatura de incubación y tipo de siembra, es así que las placas inoculadas de PCA fueron incubadas a tres temperaturas diferentes, 10°C, 20°C y 37°C, estas últimas se revisaron a las 24 horas, las de 20°C se realizó el conteo a las 48 horas, mientras que la de 10°C se incubaron durante 5 días.

Caracterización fenotípica

Se llevó a cabo la caracterización macroscópica de forma inicial observando aspectos como forma, borde, color, superficie, elevación y consistencia de las cepas bacterianas más representativas. La caracterización microscópica se efectuó mediante la tinción Gram; sin embargo, los tiempos convencionales del proceso fueron duplicados ya que los microorganismos extremófilos presentan modificaciones en la membrana que impide la coloración Gram en un corto tiempo (6).

Aislamiento y purificación

Para la purificación y aislamiento se realizó una selección de colonias bacterianas bajo criterios representativos como el color, borde y consistencia, el aislamiento de las cepas seleccionadas se desarrolló en el medio de cultivo PCA sobre el cual se inocularon las colonias mediante la técnica de estriado y las cepas se incubaron a 10, 20 y 37°C durante 5, 2 y 1 día respectivamente.

Caracterización bioquímica

Se efectuó los test de pruebas bioquímicas y enzimáticas, para lo cual se utilizó las tiras de papel reactivo compuesta de dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0,1µmol;1-naftol 1,0 µmol para la prueba de oxidasa; para evaluar la presencia de catalasa se fijó una colonia en la placa porta objetos y se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 30%. El test de ureasa se llevó a cabo inoculando las cepas en el agar Urea Christensen, así mismo, fueron sembradas en el medio de cultivo SIM para revelar la producción de sulfuro, indol y la presencia de flagelos que permiten su movilización; se evaluó además la fermentación de glucosa y lactosa al inocular las colonias bacterianas en medio de cultivo TSI (Triple Sugar Iron) y en Agar Citrato Simmons para verificar la producción de citrato (7). Adicionalmente, se evaluó la capacidad enzimática de las cepas a través de la inoculación en superficie por picadura en Agar almidón observando la hidrólisis

de almidón, así también, la hidrólisis de lípidos se comprobó mediante el medio PCA suplementado con manteca 1% V/V y la hidrólisis de caseína se analiza en medio de cultivo PCA con un suplemento de leche al 10% V/V.

Resistencia a hidrocarburos

De acuerdo a Acosta et al. (8) uno de los géneros con mayor resistencia a hidrocarburos es Pseudomonas, por lo que se procede a analizar los resultados de las pruebas bioquímicas y se selecciona a aquellas que cumplen con las características del género de interés como viables para aplicar presión selectiva a hidrocarburos, una vez identificadas las cepas se realizó una activación de las colonias mediante la inoculación en caldo Luria Bertani ya que representa un medio de crecimiento óptimo para la mayoría de microorganismos dejándolas en incubación a 30°C durante 48 horas aproximadamente realizando agitaciones manuales de 5 minutos cada 6 horas; el objetivo es alcanzar la densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600nm (9); finalmente, para determinar la resistencia a hidrocarburos se procedió a preparar el caldo del medio mínimo Bushnell Haas suplementado con benceno y diésel por separado a concentraciones de 0.5, 1 y 2% v/v, se sembró las colonias bacterianas desarrolladas en el caldo Luria Bertani con densidad óptica de 0.5 con el asa de cultivo y se trasladó a los tubos de ensayo con medio BH suplementado con hidrocarburo incubándose a 30°C durante 48 horas con controles y reporte de la densidad óptica en 1, 12, 24 y 48 horas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis físico-químico

Tabla 1: Resultados del análisis in-situ

Parámetro	Resultado
Temperatura	12.3°C
PH	7.12
Conductividad Eléctrica	3.2 µSiems/cm
Sólidos disueltos	19 ppm

Fuente: Autores, 2023

Tabla 2: Resultados del análisis ex-situ

Parámetro	Resultado
Color	25 UPtCo
Turbiedad	1.18 NTU
Sólidos en suspensión	2 mg/L
Alcalinidad	30mg/L
Dureza	24mg/L
DBO	3.4 mg/L

Fuente: Autores, 2023

Las muestras de agua de la laguna Tobar Donoso presentan una temperatura media de 12.3°C, dato similar al resultado de Chiguano (10), dicho valor registrado permite categorizar a este cuerpo lacustre como una laguna de alta montaña, puesto que Jiménez

(2) menciona un rango de 0-24°C como la temperatura media de este tipo de lagunas asociado con una elevación entre 3115 a 3779 msnm y la laguna Tobar Donoso se encuentra a 3242 msnm reafirmando la pertenencia a este grupo de sistemas lacustres.

El valor de pH es de 7.12 muy próximo a la neutralidad, lo que puede deberse a la inexistencia de factores antrópicos que puedan contribuir a la alcalinidad o acidez por la dificultad de acceso que supone la ubicación de la laguna Tobar Donoso, siendo la única vía de ingreso una de tercer orden de tierra, así lo menciona Chiza (11); además la carencia de agentes contaminantes y perturbadores introducidos por acción humana justifican que dichas aguas presenten valores mínimos de turbiedad y una coloración casi transparente.

La conductividad eléctrica es baja en las muestras de agua debido a la carencia de iones disueltos, valor que encaja con los resultados de dureza y alcalinidad que también se encuentra en un nivel bajo, de acuerdo a Solís-Castro et al. (12) estos tres parámetros guardan estrecha relación manteniendo un coeficiente de correlación muy próximo a 1.

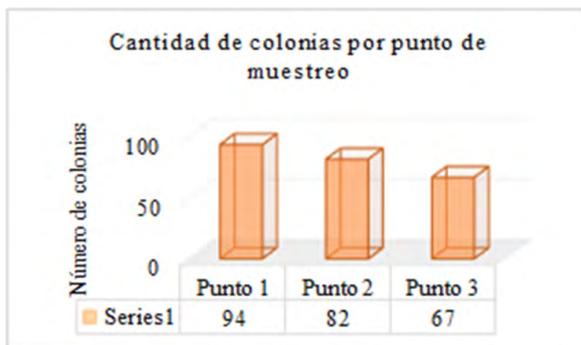


Gráfico 1: Cantidad de colonias por punto de muestreo.

Fuente: Autores, 2023

Después de haberse realizado la inoculación e incubación respectiva se contabilizó un total de 243 colonias bacterianas, de las cuales el 38.7% corresponden a la incubación de las muestras del punto 1 que en comparación con los otros puntos presenta mayor facilidad de contacto con el cuerpo lacustre, así también se observa mayor presencia y diversidad de flora nativa; el punto 2 otorgó una cantidad de 82 cepas que corresponden al 33.7% y finalmente, el punto 3 que se encuentra rodeado de paja únicamente presenta un crecimiento de 67 colonias que equivale al 27.6%.

Urbierta (13) describe que el nivel de radiación y accesibilidad alrededor del cuerpo hídrico son factores que determinan la variabilidad microbiológica en número y especie; tal formulación coincide con los resultados arrojados en esta experimentación ya que el punto 1 es más accesible y recibe menos incidencia de la radiación ya que se encuentra cobijado por vegetación arbórea; en tanto que el punto 3 recibe la radiación solar de forma directa.

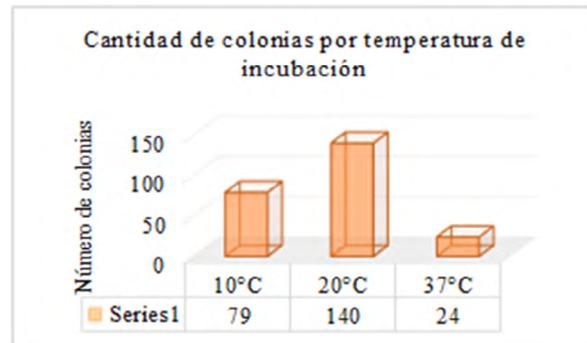


Gráfico 2: Cantidad de colonias según la temperatura de incubación.

Fuente: Autores, 2023

Una vez que las placas inoculadas se incubaron, se obtuvo el crecimiento bacteriano a tiempos diferentes para cada una de las temperaturas de incubación, de modo que las placas de 37°C mostraron las primeras colonias a partir de 8 horas, las de 20°C tomaron 48 horas para mostrar el desarrollo y las de 10°C tardaron 5 días. A esta última temperatura se demuestra un crecimiento del 32.51% del total de cepas crecidas; a 20°C se evidencia el mayor desarrollo bacteriano que representa al 57.61% y para la mayor temperatura la proliferación de bacterias fue muy baja y equivale únicamente al 9.87%.

Los resultados coinciden con la aseveración de Romero et al. (14), que indica que los microorganismos se desarrollan en mayor proporción en temperaturas óptimas de crecimiento, al ser expuestos a los extremos del rango tolerable o alejarse fuera de ellos produce una disminución en el metabolismo del microorganismo reduciendo sus capacidades de proliferación; las bacterias aisladas en la presente investigación son categorizadas como psicrófilos por el elevado porcentaje de crecimiento que demuestran a la temperatura de incubación de 10 y 20°C, ya que según Oliart-Ros et al. (15) los psicrófilos tienen como temperatura óptima 10-15°C hacia abajo y su rango tolerable se extiende hasta 25°C; en el caso de la laguna Tobar Donoso la temperatura reportada es de 12.3°C, por lo tanto, causó un nivel mínimo de estrés al ser aisladas a 10°C; sin embargo, el crecimiento es notorio ya que no se aleja en exceso de la temperatura ambiente. Por otro lado, al ser expuestas a 37°C su metabolismo impide el desarrollo mostrando muy poca tolerancia a tal nivel de calor.

Caracterización macroscópica

De las 243 colonias bacterianas contabilizadas se procede al aislamiento y purificación de 19 de ellas, seleccionadas por ser las más representativas en color, forma y demás características macroscópicas, el resto se descartan porque de acuerdo a los resultados arrojados en la caracterización fenotípica son consideradas cepas iguales a las elegidas. De las colonias aisladas se evidencia una predominancia al presentar pigmentación diferente: blanca, amarillo,

tomate, crema, rosa y anaranjado, esta característica se refleja en el 78.94% de las cepas; solamente 4 de ellas carecen de pigmentación lo que corresponde al 21.06%. Este rasgo responde a un mecanismo de protección que presenta la microbiota de sistemas altoandinos, así lo afirma Shivprasad et al. (16), quien argumenta que el proceso adaptativo de los microorganismos de alta montaña a la incidencia UV es el desarrollo de pigmentos endógenos, melaninas y carotenoides. Además, las cepas sin pigmentación son aisladas del punto 1 donde existe protección de la radiación por la vegetación arbórea.

Con relación a la superficie de las cepas bacterianas caracterizadas, la mayoría de ellas representadas por el 78.94% son lisas y el 21.06% que corresponde a 4 cepas son rugosas. Esta predominancia se atribuye a la presencia de lipopolisacáridos en la capa externa de la membrana, los cuales tienen un elevado contenido de ácidos grasos insaturados y de cadena corta, que son los responsables de atrapar los iones divalentes positivos propios de climas fríos y también son un mecanismo de defensa que impide el contacto directo con los cristales de hielo de su medio extracelular (17).

La mayoría de los aislamientos caracterizados tienen una forma irregular, lo que corresponde al 63.15%; en tanto que, el 34.84% restante reporta una forma circular. Además, se refleja una variedad en cuanto a elevación y borde así; 7 cepas son elevadas lo que equivale al 36.84%, el mismo porcentaje corresponde a una elevación convexa y las 5 faltantes son categorizadas como planas lo que respecta un 26.31%. La característica de borde irregular se observa con mayor frecuencia y se presenta en el 42.11%, seguido del 31.58% que muestra un borde entero, 2 cepas presentan borde filamentosos, esta cantidad equivale al 10.53% y finalmente, 1 cepa (5.26%) tiene un borde lobulado.

Las características ópticas reportadas de las cepas se aproximan a la mediación ya que el 52.63% son traslúcidas y el 47.37% restante son colonias opacas. Por último, la consistencia presentada con mayor frecuencia es la cremosa que corresponde al 73.68%, 3 (15.79%) cepas son suaves y el faltante 10.53% son colonias con una consistencia dura.

Caracterización microscópica

Una vez realizada la caracterización microscópica se observaron células redondas y otras alargadas con apariencia similar a mini varillas y con una coloración específica que permite clasificarlas como Gram negativas y Gram positivas; es así que, se determina una presencia mayoritaria de bacterias Gram positivas pues de los 19 aislamientos, 14 corresponde a esta categoría lo que representa un porcentaje del 73.68%; por otro lado, mostrando una coloración rosada se establece la existencia de 5 cepas bacterianas Gram negativas, lo que se traduce como el 26.32%. Estos resultados coinciden con los reportados por González et al. (18), quien menciona la prevaencia de Gram

positivas en su estudio del lago cratérico volcánico Cuicocha ubicado también en la provincia de Imbabura cuya altura es 3072 msnm y su temperatura oscila entre 8-16°C; características muy similares a las de la laguna Tobar Donoso.

Por otro lado, 10 (52.63%) de las colonias aisladas en la observación bajo microscopio mostraron forma alargada, por lo que se deduce su pertenencia a la morfología bacilos; mientras que el 47.37% de cepas restantes se visualizan como pequeñas esferas lo que corresponde a la morfología cocos.

Pruebas bioquímicas

Posterior a la aplicación de las pruebas bioquímicas a las 19 cepas aisladas y purificadas se obtiene como resultado que el 73.68% de las colonias son positivas para oxidasa denotando una coloración azul violeta en las tirillas de reacción; en cuanto a la producción de catalasa el porcentaje que se reporta como positivo tras la observación de burbujeo inmediato corresponde al 89.47%. En los dos casos se puede apreciar una minoría que muestran un resultado negativo.

Los resultados tras la inoculación en medio de cultivo SIM denotan la presencia de flagelos en 13 (68.42%) cepas, los cuales les permiten demostrar movilidad mediante la aparición de una nube en torno a la línea de siembra; por otro lado, la producción de indol es negativa para la mayoría de las cepas y se connota únicamente en el 21.05% que corresponde a 4 colonias. Así también, la producción de sulfuro es casi nula y se evidencia solo en 4 cepas bacterianas.

Cuando los aislamientos fueron inoculados en agar TSI, se observa que el 42.10% alcanzan un cambio de coloración del medio en la parte superior del pico de flauta siendo determinadas como positivas para la fermentación de lactosa; en tanto que, la fermentación de glucosa con el viraje de color en la parte inferior se demostró en menos proporción ya que únicamente se presenta en el 31.57% de las colonias y la producción de gas glucosa apenas se evidencia en dos cepas que corresponden al 10.53%.

En la producción de la enzima ureasa se presenta nulidad absoluta ya que ninguna de las cepas aisladas demuestra cambio de coloración y finalmente, en los cultivos en Citrato Simmons se visualiza un viraje de verde a azul únicamente en tres colonias, lo que respecta al 15.79% de positivas para esta prueba.

Pruebas enzimáticas

Después de realizar las pruebas enzimáticas a las 19 cepas bacterianas aisladas, se determina que el 63.16% son bacterias capaces de producir la enzima lipasa y por ende degradar los lípidos; el 78.94% que corresponde a 15 colonias producen amilasa y el 68.42% han dado como resultado positivo para la producción de la enzima caseinasa; de forma general se comprueba la producción enzimática en la mayoría de las cepas aisladas. Estos datos corroboran lo

manifestado por D'Amico et al. (1), quien pone de manifiesto la comparación de la gran producción de enzimas por microorganismos psicrófilos en contraste con la proporción en la que se desarrollan estas proteínas en microbiota mesófila. Así también indica que las enzimas psicrófilas poseen mayor eficiencia catalítica para procesos ejecutados a bajas temperaturas, mismos que resultan minimamente efectivos al trabajar con enzimas aisladas de ambientes mesófilos o termófilos.

De forma general, las cepas aisladas presentan una elevada capacidad enzimática especialmente en la hidrólisis del almidón, por lo que se destaca la posibilidad del uso de estas bacterias en la industria alimenticia y ganadera, ya que su función permite el aprovechamiento de los nutrientes en mayor proporción. Las cepas con capacidad lipolítica pudieran ser de especial interés para la industria petrolera y automotriz del país (19).

Cepas bacterianas seleccionadas

Tabla 3: Cepas bacterianas seleccionadas para aplicar presión selectiva

CEPA	OXIDASA	CATALASA	SIM			TSI			UREA	CITRATO	Enzimáticas		
			MOVILIDAD	INDOL	SULFURO	FERM. LACTOSA	FERM. GLUCOSA	GAS GLUCOSA			HIDRÓLISIS LÍPIDOS	HIDRÓLISIS ALMIDÓN	HIDRÓLISIS CASEÍNA
Ab	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Af	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Bd	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Bf	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Cb	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Fuente: Autores, 2023

Después de realizar un análisis de los resultados de las pruebas bioquímicas y enzimáticas, se determina 5 cepas que cumplen con las características para encajar dentro del género *Pseudomonas* y, por ende, son viables para la aplicación de presión selectiva con hidrocarburos a fin de evaluar su resistencia; las colonias seleccionadas demuestran la gran capacidad enzimática en la prueba lipolítica, proteolítica y amilolítica, razón por la cual Calderón y Aguilar (20) afirman que estas son capaces de sobrevivir en ambientes extremos con compuestos orgánicos e inorgánicos contaminantes presentando escasa sensibilidad ante ellos.

Densidad óptica alcanzada en caldo Luria Bertani

Tabla 4: Densidad óptica de las cepas bacterianas en Luria Bertani a 48h

CEPA	DENSIDAD ÓPTICA (600nm)
Ab	0.436
Af	0.445
Bd	0.473
Bf	0.460
Cb	0.480

Fuente: Autores, 2023

La inoculación de bacterias en caldo Luria Bertani permite la activación de las cepas seleccionadas, alcanzando un punto óptimo que sirve como partida para posteriores ensayos de crecimiento celular en otros medios de cultivo, así lo indica Corona (21) y Di Martino (22) menciona que la densidad óptica ideal a una longitud de onda de 600 nm para microorganismos extremófilos corresponde a 0.5, con un margen de error de ± 0.05 ; es así que en la experimentación se obtienen los valores de absorbancia reflejados en la Tabla 4. después de 48 horas de incubación; sin embargo las dos primeras cepas con nomenclatura **Ab** y **Af** están por debajo del margen de error estipulado en la bibliografía porque son cultivos procedentes de aislamientos de 10°C, y la incubación en caldo Luria Bertani se la realizó a 30°C; en tanto que, el resto de cepas seleccionadas proceden de incubaciones de 20 y 37°C lo que se traduce en mayor adaptabilidad a la nueva temperatura y por lo tanto, mayor crecimiento reflejado como un nivel superior de absorbancia.

Las mediciones se han realizado a 600 nm ya que Hernández y Acebo (23) manifiesta que bajo experimentación se ha demostrado que a dicha longitud de onda el nivel de absorbancia de las células es insignificante asegurando así que los valores reportados sean únicamente de la dispersión de la luz por acción de la muestra como tal lo que permite establecer de forma segura la correlación entre la densidad óptica con la concentración de células.

Absorbancia en diesel a diferentes concentraciones

Tabla 5: Absorbancia de las cepas en Bushnell Haas con diferentes concentraciones de diesel.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE DIESEL											
	0.5 % v/v				1 % v/v				2 % v/v			
	60	720	1440	2880	60	720	1440	2880	60	720	1440	2880
Ab	0.001	0.015	0.056	0.068	0	0.059	0.106	0.114	0	0.039	0.036	0.043
Af	0	0.017	0.029	0.038	0.001	0.054	0.070	0.085	0.001	0.023	0.031	0.035
Bd	0	0.015	0.031	0.063	0	0.049	0.071	0.096	0	0.026	0.031	0.042
Bf	0	0.007	0.024	0.086	0.001	0.083	0.139	0.150	0	0.049	0.06	0.078
Cb	0.001	0.048	0.055	0.124	0.001	0.091	0.147	0.201	0	0.053	0.082	0.121

Fuente: Autores, 2023

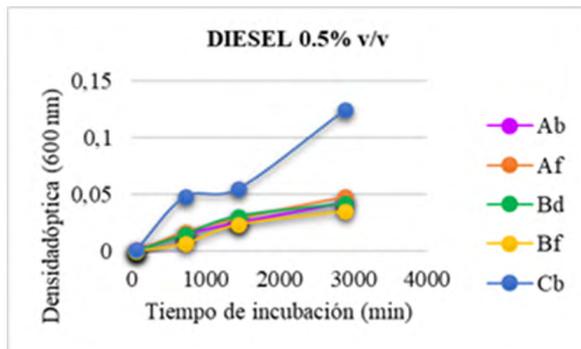


Gráfico 3: Curvas de crecimiento de cepas bacterianas en caldo suplementado con 0.5% v/v de diesel.

Fuente: Autores, 2023

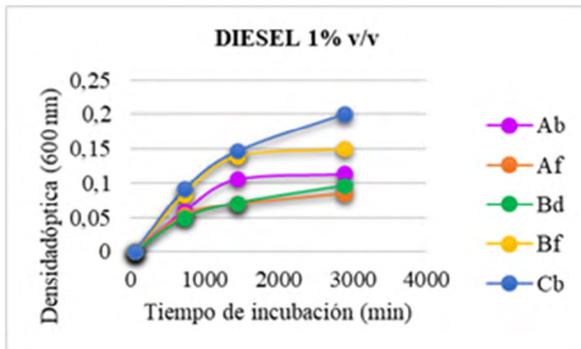


Gráfico 4: Curvas de crecimiento de cepas bacterianas en caldo suplementado con 1% v/v de diesel.

Fuente: Autores, 2023

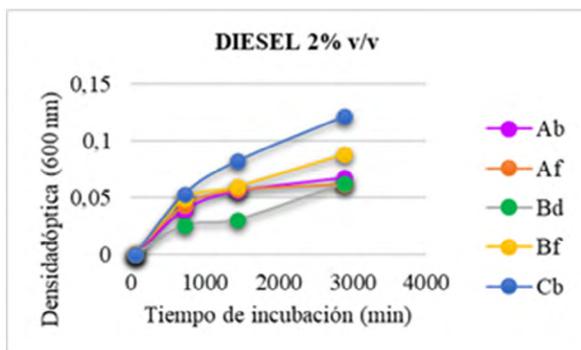


Gráfico 5: Curvas de crecimiento de cepas bacterianas en caldo suplementado con 2% v/v de diesel.

Fuente: Autores, 2023

La resistencia a diesel se evaluó a partir de un medio mínimo compuesto únicamente por sales, obligando de esta manera a las cepas bacterianas al consumo de dicho hidrocarburo como única fuente de carbono para su supervivencia; los monitoreos realizados a 1, 12, 24 y 48 horas de incubación arrojan resultados de absorbancia inferiores a los de las obtenidas como punto de partida en el caldo Luria Bertani cuyo valor oscila entre 0.436 y 0.480; en tanto que, en los ensayos con diésel el mayor valor de absorbancia se refleja a las 48 horas de incubación de la cepa bacteriana Cb en el medio con una concentración 1% v/v. Estos datos son coincidentes con los mencionados por Corona (21) quien reportó los resultados de resistencia bacteriana a gasolina cuyos datos de absorbancia también son inferiores a los del medio sin concentración alguna del contaminante; indica también que los valores se atribuyen a la necesidad de una pre-adaptación de supervivencia en el contaminante mediante una inoculación en el medio acostumbrado suplementado con hidrocarburo.

En la tabla 5 se evidencia que la densidad óptica alcanzada a las 48 horas es mayor para todas las cepas en el medio con concentración de diésel 1%v/v; seguido de los resultados en la concentración de 0.5% v/v, y finalmente, en todas las colonias bacterianas la absorbancia es menor para la concentración 2% v/v. Los resultados se justificarían basados en la teoría del punto óptimo de desarrollo, en la que se estipula que los microorganismos presentan un crecimiento idóneo con la cantidad exacta de nutrientes, por el contrario, cuando este es escaso se presenta una proliferación más lenta y cuando existe un exceso de nutriente provoca una sobresaturación del medio para el microorganismo resultando tóxico, así lo indica Meritxell (24). Lo manifestado permite determinar que la concentración 1% v/v es la mejor asimilada por las 5 cepas bacterianas, la de 0.5% v/v es insuficiente pero tolerable para las bacterias; mientras que la de 2% v/v se estima como tóxico y no asimilable por las colonias ya que los valores de densidad óptica a 48 horas son muy bajos.

Tras el análisis de los gráficos 3, 4 y 5 se establece que la cepa Cb es la que muestra los valores más altos de absorbancia para todas las concentraciones de diésel; en tanto que, Af es la de los resultados más bajos para las tres composiciones del medio. Esto se debe a la

influencia que ejerce la temperatura en la degradación de hidrocarburos siendo un factor determinante de la composición y población microbiana, es así que entre 30-40°C incrementa al máximo la velocidad metabólica de las bacterias degradadoras (25). Todas las cepas fueron incubadas a la misma temperatura (30°C) en este ensayo; sin embargo, la cepa que reporta mayor absorbancia es aislada de la temperatura de 37°C por lo que las nuevas condiciones de incubación no se muestran desagradables; por el contrario, Af proviene de un aislamiento de 10°C mostrando poca adaptación a la nueva temperatura y por ende su metabolismo no puede asimilar de forma ideal el hidrocarburo.

Absorbancia en benceno a diferentes concentraciones

Tabla 6: Absorbancia de las cepas en Bushnell Haas con diferentes concentraciones de benceno

CEPA	CONCENTRACIÓN DE BENCENO											
	0.5 % v/v				1 % v/v				2 % v/v			
	60	720	1440	2880	60	720	1440	2880	60	720	1440	2880
Ab	0	0.001	0.013	0.125	0.001	0.026	0.051	0.167	0	0.112	0.161	0.173
Af	0	0.019	0.040	0.147	0.001	0.034	0.065	0.194	0	0.064	0.089	0.219
Bd	0.001	0.007	0.061	0.132	0	0.006	0.02	0.038	0.001	0.008	0.014	0.024
Bf	0.001	0.038	0.045	0.151	0	0.012	0.022	0.045	0.001	0.004	0.011	0.031
Cb	0.001	0.004	0.009	0.013	0	0.001	0.006	0.008	0	0.002	0.005	0.007

Fuente: Autores, 2023

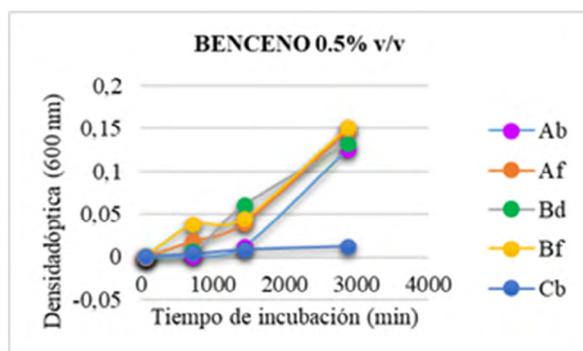


Gráfico 6: Curvas de crecimiento de cepas bacterianas en caldo suplementado con 0.5% v/v de benceno.

Fuente: Autores, 2023

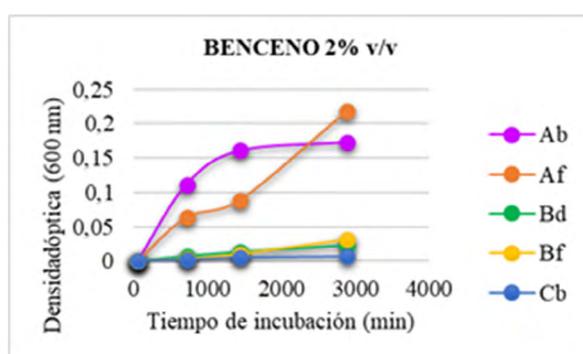


Gráfico 8: Curvas de crecimiento de cepas bacterianas en caldo suplementado con 2% v/v de benceno.

Fuente: Autores, 2023

La Tabla 6 refleja los valores de absorbancia que mostraron las cepas bacterianas en un medio mínimo suplementado con benceno a distintas concentraciones, tras el análisis se evidencia que no existe un comportamiento general para todas las cepas como se reportó en el análisis con diesel; es así que

en este ensayo las colonias bacterianas procedentes de aislamientos de 10°C alcanzan una absorbancia creciente en las concentraciones de benceno 0.5%, 1% hasta 2% v/v a las 48 horas de incubación, siendo Af la colonia con el valor más alto de densidad óptica en 2% v/v que corresponde a 0.219. Por otro lado, las bacterias originarias de aislamientos de 20 y 37°C tienen un comportamiento inverso, ya que la absorbancia decrece en el orden 0.5, 1 y 2% y el mayor nivel de densidad óptica a 0.5% v/v es de la cepa Bf con el valor de 0.151.

La colonia Cb presenta menor resistencia al benceno de los 5 aislamientos, esto se comprueba mediante las absorbancias reportadas. A partir de los resultados se estima que el benceno es un hidrocarburo con mayor resistencia al ataque microbiológico debido a factores físicos como la estructura molecular o por selectividad enzímica de las bacterias con las que se realizó el ensayo. (25)

4. CONCLUSIONES

1. La caracterización físico química del agua de la laguna Tobar Donoso presentó una temperatura media de 12.3°C, el pH cercano a la neutralidad con un valor de 7.12; son aguas con bajo color y turbiedad 25 UPtCo, 1.18 NTU respectivamente, la conductividad eléctrica es baja y presentó un valor de 3.2 μ Siems/cm y por ende la alcalinidad y dureza también lo son, reportando valores de 2 y 30 mg/L respectivamente y la demanda bioquímica de oxígeno mostró un resultado de 3.4 mg/L. Tras el análisis y sus resultados se determinó que es un agua de buena calidad ya que la perturbación antrópica que presenta es mínima.

2. El análisis microbiológico del agua de la laguna Tobar Donoso permitió el aislamiento de 243 cepas procedentes de 3 puntos de muestreo, inoculados en PCA e incubados a 3 temperaturas diferentes,

de las cuales el 38.7% proceden del punto 1, 33.7% corresponden al punto 2 y el 27.6% de cepas observadas pertenecen al punto 3; el punto 1 que registra la mayor diversidad microbiana se debe a la fácil accesibilidad al sitio de muestreo y la incidencia ocasionada por la variedad de vegetación que rodea al punto. En relación a las temperaturas de incubación, se registra una tasa de crecimiento del 57.61% a 20°C, el 32.51% se obtiene de las cajas incubadas a 10°C y el 9.87% restante proviene de la exposición a 37°C; esta última temperatura presenta la tasa más baja ya que se aleja de la temperatura ambiente que oscila los 12°C dificultando la aclimatación; en tanto que, las otras dos temperaturas permiten comprobar la existencia de cepas bacterianas psicrófilas.

3. La caracterización macro y microscópica permitió seleccionar 19 cepas representativas predominando las cepas con pigmentación típica como mecanismo de adaptación a la radiación UV, de superficie lisa y de forma irregular. En cuanto a la caracterización microscópica existe predominancia de cocos Gram positivos que corresponden a 9 cepas, 5 cepas son bacilos Gram negativos y la misma cantidad son colonias de bacilos Gram positivos. Después del análisis de los resultados de las pruebas bioquímicas y enzimáticas permitieron determinar 5 cepas bacterianas posiblemente pertenecientes al género *Pseudomonas*.

4. La evaluación de resistencia a hidrocarburos se aplicó únicamente a 5 cepas bacterianas (Ab, Af, Bd, Bf y Cb), las cuales presentan mayor resistencia al benceno puesto que se reportó valores superiores de absorbancia tras un periodo de incubación de 48 horas de incubación, comparados con los resultados obtenidos de los ensayos con diesel. La colonia más resistente al diésel es Cb, que alcanzó una densidad óptica de 0.201 para una concentración de 1% v/v, en tanto que la menos resistente a este compuesto fue la cepa Af que reportó una absorbancia de 0.085; por el contrario, en la experimentación con benceno, Af es la más resistente a 2%v/v, mientras que Cb es la más sensible ya que alcanzó una absorbancia máxima de 0.013 y corresponde a concentración de 1% v/v; datos que permiten concluir que las cepas de ensayo tienen un bajo nivel de resistencia a hidrocarburos como diésel y benceno.

5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. *EMBO reports* [Internet]. 2006 [Consultado 13 May 2022]; 7(4): 385-9. DOI: 10.1038/sj.embor.7400662.
- Jiménez Tapia EM. Bacterias poliextremófilas en lagunas de alta montaña y el potencial de su bioprospección: revisión. [Tesis de pregrado].
- Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2021 [Consultado 17 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/15323>
- Ramírez JAS, D NR, T HS. Microorganismos extremófilos. *Actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Internet]. 2006 [citado 13 de mayo de 2022];37(3):56-71. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937307>. ISSN: 1870-0195.
- INEN. NTE INEN 2176:2013 AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. TÉCNICAS DE MUESTREO [Internet]. 614.777:620.113 2013 p. 15. Disponible en: https://gestionambiental.pastaza.gob.ec/biblioteca/legislacion-ambiental/patrimonio_natural/nte_inen_2176_1_agua_calidad_agua_muestreo_tecnicas_muestreo.pdf
- Bertullo E. Recuento estandar en placa (Aerobic Plate Count) en productos de la pesca. *Veterinaria (Montevideo)* [Internet]. 1981 [citado 22 de julio de 2022];17(78):141-3. Disponible en: <https://revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/1025>. ISSN: 1688-4809.
- Forbes BA. *Diagnóstico Microbiológico*. 12th. ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2009. 1050p.
- Moreno JR, Albarracín VH. Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología) Serie (Microbiología)* [Internet]. 2012 [Consultado 22 de julio de 2022]; 5(5): 79-93 Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/17156>. ISSN: 1989-3620
- Acosta-Rodríguez I, Moctezuma-Zárate MG, Tovar-Oviedo J, Cárdenas-González JF. Aislamiento e Identificación de Bacterias y Levaduras Resistentes a Petróleo. *Información tecnológica* [Internet]. 2011 [citado 24 de febrero de 2022]; 22(6):103-10. DOI: 10.4067/S0718-07642011000600011
- Ugaz-Hoyos J, Vega-Cruz H, Iglesias-Osores S, Carreño-Farfan C. Biosurfactantes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos [Internet]. *SciELO Preprints*; 2020 [citado 24 de abril de 2022]. DOI: <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.642>
- Chiguano Ñacato AD. Diseño de una revista ecoturística de la Reserva Ecológica Cotacachi - Cayapas ubicada en la provincia de Imbabura - Ecuador con la finalidad de informar y difundir un lugar natural a los estudiantes de turismo. [Tesis de pregrado]. Quito: Tecnológico Superior Cordillera; 2017 [Consultado 17 de mayo de 2022];

- Disponible en: <http://www.dspace.cordillera.edu.ec:8080/xmlui/handle/123456789/4516>
11. Chiza Roja ML. Estudio de factibilidad para la implementación del turismo comunitario en la comunidad de Culquiloma, cantón Cotacachi, provincia de Imbabura. [Tesis de pregrado]. Quito: Universidad Politécnica Salesiana; 2011 [Consultado 17 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/5009>
 12. Solís-Castro Y, Zúñiga-Zúñiga LA, Mora-Alvarado D. La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y nacientes de Costa Rica. *TM* [Internet]. 2018 [Consultado 17 de mayo de 2022];31(1):35. DOI: 10.18845/tm.v31i1.3495.
 13. Urbietta MS. Diversidad microbiana en ambientes volcánicos [Internet] [Tesis doctoral]. Argentina: Universidad Nacional de La Plata; 2013 [Consultado 17 de mayo de 2022]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/30890>
 14. Romero E, Cobo J, Melendres KP, Polo LÁT. EVALUACIÓN DE FACTORES FÍSICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS. :8.
 15. Oliart-Ros RM, Manresa-Presas Á, Sánchez-Otero MG, Oliart-Ros RM, Manresa-Presas Á, Sánchez-Otero MG. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT* [Internet]. 2016 [Consultado 17 de mayo de 2022];11(1):79-90. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es. ISSN: 2007-7521
 16. Shivprasad S, Page WJ. Catechol Formation and Melanization by Na⁺-Dependent Azotobacter chroococcum: a Protective Mechanism for Aeroadaptation? *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 1989 [Consultado 18 de mayo de 2022];55(7):1811-7. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.55.7.1811-1817.1989>
 17. Collins T, Margesin R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2019 [Consultado 18 de mayo de 2022];103(7):2857-71. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09659-5>
 18. González M, Alarcón D, Araque J, Viteri F, Villacis L, Escobar S, et al. Microbiología del agua perteneciente al lago cratérico volcánico Cuicocha. Imbabura. Ecuador: Estudio inicial. *Rev. Fac. Farm;* 2021 [Consultado 18 de mayo de 2022];63(1). DOI: 10.53766/REFA/2021.63.01.03
 19. Dorado MG. ENZIMAS MICROBIANAS. 2016 [citado 22 de julio de 2022]; Disponible en: https://www.academia.edu/36468317/ENZIMAS_MICROBIANAS
 20. Calderón G, Aguilar L. Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev Med Cos Cen* [Internet]. 2016 [Consultado 19 mayo de 2022]; 73(621):757-63. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>. ISSN: 2215-5201
 21. Corona Galicia AM. Evaluación de cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal para degradar hidrocarburos ligeros y compuestos aromáticos (BTX). [Tesis de pregrado]. Puebla: Benemérita Universidad de Puebla; 2018 [Consultado 19 de mayo de 2022];57. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7730>
 22. Di Martino C. Estudio de bacterias del género Pseudomonas en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxialcanoatos. [Internet]. Universidad de Buenos Aires; 2015 [Consultado 19 de mayo de 2022]. Disponible en: http://repositorioubasisbi.uba.ar/gsd/cgi-bin/library.cgi?e=d-10000-00---off-0aextesis--00-2---0-10-0---0---0direct-10-SU--4-----0-11--10-es-Zz-1---20-about-HIDROXILACION--00-3-1-00-00--4---0-0-01-00-0utfZz-8-00&a=d&cl=CL2.5&d=tesis_n5752_DiMartino_oai
 23. Hernández-García AT, Acebo-González D. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* [Internet]. 2013 [Consultado 19 de mayo de 2022];44(1). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226886003>. ISSN: 0253-5688.
 24. Meritxell. Modelización de crecimientos microbianos en medios heterogéneos y de movilidad reducida. En: *Modelling in Science Education and Learning* [Internet]. Universitat Politècnica de Valencia; 2016 [citado 20 de mayo de 2022]. p. 81-120. DOI: [doi: 10.4995/msel.2016.57890](https://doi.org/10.4995/msel.2016.57890)
 25. Bracho M, Díaz L, Soto LM. Degradación de Hidrocarburos Aromáticos por Bacterias Aisladas de Suelos Contaminados con Petróleo en el Estado Zulia, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* [Internet]. 2004 [citado 16 de diciembre de 2021];38(3). Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/31>. ISSN: 2477-9458.