



DOI: <http://dx.doi.org/10.23857/dc.v6i3.1269>

Ciencias técnicas y aplicadas
Artículo de investigación

Determinación del Índice de Potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrotolerantes de las aguas termales de los Ilinizas

Determination of the lipolytic and proteolytic potency index in psychotropic bacteria from the Ilinizas hot springs

Determinação do índice de potência lipolítica e proteolítica em bactérias psicotrópicas das fontes termais de Ilinizas

Liliana Carlota Soria-Noroña ^I
liliana_soria_1994@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0761-4876>

Jocelyne Vanessa López-Almeida ^{II}
jocelyne.lopez.a@outlook.es
<https://orcid.org/0000-0002-7094-7131>

***Recibido:** 27 de abril de 2020 ***Aceptado:** 31 de mayo de 2020 *** Publicado:** 25 de junio de 2020

- I. Máster Universitario en Hidrología y Gestión de los Recursos Hídricos, Ingeniera en Biotecnología Ambiental, Instituto Superior Pedagógico Intercultural Bilingüe Ab. Martha Bucaram de Roldos, Ecuador.
- II. Ingeniera en Biotecnología Ambiental, Ecuador.

Resumen

En este trabajo de titulación tuvo como objetivo evaluar la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las Aguas Termales de los Ilinizas de la Provincia de Cotopaxi, para esto se tomaron tres muestras representativas de cada una de las cinco fuentes termales escogidas, además de una muestra compuesta para la preparación de medios de cultivo. Se analizó in situ el pH y la temperatura en cada punto de muestreo. Se procedió a sembrar en placas con medio PCA más agua destilada y más agua termal, realizando un recuento cada 24 horas de las colonias bacterianas inoculadas a 30°C. Se seleccionaron 48 colonias bacterianas y se repicaron hasta su estabilización (3 veces). Se realizaron pruebas enzimáticas de degradación en medios con PCA más leche descremada, PCA más mantequilla y PCA más aceite de oliva, los mismos que fueron preparados en agua termal y agua destilada, se identificaron aquellos aislados bacterianos capaces de degradar tributirina y caseína. Se procedió a determinar el índice de potencia enzimática tanto lipolítica como proteolítica de los aislados bacterianos identificados anteriormente, para esto se usaron los medios PCA mas leche descremada y mantequilla modificada. Se realizó tinción Gram en 69 clones bacterianos y se aislaron ocho clones representativos de cada fuente termal las cuales presentaron el mayor índice de potencia. Se emplearon pruebas bioquímicas para la identificación de los diez clones bacterianos aislados, los mismos que corresponden a los siguientes géneros: *Plesiomonas* y *Campylobacter*. Como recomendación en la toma de muestras se debe procurar no afectar el sitio o zona de muestreo con el fin de que cada muestra sea representativa del lugar.

Palabras claves: Biotecnología; lipolítica; proteolítica; fuentes termales; ilinizas; Cotopaxi (provincia).

Abstract

The objective of this titration work was to evaluate the lipolytic and proteolytic activity in bacteria from the Ilinizas Thermal Waters of the Province of Cotopaxi. For this, three representative samples were taken from each of the five hot springs chosen, in addition to a sample Composed for the preparation of culture media. PH and temperature were analyzed in situ at each sampling point. Plates with PCA medium plus distilled water and more thermal water were plated, making a count every 24 hours of the bacterial colonies inoculated at 30°C. 48 bacterial colonies were selected and planted until stabilized (3 times). Enzymatic degradation tests were performed in

media with PCA plus skim milk, PCA plus butter and PCA plus olive oil, the same that were prepared in thermal water and distilled water, those bacterial isolates capable of degrading tributyrin and casein were identified. The lipolytic and proteolytic enzymatic potency index of the previously identified bacterial isolates was determined, for this the PCA media plus skim milk and modified butter were used. Gram staining was performed in 69 bacterial clones and eight representative clones of each thermal source were isolated, which presented the highest potency index. Biochemical tests were used to identify the ten isolated bacterial clones, which correspond to the following genera: Plesiomonas and Campylobacter. As a recommendation in taking samples, care should be taken not to affect the sampling site or area so that each sample is representative of the place.

Keywords: Biotechnology; lipolytic; proteolytic; thermal sources; ilinizas; Cotopaxi (province).

Resumo

O objetivo deste trabalho de titulação foi avaliar a atividade lipolítica e proteolítica em bactérias das águas termais de Ilinizas, na província de Cotopaxi, para o qual foram coletadas três amostras representativas de cada uma das cinco fontes termais escolhidas, além de uma amostra Composto para a preparação de meios de cultura. O pH e a temperatura foram analisados in situ em cada ponto de amostragem. Placas com meio PCA mais água destilada e mais água termal foram semeadas, fazendo uma contagem a cada 24 horas das colônias bacterianas inoculadas a 30°C. 48 colônias bacterianas foram selecionadas e plantadas até estabilizar (3 vezes). Testes de degradação enzimática foram realizados em meio com PCA mais leite desnatado, PCA mais manteiga e PCA mais azeite, os mesmos que foram preparados em água termal e água destilada, foram identificados isolados bacterianos capazes de degradar tributirina e caseína. Foi determinado o índice de potência enzimática lipolítica e proteolítica dos isolados bacterianos previamente identificados, para isso foram utilizados os meios PCA mais leite desnatado e manteiga modificada. A coloração de Gram foi realizada em 69 clones bacterianos e foram isolados oito clones representativos de cada fonte térmica, os quais apresentaram o maior índice de potência. Testes bioquímicos foram utilizados para identificar os dez clones bacterianos isolados, que correspondem aos seguintes gêneros: Plesiomonas e Campylobacter. Como recomendação na coleta de amostras, deve-se tomar cuidado para não afetar o local ou a área de amostragem, para que cada amostra é representativa do local.

Palavras-chave: Biotecnología; lipolítico; proteolítico; fontes térmicas; ilinizas; Cotopaxi (provincia).

Introducción

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

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

Hasta la actualidad según Montaña et al., (2010: p. 16) se han descrito 45000 especies de bacterias, esto sugiere que los ecosistemas del planeta podrían contener una elevada diversidad microbiana aún no descubierta. Paladines mencionó que en el Ecuador se han documentado 167 manantiales de aguas termales y minerales; y, más de 1000 manantiales de agua fresca de montaña, ubicados principalmente en el callejón Interandino y alrededor de los grandes volcanes (Paladines citado en Carrión, 2014: p. 3).

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

El clima de alta montaña es un ambiente particular, a medida que se asciende la montaña la temperatura desciende, posee temperaturas que no superan los 15°C con precipitaciones anuales de 1000 mm., dentro de los ambientes de montaña se encuentran cuerpos de agua dulce donde se encuentran microorganismos que presentan adaptaciones propias a su entorno y pueden estar relacionados con la síntesis de productos naturales poco comunes (Cimera citado en Moreno, 2017: p 19)

Los extremófilos son organismos que no solamente sobreviven, sino que se desarrollan exitosamente en las condiciones más inhóspitas e impensables para la vida. Son organismos que

no sólo toleran y sobreviven a ciertas condiciones naturales extremas, sino que las requieren para poder crecer y multiplicarse (Ramírez, 2010: p. 57).

Los microorganismos psicrotolerantes presentan sus temperaturas óptimas de crecimiento entre 20°C y 40°C, pero crecen también a temperaturas bajas de hasta 0°C, este tipo de microorganismos están más distribuidos en la naturaleza y pueden ser aislados de climas templados también juegan un papel importante en el catabolismo e hidrólisis de los polisacáridos (Madigna citado en Moreno, 2017: pp. 22 - 24), produciendo algunos subproductos como parte de su metabolismo, estas enzimas psicrófilas se caracterizan por una alta eficiencia por debajo de los 40°C catalítica (Villata, 2013: p. 13-24).

Los extremófilos y sus enzimas tienen un importante potencial económico en diversas áreas, ya sea en aplicaciones directas para procesos de hidrólisis bajo condiciones extremas o como modelo biológico para mejorar las enzimas mesófilas optimizando sus propiedades y su estabilidad bajo condiciones distintas a las normales (Palacios, 2012: p. 8-11).

Las enzimas producidas por los microorganismos psicrotolerantes funcionan a manera óptima a bajas temperaturas debido a que presentan en su estructura secundaria mayor contenido de hélices alfa, menor cantidad de láminas beta y mayor cantidad de aminoácidos polares que las enzimas de organismos mesófilos, esta particularidad permite la flexibilidad de las enzimas para catalizar las reacciones metabólicas dentro de la célula. (Madigna citado en Moreno, 2017: pp. 22 - 24).

En los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes la búsqueda de nuevos bio-productos se ha enfocado en áreas como: enzimas para procesos industriales, bioremediación y otras tecnologías para el control de contaminación, ácidos grasos polinsaturados y proteínas anticongelantes (Palacios, 2012: p. 8-11).

Los psicrotolerantes tienen la capacidad de producir lipasas que funcionan eficientemente a bajas temperaturas. Las lipasas adaptadas a frío poseen características estructurales que les confieren un alto nivel de flexibilidad particularmente alrededor del sitio activo. (Palacios, 2012: p. 8-11)

Las proteasas adaptadas al frío tienen un importante valor comercial, debido a sus múltiples usos en los sectores industriales y bio-tecnológico, entre los que se destacan las aplicaciones en la industria de los detergentes, la industria de los alimentos, como biorremediadores, en la biotransformación y la biología molecular. (Falero. 2013: p. 12)

Las adaptaciones a nivel fisiológico y molecular a ambientes fríos permiten que la vida pueda prosperar, pueden presentar modificación de la membrana lipídica, síntesis de proteínas, síntesis de exopolisacáridos y síntesis de enzimas que trabajan a bajas temperaturas (Fullana citado en Moreno 2017: p 16)

Las aplicaciones potenciales de las enzimas provenientes de psicrófilos y psicrotolerantes, se encuentran en procesos tales como la hidrólisis de la lactosa en la leche utilizando galactosidasa, en el bio-pulido de productos textiles usando celulasas, en extracción y clarificación de jugos de frutas usando pectinasas, en el ablandamiento de la carne o la mejora de su sabor mediante el uso de proteasas, en el mejoramiento de las cualidades organolépticas de productos de panadería empleando amilasas, proteasas y xilanasas, en el ablandamiento de lana o en la limpieza de lentes de contacto empleando proteasas (Villata, 2013: pp. 13-24)

Por lo cual se propone como objetivo principal de la investigación: Determinar del índice de potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilinizas., que a su vez involucra los siguientes componentes: caracterizar físicamente el agua de las fuentes termales, aislar las colonias bacterianas, realizar pruebas enzimáticas, determinar el índice de potencia de la actividad e identificar las colonias bacterianas mediante pruebas bioquímicas y tinción Gram

Metodología

Lugar de muestreo

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

Se muestrearon 3 fuentes termales. Se tomó una muestra compuesta para cada fuente termal. Adicionalmente se tomó una muestra compuesta de 2 litros de todas las fuentes termales, esta muestra se utilizó para preparar los medios de cultivo con PCA.

Aislamiento, Selección y Estabilización

Se procedió a sembrar en superficie las muestras de las fuentes 1, 2 y 3 en placas Petri con medio PCA más agua termal (T) y más agua destilada (D) y se incubaron a 4°C por 48 h. Se realizó un recuento bacteriano.

Se seleccionaron 48 colonias bacterianas por tratamiento, las cuales se sembraron mediante el método de picadura en dos cajas Petri con PCA+T y PCA+D, cada tratamiento fue replicado. A continuación, se incubó las cajas Petri a 4°C y sus réplicas se sometieron a una temperatura de 30°C por 24 h. Se estabilizaron las réplicas al menos tres veces.

Pruebas de degradación enzimática

Se procedió a sembrar los 48 clones bacterianos estabilizados en cajas Petri con medio leche descremada (L) (Ramírez y Luna., 1996) y medio mantequilla modificado (M) teniendo tratamientos con agua destilada y agua termal. La composición del medio M se muestra a continuación:

Tabla 1: Composición del medio mantequilla modificado (M)

Composición	Cantidad/ 1 L
PCA	15 g
Mantequilla	10 g
Tween 80	10 ml

Realizado por: López, Jocelyne y Soria, Liliana, 2018.
Se incubaron los clones bacterianos a 30 °C por 24 h.

Determinación del Índice de potencia

Se sembraron mediante el método de picadura 16 aislados bacterianos en tres réplicas en placas Petri con medio L+T, L+D y M+T. Se incubaron a 35 °C por 24 h.

Se midió el halo de hidrólisis y el halo de cada aislado bacteriano y se determinó el índice de potencia enzimática mediante la siguiente ecuación (Herrera, 2003; Alane, 1996):

Ecuación 1. Índice de Potencia (IP)

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

Pruebas Bioquímicas y Tinción Gram

Se realizaron la técnica de tinción Gram y cinco pruebas bioquímicas a los dos aislados bacterianos.

Resultados y Discusión

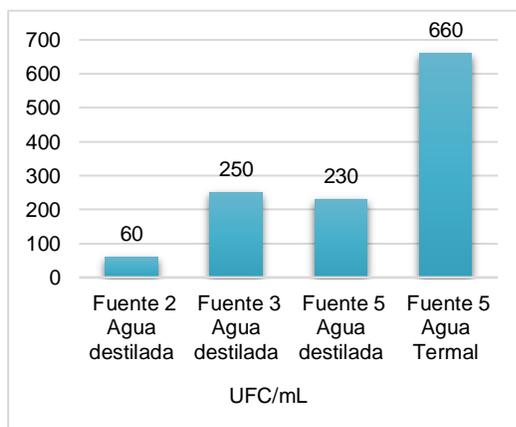
Recuento de las colonias bacterianas

Tabla 2: Recuento de las colonias bacterianas que crecieron a temperatura de 4 °C

$\frac{UFC}{mL}$	Fuente	Medio con
60	1	Agua destilada
250	2	Agua destilada
		Agua destilada
		Agua destilada
230	3	Agua destilada
		Agua destilada
		Agua destilada
660	3	Agua Termal
		Agua Termal

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

Gráfico 1: Unidades formadoras de colonia por mililitro vs fuente termal.



Determinación del índice de potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilnizas

En los tratamientos a 4°C, el mayor recuento bacteriano registrado corresponde al medio utilizado con agua termal en la fuente termal 3 siendo este de 660UFC/mL.

Según Carrión (2014: p. 67) la temperatura ambiente del lugar puede llegar hasta 0°C, además la fuente 3 identificada como una Cascada, exhibe la menor temperatura de todas las fuentes muestreadas a pesar de ser un agua termal, por lo que se justifica la presencia de microorganismos psicrótolerantes.

En comparación Moreno (2017: p. 45) en su estudio de caracterización de cepas bacterianas de la Laguna Amarilla perteneciente al nevado el Altar en la provincia de Chimborazo reporta 18 colonias bacterianas siendo menor al registrado en este estudio para la fuente termal 3 con un valor de 660UFC/mL

Pruebas de degradación

Los 48 aislados bacterianos mostraron actividad proteolítica y proteolítica en los medios L+D, L+T y M+T.

Determinación del índice de potencia de actividad enzimática

Tabla 3: Determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPAP) mostrado por los aislados bacterianos en el medio L+D.

Colonia	IP
1	1,73
2	2,17
3	2,01
4	1,00
5	3,17
6	1,67
7	1,89
8	1,89
9	1,89
10	1,00
11	2,17
12	2,45
13	1,24
14	2,06
15	2,97
16	1,23

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

El mayor IPAP observado es de 3,17 registrado en el aislado bacteriano 5. El menor IPAP se registra en el aislado bacteriano 10 con un valor de 1,00

Tabla 4: Aislados bacterianos que mostraron un IPAP mayor o igual a 2,00 en el tratamiento con AD

Colonia	\overline{IP}
2	2,17
3	2,01
5	3,17
11	2,17
12	2,45
14	2,06
15	2,97

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

De los 16 aislados bacterianos psicrótolerantes cinco muestran un IPAP mayor o igual a 2,00 lo que corresponde a un porcentaje de 31% del total de aislados.

Tabla 5: Determinación del IPAP mostrado por los aislados bacterianos en el medio L+T.

Colonia	\overline{IP}
1	1,66
2	1,56
3	3,86
4	1,00
5	2,41
6	3,00
7	2,89
8	1,00
9	2,55
10	2,49
11	2,72
12	2,52
13	2,25
14	2,27
15	2,43
16	2,39

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

El mayor IPAP observado es de 3,86 registrado en el aislado bacteriano 3. El menor IPAP se registra en el aislado bacteriano 8 con un valor de 1,00

Se concluye que el mayor IPAP registrado comparando los tratamientos con D y T es de 3,86 del aislado bacteriano 3, lo que concuerda con el apartado 3.2 Recuento de las colonias bacterianas donde se demostró que el uso del agua termal en la preparación de los medios favorece el crecimiento de los aislados bacterianos.

Determinación del índice de potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilinizas

En comparación con Domínguez (2014: p. 48), que reporta un IP de 1,9 a las 48 h y 32°C para la cepa *Bacillus licheniformis* aislada, el IPAP determinado para el aislado psicrótolerante 3 es mayor ya que este registro un valor de 3,86 valor doble del que reporta Domínguez en su investigación.

Tabla 6: Aislados bacterianos que poseen un IPAP mayor o igual a 2,00 en el tratamiento con agua termal

Colonia	IP
3	3,86
5	2,41
6	3,00
7	2,89
9	2,55
10	2,49
11	2,72
12	2,52
13	2,25
14	2,27
15	2,43
16	2,39

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

De los 16 aislados bacterianos psicrótolerantes doce muestran un IPAP mayor o igual a 2,00 lo que corresponde a un porcentaje de 75% del total de aislados.

Se concluye que el mayor porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPAP mayor o igual a 2,00, se registra en el tratamiento con agua destilada puesto que en este el 75% de los aislados exhiben tal IPAP.

Tabla 7: Determinación del índice de potencia de actividad lipolítica (IPAL) de los aislados bacterianos en medio

M+T

Colonia	IP
1	1,67
6	1,67
7	1,47
8	1,64
10	1,61
11	1,56
12	1,58
13	1,69
14	1,75
15	1,33
16	1,23

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

El mayor IPAL observado es de 1,75 registrado en el aislado bacteriano 15.

Se concluye que el mayor IP lipolítico y proteolítico registrado pertenece al aislado bacteriano psicrotolerante 11 el cual posee un valor de IPAL de 1,56 y de IPAP de 2,72.

En comparación con Pastuzo (2014: p. 52) el cual reporta un IPAL de 1,21 a los 6 días de crecimiento a 20°C para la cepa psicrotolerante UG - PA - 00 1, el valor registrado en este trabajo de investigación de 1,75 para el aislado bacteriano 15 es mucho mayor.

Tabla 8: Aislados bacterianos que poseen un IPAL mayor o igual a 1,50 por fuente termal en el tratamiento con agua termal

Colonia	IP
1	1,7
6	1,7
8	1,6
10	1,6
11	1,6
12	1,6
13	1,7
14	1,8

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

De los 16 aislados bacterianos psicrótolerantes ocho muestran un IPAP mayor o igual a 2,00 lo que corresponde a un porcentaje de 50% del total de aislados.

En comparación se concluye que el mayor porcentaje de aislados bacterianos que poseen un IPAP y IPAL mayor o igual a 2,00, se registra en los tratamientos con medio M+T correspondiendo a un 75% del total de aislados psicrótolerantes que exhiben un tal IPAP.

Identificación macroscópica y pruebas bioquímicas

Tabla 11: Identificación macroscópica y pruebas bioquímicas de los clones bacterianos aislados

Medio con	Agua termal	Agua Destilada
Aislado	10	1
Gram	-	-
Forma	Bacilos	Bacilos
Color	Crema	Crema
Tamaño(cm)	0,7	0,6
Manitol	+	-

Determinación del índice de potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilinizas

Catalasa	+	-
Urea	-/+	+
Glucosa	+	+
Lactosa	-	+
Sacarosa	-	+
SH ₂	-/+	+
Movilidad	+	+
Indol	-	-

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

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

Tabla 12: Género de los clones bacterianos aislados

Clon Bacteriano Aislado	Género
10	<i>Plesiomonas</i>
1	<i>Campylobacter</i>

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

El género *Plesiomonas* registrado en este trabajo en el grupo de psicrótolerantes, según estudios de Ponce et al, (2005: p. 2) posee actividad lipolítica y proteolítica, además en el estudio realizado por Rodríguez & Antillón (1989: pp. 1-5) se menciona que es un género propio del ambiente acuático. El género *Campylobacter* registrado en este trabajo en la fuente 3 y en el grupo de microorganismos psicrótolerantes, según estudios de Castrillón, Palma, & Macín, (2011: pp. 232-235) tiene actividad proteolítica, además Ruiz (2015: p. 31) menciona que son organismos que pertenecen a los medios acuáticos.

Conclusiones

El mayor recuento bacteriano psicrotolerante registrado de 660UFC/mL corresponde al tratamiento con agua termal en la fuente termal 3.

Determinación del índice de potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilinizas

El mayor IPAP es de 3,86 del aislado bacteriano 3 en el tratamiento con agua termal, siendo que el uso del agua termal en la preparación de los medios favoreció el crecimiento de los aislados bacterianos en concordancia con lo registrado en el recuento bacteriano.

El mayor IP lipolítico y proteolítico registrado pertenece al aislado bacteriano psicrotolerante 11 el cual posee un valor de IPAL de 1,56 y de IPAP de 2,72.

Se aislaron géneros bacterianos correspondientes a *Plesiomonas* y *Campylobacter*.

Referencias

1. Castrillón Rivera, Laura Estela; Palma Ramos, Alejandro; Macín Cabrera, Susana. “Papel de la lactoferrina en enfermedades periodontales”. Revista odontológica mexicana [en línea], 2011 (Ciudad de México- México), 15(4), pp. 231- 238. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-199X2011000400005&script=sci_arttext
2. Carrión Espín, Mayra Alejandra. Las aguas termales y su impacto en el desarrollo turístico de la parroquia San Juan de Pastocalle del cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Humanas y de la Educación. Ambato- Ecuador, 2014, p. 3. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6755/1/FCHE-TH-160.pdf>
3. Falero Evelyn. Identificación y caracterización de enzimas bacterianas de origen Antártico, con potencial aplicación biotecnológica. [en línea] (Tesis)(Maestría). Instituto de investigaciones biológicas Clemente Estable, Facultad de química, Ciudad de México– México, 2013, p.12. [Consulta: 04 junio 2018] Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/1538/1/uy24-16269.pdf>
4. Montañón N, Sandoval A. Camargo S, Sánchez J. “Los microorganismos: pequeños gigantes”. Revista Elementos [en línea], 2010 (Ciudad de México- México), 77(1), pp. 15-23. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf>
5. Moreno Ayala, Lourdes Verónica. Caracterización de cepas bacterianas de la laguna amarilla perteneciente al nevado El Altar en la provincia de Chimborazo. 2017. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7877/1/236T0302.pdf>

6. Oliart Ros, Manresa Presas Á. & Sánchez Otero M. “Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico.”, CienciaUAT, ., [en línea], 2016, (Victoria, México), 11(1), pp. 79-90. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582016000200079&script=sci_arttext#B3
7. Palacios Jaramillo. Diversidad de bacterias con actividad lipolítica en un cultivo enriquecido de suelo de páramo y glaciar del parque nacional natural los nevados. [en línea] (Tesis)(Maestría). Pontificia universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá – Colombia, 2012. Pp. 8 – 11, [Consulta: 04 junio 2018] Disponible en:Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co:8443/bitstream/handle/10554/11790/PalaciosJaramilloPao laAndrea2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
8. Pastuzo, Villalta; DAVID, José. Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile (Continente Antártico). 2014. Tesis de Licenciatura. Disponible en: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3917/1/Estudio%20polif%c3%a1sico%20de%20bacterias%20psic%c3%b3filas%20colectadas%20en%20la%20isla%20Greenwich%2c%20Bah%c3%ada%20Chile%20_Villalta%20Jose.pdf
9. Pascual Dominguez M. Aislamiento y purificación de metabolitos de (bacillus licheniformis y trichoderma harzianum) con potencial nematocida. [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad autónoma agraria antonio narro, Saltillo – México, 2013, p. 48, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1538/AISLAMIENTO%20Y%20PURIFICACION%20DE%20METABOLITOS%20DE%20%28Bacillus%20licheniformis%20y%20Trichoderma%20harzianum%29%20CON%20POTENCIAL%20NEMATICIDA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
10. Ponce C., Armenteros A., Villoch C, Montesdeoca N, & Carreras J. “Evaluación de riesgos microbiológicos y químicos de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda.”, Unidad de Análisis y Tendencias en Salud, La Habana, [en línea], 2005, (La Habana - Cuba), p.2, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/rtv0505.pdf

11. Ramírez S. “Las fronteras de la vida desde la perspectiva de los extremófilos” . Invento, la génesis de la cultura universitaria en Morelos [en línea], 2010, (Cambera - Australia) (11)., pp. 56-66. [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3235770.pdf>
12. Rodríguez, & Antillón . “Aeromonas spp. y Plesiomonas shigelloides en bivalvos, cieno y aguas del Golfo de Nicoya, Costa Rica”. Revista de biología tropical. [en línea], 1989, (San José- Costa Rica), pp. 1-5, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/23618/23820>
13. Ruiz M. Detección y caracterización de Campylobacter procedentes de animales, alimentos y agua residual. [en línea] (Tesis)(Maestría) Universidad complutense de madrid. Madrid-España, 2015, p. 31, [Consulta: 05 abril 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870199X2011000400005&script=sci_arttext
14. Villata J. Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile. [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, Guayaquil - Ecuador, 2013. pp. 13 – 24, [Consulta: 04 junio 2018] Disponible en: Obtenido http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3917/1/Estudio%20polif%C3%A1sico%20de%20bacterias%20psic%C3%B3filas%20colectadas%20en%20la%20isla%20Greenwich%2c%20Bah%C3%ADa%20Chile%20_Villalta%20Jose.pdf