

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE BACTERIAS TERMOFILAS
AMILOLITICAS DE LAS FUENTES TERMALES DEL VOLCAN CHILES.
DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ANGELA MARIA CABRERA HERNANDEZ
RUTH YAMILE DIAZ VILLOTA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2003

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE BACTERIAS TERMOFILAS
AMILOLITICAS DE LAS FUENTES TERMALES DEL VOLCAN CHILES.
DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ANGELA MARIA CABRERA HERNANDEZ
RUTH YAMILE DIAZ VILLOTA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el titulo de
Biólogo con énfasis en microbiología

Asesor:
Alvaro Pazos Moncayo

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2003

Nota de aceptación

LUZ ESTELLA LAGOS
Jurado

BENJAMIN SAÑUDO SOTELO
Jurado

ALVARO PAZOS MONCAYO
Asesor

San Juan de Pasto, Noviembre de 2003

“Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son
responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1º. Del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1996, emanado del
honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a:

Alvaro Pazos, M.Sc. Microbiología, Director y profesor del Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Pablo Fernández, Candidato, Ph.D, Profesor del programa de Biología Universidad de Nariño

Guido Villota, Biólogo con énfasis en Microbiología industrial, asistente del laboratorio cuatro de microbiología de la Universidad de Nariño.

Jairo España, Zootecnista, Universidad de Nariño

María Elena Solarte. M. Sc. Jefe de sección de laboratorios de la Universidad de Nariño.

A todas las personas que de una u otra forma ayudaron al desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios mi amigo por su grandes beneficios que me ha concedido y porque me ha permitido vencer los obstáculos y seguir adelante.

A mis padres, quienes con su comprensión y cariño me han apoyado para lograr hacer realidad esos sueños tan anhelados.

A mi hermano, le agradezco su colaboración y su apoyo para lograr mis propósitos en todo momento de mi vida.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron de alguna manera para lograr mis ideales.

ANGELA MARIA CABRERA HERNANDEZ

Este trabajo de grado esta dedicado con inmensa gratitud, por estar a mi lado con su amor y apoyo incondicional en todo momento a:

Mi Padre celestial

Mi Padre, Luis Gonzalo Díaz.

Mi Madre, Ruth Elba Villota.

Mi hermano, Luis Fernando.

Mi hermana, Diana Carolina.

Y a todas las personas que creen en mí.

RUTH YAMILE DIAZ VILLOTA

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCION	23
OBJETIVOS	24
1. MARCO TEORICO	25
1.1 GENERALIDADES	25
1.1.1 Definición	25
1.1.2 Características morfológicas culturales	26
1.1.3 Características celulares	26
1.1.4 Otros componentes celulares	26
1.1.4.1 Cilios o flagelos	26
1.1.4.2 Espora bacteriana	27
1.1.5 Características fisiológicas	27
1.1.6 Características ecológicas	27
1.1.6.1 Hábitats de microorganismos termófilos	27
1.1.6.2 Rango de pH	28
1.1.6.3 Temperatura	28
1.1.7 Evolución de microorganismos termófilos	28
1.2 APLICACIONES E IMPORTANCIA DE BACTERIAS TERMÓFILAS	29
1.2.1 Enzimas	29
1.2.2 Aplicaciones genéticas	32
1.2.3 Aplicaciones industriales	33
1.3 ADAPTACIONES A LA TERMOFILIA	33

1.3.1 Características genéticas	34
1.3.2 Características moleculares	34
1.3.3 Membrana Plasmática	35
1.3.3.1 Lípidos	35
1.3.3.2 Proteínas	35
1.4 FUENTES HIDROTERMALES	36
1.4.1 Origen	36
1.4.2 Constituyentes del agua termal	37
1.5 POSICION SISTEMATICA DE LOS TERMOFILOS	37
1.5.1 Género <i>Thermus</i>	39
1.5.2 Género <i>Bacillus</i>	40
1.6 ACTIVIDAD AMIOLITICA	41
1.6.1 Enzimas termófilas relacionadas con la degradación del almidón	41
1.6.1.1 Amilasas y glucoamilasas	42
1.6.1.2 Ciclodextrinas glicotransferasas (CGTasas)	43
2. METODOLOGIA	44
2.1 LOCALIZACION Y SELECCION DE SITIOS DE MUESTREO	44
2.1.1 Ubicación geográfica	44
2.2 TOMA DE MUESTRAS	44
2.3 AISLAMIENTO	45
2.4 PURIFICACION	45
2.5 CONSERVACION	46
2.6 ESTRES DE TEMPERATURA	46

2.7 ACTIVIDAD AMIOLITICA	46
2.8 CARACTERIZACION PARCIAL	46
2.8.1 Características morfológicas	47
2.8.2 Pruebas bioquímicas	47
2.9 CARACTERIZACION DE FUENTES HIDROTERMALES	47
2.10 ELABORACION DE MEDIOS DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDOS	47
2.11 ELECCION DEL AISLADO	48
2.11.1 Hidrólisis múltiple	48
2.11.2 Hidrólisis puntual	48
2.12 ELECCION DEL MEDIO	49
2.12.1 Curva de absorbancia espectral para BHI	49
2.12.2 Preparación de inóculo	49
2.12.3 Perfil cinético	49
2.12.3.1 Método de siembra en superficie	50
2.12.3.2 Recuento en cámara de Neubauer	50
2.12.3.3 Método turbidimétrico	50
2.12.4 Evaluación de medios de cultivo.	51
2.12.4.1 Con variación en la concentración de sales	51
2.12.4.2. Con variación en la fuente de carbono	53
3. RESULTADOS Y DISCUSION	54
3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACION	54
3.2 ESTRES DE TEMPERATURA	57
3.3 ACTIVIDAD AMIOLITICA	58

3.4 CARACTERIZACION PARCIAL	59
3.4.1 Características morfológicas culturales y celulares	59
3.4.2 Pruebas bioquímicas	59
3.5 CARACTERIZACION DE FUENTES HIDROTERMALES	71
3.6 ELABORACION DE MEDIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS	73
3.7 ELECCION DEL AISLADO	74
3.8 ELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO	78
3.8.1 Curva de absorbancia espectral para BHI	78
3.8.2 Perfil cinético	78
3.8.2.1 Método de siembra en superficie	79
3.8.2.2 Recuento en cámara de Neubauer	79
3.8.2.3 Método turbidimétrico	80
3.8.3 EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO.	81
3.8.3.1 Con variación en la concentración de sales	81
3.8.3.2 Con variación en la fuente de carbono	85
4. CONCLUSIONES	88
5. RECOMENDACIONES	89
BIBLIOGRAFIA	90
ANEXOS	97

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Aplicación de enzimas termoestables en procesos industriales	31
Cuadro 2. Grupos más importantes de procariotas termófilos e hipertermofilos	38
Cuadro 3. Procesos enzimáticos del almidón	42
Cuadro 4. Composición de medios de cultivo químicamente definidos	52
Cuadro 5. Estrés de temperatura	57
Cuadro 6. Comparación de características bioquímicas	60
Cuadro 7. Análisis físico – químico de las aguas termales	72
Cuadro 8. Composición química del agua diseñada en el laboratorio con características similares al agua termal	74
Cuadro 9. Análisis químico de agua preparada en el laboratorio	74
Cuadro 10. Análisis de varianza para diámetro de halos de hidrólisis para 9 bacterias termófilas amilolíticas en agar almidón	76
Cuadro 11. Comparación de los promedios de diámetros de halos de hidrólisis para 9 bacterias termófilas amilolíticas en agar almidón	76
Cuadro 12. Análisis de varianza para unidades formadoras de colonias para cuatro medios de cultivo	82
Cuadro 13. Comparación de los promedios de unidades formadoras de colonias por mililitro en 4 medios de cultivo	84
Cuadro 14. Análisis de varianza para unidades formadoras de colonias para dos medios de cultivo	85

Cuadro 15. Comparación de los promedios de unidades formadoras de colonias por mililitro en dos medios de cultivo

86

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Zona de muestreo A	55
Figura 2. Zona de muestreo B	55
Figura 3. Zona de muestreo C	55
Figura 4. Método de conservación	56
Figura 5. Evaluación de capacidad amilolítica por método de siembra central	59
Figura 6. Batería bioquímica de identificación.	62
Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas del aislado A18	63
Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B24	63
Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B25	65
Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B34	65
Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B42	67
Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B45	67
Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas del aislado C53	69
Figura 14. Características macroscópicas y microscópicas del aislado C54	69
Figura 15. Características macroscópicas y microscópicas del aislado C55	70
Figura 16. Cápsula	71

Figura 17. Porcentaje de elementos para la zona de muestreo A	72
Figura 18. Porcentaje de elementos para la zona de muestreo B	73
Figura 19 Porcentaje de elementos para la zona de muestreo C	73
Figura 20. Evaluación de la actividad amilolítica por los métodos de hidrólisis múltiple e hidrólisis puntual	75
Figura 21. Promedios de diámetros de halos de hidrólisis para 9 bacterias termófilas amilolíticas en agar almidón	77
Figura 22. Curva de absorbancia espectral para BHI	78
Figura 23. Curva de crecimiento por recuento en placa	79
Figura 24. Curva de crecimiento por cámara de Neubauer	80
Figura 25. Curva de crecimiento medida por espectrofotometría	81
Figura 26. Promedios de UFC por mililitro para <i>Bacillus sp.</i> en cuatro medios de cultivo con variación en la concentración de sales	84
Figura 27. Promedios de UFC por mililitro para <i>Bacillus sp.</i> en dos medios de cultivo con variación en la fuente de carbono	87

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo A. Técnica de la coloración de Gram, esporas y cápsula	98
Anexo B. Agar almidón	99
Anexo C. Análisis físico-químico del agua termal	100
Anexo D. Composición BHI	101
Anexo E. Composición de medios de cultivo diseñados	102
Anexo F. Medio diseñado con almidón como fuente de carbono	105

GLOSARIO

AEROBIO : microorganismo capaz de usar oxígeno en la respiración.

AMILASA : enzimas que transforman el almidón en maltosa.

ANAEROBIO : organismo que no puede usar oxígeno en la respiración y cuyo crecimiento puede ser inhibido por el oxígeno.

ARCHAEA : grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distintos del grupo Bacteria.

BACILO : bacteria de forma cilíndrica.

BACTERIA : grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distinto del grupo Archaea.

BIOCONVERSION : utilización de los microorganismos para realizar una reacción química que es más costosa de otro modo, o que solo se puede hacer microbiológicamente.

BIOTECNOLOGIA : uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos definidos, de aplicación industrial.

CELULA : unidad fundamental de la materia viva.

CRECIMIENTO : incremento en el número de células.

CRECIMIENTO EXPONENCIAL : crecimiento de un microorganismo en que el número de células se duplica en un periodo fijado de tiempo.

CULTIVO AXENICO (PURO) : cultivo conteniendo una única clase de microorganismos.

DNA : ácido desoxiribonucleico, el material hereditario de las células y algunos virus.

DNA POLIMERASA : enzima que sintetiza una nueva cadena en la dirección 5'—> 3' utilizando una antiparalela como molde.

DESNATURALIZACION : destrucción de las propiedades conformacionales de una proteína ocasionando, en general, la pérdida de actividad biológica.

ENDOSPORA BACTERIANA : forma de resistencia al calor y otras condiciones ambientales, que esta rodeada por una gruesa pared y se origina por la diferenciación de determinadas bacterias Grampositivas.

ENLACE GLICOSIDICO : tipo de enlace covalente que une las unidades de azúcar en un polisacárido.

ENZIMAS : catalizadores proteicos que funcionan acelerando las reacciones químicas.

ESTERIL : ausencia de todos los organismos vivos y los virus.

EVOLUCION : cambio de una línea de descendencia que conduce con el tiempo a la producción de nuevas especies o variedades dentro de la especie.

EXTREMOFILO : organismo capaz de tolerar condiciones limites de pH, salinidad, temperatura o presión.

FASE DE LATENCIA : fase que precede a la exponencial de crecimiento, cuando las células pueden estar metabolizando pero no están creciendo.

FASE ESTACIONARIA : periodo inmediatamente posterior a la fase exponencial, cuando la velocidad de crecimiento se hace cero.

FERMENTACION : catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación de sustrato.

FILOGENIA : historia evolutiva de los organismos.

FLAGELO : apéndice largo y delgado con capacidad de rotación y que permite a los procariontes que los poseen la propulsión en medio líquido.

GEN : un segmento de DNA que codifica para una proteína.

GENERO : colección de diferentes especies, que comparte una o más (generalmente varias) propiedades principales.

GENETICA : herencia y variación de los organismos vivos.

GRAM NEGATIVA : tipo de célula procariótica cuya pared contiene relativamente poca cantidad de peptidoglicano, pero que contiene una membrana externa compuesta por liposacáridos, lipoproteínas y otras macromoléculas complejas.

GRAM POSITIVA : tipo de célula procariótica cuya pared esta compuesta básicamente por peptidoglicano y carece de la membrana externa.
HABITAT : lugar de residencia de un organismo en la naturaleza.

HELICE : estructura en espiral de una macromolécula con un patrón que se va repitiendo.

HIDROLISIS : descomposición de un polímero en unidades más pequeñas, generalmente monómeros, por adición de agua; digestión.

HIPERTERMOFILO : microorganismo que tiene una temperatura óptima de 80° C o mayor.

HUELLA DACTILAR DEL DNA : uso de técnicas de ingeniería genética para determinar el origen del DNA en una muestra de tejido.

LIPIDO : glicerol unido a ácidos grasos y otros grupos tales como fosfato por unión éster o éter.

MACROMOLECULA : polímero de unidades monoméricas covalentemente unidas.

MEMBRANA PLASMATICA : barrera con permeabilidad selectiva que envuelve al citoplasma y lo separa del entorno.

MESOFILO : organismo que crece a temperaturas entre 20 y 45° C.

METABOLISMO : todas las reacciones bioquímicas de una célula.

MICROORGANISMO : organismo microscópico constituido por una sola célula o agrupación de células, incluyendo los virus.

PATOGENO : organismo capaz de causar daño a su hospedador, al cual infecta.

POLIPEPTIDO : polímero de aminoácidos unidos por enlaces péptidicos.

POLISACARIDO : polímero de unidades de azúcar unidas por enlaces glicosídicos.

PROCARIOTA : célula que carece de núcleo rodeado de membrana, y cuyo génoforo esta constituido por una molécula de ADN circular y de cadena doble.

PROTEINA : polipéptido o grupo de polipéptidos que forman una molécula con función biológica específica.

PSICROFILO : organismo con temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior y una máxima inferior a 20°C.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) : método para amplificar una secuencia específica de DNA in vitro mediante ciclos repetitivos de síntesis, usando cebadores específicos y DNA polimerasa.

RNA : ácido ribonucleico, implicado en la síntesis de proteínas como RNA mensajero, RNA de transferencia y RNA ribosomal.

TAXONOMIA : ciencia que estudia la clasificación, identificación y nomenclatura de los organismos.

TEMPERATURA OPTIMA : temperatura a la cual el crecimiento es el más rápido posible.

TERMOFILO : organismo cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 45 y 80° C.

TERMOENZIMA : enzima capaz de catalizar reacciones a temperaturas mayores a las normales.

VECTOR : elemento genético capaz de incorporar DNA y hacer que este se replique en otra célula.

VIABLE : capaz de reproducirse.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en tres fuentes termales pertenecientes al Volcán Chiles en el Departamento de Nariño. El objetivo general fue aislar y caracterizar parcialmente bacterias termófilas con capacidad amilolítica y diseñar un medio de cultivo óptimo para su manejo y conservación.

A partir de los tres sitios de muestreo se purificaron 61 aislados de los cuales 31 (58%) toleraron temperaturas superiores a 55° C y 9 (34%) de las bacterias termófilas demostraron capacidad para hidrolizar almidón. La caracterización parcial de los 9 aislados termófilos amilolíticos contempló aspectos morfológicos tanto culturales como celulares y aspectos bioquímicos. Se demostró la presencia en aguas termales del Volcán Chiles de bacilos Gramvariables y Grampositivos esporulados, la morfología de las colonias mostró en su mayoría características culturales redondas y traslúcidas. Como características bioquímicas se puede destacar su capacidad de sintetizar la enzima catalasa y diversas actividades metabólicas, que permitieron caracterizar a los 9 aislados dentro del género *Bacillus*. De los cuales B45 presentó mayor promedio en halos de hidrólisis de almidón.

El análisis físico-químico del agua termal permitió describirlas como aguas débilmente ácidas y con alto contenido de sulfatos y calcio. Para simular en el laboratorio un agua químicamente semejante al origen, se probaron diversas cantidades y compuestos químicos que permitieron la formulación de los medios de cultivo. Inicialmente al agua diseñada se le adicionó peptona y extracto de levadura entre otros convirtiéndose en el medio 1. A partir del cual se diseñaron dos medios de cultivo que variaron en la concentración química de las sales simulando el agua termal. Estos se ajustaron a un 50 y 25 % de los minerales convirtiéndose en el medio 2 y medio 3 respectivamente. Mediante el análisis estadístico andeva y la prueba de significancia de tukey, se logró determinar, que el mejor medio de cultivo para aislar y conservar bacterias termófilas es aquel que tuvo en su composición el 50 % de las sales. Posteriormente al medio 2 se le sustituyó la glucosa por almidón, demostrándose estadísticamente que el medio suplementado con almidón es el mejor medio para conservar bacterias termófilas amilolíticas. Finalmente se pudo concluir que las aguas termales del Volcán Chiles poseen características que pueden permitir el crecimiento de bacterias termo amilolíticas con potencial uso biotecnológico en la producción microbiana de enzimas α -amilasas extracelulares con características termoestables.

ABSTRACT

The present research was carried out using samples from three hot springs of the Chiles Volcano in Nariño Department. The main objective of this study was to isolate and partially characterize those Thermophile bacteria possessing amyolytic capacity and, also to design an optimum culture medium for handling and conserving them.

From the three sampling sites, 61 of the isolated bacterium were purified 31 of these (58%), tolerated temperatures above 55°C and 9 (34%) of them demonstrated the ability of hydrolyzing starch. The partial characterization of the 9 isolated amyolytic thermophiles took into account the morphological aspects both cultural and cellular, and the biochemical aspects. The presence of Gramvariable rods and Grampositive spores formation was detected also in these waters taken from the hot springs. The colonies' morphology mainly displayed cultural characteristics were rounded and transparent. The biochemical characteristics of these rods emphasize their capacity to synthesize the catalase enzyme and other diverse metabolic abilities, which allowed the classification of the 9 isolated rods as belonging to the *Bacillus* genus of these B45 displayed a greater number in halos of hydrolysis starch.

The physio-chemical analysis of these waters can be described as slightly acidic, with a high sulfate and calcium content to be able to simulate water of a similar chemical origin, it was necessary to test various quantities and also the chemical compositions which allowed the formulation of the culture medium. Initially, peptone, yeast extract and other components were added the fabricated water changing it in the 1 medium from this, two culture mediums developed, altering the chemical concentration of the salts and creating a simulation the water from springs. These two cultures were adjusted 50 y 25 percent of the minerals changing them in the second and third medium respectively. Through the anova statistical analysis and by the tukey test of significance; it was deduced that the best medium for isolating and conserving thermophile bacteria, is the medium containing 50 % salts. Subsequently in relation to the the culture second medium, starch was used in place of glucose thus, proving statistically that the medium enhanced with starch in the best for conserving amyolytic thermophile bacteria. Finally, it can be concluded that the waters from the hot springs of the Chiles Volcano, possess characteristics that facilitate the growth of thermo-amyolytic bacteria, these bacteria have potential biotechnological use for microbial production of extracellular α -amylase enzymes possessing thermostable characteristics.

INTRODUCCION

Existen muchos microorganismos que viven en condiciones extremas que podrían ser letales para otros. Entre los factores que miden dichas condiciones esta la temperatura y desafiando a los rangos soportables por la gran mayoría de los organismos se encuentran, los termófilos. Estos microorganismos y en particular las bacterias, toleran temperaturas que van de los 40 a 70°C y más, para ello cuentan con características particulares de supervivencia en su estructura. Los termófilos habitan lugares asociados con la actividad volcánica como fuentes hidrotermales, las cuales les suministran los requerimientos nutricionales necesarios para sobrevivir.

El hecho de crecer a altas temperaturas hace interesante conocer a este tipo de microorganismos y profundizar principalmente en sus enzimas, las cuales son capaces de actuar a altas temperaturas sin desnaturalizarse como lo harían otros biocatalizadores.

Por tal razón, el estudio de bacterias termófilas es de gran importancia, por los aportes a nivel evolutivo y ecológico, y por la variedad de enzimas que de ellas se han logrado obtener, en su mayoría de gran utilidad en procesos industriales, biotecnológicos y bioquímicos entre otros.

La presente investigación pretende iniciar hacia el estudio de la microbiología de las aguas termales en el Departamento de Nariño, que pueden albergar una interesante diversidad biológica para explotar y preservar ya que ciertas actividades humanas están propiciando su agotamiento.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de aislamiento y caracterización parcial de bacterias termófilas amilolíticas de fuentes termales del Volcán Chiles. Esto se logró aislando en el laboratorio bacterias termófilas de "Baños Chiles", las bacterias purificadas se sometieron a pruebas de hidrólisis de almidón para ser caracterizadas parcialmente y finalmente se estandarizó un medio de cultivo con base en los componentes del agua origen con el fin de optimizar el crecimiento de tales bacterias.

Las pruebas estadísticas utilizadas para la interpretación de resultados fueron el análisis de varianza y la prueba de significancia de tukey.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar parcialmente bacterias termófilas amilolíticas de fuentes termales del Volcán Chiles. Departamento de Nariño

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Aislar bacterias termófilas de fuentes hidrotermales del Volcán Chiles. Departamento de Nariño.

Caracterizar los aislados termófilos por su actividad amilolítica.

Elaborar un medio de cultivo para el manejo de bacterias amilolíticas aisladas de fuentes termales.

1. MARCO TEORICO

1.1 GENERALIDADES

1.1.1 Definición de microorganismos termófilos. “Muchos microorganismos se han instalado en ambientes con condiciones que serían letales para cualquier otro ser vivo; a estos se les llama extremófilos. Ellos toleran situaciones límites de pH, salinidad, temperatura y presiones, entre otras y aunque algunos de estos se conocen desde hace más de 40 años, su búsqueda se ha intensificado recientemente”¹.

“El término termófilo ha sido usado en una variedad de formas y su definición no ha sido aceptada universalmente. Simplemente da una idea de que un termófilo es un organismo capaz de crecer a altas temperaturas. Se han descrito temperaturas óptimas entre 40 y 105°C, que en un organismo puede cambiar en pocos grados dependiendo del medio de cultivo y las condiciones en la cual este creciendo”².

“Uno de los parámetros ambientales más importantes que afecta el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos es la temperatura, de acuerdo al rango en el que pueden desarrollarse, se establecen cuatro categorías”³:

Psicrófilos o Criófilos: Con temperaturas óptimas muy bajas, pueden crecer a 0°C, así como algunos bajo -10°C.

Mesófilos: Crecen en rangos de temperatura moderados, desde cerca a 20°C (o menor) a 40°C, su temperatura óptima es de 25-40°C. La mayor parte de las bacterias, incluyendo patógenas, pertenecen a esta categoría.

Termófilos o termófilos facultativos (Euritermófilos): Con una temperatura óptima de 45°C o más. Ej. *Thermus acuaticus* y el

¹MADIGAN, Thomas. Extremófilos. En : Investigación y ciencia. (jun. 1997); p.60

²BROCK, Thomas. Introduction: an overview of the thermophiles. En : Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology. New York : A wiley interscience publication, 1986. p.2.

³MADIGAN, Thomas. Biología de los microorganismos. Octava edición. Madrid : Prentice hall, 1997. p.161-162.

termófilo moderado *Bacillus thermoamylovorans*⁴.

Hipertemófilos ó termófilos estrictos (estenotermófilos): Con una temperatura óptima de 75°C, pueden crecer a temperaturas mucho mayores, son de hecho incapaces de crecer a menos de 37°C, como Archea (*Thermoproteus, Pyrococcus, Pyrodictium*)⁵.

Debe enfatizarse que los rangos de temperatura para los grupos anteriores son aproximaciones únicamente.

1.1.2 Características morfológicas culturales. “Los termófilos se caracterizan por tener muchas formas morfológicas, varias de las bacterias termofílicas forman colonias compactas amarillas, naranjas, rojizas, rosadas con pigmentación debido a la presencia de carotenos; pero otras son traslúcidas”⁶.

1.1.3 Características celulares. “Microscópicamente se observan formas bacilares, largos o cortos, móviles o no móviles, que crecen en cadenas o individuales, algunos presentan extremos redondeados. Con presencia o ausencia de esporas, en distinta posición y variedad de formas, centrales, polares, ovoides y redondeadas. Presencia o ausencia de flagelos”⁷.

1.1.4 Otros componentes celulares

Las bacterias termófilas como otras bacterias pueden desarrollar en su estructura celular diferentes componentes como cilios o flagelos, que las hacen móviles y la formación de esporas, los cuales son mecanismos de supervivencia, sin embargo están restringidas a ciertos géneros.

1.1.4.1 Cilios o flagelos. Los cilios y flagelos no existen más que en ciertas especies. Filamentosos y de longitud variable, constituyen los órganos de locomoción. Según las especies, pueden estar implantados en uno o en los dos polos de la bacteria o en todo su entorno. Constituyen el soporte de los antígenos "H". En algunos bacilos Gramnegativos se

⁴www.helios.bto.ed.ok/bto/microbes/thermo.htm. ADAMS, M. The microbial World, thermophilic microorganisms. 1999.

⁵www.ugr.es/~eiañes/microbiologia/17. IAÑES, Enrique. Curso de microbiología general.1999.

⁶SNEATH, Peter. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Estados Unidos : Williams & Williams, 1986. p. 1105.

⁷MORRISON, Lethe. Studies on thermophilic bacteria. En : Journal bacteriology. Urbana. (Nov. 1981); p. 354

encuentran *pili*. Son apéndices más pequeños que los cilios, cumplen un papel fundamental en genética bacteriana.

1.1.4.2 Espora bacteriana. Ciertas bacterias pueden sintetizar un órgano de resistencia que les permite sobrevivir en condiciones más desfavorables, pudiéndose transformar en una forma vegetativa cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables.

Las esporas, son estudiadas gracias a la microscopía electrónica, contiene la información genética de la bacteria la cual está protegida mediante dos cubiertas impermeables. Se caracteriza por su marcado estado de deshidratación y por la considerable reducción de actividades metabólicas, lo que contrasta con su riqueza enzimática. La facultad de esporular está sometida a un control genético y ciertos gérmenes pueden perderla. La germinación de las esporas es siempre espontánea. Da lugar al nacimiento de una bacteria idéntica al germen que había esporulado⁸.

1.1.5 Características fisiológicas. “El oxígeno es un nutriente importante para los termófilos aerobios. La solubilidad del oxígeno en medios acuosos disminuye considerablemente a la temperatura de crecimiento de los termófilos, y la difusión es generalmente el medio de proveer oxígeno al organismo. Por lo tanto la ausencia o insuficiencia del oxígeno es un problema en el medio de crecimiento de los aerobios termófilos, a menos que la densidad celular sea baja, tal situación prevalece en manantiales”⁹.

1.1.6 Características ecológicas

1.1.6.1 Hábitats de microorganismos termófilos. “Los termófilos se pueden encontrar habitando el agua, el suelo, los alimentos, y materiales en fermentación (compost), entre otros, al igual se han aislado de medios artificiales, como calentadores de agua domésticos e industriales”¹⁰.

Las zonas naturales con temperaturas permanentemente altas están restringidas a algunas zonas de la biosfera, normalmente

⁸www.lafacu.com/apuntes/biologia/bacterias/default.htm. 1999.

⁹SUDARAM, T. Physiology and growth of thermophilic bacteria, citado por BROCK, Thomas. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology. New York : A Wiley Interscience publication, 1986. p. 78.

¹⁰WILLIAMS, Ralph. *Thermus ashimae* sp. Nov., Isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and comment on the concept of a limited geographical distribution of *Thermus* species. En : International journal of systematic bacteriology. Vol. 46, No. 2. (abr. 1996);

relacionadas con fenómenos volcánicos, que difieren unas de otras, así se tiene varios tipos de aguas de fuentes que incluyen: pozos profundos, pozos superficiales, aberturas en el fondo del mar, manantiales ácidos ricos en sulfuros donde los organismos deben superar dos barreras medioambientales, alta temperatura y acidez, y manantiales con un pH neutro o alcalino, donde las cantidades pequeñas de sulfato de hidrógeno proporcionan una fuente de energía para la vida bacteriana. Las bacterias termófilas han sido descubiertas en asociación con todos estos tipos de hábitats geotermales ya que encuentran componentes disueltos en el agua que le suministran los nutrientes necesarios, entre los que se pueden incluir sulfitos de hidrogeno, dióxido de carbono, compuestos de carbono orgánico con bajo peso molecular, metano, hidrogeno, amonio y elementos trazas. Los cloruros y bicarbonatos son usualmente los aniones dominantes, si se encuentran algunos minerales inmóviles como arsénico y mercurio, que son tóxicos, muchos microorganismos han aprendido a tolerarlos¹¹⁻¹².

1.1.6.2 Rango de pH. "Aunque se han encontrado termófilos en diferentes rangos de pH, de acuerdo a los valores de las fuentes termales, los termófilos prefieren medios ligeramente alcalinos o medianamente ácidos"¹³.

1.1.6.3 Temperatura. "La temperatura es uno de los más importantes factores ambientales que controla las actividades y la evolución de los organismos. Se han encontrado bacterias termófilas, con temperaturas permanentemente altas (por encima de 45 a 50°C)"¹⁴.

1.1.7 Evolución de microorganismos termófilos. Las preguntas acerca del origen de los microorganismos termófilos han intrigado a científicos por más de 100 años, al respecto Danival sugiere:

Se establecen dos tipos de microorganismos termófilos: Termófilos hereditarios (*Thermotoga*) tiene solamente antepasados termófilos, ellos nunca han sido mesófilos y así nunca han tenido que adaptarse a la termofilia. Evolucionaron desde el principio en ambientes

¹¹BROCK,Thomas. Thermophiles:General, molecular, and applied microbiology, Op. cit., p.7-9

¹²www.bact.wisc.edu/bact303/b1. Origins of thermal features.1999

¹³MADIGAN, Thomas. Biología de los microorganismos, Op. cit., p. 164.

¹⁴www.bact.wisc.edu/bact303/b1. Up the temperature gradient.1999.

termofílicos y la termofilia se desarrolla en ellos desde el principio y el segundo grupo son los termófilos recientes (*Bacillus stearothermophilus*) se relacionan y evolucionan desde los mesófilos y se readaptan recientemente a la termofilia. La termofilia en estos organismos es una adaptación; e identificar los mecanismos para estas adaptaciones es más fácil que para los termófilos hereditarios porque se relacionan estrechamente con los organismos mesófilos y sus moléculas son ideales para sacar conclusiones de la comparación. Siguiendo estas y otras líneas, se han aportado muchos argumentos a favor de un escenario hipertermófilo para los orígenes de la vida y de una unión directa entre este origen caliente y los hipertermófilos actuales. Existen diversas contradicciones que incluyen la temperatura de la tierra primitiva, y el carácter primitivo de los hipertermófilos; estos microorganismos presentan características que parecen ser adaptaciones secundarias para vivir a altas temperaturas como la reversa girasa. Hoy en día las diferentes hipótesis no están claras¹⁵.

1.2 APLICACIONES E IMPORTANCIA DE BACTERIAS TERMOFILAS

Las bacterias termófilas han sido interesantes desde el punto de vista biológico y la base para impresionantes desarrollos en medicina y biotecnología, donde parece ofrecen algunas ventajas mayores. Entre sus amplios usos Brock¹⁶ cita: las posibilidades para la producción de químicos y combustibles, la manipulación genética de estos organismos fermentadores, la lixiviación microbial, manufactura del etanol, pero quizás, los atributos mas atractivos de las termófilas desde el punto de vista biotecnológico son sus enzimas.

1.2.1 Enzimas. “Las enzimas de los termófilos e hipertermófilos denominadas -extremoenzimas- son muy tolerantes al calor, se activan a altas temperaturas y pueden catalizar reacciones bioquímicas a temperaturas mas altas que las de otros organismos convencionales”¹⁷.

Las termoenzimas no son solamente más termoestables, sino también más resistentes a los agentes químicos que sus homólogas mesoenzimas, de esta manera su utilización industrial podría

¹⁵www.danival.org/notasmicro/micro_anchtmlsterothermo.html. Danival.

¹⁶BROCK, Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology, Op. cit., p. 13-14

¹⁷MADIGAN, Extremófilos, Op. cit., p. 60, 62

potencialmente ahorrar las precauciones de almacenamiento e incrementar el rendimiento de los procesos, a la vez que reducir costos. Además, puesto que estas son más estables a temperaturas habituales, prolongan la vida media de productos comerciales¹⁸.

Entre los catalizadores biológicos sobre los cuales se han desarrollado mayores estudios están: “degradadoras de polímeros como amilasas, ciclodextrinas, glicosiltransferasas, celulasas, proteinasas y otras semejantes a estearasas, glucosa isomerasas, de ADN-modificadas con potencial uso en industrias alimenticias, químicas, farmacéuticas y en biotecnología ambiental”¹⁹.

Las enzimas termotolerantes se han empleado en:

La ADN polimerasa, llamada Taq polimerasa, aislada del termófilo *Thermus aquaticus* ha permitido el establecimiento de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Debido a que esta enzima no se desnaturaliza a temperaturas necesarias para separar las hebras del ADN, es posible llevar a cabo ciclos repetitivos con una sola muestra de esta enzima; también es el fundamento de la determinación, en medicina forense, de las huellas de ADN y es un procedimiento rutinario en múltiples diagnósticos, como el de la detección del virus VIH del SIDA o la susceptibilidad genética hacia ciertos tipos de cáncer. Recientemente en la PCR se está reemplazando la Taq polimerasa por Pfu polimerasa. Esta enzima es aislada del hipertermófilo *Pirococcus furiosus*, que trabaja mejor a 100°C²⁰.

La glucosa isomerasa se aplica en la producción de jarabe de maíz con alta cantidad de fructosa. Las ciclodextrinas, se utilizan para estabilizar las sustancias volátiles (verbigracia, aromas que dan sabor a ciertos alimentos), para mejorar la absorción de fármacos por el cuerpo humano y para reducir y enmascarar olores y sabores desagradables, lo mismo en alimentos que en fármacos²¹.

¹⁸PANTAZAKI, A. Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. En : Applied microbiology and biotechnology. Vol. 58 (jun. 2002); p.1.

¹⁹NIEHAUS, F. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. En : Applied microbiology and biotechnology. Vol. 51 (feb. 1999); p.711.

²⁰www.laverdad.es/cienciaysalud/8_4_5.html.Lozano.1997.

²¹MADIGAN, Extremófilos, Op. cit., p. 63.

“La mayoría de enzimas industriales son utilizadas a temperaturas alrededor de los 50° C. Esas enzimas termoestables son adicionadas a detergentes y usadas en manufacturas de farmacéuticos. El cuadro 1 muestra algunas de las industrias básicas de enzimas termoestables y sus usos”²².

Cuadro 1. Aplicación de enzimas termoestables en procesos industriales

ENZIMA	TEMPERATURA	PRINCIPALES APLICACIONES
Carbohidrasas		
Amilasa (bacterial)	90 – 110	Hidrólisis de almidón, detergentes
Glucoamilasa	50 – 60	Hidrólisis de maltodextrinas
Amilasa (fungal)	50 – 60	Maltosa
Pululunasas	50 – 60	Jarabes ricos en glucosa
Xilosa isomerasa	45 – 55	Jarabes ricos en glucosa
Pectinasa	20 – 50	Clarificación de vino
Celulasa	45 – 55	Hidrólisis de la celulosa
Lactasa	30 – 50	Hidrólisis de lactosa y procesos de alimentos
Proteasas		
Proteasa ácida	30 – 50	Procesos de alimentos
Proteasa fungal (Proteasa neutral)	40 – 60	Procesos de alimentos
Proteasa alcalina	40 – 60	Detergentes
Lipasas	30 – 70	Detergentes, procesos de alimentos

Fuente: Kenealy, 1986

El género *Bacillus* produce una gran variedad de enzimas extracelulares que como amilasas y proteasas son de importancia a nivel industrial, por ejemplo, *Bacillus stearothermophilus* ofrece una alternativa para la producción comercial de α -amilasa termoestable²³ y en el género *Thermus*, se han caracterizado y purificado varias enzimas con aplicaciones biotecnológicas, como las α -amilasas de algunas especies que son usadas para producción de endulzantes²⁴.

²²KENEALY, William. Industrial application of thermostable enzymes, citado por BROCK, Thomas. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology. Op. Cit., p. 206.

²³WIND, R. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable α -amylase-producing strain. En : Applied microbiology and biotechnology. Vol. 41 (oct. 1994); p.155, 156.

²⁴DUFFIELD, Melanie. Enzymes of *Thermus* and their properties, citado por SHARP, Richard. Biotechnology handbooks. *Thermus* species. New York: Plenum press, 1995. p.93.

“Los termófilos moderados pueden ser una próspera fuente de nuevas enzimas termoestables, la actividad de estas se puede dar en rangos de temperaturas donde la mayoría de procesos industriales se ejecutan, es el caso de una estearasa termoestable aislada a partir de *Bacillus circulans* que muestra un comportamiento favorable comparado con otras enzimas”²⁵.

1.2.2 Aplicaciones genéticas. Las propiedades metabólicas de los microorganismos termófilos y mesófilos son similares en general. La principal diferencia entre las dos clases de microorganismos es la temperatura óptima de crecimiento.

Si un método para permitir un cambio de información genética fuera establecido, y si las técnicas de ingeniería genética fueran hechas aplicables a tales bacterias termófilas, las ventajas en comparación a las mesófilas serían:

1. El sistema hospedero-vector sería realmente seguro desde el punto de vista de riesgos biológicos puesto que los termófilos no crecen a temperatura ambiente.
2. El modo de expresión de los genes clonados a partir de mesófilos y/o termófilos puede ser comparado, y los genes producto pueden ser examinados comparativamente a altas temperaturas en termófilos. En consecuencia, un sistema genético contribuiría a una aclaración de la termofilia sobre bases moleculares.
3. Cuando los genes estructurales de las enzimas termoestables son clonados en vectores plasmídicos los cuales son expresados eficientemente en termófilos, la productividad de enzimas termoestables pueden ser reforzadas en virtud del efecto de dosificación del gen.
4. El tiempo de cultivo es más corto por la proporción acelerada de crecimiento de los termófilos.
5. La probabilidad de contaminación disminuye debido a las altas temperaturas de cultivo (>55°C).

Linsay y Creaser (1975) reportaron que el mesófilo *Bacillus subtilis*

²⁵KADEMI, A. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. En : Applied microbiology and biotechnology. Vol. 54 (ene. 2000); p.173.

producía transformantes que podrían crecer a altas temperaturas (70° C), después de un tratamiento con ADN de un hipertermófilo *Bacillus caldolyticus*²⁶.

Estudios en plantas de papa demuestran que es posible reemplazar la degradación de almidón usando enzimas microbiales en un sistema en el cual las enzimas son producidas directamente en la planta, pero son activas únicamente a altas temperaturas, ofreciendo una estrategia nueva y viable para la industria productora de almidón²⁷.

1.2.3 Aplicaciones industriales. Los microorganismos termófilos han proveído sistemas de modelos biológicos y bioquímicos exitosos y fascinantes para investigaciones fisiológicas, ecológicas y procesos bioquímicos a grandes y pequeños niveles. Sin embargo la explotación de estos organismos por la microbiología industrial para proporcionar productos útiles para la sociedad ha sido poca.

Se ha propuesto el uso de termófilos anaerobios como *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Clostridium thermosaccharoliticum* y *Thermoanaerobacter* para la producción de etanol ya que realizan una fermentación directa de polisacáridos hasta producir etanol moderadamente, tienen la capacidad de actuar sobre varios sustratos y así se pueden minimizar los costos de las fermentaciones. Por otra parte, en la producción de ácido láctico se ha utilizado a *Thermocellum*, *Thermohydrosulfuricum*, y *Thermoanaerobium brokii*. Otra aplicación importante es en cuanto al mejoramiento de utilidad de los hidrocarburos naturales como fuentes de químicos y combustibles sometidos a un pretratamiento con termófilos, *Sulfolobus* remueve la pirita del carbón resultando un carbón bajo en sulfuros el cual libera menos dióxido de sulfuros durante la combustión en plantas eléctricas²⁸.

1.3 ADAPTACIONES A LA TERMOFILIA

“Los microorganismos que habitan en lugares con temperaturas superiores, poseen componentes celulares y sistemas genéticos que varían, con

²⁶IMANAKA, Tadayuki. Applied genetics aerobic thermophiles, citado por BROCK, Thomas. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology. Op.cit., p. 160.

²⁷PANTAZAKI, Op.cit., p.2.

²⁸WEIMER, Paul. Use of thermophiles for the production of fuels and chemicals, citado por BROCK, Thomas. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology. Op. cit., p. 226-241.

respecto a los mesófilos, adaptados para vivir en ellos²⁹.

1.3.1 Características genéticas. Se consideran numerosos componentes que son termoestables en las células termofílicas.

Para evitar que el ADN se descomponga por las altas temperaturas, las bacterias termófilas poseen una enzima llamada “ADN girasa reversa”, esta enzima hace que el ADN se enrolle y se doble sobre si misma de tal forma que hace que sea más estable en temperaturas muy altas a diferencia de los microorganismos que viven a temperaturas normales los cuales tienen una “ADN girasa” normal³⁰. Otro componente característico de algunas bacterias termofílicas es que su ADN contiene alto contenido de G-C lo que le confiere a la molécula de ADN mayor estabilidad porque ellas se unen mediante enlaces triples³¹.

1.3.2 Características moleculares. “Las enzimas de los termófilos y otras proteínas celulares son mucho más estables al calor que las de los mesófilos, funcionando óptimamente a altas temperaturas que causarían su desnaturalización”³².

Las macromoléculas deben estar enrolladas y dobladas en un patrón tridimensional correcto, las altas temperaturas pueden causar que estas estructuras tridimensionales se desdoblén y que las uniones que las mantienen juntas se rompan. Para evitar esto, las enzimas de los termófilos cuentan con una menor cantidad del aminoácido glicina que es el responsable de darles flexibilidad a las proteínas normales, es así como al tener menor glicina las enzimas extremófilas son más rígidas y fuertes. Los hipertermófilos cuentan con un tipo especial de proteína “reparadora” llamada chaperona, la cual repara las enzimas que se comienzan a separar uniéndose a ellas y enrollándolas en su forma original³³.

²⁹MADIGAN, Thomas. Biología de los microorganismos, Op. cit., p. 165.

³⁰www.microbe.org/espanol/microbes/termofilas. STETTER, Karl. 1999.

³¹SUNDARAM, T. Physiology and growth of thermophilic bacteria, , citado por BROCK, Thomas. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology. Op. cit., p. 96.

³²MADIGAN, Op. cit., p.165.

³³www.microbe.org/espanol/microbes/termofilas. STETTER, Karl. 1999.

1.3.3 Membrana plasmática. “La membrana plasmática es un elemento esencial de todas las células vivientes, siendo una estructura bien organizada, es importante en el mantenimiento y la integridad de la célula dentro de su rango de temperatura de crecimiento”³⁴.

“Sus propiedades contribuyen a la habilidad de los microorganismos para crecer a altas temperaturas, esta ocupa una posición única en la fisiología celular porque debe controlar el flujo de las sustancias entre el ambiente celular externo e interno”³⁵.

1.3.3.1 Lípidos. El mayor componente de la membrana de los termófilos son los lípidos, abundantes en ácidos grasos con puntos de fusión más altos que en los mesófilos, no sufren inactivación termal irreversible.

Proveen la matriz hidrófoba de la membrana y mantienen la apropiada fluidez para la función de las proteínas de membrana bajo una variedad de parámetros cambiantes externos, especialmente la temperatura. Los termófilos poseen membranas ricas en ácidos grasos saturados, lo que hace que las membranas sean estables y funcionales a altas temperaturas. Los ácidos grasos saturados dan lugar a enlaces hidrófobos mucho más eficientemente que los ácidos grasos insaturados. Los hipertermófilos, virtualmente todos los pertenecientes a las Arquea, no contienen ácidos grasos en su membrana, en su lugar poseen hidrocarburos de cadena larga formados por unidades repetitivas de fitano, unido por enlace éter al glicerol fosfato³⁶.

1.3.3.2 Proteínas. “Las proteínas de la membrana de los termófilos son más estables, que sus homologas de los mesófilos, La estabilidad se incrementa como resultado de la formación de puentes de sal y un empaquetamiento altamente hidrofóbico en su interior. Además la maquinaria sintetizadora de proteínas de los termófilos e hipertermófilos son también estables al calor”³⁷.

³⁴DA COSTA, Milton. The cell walls and lipids of *Thermus*, citado por SHARP, Richard. Biotechnology handbooks. *Thermus* species. New York: Plenum press, 1995. p.143.

³⁵LANGWORTHY, Thomas, Membranes and lipids of thermophiles, citado por BROCK, Thomas. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology. p. 108.

³⁶Ibid., p. 110-111.

³⁷SUNDARAM, T. Physiology and growth of thermophilic bacteria, citado por BROCK, Thomas. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology, Op.cit., p. 97,98.

1.4 FUENTES HIDROTERMALES

Algunos ambientes termales de la tierra son naturales, otros son fabricados por el hombre. Los sistemas naturales tales como los ambientes geotermales (Manantiales calientes, géisers, agujeros con vapor) son frecuentemente bastante estables, pero los sistemas solares calientes (como el suelo o piscinas superficiales que reciben directamente calor solar) son generalmente, inestables y usualmente muestran gran variación de temperatura diurna. Los ambientes geotermales naturales son raros en varios aspectos, mostrando grandes diversidades como hábitats. En los manantiales calientes la temperatura y el pH cubren un amplio rango (30-100 °C y un pH 1-11)³⁸.

1.4.1 Origen. Los hábitats naturales geotermales están ampliamente distribuidos en el mundo, asociados principalmente con las zonas tectónicas activas donde ocurren los mayores movimientos de la corteza terrestre.

En tales áreas, los materiales magmáticos de las profundidades son empujados cerca de la superficie de la tierra y sirven como fuente de calor. El agua de mar o grandes cantidades de agua que se cuelean en la tierra se vuelven intensamente calientes pero no hierven a presión litostática. Cuando los fluidos se cuelean llegan a altas temperaturas, la presión genera fuerza a través de los poros del fluido y fisuras sobre la superficie de la tierra, donde estas pueden distribuirse como manantiales termales y geysers. Cuando los fluidos pasan calientes a través de la superficie de la tierra, los minerales disueltos, contribuyen para la extensa mineralización de los manantiales termales y geysers asociados con fuentes geotermales. Debido a la localización natural de las fuentes geotermales, estos hábitats están generalmente concentrados en pequeñas áreas, llamadas cuencas termales. Si el agua suministrada en el fondo de las fuentes termales es baja, en lugar de agua caliente emite vapores que se pueden distribuir en la superficie. Los vapores dominantes de las fuentes termales son llamadas fumarolas y son comunes en ciertas partes del mundo³⁹.

³⁸ALFREDSON, Gudni. Ecology, distribution, and solation of *Thermus*, citado por SHARP, Richard. Biotechnology handbooks. *Thermus* species. New York: Plenum press, 1995. p.44.

³⁹BROCK, Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology, Op. cit., p. 7,8.

1.4.2 Constituyentes del agua termal. La composición de un fluido hidrotermal es influenciada principalmente por la temperatura y la química de las rocas a través de las cuales pasa, pero también por mezclas con otras soluciones y por efectos tal como la ebullición y la filtración.

Un fluido hidrotermal de minerales contiene una solución acuosa, como mayores componentes, sodio, potasio, calcio y cloro. También pueden estar presentes otros elementos en grandes cantidades de 1000 ppm como magnesio, Bromo, Sulfuros (En forma de sulfitos, sulfatos o ambos), estroncio, y algunas veces hierro, zinc, carbono (como HCO_3 y CO_2), y nitrógeno (NH_4). Los metales como el cobre, plomo, zinc, estaño, molibdeno y plata, raramente se presentan como mayores constituyentes en solución. Los geysers y manantiales corrientes generalmente pueden tener pH neutros o alcalinos; sus aguas serían usualmente altamente mineralizadas. Los manantiales con sulfuro y ricos en hierro son usualmente ácidos, debido principalmente a la presencia de ácido sulfúrico, pero excepto por el ion sulfato (y ocasionalmente hierro en forma soluble). La mineralización de estos manantiales es baja. Esto es porque el agua de los manantiales ricos en sulfuros, si existen, son grandes masas de agua principalmente superficiales que nunca han sufrido circulación profunda. El ácido sulfúrico (H_2SO_4) es derivado de la oxidación del ácido sulfhídrico (H_2S) el cual asciende con el vapor de lo profundo de la tierra. Cuando el ácido sulfhídrico encuentra oxígeno (O_2) derivado de la atmósfera, se forma el azufre elemental S^0 (no usado biológicamente) y convirtiéndose en depósitos en el suelo. Las bacterias oxidadoras de sulfuros (generalmente no termófilas) oxidan estos sulfuros elementales a ácido sulfúrico y el pH del suelo baja⁴⁰.

1.5 POSICION SISTEMATICA DE LOS TERMOFILOS

Aunque existen ciertas dudas acerca de la taxonomía de algunas especies de bacterias termófilas, una apreciación global de los géneros más característicos se muestran en el cuadro 2, donde se observa que una amplia variedad de géneros tienen representantes termófilos, pero que las bacterias que crecen a altas temperaturas, sobre o cerca al punto de ebullición del agua, son todas las arqueobacterias.

⁴⁰SKINNER, B. The many origins of hydrothermal mineral deposits. The science today. Yale University. 1990. p. 11-19.

CUADRO 2. Grupos más importantes de procariotas termófilos e hipertermófilos.

GENERO	No. DE ESPECIES	RANGO DE TEMPERATURA (° C)
Bacterias fototróficas		
Cianobacterias	16	55 - 70 (Una cepa, 74)
Bacterias púrpuras	1	55 - 60
Bacterias verdes	1	70 - 73
Bacterias Grampositivas		
<i>Bacillus</i>	15	50 - 70
<i>Clostridium</i>	11	50 - 75
Bacterias acidolácticas	5	50 - 65
Actinomicetos	23	55 - 75
Otras Eubacterias		
<i>Thiobacillus</i>	3	50 - 60
Espiroqueta	1	54
<i>Desulfotomaculum</i>	7	37 - 55
Aerobios Gramnegativos	7	50 - 75
Anaerobios Gramnegativos	4	50 - 75
Arqueobacterias		
Metanógenas	4	55 - 95
Sulfuro dependientes	10	55 - 110
Thermoplasma	1	37 - 55

Fuente: Brock, 1986

Como resultado de detallados análisis del RNA 16S ribosomal, Woese y Wolfe (1972) han presentado un esquema filogenético para el mundo viviente. Tres reinos son reconocidos: Archaeobacteria, Eubacteria, y Eucaryotes. Las bacterias termófilas, definidas como organismos que crecen a temperaturas de 55° C o más altas, son encontradas en ambos reinos, arqueobacterias y eubacterias. Varias de las líneas de descendientes de los dos reinos contienen miembros termofilícos. A partir de este hecho parece razonable concluir que la termofilia es un carácter polifilético⁴¹.

⁴¹BROCK, Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology, Op. cit., p. 5-6.

En la primera edición del manual de Bergey's se contempla en el volumen 1 que con respecto a la temperatura, el mundo *Thermofilo* tiene numerosos significados, dependiendo del grupo de organismos bajo estudio. La definición de termófilos obligados es algo arbitraria, pero generalmente se considera para incluir aquellos organismos incapaces de crecer a temperaturas bajo los 45-50°C. Los termófilos extremos pueden ser aquellos organismos que crecen a temperaturas sobre 70°C. En una consideración para la terminología de bacterias termófilas, Williams realizo la siguiente propuesta:

Bacterias caldo-activas, crecimiento máximo bajo 70°C, óptimo bajo 65°C, mínimo bajo 40°C.

Bacterias termofílicas, crecimiento máximo a temperaturas bajo 60°C, óptimo bajo 50 °C, mínimo 30°C⁴².

1.5.1 Género *Thermus*. En el manual Bergey's manual of determinative bacteriology las características para este género son:

Longitud, 0.5-0.8 µm de diámetro y 5.0-10.0 µm de largo. Sin motilidad. Ausencia de endosporas. Gramnegativos. La mayoría de especies forman colonias amarillas, naranjas o rojizas, pigmentación debida a los carotenos. Aerobios, oxidasa y catalasa positivas. La gelatina es usualmente hidrolizada. El almidón es débilmente digerido. Temperatura óptima de 70-75°C. El pH óptimo está alrededor de la neutralidad. Habitan en manantiales calientes de pH neutro o alcalino, así como en aguas de calentador. Igualmente viven en aguas naturales sujetas a polución termal⁴³.

Las especies que en la actualidad se conocen dentro del género *Thermus* han sido identificadas como: *Thermus atranikii*, *Thermus aquaticus*, *Thermus brockianus*, *Thermus filiformis*, *Thermus igniterrae*, *Thermus oshimai* y *Thermus scotoductus*⁴⁴.

⁴²KRIEG, Noel. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1, Estados Unidos: Williams & Williams, 1986. p. 333.

⁴³ibid, p. 333-335.

⁴⁴WILLIAMS, Ralph. International journal of systematic bacteriology, Op.cit, p.

1.5.2 Género *Bacillus*. En el manual Bergey's manual of determinative bacteriology las características para este género son:

Características: Células en forma bacilar, rectos, formadores de endo-esporas, muy resistentes a condiciones adversas; no mas que una por célula; la esporulación no se reprime por exposición al aire. Grampositivo, solo algunas fases de crecimiento, o Gramnegativo en otras. Posee flagelos peritricos o peritricos degenerados. Aerobio o facultativamente anaerobio. El Oxígeno es el electrón aceptor terminal reemplazable en algunas especies por alternativos. La morfología de la colonia y el tamaño es muy variable; los pigmentos pueden ser producidos en cierto medio. Exhibe una amplia variedad de habilidades fisiológicas; de psicrófilos a termófilos, de acidófilos a alcalófilos; algunas cepas son tolerantes a la sal, otras tienen requerimientos específicos de sales. Formación de catalasa por la mayoría de especies. Oxidasa positiva o negativa. Quimiorganotrofos; unas especies quimiolitotrofas facultativas: fototrofas o auxotrofas requieren algunos factores de crecimiento.

Morfología celular. Las células de *Bacillus* pueden estar solas o en cadenas las cuales pueden ser de considerable longitud. Los bacilos pueden tener extremos redondeados o cuadrados y pueden ser bastante pequeños (0.5 x 1.2 μm) o más bien largos (2.5 x 10 μm). Las endoesporas son usualmente cilíndricas o helipsoidales, ovales o redondas, pero en algunas cepas, la espora puede estar localizada en una posición central, paracentral, subterminal, terminal o lateral sin el esporangio.

Características de la colonia: La apariencia de la superficie de las colonias de las cepas de *Bacillus* generalmente varía en gran cantidad de acuerdo a factores medioambientales, incluyendo aquellos in-vitro en cultivo, como: composición del medio, temperatura de incubación y humedad. Las colonias en cultivos puros en una placa algunas veces muestran pocas diferencias pronunciadas, son translúcidas u opacas, o son mas o menos blanquecinas o color crema. Esto puede deberse a los diferentes grados de esporulación dentro de las colonias. La mayoría de las especies de *Bacillus* no son pigmentadas⁴⁵.

⁴⁵SNEATH, Op. cit., p. 1105-1110.

1.6 ACTIVIDAD AMILOLITICA.

El almidón, uno de los más abundantes polisacáridos, es un compuesto formado por, la amilosa (cadenas de glucosas unidas por enlaces glucosídicos (α 1-4) y amilopectina con enlaces (α 1-4 y α 1-6) es una reserva importante de carbono y energía. Debido a la compleja estructura del almidón, un número de enzimas es necesario para su degradación, que pueden ser clasificadas dentro de 2 grupos: Enzimas endoactivadas y exoactivadas. Las enzimas endoactivadas, tal como las α -amilasas, hidrolizan enlaces en el interior del polímero de almidón al azar, las cuales llevan a la formación de oligosacáridos lineales y ramificados. Las enzimas exoactivadas (β -amilasas, glucoamilasas α -glucosidasas) atacan los sustratos finales no reducidos, produciendo oligo y/o monosacáridos⁴⁶.

“Dentro de la actividad amilolítica se debe destacar que existen microorganismos como bacterias, hongos y actinomicetos con capacidad de hidrolizar almidón. Dentro de las bacterias están los géneros Grampositivos y Gramnegativos formadores y no formadores de esporas, aerobios y anaerobios obligados”⁴⁷.

1.6.1 Enzimas termófilas relacionadas con la degradación del almidón.

“Las enzimas que hidrolizan el almidón extremadamente termoestables tal como las amilasas y pululinasas que se activan en condiciones similares mejoran los procesos de bioconversión de almidón industrial, licuefacción del almidón en industrias cerveceras y azucareras, sacarificación o isomerización”⁴⁸.

“La bioconversión de almidón a glucosa y fructosa tiene que ser ejecutada sobre varias condiciones, los múltiples pasos del proceso incluyen cambios de pH y temperatura, son acompañados por la formación de altas concentraciones de sal no deseables. En el último paso, donde se produce el jarabe rico en fructosa, las sales deben ser removidas por cambio de costosos intercambios iónicos”⁴⁹.

⁴⁶NIEHA US, F. Applied microbiology and biotechnology, Op. cit., p.712.

⁴⁷MARTIN, A. Introducción a la microbiología del suelo. Editor S. A. Mexico. 1980. p. 110.

⁴⁸SUNNA, Anwar. Glycosyl hidrolases from hiperthermophiles. En : Extremophiles. Vol. 1, (Oct. 1997); p.2.

⁴⁹NIEHAUS, Op. cit., p.712.

“Recientemente, las enzimas termoestables son utilizadas extensivamente a lo largo de los procesos industriales del almidón. El cuadro 3 muestra las carbohidrolasas termoestables que están directamente involucradas en la manufactura de todos los productos derivados del almidón”⁵⁰.

Cuadro 3. Procesos enzimáticos del almidón.

SUSTRATO	PROCESOS	ENZIMAS	PRODUCTOS
Almidón gelatinizado	Licuefacción	Amilasa	Maltodextrinas
Maltodextrinas	Sacarificación	Glucoamilasa Amilasa fúngica Glucoamilasa + Pululunasa Glucoamilasa + amilasa fúngica	Jarabes con glucosa Jarabes con maltosa Jarabes ricos en glucosa Jarabes mixtos
Jarabes ricos en glucosa	Isomerización	Xilosa isomerasa	Jarabes ricos en fructosa

Fuente: Kenealy, 1986

1.6.1.1 Amilasas y glucoamilasas. Las enzimas de los microorganismos termófilos, son consideradas como interesantes candidatos para el uso en procesos de bioconversión del almidón.

La intensiva búsqueda apunta al aislamiento termoestable y termoactivo de las amilasas de termófilos. La familia de las α -amilasas (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasas) consiste de un gran grupo de hidrolasas de almidón y enzimas relacionadas, corrientemente conocidas como glicosil hidrolasas⁵¹, que son un grupo de enzimas las cuales tienen la habilidad para hidrolizar bandas glicosídicas en dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato⁵². Se destaca el género *Bacillus* que produce una amplia variedad de enzimas extracelulares importantes a nivel industrial⁵³.

⁵⁰KENEALY, William. Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology, Op. cit., p. 206, 207.

⁵¹NIEHAUS, Op. cit., p.712.

⁵²SUNNA, Op. cit., p.2.

⁵³WIND, Op. cit., p. 155

La glucoamilasa (1,4-glucohidrolasa) es una enzima exo-activa que ataca enlaces (α -1,4 y α -1,6 glucosídicos de α -glucan). La acción de esta enzima libera una molécula de β -D-glucosa, causando la conversión completa de polisacáridos a glucosa. Las glucoamilasas son típicamente enzimas fúngicas y son entre las más importantes enzimas industriales usadas para la producción de jarabe de glucosa⁵⁴.

1.6.1.2 Ciclodextrinas glicotransferasas (CGTasas). “Las CGTasas atacan enlaces α -1,4 en polisacáridos al azar y convierte el almidón por una reacción de transglicosilación intramolecular. La no-reducción de la ciclización de productos de ésta reacción son α - β - ó δ - ciclodextrinas, que consta de 6, 7 u 8 moléculas de glucosa respectivamente”⁵⁵.

La aplicación de estas enzimas predomina en la producción industrial de ciclodextrinas. La capacidad de las ciclodextrinas para formar inclusiones complejas con una variedad de moléculas orgánicas significa que ellas mejoran la solubilidad de compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas. Los productos de las ciclodextrinas ocurren en un proceso con múltiples pasos en el cual, el primer paso, es licuar almidón por una amilasa termoestable, y el segundo paso, toma lugar en la reacción de ciclización con una CGTasa de *Bacillus sp*⁵⁶.

⁵⁴NIEHAUS, Op. cit., p. 712.

⁵⁵SUNNA, Op. cit., p.7.

⁵⁶NIEHAUS, Op. cit., p.714-715.

2. METODOLOGIA

2.1 LOCALIZACION Y SELECCION DE SITIOS DE MUESTREO

En el Departamento de Nariño se encuentran varias fuentes termales de origen volcánico. Para el presente trabajo se eligió el Volcán Chiles ya que sus fuentes hidrotermales “Baños Chiles” cuentan con temperaturas superiores a 40°C, es decir, aptas para el desarrollo de bacterias termófilas.

2.1.1 Ubicación geográfica. “Volcán Chiles: Volcán ubicado en el Nudo Orográfico de los Pastos por cuya cima pasa la línea fronteriza entre las repúblicas de Colombia y Ecuador. Se localiza a 0°49´latitud norte y 77°56´longitud oeste. Tiene una altura aproximada de 4750 m.s.n.m. Departamento de Nariño”⁵⁷.

En el Volcán Chiles se localizan las Fuentes termales de “Agua Hediondas” y “Baños Chiles”. Por pertenecer al territorio Colombiano, se seleccionó la “Fuente Termal Baños Chiles: Latitud norte = 0.0°48´46.4´´. Longitud occidental = 77°51´59.4´´. Altitud = 3234m. Temperatura promedio = 30-40 °C. pH = 5.3”⁵⁸.

2.2 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras fueron colectadas en tres fuentes hidrotermales de “Baños Chiles”, en las cuales las zonas A y C se presentan en forma de nacimientos de agua y en la zona B convergen aguas de otra fuente termal y de una corriente que baja de la parte superior del Volcán Chiles. Para evitar variaciones en los parámetros de pH y temperatura, se midió directamente en el ambiente natural haciendo uso de un pH-metro portátil Hach DR/2010.

Para el análisis microbiológico de las muestras de agua, estas se colectaron a profundidades de 60 y 30 cm aproximadamente en botellas de vidrio estériles dejando un espacio considerable entre el tapón y la muestra

⁵⁷INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. Diccionario Geográfico de Colombia. Tomo 2. Bogotá. 1996

⁵⁸GARCIA, F. Informe ejecutivo de comisión volcán chiles, cumbal y azufral. proyecto p97902. investigación de suelos, y procesos geoquímicos ambientales. Pasto : ingeominas. 1997

para permitir aireación, estas se transportaron hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño-Pasto. Colombia en cajas de icopor.

Para el análisis físico-químico de las aguas se colectaron muestras de 1000 c.c. por cada zona de muestreo en recipientes de polietileno debidamente lavados y se transportaron al Laboratorio de Aguas de la Universidad de Nariño-Pasto. Colombia.

2.3 AISLAMIENTO

Para el aislamiento de las bacterias, se empleó la técnica de los platos de dilución⁵⁹, con cada una de las muestras de agua:

Con una pipeta estéril se transfirió 10 ml de muestra en forma aséptica a un erlenmeyer que contiene 90 ml de agua termal previamente esterilizada, obteniéndose así la dilución 10^{-1} , a partir de ella se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar una dilución de 10^{-6} en tubos con 9 ml de agua termal estéril.

Posteriormente se realizó una siembra por profundidad inoculando 1 ml de cada dilución en cajas estériles a las cuales se les adicionó aproximadamente 20 ml de agar (1.5% w/v) BHI preparado con agua termal fundido a 40°C, para lograr una perfecta homogeneización entre el medio y el inóculo se realizaron movimientos circulares. Este procedimiento se hizo por duplicado para cada dilución. Las cajas selladas con papel vitafil se llevaron a incubación durante 24 horas a 45°C. Después de este tiempo se seleccionaron aquellas diluciones con crecimiento bacteriano entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC), y se realizó el recuento estándar en placa.

2.4 PURIFICACION

Para la purificación se agruparon los aislados de acuerdo a su similitud morfológica y se logró tras pases sucesivos en agar BHI. Su pureza se determinó mediante la técnica de tinción de Gram.

⁵⁹MADIGAN, Biología de los Microorganismos, Op. Cit., p.156-157

2.5 CONSERVACION

Los cultivos axénicos se repicaron a tubos inclinados y a cajas con el mismo agar para ser preservados en un lugar seco a temperatura ambiente como lo plantea Wiegel⁶⁰.

2.6 ESTRES DE TEMPERATURA

Con el objeto de descartar aquellos aislados que no toleren temperaturas superiores a 55°C, se realizó un tamizaje sometiendo a estrés por temperatura, para lo cual el aislado puro se transfirió con asa a tres tubos de ensayo con 5 ml de caldo BHI y se incubaron a 50°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, de cada tubo con crecimiento, evaluado por turbidez o presencia de precipitado, se transfirió asépticamente 0.1 ml de muestra a tres tubos con 5 ml de caldo BHI y se llevaron a incubación por 24 horas a 55°C. El procedimiento se realizó también para las temperaturas de 60, 65 y 70°C. Hasta lograr seleccionar un grupo de bacterias termófilas*.

2.7 ACTIVIDAD AMILOLITICA

Para determinar la capacidad amilolítica de los aislados, de cada uno con una asa de transferencia se tomó una colonia y se hizo un rayado central en cajas con agar almidón 0.1% (Anexo B), las cuales se incubaron por 24 a 48 horas a 55°C.

Posteriormente, “se reveló la prueba exponiendo las cajas de agar almidón con crecimiento a vapores de yodo bisublimado por aproximadamente 30 segundos. Se determinó como positivo, aquel aislado que mostró alrededor de las colonias halos transparentes dado porque el yodo al reaccionar con el almidón vira su color a un complejo café-azulado, dejando visualizar ampliamente las zonas o halos de hidrólisis del almidón”⁶¹.

2.8 CARACTERIZACION PARCIAL

Para caracterizar parcialmente los aislados con actividad amilolítica se

⁶⁰WIEGEL, J. Methods for isolation and study of thermophiles, citado por : Brock, Thomas. Thermophiles: General, molecular and applied microbiology. Op. Cit., p32

*ENTREVISTA con Pablo Fernandez, Profesor Departamento de Biología de la Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, julio de 2000.

⁶¹CDC; OPS; OMS. Métodos de laboratorio para diagnóstico de *vibrio cholerae*. 1994

consideraron los siguientes parámetros:

2.8.1 Características morfológicas. Se precisaron las características culturales de cada aislado: Forma, color, borde, elevación y textura, así mismo las características celulares evaluadas por tinción de Gram, coloración de esporas, y coloración de cápsula⁶². (Anexo A)

2.8.2 Pruebas bioquímicas. Se realizaron pruebas para bacterias termófilas del género *Bacillus* de: Hidrólisis de caseína, gelatina y urea, catalasa, oxidasa, citrato, producción de indol, motilidad, producción de sulfuros, reducción de nitratos, utilización de diferentes fuentes de carbono como: D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-manitol, D-maltosa. y pruebas de crecimiento sobre NaCl al 2%, 5%, 7% y 10%⁶³.

2.9 CARACTERIZACION DE FUENTES HIDROTERMALES

La caracterización de las fuentes hidrotermales se hizo con las muestras colectadas en la primera fase. Se realizó un análisis físico-químico parcial teniendo en cuenta los parámetros de temperatura, pH, oxígeno, dióxido de carbono, dureza, alcalinidad, sólidos totales, nitratos, nitritos, amonio, cloruros, fosfatos, sulfatos, hierro, según los métodos aplicados en el laboratorio de aguas de la Universidad de Nariño. (ANEXO C).

2.10 ELABORACION DE MEDIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS

Para formular los medios de cultivo se tuvo en cuenta la composición química del agua termal de acuerdo a los resultados del análisis físico-químico. Se simularon las concentraciones de los iones en su forma natural, reemplazándolos por compuestos químicos que asemejen el ambiente natural, la elección se realizó teniendo en cuenta la solubilidad en agua y los aportes de cada elemento formulados en otros medios de cultivo. Lo anterior estandarizó los componentes y cantidades, ya que un mismo compuesto puede aportar varios elementos o estar incluido en dos o más compuestos químicos.

El agua obtenida en el laboratorio nuevamente se llevó a un análisis de amonio, nitratos, nitritos, fosfatos, sulfatos y cloruros en el laboratorio de

⁶²ESCOBAR, Miryam. Fundamentos de microbiología. Santafé de Bogotá : Centro Editorial Javeriano. CEJA. 1988. p.107-114

⁶³SNEATH, Op. cit., p. 1105-1110.

aguas de Corponariño. (Anexo C) La dureza de la misma se determinó en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño, para lo cual, a 50ml de muestra se le adicionó 1ml de solución buffer, luego una pequeña cantidad de indicador negro de eriocromo hasta obtener un color morado y finalmente poco a poco se adiciona titulante EDTA, removiendo continuamente hasta que desaparezcan los últimos matices rojizos. El punto final lo da un color azul.

Posteriormente, a esta agua se le adicionó como fuente de carbono glucosa, como fuentes de nitrógeno extracto de levadura, peptona bacteriológica y extracto de carne, los cuales también poseen otros factores de crecimiento importantes, y componentes en cantidades similares al BHI que es un medio favorable para el crecimiento de bacterias termófilas (Anexo D), convirtiéndose así en el medio 1.

A partir del medio con concentraciones similares al origen ó al 100% en concentración de sales, se formularon dos medios más diferenciando en la concentración de las sales, el medio 2 incluyó el 50% y el medio 3 bajó a un 25% dicha concentración. (Anexo E)

2.11 ELECCION DEL AISLADO

De los aislados termófilos con capacidad amilolítica se eligió el más eficaz para hidrolizar el almidón, la evaluación contempló los diámetros de la zona de hidrólisis y la selección por medio de análisis de varianza (andeva) y la prueba de significancia de tukey. Según la CDC⁶⁴ se realizaron los métodos de:

2.11.1 Hidrólisis múltiple. Con un asa de argolla se transfirió una colonia a la placa de agar almidón y se realizó una siembra por agotamiento.

2.11.2 Hidrólisis puntual. Con un asa de punta se tomó un inóculo pesado de la colonia y se puncionó en dos sitios de la caja con agar almidón, se llevó a incubación por 24 a 48 horas a 55°C.

Las cajas luego del periodo estandarizado de incubación se sometieron a un revelado de la prueba como indica la sección 2.7 permitiendo visualizar y medir el diámetro de los halos de hidrólisis.

La prueba se hizo con seis repeticiones por cada método, que se probaron

⁶⁴CDC, Op. cit.

en agar almidón (Anexo B) y en el medio diseñado con 100% de las sales sustituyendo la glucosa por almidón soluble 0.1% (Anexo F).

2.12 ELECCION DEL MEDIO

Con el fin de realizar un mejor aislamiento y manejo de bacterias termófilas, debido al problema que se presentó al tratar de aislar y cultivarlas in-vitro, fue preciso diseñar un medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para su crecimiento.

2.12.1 Curva de absorbancia espectral para BHI. Para estandarizar métodos turbidimétricos en evaluación de cinética de crecimiento por espectrofotometría se procedió a realizar la curva de absorbancia espectral como lo indica Collins⁶⁵ para la sustancia pura o BHI sin inocular y así conocer la longitud de onda del filtro en nanómetros en la cual se debe trabajar con este medio específicamente. Para lo cual se puso el equipo en cero con agua destilada como blanco a 405 nm, en esta misma longitud se midió la densidad óptica para BHI estéril; luego, nuevamente se ceró el equipo con agua destilada a 415 nm y se midió aquí la densidad óptica (D.O) para BHI; La operación se repitió en intervalos de 10 nm hasta 525 nm.

Con los datos obtenidos se trazó la curva de absorbancia espectral y se determinó la longitud de onda del filtro a la cual la D.O. es máxima. Esta longitud de onda se seleccionó para realizar la cinética de crecimiento de *Bacillus sp.* en BHI.

2.12.2 Preparación de inóculo. A partir de un cultivo preservado en agar BHI inclinado a temperatura ambiente se realizó un repique en placas petry con el mismo agar. Se incubó por 20 horas a 55°C y se evaluó pureza por medio de tinción de Gram. Posteriormente se tomó una colonia y se inoculó en 40 ml de caldo BHI, se llevó a incubación a 55°C por 20 horas.

2.12.3 Perfil cinético. Según Crueger⁶⁶ el porcentaje del inóculo se debe ajustar al 10% v/v, en esta forma, se tomaron 30 ml del inóculo que se adicionaron a un erlenmeyer que contenía 300 ml de caldo BHI. El anterior momento representó el tiempo cero (To) de la cinética de crecimiento. Para

⁶⁵COLLINS, C. Métodos microbiológicos. 5ta edición. España : Editorial Acribia, 1989. p. 158.

⁶⁶CRUEGER, W; Crueger, A. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. España : Editorial Acribia, 1989. p. 305.

medir el crecimiento de la población en cada tiempo se desarrollaron tres métodos:

2.12.3.1 Método de siembra en superficie. Del erlenmeyer con el cultivo, asépticamente se tomó 1 ml y se adicionó a un tubo que contenía 9 ml de solución salina peptonada, obteniéndose así la dilución de 10^{-1} , el proceso se continuó para conseguir diluciones decimales hasta 10^{-9} . Logrando una perfecta homogenización con vortex Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF2.

Posteriormente, se realizó una siembra en superficie⁶⁷ a partir de 10^{-4} , inoculando 0.1 ml de cada dilución en 2 cajas con agar BHI. Se extendieron las células con perlas de vidrio realizando movimientos en diferentes direcciones. Las cajas se llevaron a incubación a una temperatura de 55°C por 20 horas.

2.12.3.2 Recuento en cámara de Neubauer. De la dilución 10^{-1} se tomó 0.1 ml., se depositó una gota pequeña en la superficie de la cámara de recuento cerca al extremo del cubreobjetos, dando lugar a que la suspensión entre por capilaridad. Se escogió uno de los cuatro cuadrantes laterales (1mm x 1mm) con 16 cuadros de menor tamaño (0.2 x 0.2). Se empezó a contar desde la parte superior de los cuadros menores que están dentro del cuadrado grande y se continuo hasta la base, de manera que se cuenten las células una sola vez. El conteo de células se realizó teniendo en cuenta que su número estuviera entre 20 y 200 células⁶⁸. Si la población en esta dilución sobrepasaba en número, se pasaba a la siguiente dilución y así sucesivamente. Con estos datos se realizaron los cálculos multiplicando el valor por 10^{-4} que es un valor estándar y por el inverso de la dilución, obteniéndose el número de células por mililitro.

2.12.3.3 Método turbidimétrico. Siguiendo la metodología planteada por Martinez⁶⁹, con una pipeta estéril se tomó una alícuota de 10 ml de caldo BHI del erlenmeyer con el cultivo en un tubo completamente limpio, luego en un espectrofotómetro Hach DR/2010 se midió la densidad óptica a 405 nm tomando BHI estéril como blanco.

El erlenmeyer con el cultivo se llevó nuevamente a las mismas condiciones de incubación y a intervalos de 2 horas se realizó el mismo procedimiento hasta las 20 horas para todos los anteriores métodos.

⁶⁷MADIGAN, Biología de los Microorganismos, Op. Cit., p.156-157

⁶⁸COLLINS, Op. Cit. p. 151.

⁶⁹MARTINEZ, Mercedes. Introducción a la biotecnología industrial. Manual de laboratorio. Santa Fe de Bogotá : Centro Universidad Javeriana. CEJA, 1995. p. 16.

Con los datos obtenidos se graficó la curva de crecimiento y de esta manera se determinó el tiempo de cosecha que se da al final de la fase logarítmica.

2.12.4 Evaluación de medios de cultivo. Los medios de cultivo propuestos se evaluaron sin variación de las condiciones, es decir, temperatura, pH y número de células para iniciar el ensayo.

2.12.4.1 Con variación en la concentración de sales. A partir de un cultivo fresco se transfirió una colonia del aislado a 40 ml de caldo BHI y se llevó a incubación hasta el tiempo de cosecha, es decir 14 horas, cumplido el tiempo, se realizaron las diluciones correspondientes para hacer el conteo de células en cámara de Neubauer. Para ajustar la población a 11×10^8 bacterias/ml, dada por el recuento en cámara del perfil cinético y se procedió de la siguiente manera: Si la población celular hubiese sido inferior, el cultivo se debió llevar nuevamente a incubación en iguales condiciones. Pero debido a que la población en la mayoría de los casos era superior, se adicionó caldo BHI estéril. teniendo en cuenta el siguiente cálculo matemático de proporcionalidad:

M1 = Población o densidad celular que se debe ajustar

M2 = Población celular óptima determinada por el tiempo de cosecha

X1 = Cantidad que contiene M2.

V2 = Lo que se agrega a 1 ml para ajustar a la población óptima.

V3 = 40 ml cantidad total de inóculo.

X2 = Cantidad de caldo BHI estéril que se agrega a V3, para ajustar la población al valor de M2.

Encontramos entonces X1:

$$\begin{array}{l} M1 \text{-----} V1 \\ M2 \text{-----} X1 \end{array} \quad X1 = \frac{M2 \times V1}{M1}$$

Luego se encuentra V2:

$$V2 = V1 - X1$$

Finalmente se obtiene el valor de X2:

$$\begin{array}{l} V1 \text{-----} V2 \\ V3 \text{-----} X2 \end{array} \quad X2 = \frac{V3 \times V2}{V1}$$

El valor de X2 es la cantidad que se debe agregar a 40 ml para ajustar a la población óptima⁷⁰.

Una vez estandarizada la población celular, se realizaron diluciones decimales de 10^{-1} hasta 10^{-10} en solución salina peptonada. Se sembró en superficie 0.1 ml de cada dilución en cajas con agar BHI (control), extendiendo el inóculo con perlas de vidrio, se trabajó con 6 repeticiones. La misma técnica de siembra en superficie y el mismo número de repeticiones se empleó también para los tratamientos que se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Composición de medios de cultivo químicamente definidos.

	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Composición	Cantidad	Cantidad	Cantidad
Extracto de levadura	3 g	3 g	3 g
Peptona bacteriológica	1.5 g	1.5 g	1.5 g
Extracto de carne	2 g	2 g	2 g
Glucosa	10 g	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g	5 g
Na₂HPO₄	2.5 g	2.5 g	2.5 g
NH₄Cl	0.004 g	0,002	0,001
MgSO₄ * 7H₂O	1.284 g	0,592	0,296
CaCl₂ * 2H₂O	0.214 g	0,107	0,054
CaCO₃	1.1 g	0,55	0,275
Agar	15 g	15	15
Agua destilada	1000 ml	1000	1000
Para los elementos con mínimas concentraciones preparar una solución en 1000 ml de:			
FeSO₄ * 7H₂O	0.199g	0,0995	0,0497
NaNO₂	0.331 g	0,1655	0,083
NaNO₃	1.919 g	0,9595	0,479

Fuente: Esta investigación

Las cajas sembradas se llevaron a iguales condiciones de incubación distribuidas al azar. Al cabo de 14 horas se seleccionaron aquellas que contenían entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias, valor que se multiplicó por el factor de dilución y por diez para reportar el volumen por mililitro.

⁷⁰GUERRERO, Gladys; Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus* aislado del tracto intestinal humano sobre *Vibrio Cholerae* 01 Ogawa in vitro. San Juan de Pasto, 2002.

Con los datos obtenidos se realizó un diseño irrestrictamente al azar con un factor y un error. Se aplicaron las pruebas de significancia de tukey para establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo diseñados y el control, que se midió por el número de UFC/ml en cada medio.

2.12.4.2 Con variación en la fuente de carbono. Una vez se seleccionó el mejor medio, se procedió a realizar un ensayo con variación en la fuente de carbono, es decir, se sustituyó la glucosa por el almidón soluble y siguiendo la misma metodología aplicada anteriormente se compararon los dos medios de cultivo (Anexo F).

Con los datos obtenidos se realizó un diseño irrestrictamente al azar con un factor y un error. Se aplicaron las pruebas de significancia de tukey para establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios de cultivo, que se determinó por el número de UFC/ml en cada medio.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACION

Para lograr el aislamiento de las bacterias, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de las tres zonas de muestreo teniendo en cuenta las cajas que contenían entre 30 y 300 UFC. De acuerdo a lo reportado por las normas de MERCK, el recuento estándar en placa para la zona A fue de 10×10^4 UFC/ml de caldo BHI, para la zona B fue de 17×10^4 UFC/ml de caldo BHI y para la zona C fue de 22×10^3 UFC/ml de caldo BHI, observando en la zona B la mayoría de aislados.

Se obtuvo un total de 61 aislados que crecieron a 50°C de muestras de agua colectadas en tres sitios de las fuentes termales “Baños Chiles”; de los cuales 20 se localizaron en la zona A, 27 para B y 14 para C. que es un número relativamente bajo si se compara con los reportes dados por Rodríguez⁷¹ en aguas Venezolanas y Díaz⁷² en Iza, Boyacá, donde el número de aislados es mayor, teniendo en cuenta que las temperaturas son similares.

Las 3 zonas reportaron temperaturas similares y pH débilmente ácido, así se tuvo:

- Zona A: temperatura 40°C y pH 5.98.
- Zona B: temperatura 40°C y pH 6.45.
- Zona C: temperatura 40.4°C y pH 6 (figuras 1, 2 y 3).

Según Alfredson⁷³ este tipo de aguas con pH cercanos a la neutralidad y temperaturas relativamente bajas son mucho más frecuentes en la naturaleza que aquellos con pH extremos o temperaturas superiores a 70°C.

⁷¹RODRIGUEZ, Francisco. Búsqueda de bacterias termófilas con actividad amilolítica en aguas termales de Venezuela. Venezuela, 1999.

⁷²DIAZ, Paula. Aislamiento e identificación preliminar de bacterias termófilas autóctonas. Memorias primer congreso internacional de microbiología industrial. 1998. p. 123

⁷³ALFREDSON, Op. Cit., p. 45.

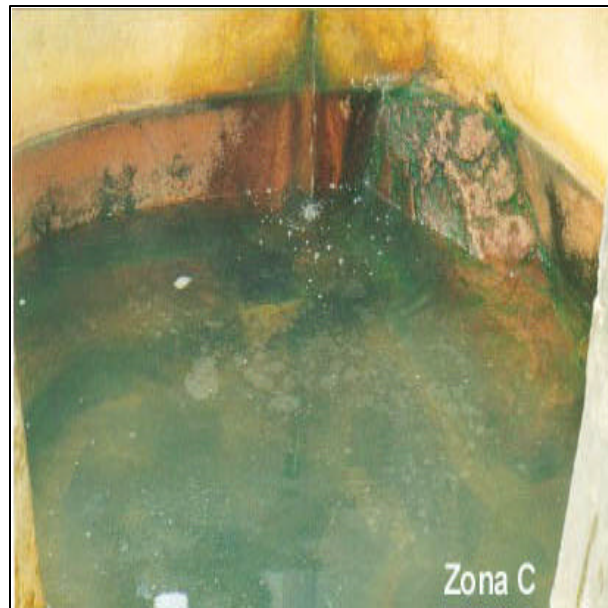
Figura 1. Zona muestreo A



Figura 2. Zona muestreo B



Figura 3. Zona de muestreo C



“Las aguas termales presentan gran diversidad de microorganismos autóctonos característicos de cada hábitat pero también alóctonos”⁷⁴, una

⁷⁴www.raf.es/pdf/aguas/alhama_granada/capitulo%20de%20la%20rosa.pdf. MOSSO, María Angeles. Diversidad microbiana de las aguas termales. Universidad Complutense. Madrid.

parte de esa biodiversidad en las aguas termales del Volcán Chiles se vio reflejada mediante la purificación y tinción de Gram donde todos los aislados presentaron formas bacilares, Grampositivos y Gramnegativos, con variadas características culturales. Hubo dos excepciones que exhibieron una pigmentación amarilla quizás por la presencia de carotenoides, morfología celular en forma de cocos y una temperatura máxima de crecimiento relativamente baja (50°C); Estos dos aislados, después de algunos pases no exhibieron crecimiento a dicha temperatura y sí lo hicieron a una temperatura cercana a 40°C, es probable que de acuerdo a lo planteado por Mosso⁷⁵ se trate de una adaptación temporal de estos microorganismos a esta condición.

“Debido a que al disminuir la temperatura, la velocidad de las reacciones enzimáticas también disminuye”⁷⁶, fue posible conservar los aislados puros en tubos inclinados con agar BHI a temperatura ambiente. (Figura 4).

Figura 4. Método de conservación.



⁷⁵www.raf.es/pdf/aguas/alhama_granada/capitulo%20de%20la%20rosa.pdf.

⁷⁶http://danival.org/extremofilos/extrem_200_temp1.html. Danival.

3.2 ESTRES DE TEMPERATURA

Mediante sometimiento de las bacteria a estrés por temperatura se pudo tamizar aquellos aislados que eran incapaces de tolerar temperaturas superiores a los 55°C, de esta forma, se obtuvieron 39 aislados de los 61 totales, o sea el 63.9% de posibles bacterias termófilas. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estrés de temperatura.

AISLADO	50° C	55° C	60° C	65° C
A1	+++	---		
A2	+++	+++	+++	---
A3	+++	+++	+++	---
A4	+++	+++	+++	---
A5	+++	+++	+++	---
A6	+++	+++	++-	---
A7	+++	+++	++-	---
A8	+++	+++	+++	---
A9	+++	+++	++-	---
A10	+++	+++	+++	---
A11	+++	+++	+++	---
A12	+++	+++	---	
A13	+++	+++	+++	---
A14	+++	---		
A15	+++	---		
A16	+++	---		
A17	+++	+++	+++	---
A18	+++	+++	++-	++-
A19	+++	+++	++-	---
A20	+++	+++	---	---
B21	+++	+++	+++	---
B22	+++	+++	+++	---
B23	+++	+++	+++	---
B24	+++	+++	++-	---
B25	+++	+++	+++	---
B26	+++	---		
B27	+++	---		
B28	+++	---		
B29	+++	+++	++-	---
B32	+++	---		
B31	+++	+++	+++	---

Fuente: Esta investigación

AISLADO	50° C	55° C	60° C	65° C	70° C
B30	+++	+++	+++	+++	+++
B33	+++	+++	---		
B34	+++	+++	+++	---	
B35	+++	+++	++-	---	
B36	+++	---			
B37	+++	---			
B38	+++	+++	+++	+++	---
B39	+++	+++	+++	+++	+++
B40	+++	+++	+++	---	
B41	+++	+++	++-	+++	++-
B42	+++	+++	++-	+++	+++
B43	+++	+++	++-	++-	++-
B44	+++	+++	++-	+++	---
B45	+++	+++	++-	+++	+++
B46	+++	+++	+++	++-	---
B47	+++	+++	+++	---	
C48	+++	+++	++-	---	
C49	+++	+++	---	---	
C50	+++	+++	---		
C51	+++	+++	---		
C52	+++	+++	++-	---	
C53	+++	+++	++-	---	
C54	+++	+++	+++	---	
C55	+++	+++	+++	---	
C56	+++	---			
C57	+++	---			
C58	+++	---			
C59	+++	---			
C60	+++	---			
C61	+++	---			

+: Presencia de crecimiento.

-: Ausencia de crecimiento

En esta fase se observó como lo indica Morrison⁷⁷ y Krieg⁷⁸ que la mayoría de termófilos crecen más rápidamente a temperaturas de 55°C, sin ser necesario un largo periodo de incubación. Otros hallazgos destacables fueron el crecimiento superficial en los medios líquidos o formación de capas, turbidez o sedimentos en el fondo del tubo, que concuerdan en buena medida con los reportados por Krieg⁷⁹ y Pask-Huges⁸⁰.

3.3 ACTIVIDAD AMILOLITICA

La prueba de hidrólisis de almidón se realizó por el método de rayado central a los 39 aislados (Figura 5), dando como positivos 9 de ellos, A18, B24, B25, B34, B42, B45, C53, C54 Y C55. Agrupándolos de acuerdo al sitio de muestreo se tuvo 1 aislado para la zona A, 5 aislados para B y 3 para C. Lo que corresponde al 11.11%, 55.55% y 33.33% respectivamente, esto demuestra lo afirmado por Sunna⁸¹ en cuanto a que en estos microorganismos se han encontrado enzimas termoestables con capacidad de hidrolizar polímeros naturales como almidón, celulosa y xilano.

El hecho de que en la zona B se haya encontrado el mayor número de bacterias amilolíticas puede atribuirse a la probabilidad de que exista una mayor cantidad de materia orgánica debido a las características de la zona, ya que como lo dice Alfredsson⁸², en las fuentes termales la materia orgánica puede provenir de animales, plantas y sus productos como las hojas de los árboles, y del suelo adyacente.

⁷⁷MORRISON, Op. cit., p. 354.

⁷⁸KRIEG, Noel. Enrichment and Isolation. Citado por MURRAY, R. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. Estados Unidos. 1986. p. 115.

⁷⁹KRIEG, Noel. Enrichment and Isolation. Op. Cit., p. 115.

⁸⁰PASK-HUGES, R. Yellow-pigmented strains of *Thermus* spp. From Icelandic hot springs. En : Journal of general microbiology. Vol. 102. (jun.1977); p. 377.

⁸¹SUNNA, Op. cit., p. 2.

⁸²ALFREDSSON, Op. cit., p 47.

Figura 5. Evaluación de capacidad amilolítica por método de siembra central.



3.4 CARACTERIZACION PARCIAL

Los 9 aislados con capacidad amilolítica se sometieron a una caracterización parcial que contempló:

3.4.1 Características morfológicas culturales y celulares. La mayoría de los aislados presentaron pigmentos de color crema, rosado, blanco o incoloro, y la morfología general de las colonias fue variada. La morfología celular evaluada mediante tinción de Gram mostró similitudes con relación a los reportes presentados por Combet-Blanc⁸³, Wind⁸⁴ y Sneath⁸⁵ al encontrar formas bacilares de distintos tamaños, individuales o en cadenas que van de 2 a 6 células, Grampositivos o Gramvariables. Una característica común fue la presencia de esporas centrales, algunas ocupando la totalidad del citoplasma del bacilo; y de cápsula.

3.4.2 Pruebas bioquímicas. El cuadro número 6 resume algunas características de los 9 aislados que destaca similitudes como pruebas

⁸³COMBET-BLANC, Y. *Bacillus thermoamylovorans* sp. Nov., a moderately thermophilic and amylolytic bacterium. En : International Journal of systematic bacteriology. Vol. 45, No. 1 (En. 1995). p. 13.

⁸⁴WIND, Op. cit., p. 156.

⁸⁵SNEATH, Peter. Op. cit., p. 1105.

negativas para indol, sulfuros, hidrólisis de gelatina y utilización de xilosa, por el contrario, todos fueron positivos para catalasa, oxidasa (excepto B24) y la mayoría son capaces de hidrolizar caseína, utilizar glucosa y maltosa, y tolerar bajas concentraciones de NaCl.

Cuadro 6. Comparación de características bioquímicas.

	A18	B24	B25	B34	B42	B45	C53	C54	C55
Gram	+	+	+	+	+	Variable	+	Variable	+
Oxidasa	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Motilidad	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfuros	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Caseína	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Glucosa	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Maltosa	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	+	+	+	-	-	+	-	-
NaCl									
2%	-	+	+	+	+	+	-	+	+
5%	-	+	+	+	+	+	-	+	+
7%	-	+	+	-	+	+	-	+	+
10%	-	+	+	-	+	-	-	-	-

Dentro de las bacterias termófilas existen tres géneros que son comúnmente encontrados en distintos hábitats, *Thermus*, "*Bacillus* y *Clostridium* , estos dos últimos con miembros mesófilos también"⁸⁶. En las fuentes termales del Volcán Chiles únicamente se encontraron bacterias termófilas amilolíticas pertenecientes al género *Bacillus*.

"Aunque el género *Thermus* se encuentra ampliamente distribuido en diversos sistemas termales tanto naturales como artificiales"⁸⁷, dentro de las bacterias caracterizadas no se encontró ningún miembro que presente colonias con pigmentación amarilla, roja o naranja, Gramnegativos y no

⁸⁶MOSSO, Op. cit.

⁸⁷ALFREDSSON, Op. cit., p. 44-45.

esporulados, que según Krieg⁸⁸ son características típicas del género, probablemente porque *Thermus* prefiere temperaturas entre 70 y 75°C en ambientes naturales, a pesar de que se han aislado a 40°C⁸⁹. El género *Clostridium* no se consideró debido a que básicamente todos sus miembros son anaerobios.

Los 9 aislados se ubicaron dentro del género *Bacillus* por que sus características concuerdan con las reportadas en el manual de Bergey's⁹⁰. En gran medida varios de los aislados se asemejan a:

- *Bacillus thermoamylovorans* descrito por Combet-Blanc⁹¹, como un termófilo moderado Grampositivo, catalasa positiva, negativo para la reducción de nitratos y sulfatos, y para la producción de indol y ácido sulfúrico, es capaz de fermentar glucosa, arabinosa, y no fermenta xilosa ni manitol, entre otros.
- Díaz y col.⁹² hacen una descripción de *Bacillus sp.* coincidiendo con la producción de esporas, catalasa y movilidad positivo, negativo para sulfuros, indol y utilización de diferentes azúcares.
- Para la especie *Bacillus steaotermophilus*, el manual de Bergey's⁹³ lo caracteriza como negativo para urea, formación de indol, no presenta crecimiento sobre concentraciones de 7 y 10% de NaCl, y es positivo para catalasa, utilización de glucosa e hidrolisis de almidón.
- Según Morrison⁹⁴, todos los aislados de su estudio fueron Grampositivos, capaces de formar esporas y actuar sobre las proteínas de la leche, no produjeron indol ni sulfuros.

⁸⁸KRIEG, Noel. Bergey's manual of systematic bacteriology. Op. cit., p. 334.

⁸⁹ALFREDSSON, Op. cit., p. 45.

⁹⁰SNEATH, Peter. Op. cit., p. 1105-1108.

⁹¹COMBET-BLANC, Op. cit., p. 15.

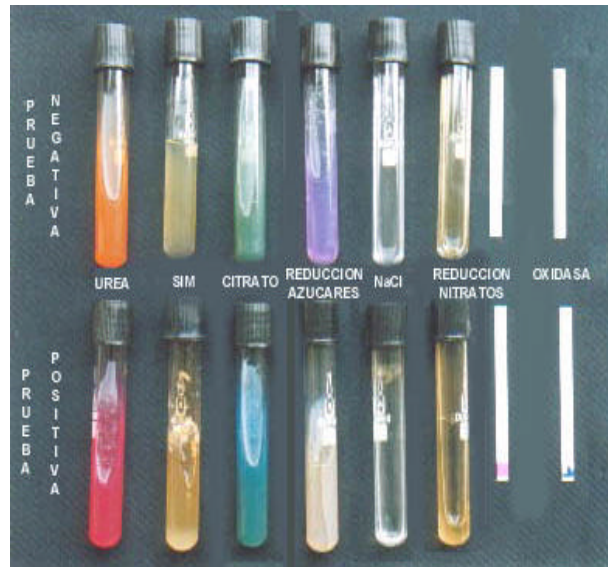
⁹²DIAZ, Op. cit., p. 125.

⁹³SNEATH, Peter. Op. cit., p. 1122.

⁹⁴MORRISON, Op. Cit., p. 354-358.

La figura 6 muestra la batería bioquímica empleada, las pruebas control y con su respectiva prueba positiva.

Figura 6. Batería Bioquímica de Identificación.



Hidrólisis de Caseína.

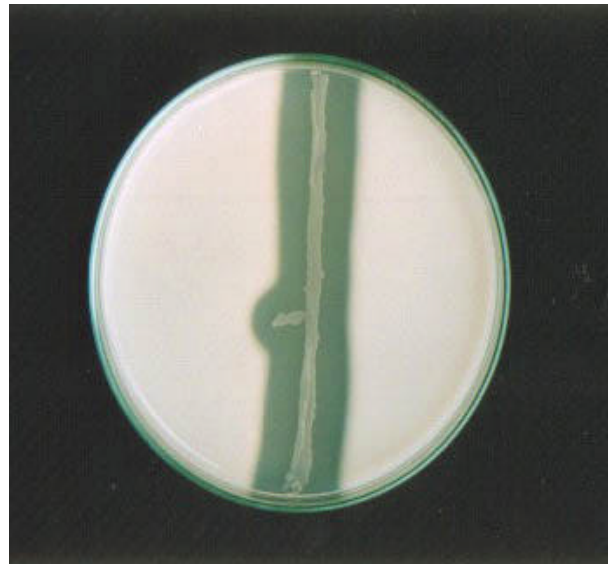


Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas del aislado A18.

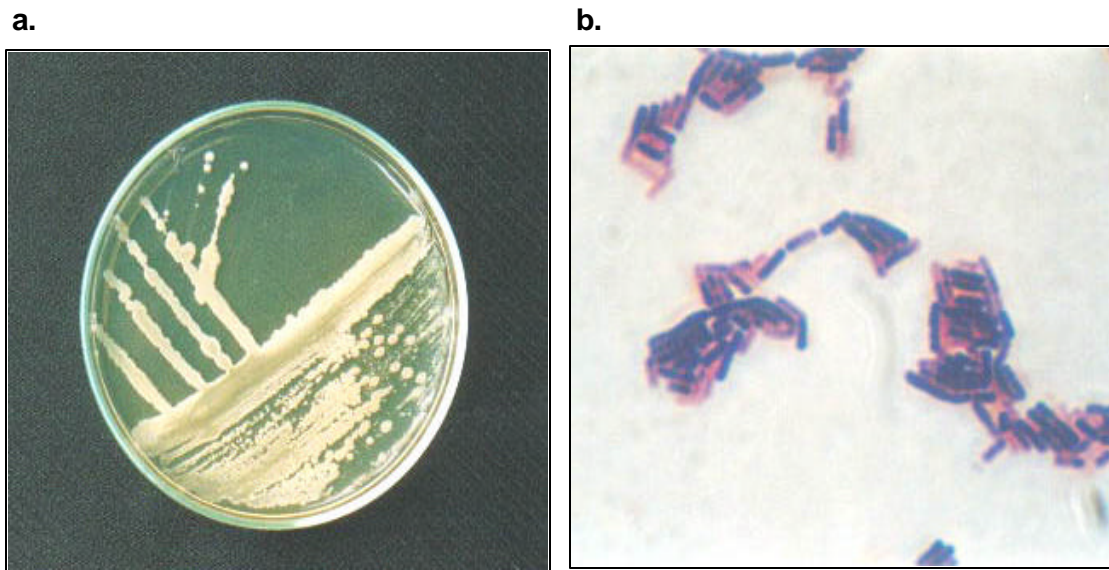
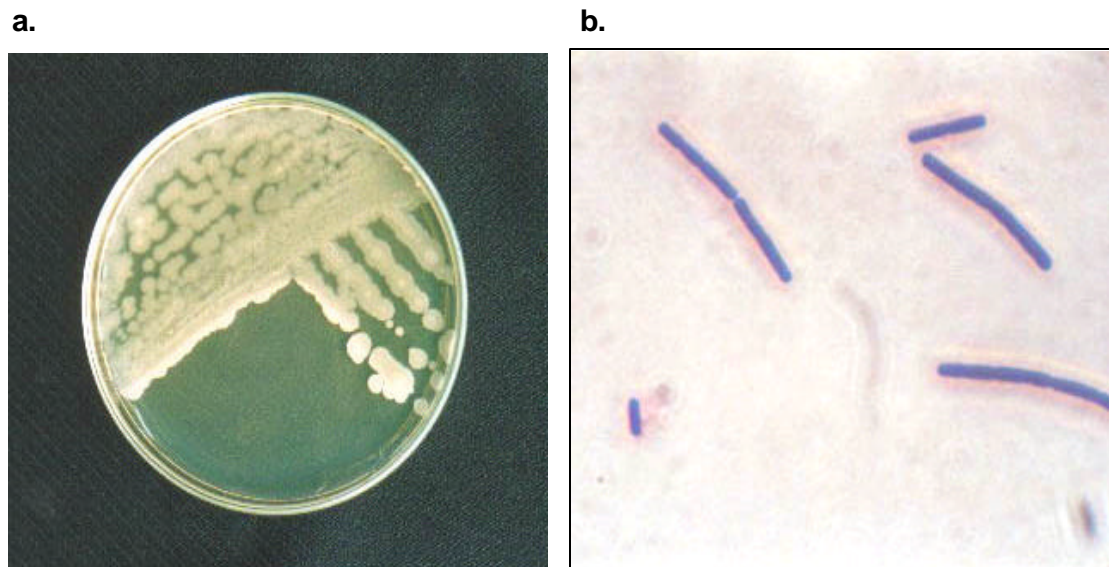


Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B24.



- **B25**

Morfología de la colonia: Colonias de tamaño pequeño, redondas, con borde irregular, convexas, traslúcidas con el centro mas oscuro y de textura cremosa (Figura 9a).

Morfología celular: Se observaron bacilos Gramnpositivos, medianos, rectos y largos, individuales o formando cadenas cortas. Presencia de una espora central de tamaño mediano y una por célula (Figura 9b).

Pruebas bioquímicas: Oxidasa positiva. Catalasa positiva. Reductores de nitratos. Motilidad positiva e indol negativo. No existe producción de sulfuros. Citrato positivo. Degradación de caseina positiva. La bacteria tiene la capacidad de fermentar arabinosa y no crece sobre maltosa, sacarosa, glucosa y xilosa. Tiene la capacidad de tolerar concentraciones de 2, 5, 7, y 10% de NaCl.

Según lo anterior se puede considerar compatible con el genero *Bacillus sp.*

- **B34**

Morfología de la colonia: Colonias fueron pequeñas y redondas, con borde lobulado, planas, color blanquecino, que con el tiempo se torna rosado (Figura 10a).

Morfología celular: Se observaron bacilos Grampositivos, medianos y anchos, en cadenas de 2 o tres células o en grupos (Figura 10b).

Pruebas bioquímicas: Oxidasa positiva. Catalasa positiva. No reductores de nitratos. Motilidad positiva e Indol negativo. No existe producción de sulfuros. Citrato positivo. Degradación de caseina positiva. La bacteria tiene la capacidad de fermentar maltosa, glucosa, arabinosa y manitol y no crece sobre sacarosa, xilosa. Tiene la capacidad de tolerar concentraciones de 2 y 5% de NaCl.

Según lo anterior se puede considerar compatible con el genero *Bacillus sp.*

Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B25.

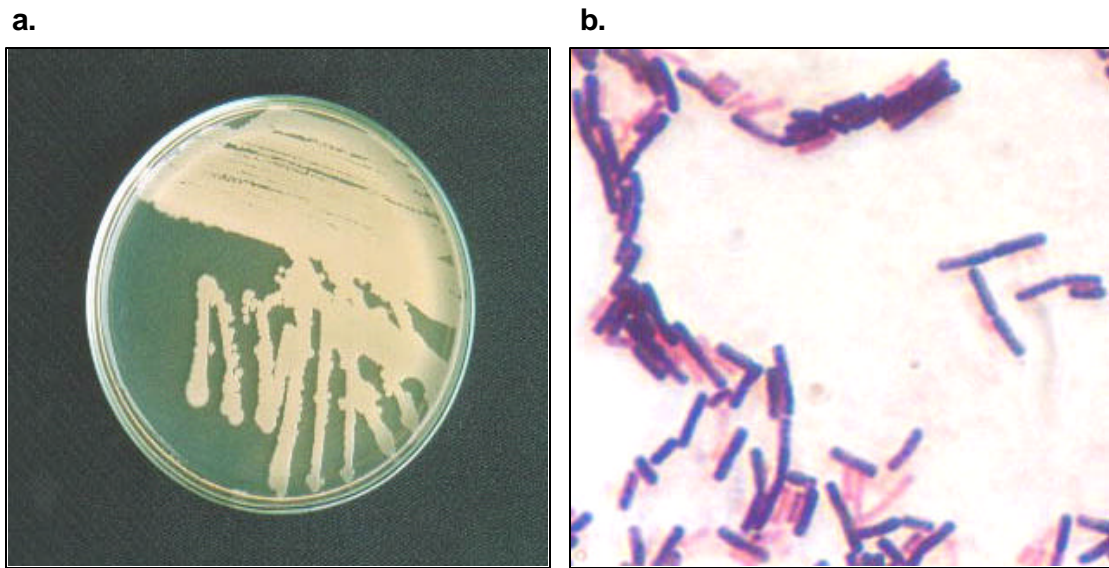
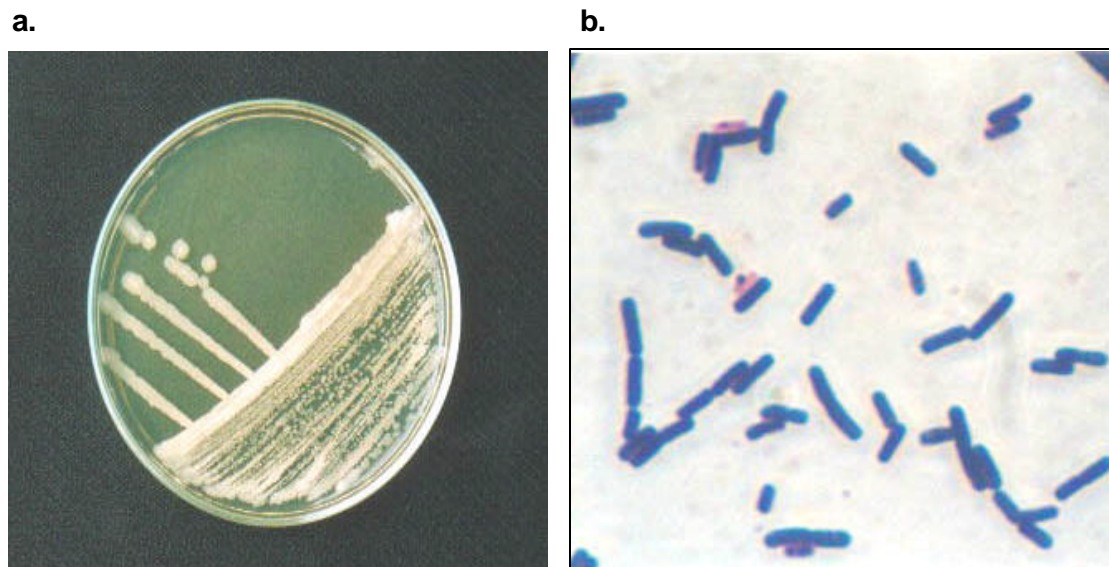


Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B34.



- **B42**

Morfología de la colonia: Colonias redondas y pequeñas, con borde liso, convexas, cremosas, translúcidas que al pasar el tiempo toman una coloración blanca (Figura 11a).

Morfología celular: Se observaron Bacilos Grampositivos. medianos y anchos, rectos, formando cadenas largas. Presencia de una espora central de tamaño mediano y una por célula (Figura 11b).

Pruebas bioquímicas: Oxidasa positiva. Catalasa positiva. Reductores de nitratos. Motilidad positiva e Indol negativo. No existe producción de sulfuros. Citrato negativo. Degradación de caseína negativa. La bacteria tiene la capacidad de fermentar maltosa, sacarosa, glucosa y manitol y no crece sobre arabinosa y xilosa. Tiene la capacidad de tolerar concentraciones de 2, 5, 7, y 10% de NaCl.

Según lo anterior se puede considerar compatible con el género *Bacillus sp*

- **B45**

Morfología de la colonia: Colonias de tamaño pequeño, redondas, con borde liso, convexas, , translúcidas con centro más oscuro y de textura cremosa(Figura 12a).

Morfología celular: Se observaron Bacilos Gramvariables, medianos y delgados, rectos, individuales o formando cadenas largas. Presencia de una espora central de tamaño mediano y una por célula (Figura 12b).

Pruebas bioquímicas: Oxidasa positiva. Catalasa positiva. No reductores de nitratos. Motilidad positiva e Indol negativo. No existe producción de sulfuros. Citrato negativo. Degradación de caseína positiva. La bacteria tiene la capacidad de fermentar glucosa y no crece sobre maltosa, sacarosa, manitol arabinosa xilosa. Tiene la capacidad de tolerar concentraciones de 2, 5, y 7% de NaCl.

Según lo anterior se puede considerar compatible con el género *Bacillus sp*.

Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B42.

a.



b.



Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas del aislado B45.

a.



b.



- **C53**

Morfología de la colonia: Colonias de tamaño pequeño, redondas con borde irregular, convexas, traslúcidas y de textura cremosa (Figura 13b).

Morfología celular: Se observaron bacilos Grampositivos, pequeños y delgados, individuales, en pares o grupos. Presencia de una espora central de tamaño mediano y una por célula (Figura 13b).

Pruebas bioquímicas: Oxidasa positiva. Catalasa positiva. Reductores de nitratos. Motilidad negativa e Indol negativo. No existe producción de sulfuros. Citrato negativo. Degradación de caseína positiva. La bacteria tiene la capacidad de fermentar maltosa, sacarosa, glucosa, arabinosa y manitol y no crece sobre xilosa. No tiene la capacidad de tolerar concentraciones de 2, 5, 7, y 10% de NaCl.

Según lo anterior se puede considerar compatible con el género *Bacillus sp.*

- **C54**

Morfología de la colonia: Colonias de tamaño pequeño, redondas con borde entero, convexas, traslúcidas, y de textura cremosa (Figura 14a).

Morfología celular: Se observaron bacilos Gramvariables, medianos y delgados, individuales. Presencia de una espora central de tamaño mediano y una por célula (Figura 14b).

Pruebas bioquímicas: Oxidasa positiva. Catalasa positiva. No reductores de nitratos. Motilidad negativa. Indol negativo. No existe producción de sulfuros. Citrato positivo. Degradación de caseína positiva. La bacteria tiene la capacidad de fermentar maltosa, y no crece sobre sacarosa, glucosa, manitol, arabinosa y xilosa. Tiene la capacidad de tolerar concentraciones de 2, 5 y 7% de NaCl.

Según lo anterior se puede considerar compatible con el género *Bacillus sp.*

Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas del aislado C 53.

a.



b.



Figura 14. Características macroscópicas y microscópicas del aislado C54.

a.



b.



- **C55**

Morfología de la colonia: Colonias de tamaño grandes, redondas, con borde irregular, planas, con pigmentación crema y centro más oscuro y de textura cremosa (Figura 15a).

Morfología celular: Se observaron bacilos Grampositivos, grandes, largos y anchos en cadenas de cuatro o más células. Presencia de una espora central de tamaño mediano y una por célula (Figura 15b).

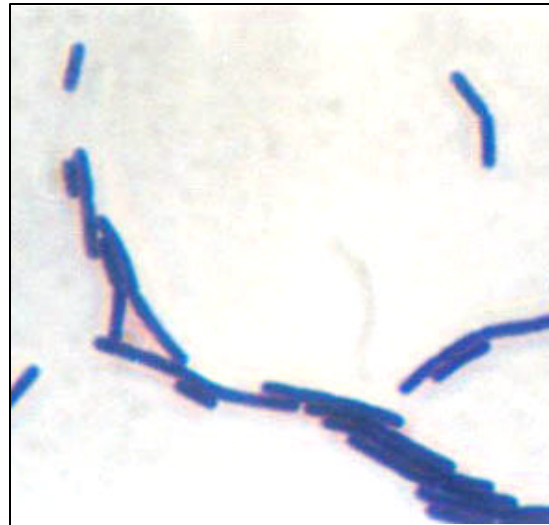
Pruebas bioquímicas: Oxidasa positiva. Catalasa positiva. Reductores de nitratos. Motilidad positiva e Indol negativo. No existe producción de sulfuros. Citrato positivo. Degradación de caseína positiva. La bacteria tiene la capacidad de fermentar maltosa, sacarosa, glucosa y manitol y no crece sobre arabinosa y xilosa. Tiene la capacidad de tolerar concentraciones de 2, 5 y 7% de NaCl.

Figura 15. Características macroscópicas y microscópicas del aislado C55.

a.

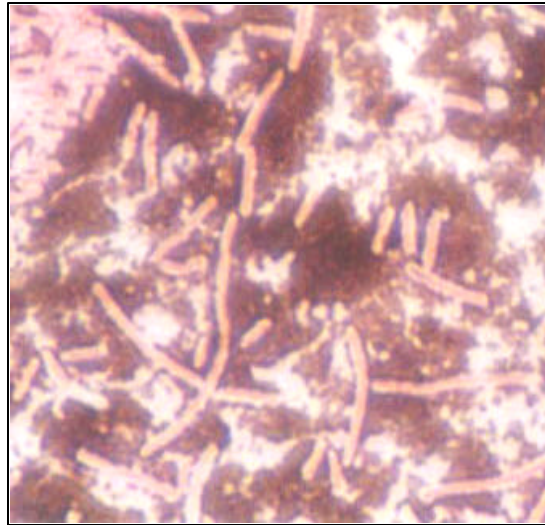


b.



Otra característica importante en los 9 aislados fue la presencia de cápsula, que se visualizó por medio de la tinción de tinta china (Figura 16).

Figura 16. Cápsula.



3.5 CARACTERIZACION DE FUENTES HIDROTERMALES

El cuadro 7 muestra que el análisis realizado a las aguas termales permite describirlas como aguas sulfatadas según Altman⁹⁵, débilmente ácidas, con bajo contenido de otros elementos como nitratos, nitritos, fosfatos y hierro los cuales seguramente aportan para el desarrollo de las bacterias. Además, tienen un alto contenido de calcio, que combinado con el magnesio y otros elementos en pequeñas cantidades hacen de ellas aguas duras; proporciones que contrastan con algunos análisis químicos reportados en la literatura donde el “calcio y magnesio son elementos fundamentales”⁹⁶ pero se encuentran en menores cantidades. Confirmando de esta manera que “cada fuente termal es única, incluso aquellas que aparentan ser las mismas difieren en características como la temperatura, volumen de flujo y composición química del agua”⁹⁷.

⁹⁵www.yacurupaj.com.ar/lasaguas_termalespde.htm.

⁹⁶ALFREDSSON, Op. cit., p. 46.

⁹⁷www.bact.wisc.edu/bact303/b1. Origins of thermal features.1999

Cuadro 7. Análisis físico - químico de las aguas termales.

PARAMETRO	M1	M2	M3	PROMEDIO
pH de la muestra	7.03	6.61	6.76	6.8
Color	12.5	13.7	14.2	13.46
Turbiedad UNT	22.6	27.3	22.5	24.13
Conductividad ms/cm	1.40	1.43	1.41	1.41
Alcalinidad mg/L	554.8	466	551.3	524.03
Acidez mg/L	128	600	357	361.66
Dureza total mg/L	560	576	567	567.66
Calcio mg/L	466	489	436	463.66
Magnesio mg/L	94	87	131	104
Cloruros mg/L	85.7	86	83	84.9
Sulfatos mg/L	281.7	617.7	400.7	433.36
Nitratos mg/L	1.33	0.18	0.19	0.56
Nitritos mg/L	0.13	0.05	0.07	0.08
Hierro mg/L	ND	0.04	ND	0.01
Fosfatos mg/L	0.45	0.27	0.30	0.34
Amonio mg/L	0.71	1.9	0.98	1.19
Sólidos Totales mg/L	1382	1202	1312	1298.6
Sólidos Disueltos mg/L	1215	1094	1213	1174
Sólidos Suspendidos mg/L	167	108	99	124.66

Fuente: Esta investigación
Laboratorio de aguas Universidad de Nariño

Las figuras 1, 2, y 3, se observan los porcentajes de los componentes de cada zona de muestreo.

Figura 17. Porcentaje de elementos para la zona de muestreo A

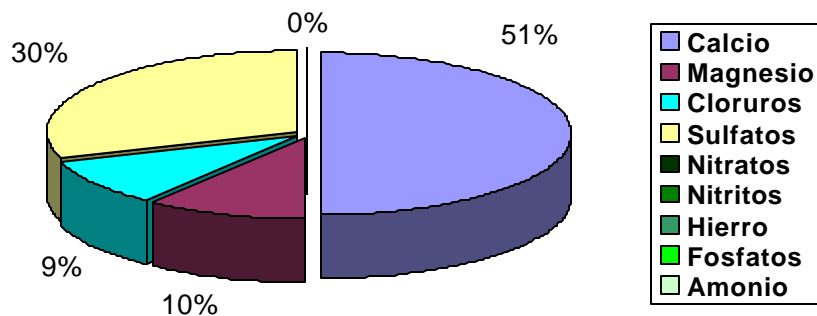


Figura 18. Porcentaje de elementos para la zona de muestreo B

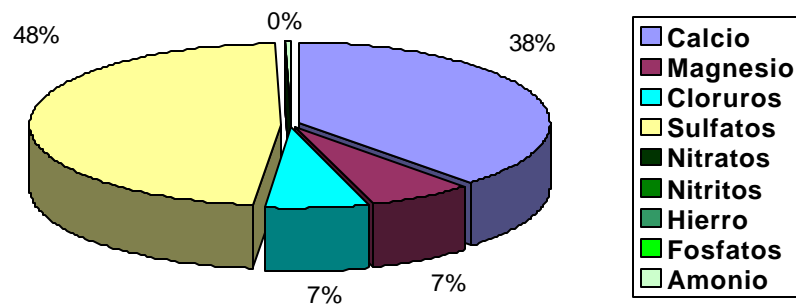
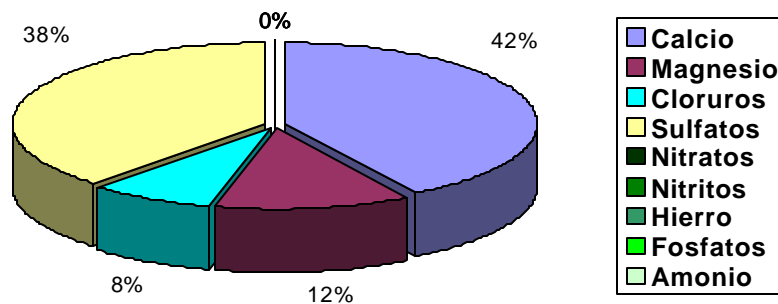


Figura 19. Porcentaje de elementos para la zona de muestreo C



3.6 ELABORACION DE MEDIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS

Debido a que las características químicas de las tres zonas de muestreo variaron poco, se ajustaron sus componentes para la respectiva formulación de los medios de cultivo. El cuadro 8 presenta la composición química y las cantidades que se utilizaron para simular el agua origen.

Cuadro 8. Composición química del agua diseñada en el laboratorio con características similares al agua termal.

COMPOSICIÓN	CANTIDAD
NH ₄ Cl	0.004 g
MgSO ₄ * 7· H ₂ O	1.284 g
CaCl ₂ * 2· H ₂ O	0.214 g
CaCO ₃	1.1 g
Agua destilada	1000 ml
Para los elementos con mínimas concentraciones preparar una solución en 1000 ml de:	
FeSO ₄ * 7· H ₂ O	0.199g
NaNO ₂	0.331 g
NaNO ₃	1.919 g

Fuente: Esta investigación

El agua obtenida en el laboratorio nuevamente se sometió a un análisis químico. El cuadro 9 muestra que la concentración final para los parámetros estudiados se asemeja a la concentración de las fuentes termales.

Cuadro 9. Análisis químico de agua preparada en el laboratorio.

PARAMETRO	UNIDADES	CONCENTRACION
Nitrógeno Amoniacal	mg NH ₃ /L	1.02
Nitratos	mg NO ₃ /L	0.2
Nitritos	mg NO ₂ /L	0.03
Orto fosfatos	mg PO ₄ /L	0.01
Sulfatos	mg SO ₄ /L	441.8
Cloruros	mg CL ⁻ /L	85
Dureza	Mg CaCO ₃	570
pH final = 9		

Fuente: Laboratorio de aguas de Corponariño.
Esta investigación

3.7 ELECCION DEL AISLADO

De acuerdo a lo planteado por Wind⁹⁸ el género *Bacillus* produce una amplia variedad de enzimas extracelulares que como proteasas y amilasas

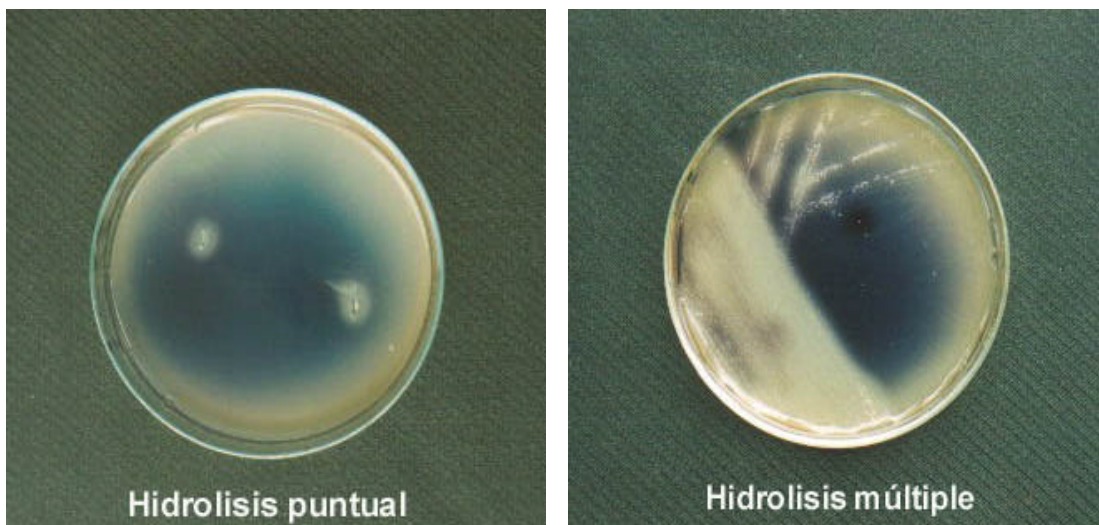
⁹⁸WIND, Op. Cit., p. 155.

son de importante significancia a nivel industrial, ello sustenta el por que los nueve aislados con actividad amilolítica pertenecen a este género.

Debido a que todos los aislados pertenecen al género *Bacillus* y presentan algunas característica comunes, (ver cuadro 6), fue posible elegir un representante que posea la mayor capacidad amilolítica para evaluar y posteriormente seleccionar el medio cultivo, sometiendo a los nueve aislados a pruebas de hidrólisis de almidón.

Los métodos de hidrólisis múltiple e hidrólisis puntual según CDC⁹⁹ permitieron: Por el primer método, se visualizo el cultivo en forma masiva y zonas transparentes alrededor de las colonias, verificando cualitativamente la capacidad amilolitica de los aislados. Mientras que el método de hidrólisis puntual permitió realizar una medición en las zonas transparentes de degradación de almidón, obteniéndose un total de 12 diámetros para cada una de las bacterias (Figura 20).

Figura 20. Evaluación de la actividad amilolítica por los métodos de hidrólisis múltiple e hidrólisis puntual.



El análisis de varianza que se observa en el cuadro 10, muestra que existen diferencias significativas para las 9 bacterias, cada una de ellas tiene mayor o menor actividad amilolítica.

⁹⁹CDC, Op. cit.

Cuadro 10. Análisis de varianza para diámetro de halos de hidrólisis para 9 bacterias termófilas amilolíticas en agar almidón.

FV	GL	SC	CM	FC	FT	
					1%	5%
Tratamiento	8	1406,208	175,776	93,735	2,75	2,06

Fuente: Esta investigación

FV Factor variable
 GL Grados de libertad
 SC Suma de cuadrados
 CM Cuadrados medios
 FC Frecuencia calculada
 Ft Frecuencia tabulada
 ** Diferencias altamente significativas

En el cuadro 11, básicamente se tienen dos grupos, el primero, conformado por B45, B24 y B42 los cuales presentan diferencias significativas con respecto a los demás evaluados y no entre ellos, estos aislados presentaron una mayor actividad amilolítica, aunque B42 tampoco las presenta con A18 y C55. Y el segundo grupo, conformado por aquellas en las que no existen diferencias significativas, A18, C55, C54, B34, B25 y C53.

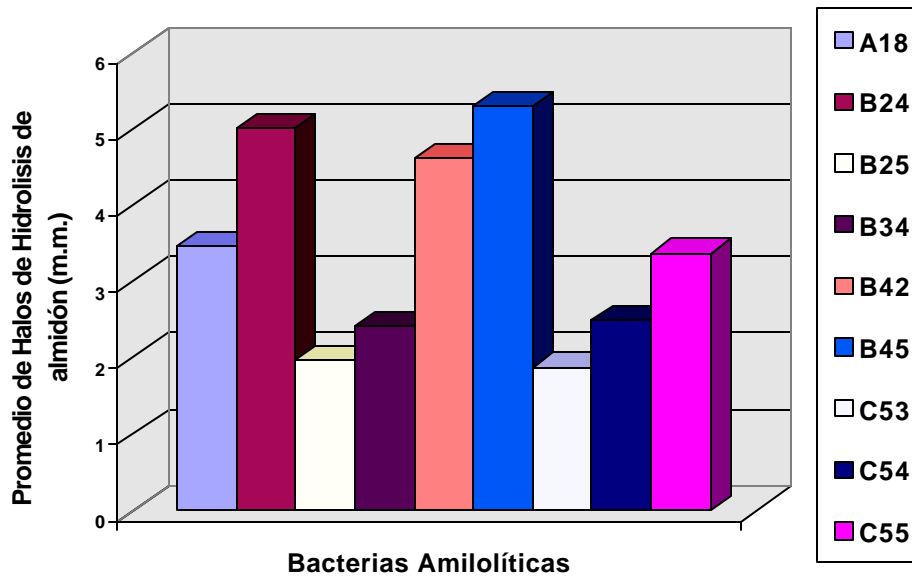
Cuadro 11. Comparación de los promedios de diámetros de halos de hidrólisis para 9 bacterias termófilas amilolíticas en agar almidón.

	B45	B24	B42	A18	C55	C54	B34	B25	C53
	5,292	5	4,625	3,458	3,375	2,5	2,417	1,958	1,875
1,875	3,417*	3,125*	2,75*	1,583 ^{NS}	1,500 ^{NS}	0,625 ^{NS}	0,542 ^{NS}	0,083 ^{NS}	X
1,958	3,334*	3,042*	2,667*	1,500 ^{NS}	1,417 ^{NS}	0,542 ^{NS}	0,459 ^{NS}	X	
2,417	2,875*	2,583*	2,208*	1,041 ^{NS}	0,958 ^{NS}	0,083 ^{NS}	X		
2,5	2,792*	2,5*	2,125*	0,958 ^{NS}	0,875 ^{NS}	X			
3,375	1,917*	1,625*	1,25 ^{NS}	0,083 ^{NS}	X				
3,458	1,834*	1,542 ^{NS}	1,167 ^{NS}	X					
4,625	0,667 ^{NS}	0,375 ^{NS}	X						
5	0,292 ^{NS}	X							
5,292	X								

TUKEY 5% = 1.738

* = Diferencia significativa
 NS = Diferencia no significativa

Figura 21. Promedios de diámetros de halos de hidrólisis para 9 bacterias termófilas amilolíticas en agar almidón.



Es así como entre B45, B24 Y B42, que además de haberse aislado en la misma zona de muestreo, resisten entre las mayores temperaturas registradas en el presente trabajo y presentan características metabólicas similares, se eligió a B45 con un promedio de 5,29 m.m. en halos de hidrólisis al rededor de la colonia, como representante para continuar con los siguientes ensayos ya que trabajar con los tres aislados implicaría realizar el seguimiento de crecimiento a cada bacteria y mayores costos.

Los métodos de hidrólisis puntual e hidrólisis múltiple se probaron tanto en un medio almidón básico como en el medio diseñado con el 100% de las sales. En los dos medios los diámetros fueron similares, pero este último mostró ventaja en cuanto al tiempo de incubación, pues mientras el medio almidón comercial necesitó 48 horas de incubación, el medio almidón diseñado permitió visualizar crecimiento antes de las 24 horas. Esto posiblemente porque de acuerdo a Valenzuela el ciclo celular esta influenciado por los nutrientes del medio y por otras condiciones, y aunque las bacterias son capaces de crecer dentro de un amplio rango de condiciones físicas y nutricionales, el crecimiento óptimo, requiere condiciones específicas.

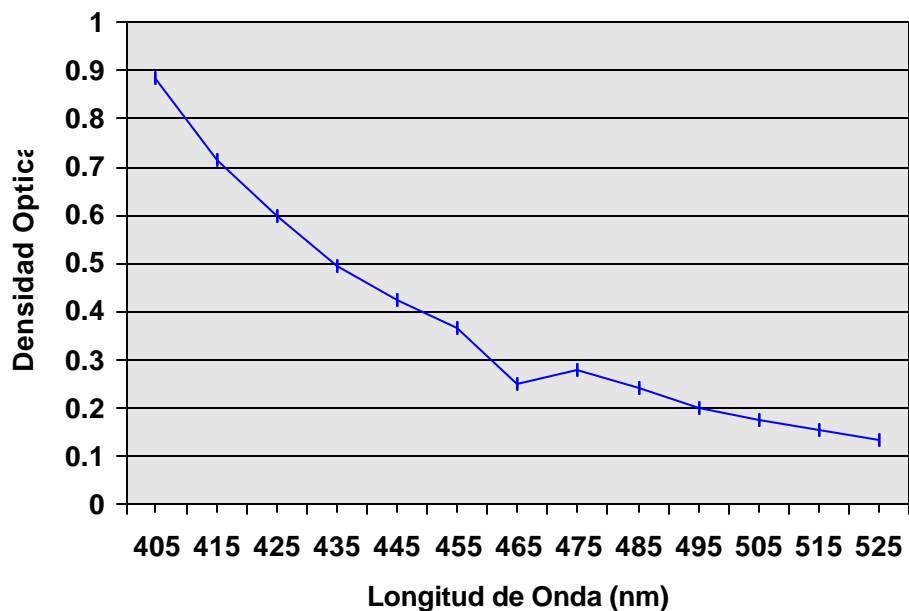
¹⁰⁰VALENZUELA, M. Manual de microbiología. Santa fe de Bogotá : UNISUR. 1995.

3.8 ELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO

La etapa que permitió seleccionar el medio que favorecía el crecimiento de bacterias termófilas se dividió en dos pasos, inicialmente la selección de la longitud de onda en el método turbidimétrico de cinética de crecimiento y finalmente la selección del medio de cultivo.

3.8.1 Curva de absorbancia espectral para BHI. Para BHI estéril la máxima densidad óptica fue de 0.886 la cual se obtuvo con un filtro de 405 nanómetros de longitud de onda para el espectrofotómetro Hach DR/2010. Como se observa en la figura 22.

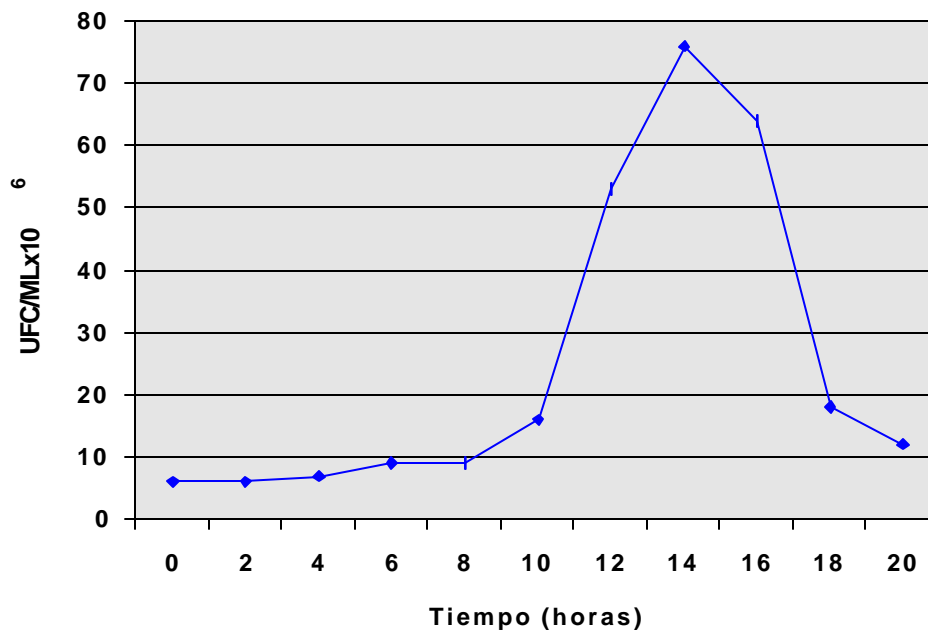
figura 22. Curva de absorbancia espectral para BHI



3.8.2 Perfil cinético. Para conocer el tiempo de cosecha de bacterias en BHI y el máximo número que se producen se ensayaron tres métodos. La posterior comparación determinó que la fase de latencia, donde el microorganismo se está adaptando, se da hasta las 8 horas aproximadamente, a partir de ese tiempo comienza la fase logarítmica, que es relativamente corta en comparación a la anterior y dura al rededor de 4 horas, hasta alcanzar el pico máximo a las 14 horas, donde el número de células es máximo. Posteriormente, el agotamiento de nutrientes se hace visible por la muerte celular, la población disminuye notoriamente hasta las 20 horas.

3.8.2.1 Método de siembra en superficie. Este método permitió que a las 14 horas de incubación se obtuvo la mayor cantidad de colonias, con una población de 76×10^6 UFC/ml de caldo BHI como lo muestra la figura 23. Este método a pesar de ser el más confiable, en este caso particular mostró mayor dificultad, debido a que la bacteria muestra un crecimiento expansivo llegando a la unión de las colonias, así, es conveniente realizar el conteo y marcar las colonias aproximadamente a las diez horas. Luego incubar nuevamente hasta el tiempo establecido.

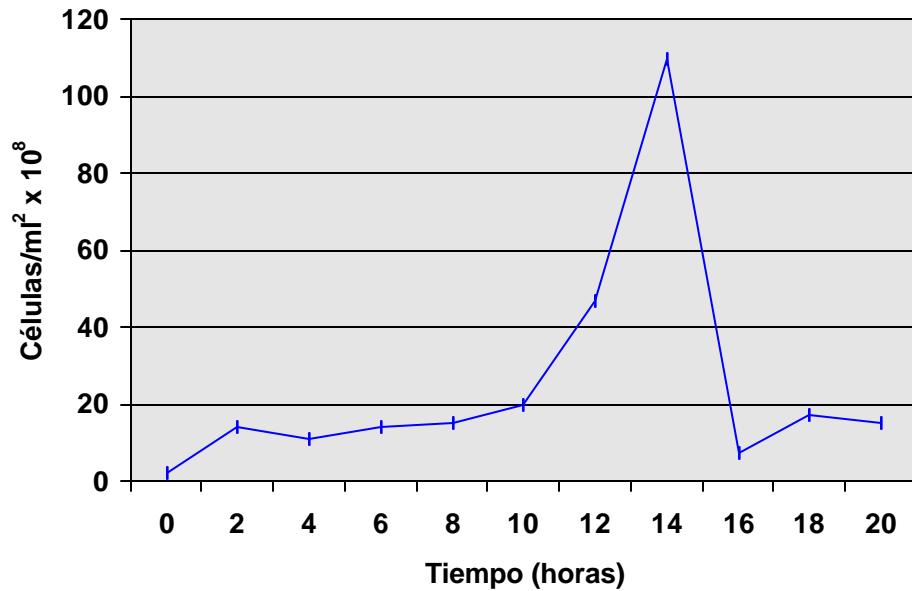
Figura 23. Curva de crecimiento por recuento en placa



3.8.2.2 Recuento en cámara de Neubauer. Mediante recuento en cámara de Neubauer se logró establecer que a las 14 horas el número de células fue máximo con una densidad celular de 11×10^8 bacterias/ml de caldo BHI.

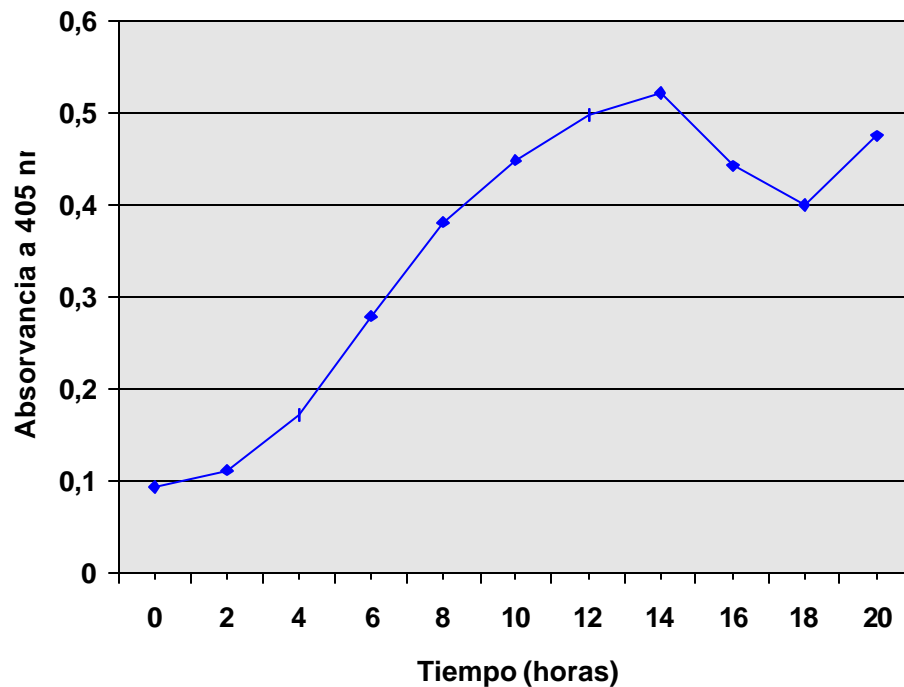
Los inóculos para los ensayos posteriores se ajustaron a esta misma densidad celular. Mediante este método, se observó un decrecimiento bastante rápido entre las 14 y 16 horas, tiempo en el cual la población llegó a su punto mínimo, concordante con la fase de muerte. Se observa en la figura 24 que hay un leve incremento en el número de células entre las 16 y las 18 horas a manera de diauxia, debido posiblemente a que existen en el medio sustratos utilizables de manera secundaria.

Figura 24. Curva de crecimiento por cámara de Neubauer



3.8.2.3 Método turbidimétrico. En la figura número 25 se puede observar que la bacteria crece rápidamente a partir de la primera hora de incubación hasta las 14 horas coincidiendo con los resultados obtenidos por los métodos de cinética de biomasa y densidad celular. Las fases estacionarias por los tres métodos no se presentaron debido posiblemente a una carencia brusca de nutrientes o a la producción o formación de detritus tóxicos para el microorganismo. Se puede observar en las gráficas número 7 y 8 que la bacteria en el medio BHI presenta un repunte en su crecimiento en el rango de 16 a 20 horas posiblemente por que existen componentes en el medio que son utilizados en la fase final de muerte, por las células que permanecen viables.

Figura 25. Curva de crecimiento medida por espectrofotometría



3.8.3 EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

3.8.3.1 Con variación en la concentración de sales. Hurlbert¹⁰¹ expresa: Los nutrientes que se encuentran en el ambiente natural son indispensables para el crecimiento bacteriano ya que están relacionados directamente con las funciones celulares. En el laboratorio los medios de cultivo son los responsables de proporcionarle a la bacteria un ambiente adecuado

El análisis de varianza presentado en la cuadro 12 muestra que existen diferencias altamente significativas para los cuatro medios de cultivo evaluados.

¹⁰¹<http://textbookofbacteriology.net/bacillus.htm>. Nutrition and growth of bacteria. Hurlbert, R. 1999.

Cuadro 12. Análisis de varianza para numero formadoras de colonias para cuatro medios de cultivo.

FV	GL	SC	CM	FC	FT	
					0,50%	0,10%
Tratamiento	3	1390,45	463,483	17,972**	3,1	4,94
Error	20	515,785	25,789			

Fuente: Esta investigación

- FV Factor variable
- GL Grados de libertad
- SC Suma de cuadrados
- CM Cuadrados medios
- FC Frecuencia calculada
- Ft Frecuencia tabulada
- ** Diferencias altamente significativas

Como se muestra en la tabla 12, se obtuvieron promedios entre 7.325×10^7 y 27.221×10^7 UFC/ml, al analizar 4 medios de cultivo, encontrándose los menores promedios en los tratamientos 1, 2 y 4, y entre ellos diferencias significativas únicamente del tratamiento 4 con respecto al tratamiento 1. El tratamiento 2, con la totalidad de sales en el medio de cultivo, es el medio menos favorable, con un promedio de 7.325×10^7 UFC/ml. Se observaron características físicas como la formación de un gran precipitado, las placas de agar presentaron una contextura densa, el color al igual era más oscuro que los otros, así, se puede suponer que hubo una precipitación de sales. El escaso crecimiento obtenido en este medio bajo esta condición posiblemente se relaciona con la ausencia de mecanismos para solubilizar los nutrientes que precipitaron, al respecto es de señalar que como lo indica Dilworth¹⁰² y Rodriguez¹⁰³ algunos microorganismos entre ellos *Pseudomonas* han desarrollado una variedad de estrategias para la adquisición de elementos como hierro insoluble, que incluyen biosíntesis y excreción de compuestos quelantes. Por lo tanto si las sales del medio de cultivo no se hubiesen acomplejado, el microorganismo tendría mayor disponibilidad para asimilar los nutrientes.

“Lo medios de cultivo utilizados para el cultivo de bacterias mesófilas

¹⁰²DILWORTH, Michael. *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicibactin. En : Microbiology. Vol. 144, (1998). p.781.

¹⁰³RODRIGUEZ, Hilda. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. En : Biotechnology advances. Vol. 17. (1999). p. 319-320.

pueden ser empleados para termófilos¹⁰⁴⁻¹⁰⁵, incluyendo BHI, el cual ha sido usado por Pask-Hughes¹⁰⁶, Díaz¹⁰⁷ y Poutou¹⁰⁸, en las investigaciones acerca de estos microorganismos, sin embargo, el tratamiento 1 (agar BHI), a pesar de ser el medio de aislamiento, purificación y preservación hasta esta etapa presentó también un bajo promedio (10.658×10^7 UFC/ml), lo cual indica que las bacterias termófilas necesitan de elementos adicionales para sus funciones celulares y mayor producción de biomasa.

Con respecto al medio 4, con el 25% de sales y un promedio de 17.558×10^7 UFC/ml, aunque los componentes se encontraban más disueltos que en los anteriores medios, la concentración es posiblemente baja para permitir un óptimo desarrollo de la bacteria. En este, el agar era notablemente claro, donde se visualizaron perfectamente las colonias y al igual que el medio 3 no se observó precipitación de sales.

Se determinó que el mejor promedio de biomasa es 27.221×10^7 UFC/ml perteneciente al tratamiento 3, el cual tiene el 50% de las sales, que contrasta con lo esperado, pues se pensaba que el medio que simula las condiciones naturales en que se desarrolla la bacteria, o sea el que posee estrictamente las concentraciones del origen sería el adecuado. Las características físicas que se visualizaron fueron: el medio no formaba gran precipitado de sales, quizás el compuesto que por no presentar alta solubilidad en agua precipitaba es el carbonato de calcio y las placas de agar se mostraron más transparentes que el medio uno, dando ventajas como el permitir un mejor conteo de colonias. Se puede afirmar finalmente que el medio no está saturado de sales y en este sentido la bacteria puede incorporar los nutrientes mejor a su metabolismo. (Cuadro 13 y figura 26)

¹⁰⁴WIEGEL, J. Methods for isolation and study of thermophiles, citado por : Brock, Thomas. Thermophiles: General, molecular and applied microbiology. Op. Cit., p. 28.

¹⁰⁵ALFREDSSON, Op. cit., p. 57.

¹⁰⁶PASK-HUGES, Op. cit., p.322.

¹⁰⁷DIAZ, Op. cit., p. 123.

¹⁰⁸POTOUT, Raul. Diseño de un medio definido para el cultivo de bacterias termófilas aerobias con actividad amilolítica. Memorias congreso internacional de microbiología industrial. Mayo, 2000. p. 142.

Cuadro 13. Comparación de los promedios de unidades formadoras de colonias por mililitro en 4 medios de cultivo.

	T3	T4	T1	T2
	27,221x10 ⁷	17,558x10 ⁷	10,658x10 ⁷	7,325x10 ⁷
7,325x10 ⁷	19,896x10 ⁷ *	10,233x10 ⁷ *	3,333x10 ⁷ NS	X
10,658x10 ⁷	16,563x10 ⁷ *	6,9x10 ⁷ NS	X	
17,558x10 ⁷	9,663x10 ⁷ *	X		
27,221x10 ⁷	X			

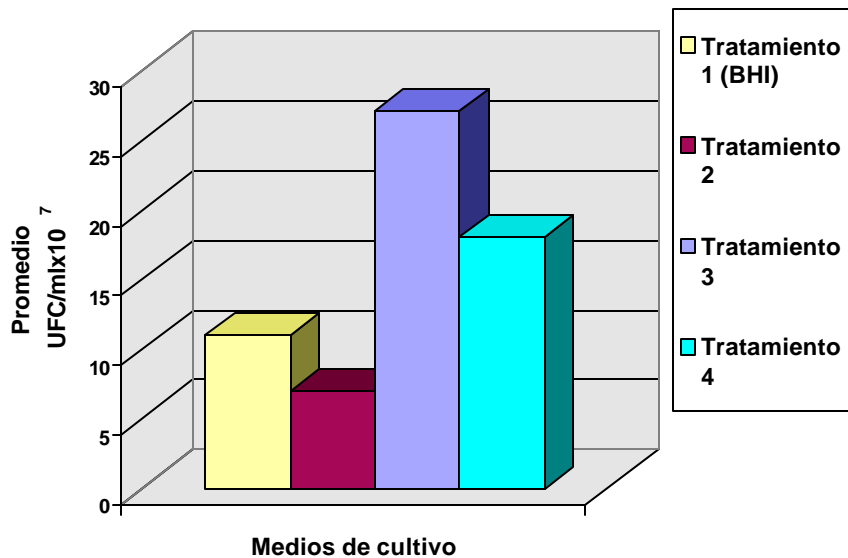
Fuente: Esta investigación

TUKEY 5% = 8.29

* = Diferencia significativa

NS = Diferencia no significativa

Figura 26. Promedios de UFC por mililitro para *Bacillus sp.* en cuatro medios de cultivo con variación en la concentración de sales



La composición de los medios de cultivo diseñados en este trabajo, presentaron similitud en cuanto a composición mas no en cantidades con otros propuestos para el cultivo de algunas especies de *Bacillus* como los

reportados por Combet-Blanc¹⁰⁹ para *Bacillus thermoamylovorans* y por El-Aassar¹¹⁰ para *Bacillus lentus* donde se involucran a NH₄Cl, MgSO₄*7· H₂O, CaCl₂*2· H₂O, FeSO₄*7· H₂O, pero adicionalmente otros compuestos químicos que seguramente son aportes de acuerdo a las necesidades específicas del microorganismo. Así el tratar de simular químicamente el hábitat natural de las bacterias del Volcán Chiles que difiere de otras fuentes termales, permitió el buen desarrollo de estos microorganismos

3.8.3.2 Con variación en la fuente de carbono. Una vez se precisó que el tratamiento 3 era el mejor medio, es decir, el medio que mayor biomasa produjo, se procedió a comparar este con variación de la glucosa por almidón por el método de recuento en placa.

El procedimiento se realizó con una población inicial de 11 x 10⁸ bacterias por mililitro como inóculo. Se realizó una siembra en superficie en los dos medios y luego de las 14 horas de incubación se procedió a realizar el conteo de colonias en placa.

El cuadro 14 muestra que existen diferencias significativas entre la biomasa formada en los 2 medios propuestos, observándose que la formación de biomasa hasta el tiempo de cosecha se favorece en el medio que posee almidón como fuente de carbono.

Cuadro 14. Análisis de varianza para numero formadoras de colonias para dos medios de cultivo.

FV	GL	SC	CM	FC	FT	
					0,50%	0,10%
Tratamiento	1	427,213	427,213	94,709**	4,1	7,56
Error	10	45,108	4,511			

Fuente: Esta investigación

- FV Factor variable
- GL Grados de libertad
- SC Suma de cuadrados
- CM Cuadrados medios
- FC Frecuencia calculada
- Ft Frecuencia tabulada
- ** Diferencias altamente significativas

¹⁰⁹COMBET-BLANC. Y. Op. Cit., p. 9.

¹¹⁰EL-AASSAR, S. Purification of α-amylase from *Bacillus lentus* cultures. En : Applied microbiology and biotechnology. Vol. 38. (Jul. 1992). p. 312.

El cuadro 15 muestra que en el medio almidón, crecen $71,6 \times 10^7$ UFC/ml más que en el medio glucosa, y aunque la glucosa es una molécula más sencilla y más fácil de incorporar al metabolismo, la maquinaria biosintética de la síntesis de los precursores intermediarios del metabolismo del almidón estuvo adaptada por un largo periodo a asimilar este sustrato.

Willem¹¹¹ expresa que mientras algunos microorganismos termófilos e hipertermófilos son capaces de crecer sobre azúcares monoméricos en muchos casos un crecimiento eficiente se obtiene con polímeros de glucosa como almidón y glicógeno.

Al respecto, en estudios realizados en dos especies del género *Bacillus* acerca de la utilización de sustratos como almidón, amilopectinas, glicógeno, glucosa entre otros, se demostró que el almidón junto a amilopectinas para *Bacillus stearothermophilus* y dextrinas para *Bacillus lentus*, son los mejores para una buena producción de enzimas amilolíticas. Wind también manifestó que la producción de biomasa en *Bacillus stearothermophilus* era mayor a 50° C en un sustrato con almidón como fuente de carbono que en presencia de glucosa.

Por lo anterior se puede concluir que el medio almidón puede utilizarse para la preservación de bacterias termófilas amilolíticas, evitando la pérdida de esta importante actividad metabólica.

Cuadro 15. Comparación de los promedios de unidades formadoras de colonias por mililitro en dos medios de cultivo.

	M. Almidón	M. Glucosa
	$174,3 \times 10^7$	$102,7 \times 10^7$
$102,7 \times 10^7$	$71,6 \times 10^7$	X
$174,3 \times 10^7$	X	

Fuente: Esta investigación

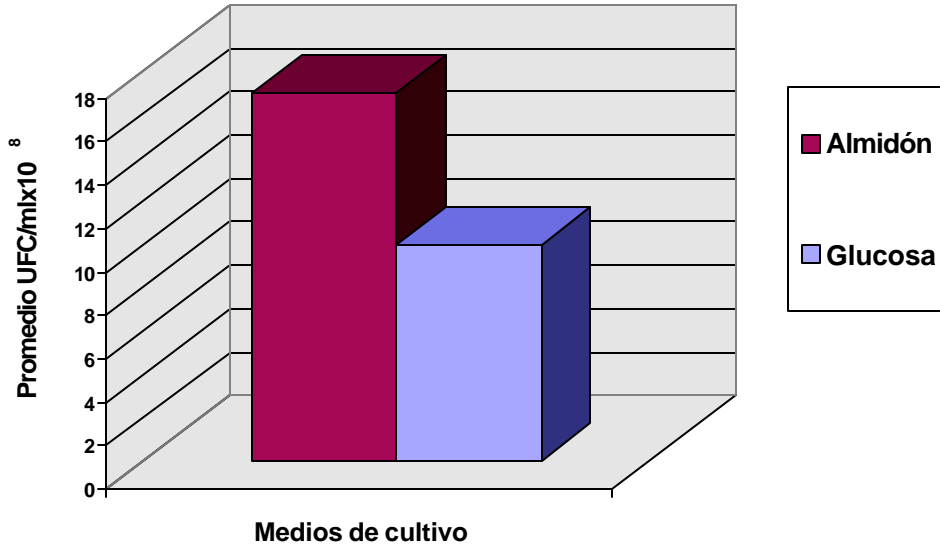
TUKEY 5% = 2.731

* = Diferencia significativa

NS = Diferencia no significativa

¹¹¹WILLEM, M. Sugar utilization and its control in hyperthermophiles En: Extremophiles. (1998); p.201.

Figura 27. Promedios de UFC por mililitro para *Bacillus sp.* en dos medios de cultivo con variación en la fuente de Carbono



4. CONCLUSIONES

La elaboración de la presente investigación permitió obtener las siguientes conclusiones:

Las bacterias termófilas amilolíticas encontradas en los tres sitios de muestreo corresponden al 23% de los 39 aislados que toleraron temperaturas superiores a 55°C.

La caracterización morfológica y bioquímica determinó en los 9 aislados la presencia de formas bacilares Grampositivos y Gramvariables con características particulares de los termófilos como catalasa positiva y presencia de esporas de algunos géneros. Aunque todos se agruparon dentro del género *Bacillus* se observaron entre ellos diferencias en cuanto la utilización de fuentes de energía y carbono como azúcares, citrato y caseína, y a la tolerancia de determinadas concentraciones de NaCl.

En los diferentes medios de cultivo analizados para el aislado B45 identificado dentro del género *Bacillus*, se observó que la composición del medio que contiene el 50% de sales, favoreció el crecimiento óptimo de la bacteria. Recomendándose como un medio para aislamiento, conservación y manejo general de bacterias termófilas del género *Bacillus* sp.

Al analizar el mismo medio de cultivo cambiando glucosa por almidón, la bacteria se adaptó mejor en agar almidón, y aunque puede ser producto del hábito amilolítico temporal en este, su importancia radica en que si se preserva y cultiva bacterias termófilas amilolíticas en él, se evitará la pérdida de la capacidad para hidrolizar almidón, en contraste cuando se conserva o cultiva en otros medios.

Un medio de cultivo óptimo para conservar bacterias termófilas amilolíticas es aquel que contiene el 50% de las sales y almidón como fuente de carbono, pues así lo demostró la prueba de significancia estadística de tukey con un p de 0.05.

5. RECOMENDACIONES

Realizar Investigaciones en el Volcán Chiles y otros lugares, que involucren diferentes clases de enzimas termotolerantes como las proteasas y evaluar cuantitativamente la producción enzimática.

Evaluar el potencial enzimático de los 9 aislados termotolerantes con un estudio de rendimiento y producción de este tipo de enzimas microbianas.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. The microbial world, thermophilic microorganism. [Htp:// www helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes / thermo.htm](http://www.helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/thermo.htm). 1999

AGUILAR, Alfredo. Extremophile microorganisms as cell factories: Support from the European Union. En: Extremophiles. (Feb. 1998); p. 367-373

ALFREDSSON, Gudni and KRISTJANSSON, Jacob. Ecology, distribution, and isolation of *thermus*. En: SHARP Richard and WILLIAMS, Ralph. *Thermus* species. New York :Plenum press, 1995. p. 43-63.

ALTMAN, Nathaniel. Balneotherapy - Healing with Water.(online) . Tomado de Healing Springs, The Ultimate Guide to Taking the Waters," lugar de publicación desconocida" junio 17.htm. <http://www.care2.com>.

ANTRANIKIA, G. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. Extremophiles. © Springer-Verlang. 1997.

BERGER, J. Y LEE, B. Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus* species. En: Applied Microbiology and Biotechnology. (Mar. 1995); p. 81-87

BERGQUIST, Peter and MORGAN, Hugh. Biotechnological applications of *Thermus*. En : SHARP Richard and WILLIAMS, Ralph. *Thermus* specie. New York: Plenum press, 1995. p. 207-223

BERGQUIST, P. Biotechnological applications of *Thermus*. En: Sharp R. *Thermus* specie. New York. 1995

BROCK, Thomas. Introduction: An overview of the thermophile. En: ----- . Thermophiles General, Molecular, and applied microbiology. New York : A willey interscience publication, 1986. p. 1-16.

BROCK, Thomas. Life at Highs Temperatures. [Online]. Yellowstone Association for Natural Science, History & Education. Inc. "Lugar de publicación desconocida". [1999]. Kinds of Hot Springs. www.bact.wisc.edu/bact303/b1. Origins of thermal features.1999

-----, Life at Highs Temperatures. [Online]. Yellowstone Association for Natural Science, History & Education. Inc. "Lugar de publicación desconocida". [1999]. Origins of thermal. www.bact.wisc.edu/bact303/b1. Origins of thermal features.1999

-----, Life at Highs Temperatures. [Online]. Yellowstone Association for

Natural Science, History & Education. Inc. "Lugar de publicación desconocida". [1999]. Up the temperature gradient. www.bact.wisc.edu/bact303/b1. Up the temperature gradient.1999

-----, Life at High Temperatures: Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. En: Science. Vol. 158 (1999); p. 1012-1019

CDC; OPS; OMS. Métodos de laboratorio para diagnóstico de *vibrio cholerae*. 1994

COLLINS, C. Métodos microbiológicos. 5ta edición. España : Editorial Acribia, 1989. p. 158

COMBET-BLANC, Y. *Bacillus thermoamylovorans* sp. Nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. En: International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 45, No. 1 (Jan. 1995); p. 9-16

CRUEGER, W; Crueger, A. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia.Zaragoza, España. 1989.

DANIVAL. El debate del ancestro termófilo. [Online].. "Lugar de publicación desconocida" [1995]. Microbiology internet text: <http://danival.org/notasmicro/micro-ancestro3.html>.

----- . Diversidad natural sin cultivo de los microorganismos. [Online].. "Lugar de publicación desconocida" [1995]. Microbiology internet text: <http://danival.org/notasmicro/micro-diversidad1.html>.

----- . Diversidad natural sin cultivo de los microorganismos. [Online].. "Lugar de publicación desconocida" [1995]. Microbiology internet text: http://danival.org/notasmicro/micro_ancestrothermo.html.

DA COSTA, Milton. The cell walls and lipids of *Thermus*, citado por SHARP, Richard. Biotechnology handbooks. *Thermus* species. New York: Plenum press, 1995. p.143.

DUFFIELD, Melaine. Enzymes of *Thermus* and their properties. En: Sharp Richard and Williams, Ralph. *Thermus* species. New York and London: Plenum press,1995. p. 116 -122.

DIAZ, Paula. Aislamiento e identificación preliminar de bacterias termófilas autóctonas.(1998). Memorias primer congreso internacional de

microbiología industrial. Universidad Javeriana. Santa Fé de Bogotá. Mayo 1998.

DILWORTH, Michael. *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicibactin. En : Microbiology. Vol. 144, (1998). p.781.

EGAS, María. Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: Purification and biochemical characterization. En: Extremophiles. (1998); p. 23-32

EL –ASSAR, Purification of α -amylase from *Bacillus lentus* cultures. En : Applied Microbiology and biotechnology. (1992); p. 312-314

ESCOBAR, Miryam. Fundamentos de microbiología. Santafé de Bogotá: Centro Editorial Javeriano, 1988. p. 246

GARCIA, F. Informe ejecutivo de comisión volcán chiles, cumbal y azufral. proyecto p97902. investigación de suelos, y procesos geoquímicos ambientales. Pasto: ingeominas. 1997

GUERRERO, Gladys; Guzman, Sandra; Yandar, Nubia. Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *lactobacillus acidophilus* aislado del tracto intestinal humano sobre *Vibrio cholerae* 01 ogawa in vitro. Tesis Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. 2003.

HOLT, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Baltimore, USA, William & Wilkins. 1989

HOSHINO, T. Molecular microbiology, Applied microbial Genetics. Applied and environmental microbiology 1998

HULBERT. Bacterial nutrition and environmental requirements. [Online]. Science hall. "Lugar de publicación desconocida" [1999-cited 12 July 1999]. Microbiology 101/102 internet text: <http://www.wsu.edu:8080/~hurlbert/pages/101hmpg.html>

IAÑES, E. Curso de microbiología general. Acción de los agentes físicos sobre las bacterias. [Online] "Lugar publicación desconocida": [1999]. Microbiology internet text. <http://www.ugr.es/~eiañes/Microbiologia/17>.

IMANAKA, Tadayuki and AIBA, Shuichi. Applied genetics of aerobic thermophiles. En: Brock, Thomas. Thermophiles. General, molecular and

applied microbiology. New York : A willey interscience publication,1986. p. 159 -178.

INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI. Nariño Aspectos geográficos. Bogotá. 1985.

INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI. Diccionario Geográfico de Colombia. Tomo 2. Bogotá. 1996

KADEMI, A. Y AÏT-ABDELKADER, N. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. En: Applied Microbiology and Biotechnology. (Jan. 2000); p. 173-179

KENEALY, W. Industrial application of thermostable enzymes. En : Brock, T. Thermophiles. General, molecular and applied microbiology. New York. 1986

KRIEG, Noel. Enrichment and Isolation. En: MURRAY, R., Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, 1986. p. 114-119

KRIEG, Noel. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1, Estados Unidos : Williams & Williams, 1986. p. 333.

KRISTJANSSON, J. ALFREDSSON, G. Distribution of *Thermus* spp. In Icelandic Hot springs and a thermal gradient. En: Applied environment microbiology. 1983

LANGWORTHY, Thomas and POND, Jean. Membranes and lipids of thermophiles. En Brock, Thomas. Thermophiles. General, molecular and applied microbiology. New York : A willey interscience publication, 1986. p. 107 – 135.

LOZANO, Jose. Los extraños extremófilos. [Online].. “Lugar de publicación desconocida” [1997]. Biología molecular y celular: www.laverdad.es/cienciasalud/8-4-5.html

MADIGAN, Michael; MARTINKO John y PARKER Jack. Brock: Biología de los microorganismos. Octava edición. Madrid: Prentice Hall, 1997. 986p

MADIGAN, Michael and MARRS, Barry. En : Extremófilos. Investigación y ciencia. (Junio. 1997); p.60-66

- MARTIN, A. Introducción a la microbiología del suelo. Editor S. A. Mexico. 1980
- MARTINEZ, Mercedes. Manual de laboratorio Introducción a la microbiología industrial Versión II. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Santa Fe de Bogotá. 2000.
- MORRISON, Lethe and TANNER, Fred. Studies on thermophilic bacteria. En: Journal Bacteriology. Vol 7. (Nov. 1981); p. 343-366
- MOSSO, María. Diversidad microbiana de las aguas minerales. ed. real academia. [Online] Madrid. [1999].
www.raf.es/pdf/aguas/alhma_granada/capitulo%20de%20la%20rosa.pdf.
- NIEHAUS, F and BERTOLDO, C. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. En: Applied Microbiology and Biotechnology. (feb. 1999); p. 711-729
- PANTAZAKI, A. Biotecnologically relevant enzymes from *Thermus Thermophilus*. En: Applied Microbiology and Biotechnology. (2002); p. 1-12
- PASK-HUGHES, R. A. Y WILLIAMS, R.A. Extremely thermophilic Gram-negative bacteria from hot tap water. En: Journal of General Microbiology. (Jan. 1975); p. 321-328
- , Yellow-pigmented strains of *Thermus spp.* From Icelandic Hot Springs. En: Journal of General Microbiology. (Jun. 1977); p. 375-383
- POUTOU, Raul. Diseño de un medio definido para el cultivo de Bacterias termófilas aeróbicas con actividad amilolítica. Memorias primer congreso internacional de microbiología industrial. Universidad Javeriana. Santafé de Bogotá. Mayo 2000.
- RODRIGUEZ, Francisco. Búsqueda de bacterias termófilas con actividad amilolítica en aguas termales de Venezuela. Universidad de Carabobo. Facultad de ciencias de la salud.
- RODRIGUEZ, Hilda. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. En : Biotechnology advances. Vol. 17. (1999). p. 319-320.
- SKINNER, B. The many Origins of hydrothermal mineral deposits. The science today. Yale University. 1990

STANBURY, P. F. Tecnología de las fermentaciones. En: Biología molecular y Biotecnología. 1995.

STETTER, Karl. Cómo sobreviven los termófilos extremo calientan. [Online]. “Lugar de publicación desconocida” [1999]. Sociedad Americana de Microbiología: www.microbe.org/espanol/microbes/thermophiles.asp

SNEATH, Peter, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Estados Unidos. Williams & Williams .1986.

SUNDARAM, T. Physiology and growth of thermophilic bacteria. En Brock, Thomas. Thermophiles. General, molecular and applied microbiology. New York : A willey interscience publication, 1986. P. 75 –106.

SUNNA, Anwar. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. En: Extermophiles. (1997); p. 1-13

VALENZUELA, M. Manual de Microbiología. Santa Fe de Bogotá : UNISUR. 1995.

WEIMER, Paul. Use of thermophiles for the production of fuels and chemicals. En Brock, Thomas. Thermophiles. General, molecular and applied microbiology. New York : A willey interscience publication, 1986. P. 217 –256.

WIEGEL, J. Methods for isolation and study of thermophiles. En Brock, T. Thermophiles. General, molecular and applied microbiology. New York. 1986

WILLIAMS. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, Baltimore, USA, William & Wili kins. 1989

WILLIAMS, Ralph y SMITH, Kelvin. *Thermus ashimai* sp. Nov., Isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and the Azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution of *Thermus* species. En: International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 46, No. 2. (Apr. 1996); p. 403-408

WILLEM, M. Sugar utilization and its control in hyperthermophiles En: Extremophiles. (1998).

WIND, R. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable α -amylase – producing strain. En: Applied Microbiology and Biotechnology. (1994); p.155-162

www.lafacu.com/apuntes/biologia/bacterias/default.htm. 1999.

www.yacurupaj.com.ar/lasaguas_termalespde.htm.

ZUBER, H. Comparative studies of thermophilic and mesophilic enzymes: Objectives, problems, results. En: Biochemistry of thermophily. (1978); p. 267

ANEXOS

ANEXO A

TECNICA DE COLORACION DE GRAM

1. Realizar un frotis de la bacteria sobre un cubreobjetos y fijar al calor.
2. Aplicar cristal de violeta y dejar actuar por 1 minuto.
3. Lavar con agua
4. Aplicar lugol, dejar actuar po 1 minuto.
5. Aplicar fuscina básica, dejar actuar por 1 minuto.
6. Lavar con agua y dejar secar a temperatura ambiente.

TECNICA DE COLORACION DE ESPORAS

METODO DE SCHAEFFER-FULTON

1. Preparar un frotis de la bacteria sobre un cubreobjetos y fijarlo ala calor.
2. Cubrir la muestra con una solución de verde malaquita.
3. Calentar durante 5 a 10 minutos la lámina produciendo evaporación, sin dejar secar.
4. Lavar con agua de grifo durante 30 segundos.
5. Cubrir la preparación con safranina durante 15 segundos.
6. Lavar con agua de grifo, escurrir, dejar secar al aire.

TECNICA DE COLORACION DE CAPSULA

TINCION NEGATIVA

1. Depositar sobre una lámina una gota de agua.
2. Transferir una colonia de la bacteria y homogenizar.
3. Añadir un volumen igual de tinta china y mezclar con asa.
4. Estender la mezcla hasta obtener una película homogénea.
5. Dejar secar a temperatura ambiente.
6. Cubrir con safranina por 10 a 30 segundos.
7. Lavar con agua de grifo y dejar secar ala aire.

ANEXO B

AGAR ALMIDON

COMPOSICION

CANTIDAD

K_2HPO_4	1g
$MgSO_4$	0.2g
$CaCl_2$	0.1g
KNO_3	0.5g
Almidón soluble	10g
Agar	15g
Agua	1000 ml

ANEXO C

ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL AGUA TERMAL

PARÁMETRO	METODO
Alcalinidad	Volumetría
Acidez	Volumetría
Dureza total	Volumetría
Calcio mg/l	Volumetría
Magnesio mg/l	Volumetría
Cloruros mg/l	Volumetría
Sulfatos mg/l	Espectrofotometría
Nitratos mg/l	Espectrofotometría
Nitritos mg/l	Espectrofotometría
Hierro mg/l	Espectrofotometría
Fosfatos mg/l	Espectrofotometría
Amonio mg/l	Espectrofotometría
Sólidos totales	Gravimetría

ANEXO D

COMPOSICION DEL BHI

COMPOSICION	CANTIDAD
Infusión cerebro-corazón de ternera	12.5 g
Infusión corazón-bovino	5 g
Proteosa-peptona	10 g
Glucosa	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g

ANEXO E

COMPOSICION MEDIOS DE CULTIVO DISEÑADOS

MEDIO 1. 100% CONCENTRACION DE SALES

COMPOSICION	CANTIDAD
Extracto de levadura	3 g
Peptona bacteriológica	1.5 g
Extracto de carne	2 g
Glucosa	10 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
NH ₄ Cl	0.004 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	1.284 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.214 g
CaCO ₃	1.1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Para los elementos con mínimas concentraciones preparar una solución de 1000 ml de:

FeSO ₄ *7H ₂ O	0.199 g
NaNO ₂	0.331 g
NaNO ₃	1.919 g

Adicionar 1 ml de la solución al medio base. Ajustar el pH 6.5 con ácido clorhídrico. Esterilizar por 15 minutos a 21 libras de presión.

MEDIO 2. 50% CONCENTRACION DE SALES

COMPOSICION	CANTIDAD
Extracto de levadura	3 g
Peptona bacteriológica	1.5 g
Extracto de carne	2 g
Glucosa	10 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
NH ₄ Cl	0.002 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0.592 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.107 g
CaCO ₃	0.55 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Para los elementos con mínimas concentraciones preparar una solución de 1000 ml de:

FeSO ₄ *7H ₂ O	0.0995 g
NaNO ₂	0.1655 g
NaNO ₃	1.9595 g

Adicionar 1 ml de la solución al medio base. Ajustar el pH 6.5 con ácido clorhídrico. Esterilizar por 15 minutos a 21 libras de presión.

MEDIO 3. 25% CONCENTRACION DE SALES

COMPOSICION	CANTIDAD
Extracto de levadura	3 g
Peptona bacteriológica	1.5 g
Extracto de carne	2 g
Glucosa	10 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
NH ₄ Cl	0.001 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0.296 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.054 g
CaCO ₃	0.275 g
Agar	15 g

Agua destilada 1000 ml

Para los elementos con mínimas concentraciones preparar una solución de 1000 ml de:

FeSO ₄ *7H ₂ O	0.0995 g
NaNO ₂	0.1655 g
NaNO ₃	1.9595 g

Adicionar 1 ml de la solución al medio base. Ajustar el pH 6.5 con ácido clorhídrico. Esterilizar por 15 minutos a 21 libras de presión.

ANEXO F

MEDIO DISEÑADO CON ALMIDON COMO FUENTE DE CARBONO

COMPOSICION	CANTIDAD
Extracto de levadura	3 g
Peptona bacteriológica	1.5 g
Extracto de carne	2 g
Glucosa	10 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
NH ₄ Cl	0.002 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0.592 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.107 g
CaCO ₃	0.55 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Para los elementos con mínimas concentraciones preparar una solución de 1000 ml de:

FeSO ₄ *7H ₂ O	0.0995 g
NaNO ₂	0.1655 g
NaNO ₃	1.9595 g

Adicionar 1 ml de la solución al medio base. Ajustar el pH 6.5 con ácido clorhídrico. Esterilizar por 15 minutos a 21 libras de presión.