



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS  
AISLADOS DE AGUA TERMAL DE  
CHIGNAHUAPAN, PUEBLA”**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

**DAVID ISRAEL RÍOS VÁZQUEZ**

Director de tesis:

**DRA. NORMA ELENA ROJAS RUÍZ**

Co Director:

**DR. ALEJANDRO CARABARIN LIMA**



**NOVIEMBRE 2019**

## *Agradecimientos*

Expreso mis más sinceros agradecimientos a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a la Facultad de Ciencias Biológicas por la calidad académica y humana brindada a mi formación profesional y personal, así como a la orientación y preocupación hacia los procesos académicos e institucionales correspondientes.

A la VIEP por su apoyo en el programa “Haciendo Ciencia en la BUAP Otoño IX” y por cubrir los gastos de hospedaje en mi participación en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica” realizado por la SMB (Sociedad Mexicana de Bioquímica).

A la Comisión Revisora y Jurado de Tesis conformados por el Dr. Candelario Vázquez Cruz y la Dra. María Cristina González Vázquez.

Especiales agradecimientos a mi asesora, Dra. Norma Elena Rojas Ruíz por los conocimientos y habilidades que logró transmitirme y por la calidez, paciencia y profesionalismo que tuvo para conmigo. De igual manera agradezco a mi co-asesor, Dr. Alejandro Carabarán Lima por sus atenciones y apoyo hacia este proyecto.

Infinitamente agradecido con mis padres, Ma. Elizabeth Vázquez Gutiérrez y David Ríos Flores debido a su constante apoyo en los aspectos económicos, familiares y personales, por ser mis primeros maestros en la vida, por tener confianza en que yo podría continuar estudiando, por la motivación que siempre implantaron en mí y por un sin fin de razones más que no me alcanzarían en describir en este documento. De igual manera quiero expresar mi enorme cariño por ustedes y por mis hermanas, Miriam Ríos Vázquez y Elizabeth Ríos Vázquez a quienes deseo y auguro mucho éxito en los caminos

personales y profesionales que elijan. Muchas gracias, sobre todo, por criar a seres humanos de bien.

Agradezco a mi hija Ximena Ríos García por ser mi motor para seguir adelante durante toda la carrera, por ser el motivo de continuar a pesar de las dificultades y por confiar todos los días en que puedo hacerme cargo de sus necesidades; este trabajo es dedicado especialmente para ella.

También agradezco a Ruth Abril Vela Sánchez por acompañarme todos estos años animándome y apoyándome en las clases, en el laboratorio y en lo personal. Te deseo lo mejor en tu porvenir ya que eres una persona fantástica que tuve la fortuna de conocer.

Por último, agradezco a todos los, familiares, compañeros, amistades y conocidos que han estado atentos a mi progreso, por sus palabras de aliento y por siempre creer en mí.

¡Muchas gracias a todos!

## RESUMEN

En el presente estudio se realizó el aislamiento e identificación de bacterias provenientes de agua termal de Chignahuapan, Puebla. Los aislados fueron identificados mediante técnicas microbiológicas y de biología molecular mediante la amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S el cual fue secuenciado. Las muestras de agua fueron captadas del manantial, los brotes y las albercas recreativas del balneario "Aguas Termales de Chignahuapan". La temperatura de estos puntos osciló entre los 38.7°C y 50°C. Se aislaron un total de 54 cepas, las cuales mostraron tolerancia a temperaturas más altas a las que los microorganismos mesófilos suelen crecer de manera óptima (a partir de los 45°C), por lo que estas bacterias son consideradas termófilas moderadas, en las pruebas de crecimiento con diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio, algunas resultaron ser halotolerantes, se realizaron pruebas bioquímicas, encontrándose cepas con actividad amilolítica. Para la identificación molecular de algunos aislados de interés se obtuvo ADN genómico total y se amplificó mediante PCR el gen que codifica para el ARNr 16S, las muestras fueron enviadas a secuenciar, las secuencias fueron analizadas mediante herramientas bioinformáticas, los resultados indicaron que algunos de los aislados pertenecían a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, la presencia de microorganismos patógenos oportunistas en el agua del balneario es un foco de alerta para las personas inmunocomprometidas que acuden a este centro recreativo.

## ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Microorganismos extremófilos .....	3
1.1.1 Microorganismos termófilos: Características y clasificación .....	4
1.2 Aguas termales .....	10
1.3 Aguas termales de Chignahuapan, Puebla .....	12
1.4 Microbiota de las aguas termales .....	16
2.- ANTECEDENTES .....	18
3.- JUSTIFICACIÓN .....	20
4.- OBJETIVOS .....	21
5.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
5.1 Microorganismos utilizados .....	23
5.2 Medios de cultivo y medios diferenciales .....	23
5.3 Recolección de muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla .....	24
5.4 Aislamiento de microorganismos presentes en agua de origen termal .....	26
5.5 Criopreservación de las cepas aisladas .....	27
5.6 Identificación de las cepas aisladas mediante tinción diferencial de Gram .....	27
5.7 Crecimiento microbiano a diferentes temperaturas .....	28
5.8 Pruebas de halotolerancia de las 54 cepas aisladas .....	29
5.9 Identificación molecular de cuatro cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla .....	29
5.10 Identificación bioquímica de las cepas aisladas .....	33
6.- RESULTADOS .....	39
6.1 Recolección de muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla .....	39
6.2 Aislamiento de microorganismos presentes en agua de origen termal .....	42
6.3 Identificación de las cepas aisladas mediante tinción diferencial de Gram .....	47
6.4 Crecimiento microbiano a diferentes temperaturas .....	49
6.5 Pruebas de halotolerancia de las 54 cepas aisladas .....	52
6.6 Identificación molecular de cuatro cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla .....	54
6.7 Identificación bioquímica de las cepas aisladas .....	56
7.- DISCUSIÓN .....	65

8.- CONCLUSIONES .....	69
9.- PERSPECTIVAS.....	70
10.- BIBLIOGRAFÍA .....	70
11.- ANEXOS .....	75
11.1 Tinciones de Gram de las cepas aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.....	75
11.2 Crecimiento de los 54 aislados a diferentes concentraciones de NaCl.....	76
11.3 Prueba de movilidad de los aislados en medio SIM.....	77
11.4 Prueba de asimilación del citrato en medio Citrato de Simmons .....	78
11.5 Prueba de hidrólisis de almidón en medio Agar-Almidón.....	78
11.6 Prueba de síntesis de pioverdina en medio King B.....	79

## 1.- INTRODUCCIÓN

Los microorganismos extremófilos son aquellos que poseen la capacidad de crecer, sobrevivir y proliferar de manera óptima bajo rangos fisicoquímicos extremos (temperatura, presión, pH, entre otros). Debido a sus peculiares vías metabólicas y biomoléculas adaptadas a ambientes extremos, estos microorganismos prosperan en hábitats hostiles e incluso letales para otros microorganismos (Rampelotto., 2013).

Los microorganismos termófilos representan el grupo más amplio de extremófilos, estos son capaces de crecer, sobrevivir y proliferar de manera óptima en condiciones de altas temperatura oscilando entre los 60°C y 80°C (Mehta *et al.*, 2016), aunque es posible encontrarlos a temperaturas que rebasan los 100°C (Ramírez., 2005). En general si la temperatura óptima del microorganismo es igual o superior a los 45°C se considera termófilo (Zeldes *et al.*, 2015). Existe una clasificación para estos microorganismos en base a los rangos de temperatura a los cuales sobreviven, que va desde los termófilos moderados hasta los hipertermófilos. Para sobrevivir en estas condiciones los microorganismos termófilos poseen una serie de factores clave en su capacidad de tolerar el calor como son: la alta permeabilidad de su membrana celular, estabilidad química de sus lípidos de membrana, mayor contenido de Guaninas y Citosinas (G + C) en sus moléculas de ARNr (ARN ribosomal) y ARNt (ARN de transferencia) que los mesófilos, presencia de proteínas termófilas con un mayor número de aminoácidos con carga positiva en su estructura (Mehta *et al.*, 2016) y la presencia de enzimas termoestables que participan en sus procesos metabólicos.

Es posible encontrar de manera natural a este tipo de microorganismos en áreas geotérmicas en donde existe un constante flujo de calor, siendo los manantiales de agua

termal los sitios más propicios para encontrar a estas formas de vida, aunque también pueden ser encontrados en suelo y aire. Este tipo de áreas se encuentran en muy pocos lugares del mundo en donde las condiciones ambientales son adecuadas para su existencia (Mohammad *et al.*, 2017) y muchas veces es complicado acceder a ellas.

La explotación de los manantiales de agua termal es cada vez más común en distintas partes del mundo, esto es debido al incremento en la conciencia de bienestar, cuidado personal y expectativas de estado físico de la población, por tal motivo los centros recreativos y terapéuticos que ofrecen aguas termales de origen natural son negocios cada vez más rentables (Valeriani *et al.*, 2018). Si bien, la mayoría de los microorganismos termófilos autóctonos de las aguas termales no suelen representar un riesgo para la salud, existen estudios que señalan la presencia de especies bacterianas patógenas autóctonas y alóctonas capaces de sobrevivir en ambientes termales, las cuales podrían comprometer la salud humana (De la Rosa y Mosso., 2000).

México es un país en el que, debido a su ubicación geográfica y a su vasta diversidad ambiental, existen diversos manantiales de agua termal, uno de ellos es el ubicado en el municipio de Chignahuapan, Puebla donde se encuentra un manantial cuya temperatura se ha reportado es de 50°C y cuya formación es debida a la fluctuación de agua subterránea magmática (Gutiérrez-Cirlos., 2010). El centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” ha convertido al manantial en la fuente que abastece sus albercas termales, las cuales son recomendadas por los locatarios y por los dueños del centro recreativo en procesos de exfoliación de la piel y desintoxicación del cuerpo además de ser ampliamente utilizadas como parte de distintas técnicas de balneoterapia destinadas al tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas y de la piel.



## 1.1 Microorganismos extremófilos

Si bien no todos los organismos extremófilos son procariotas o unicelulares, ya que existen organismos pluricelulares y eucariotas capaces de sobrevivir en ambientes extremos, la inmensa mayoría sí lo son. Las especies pertenecientes al dominio *Archaea* son las más abundantes, seguidas de aquellas pertenecientes al dominio *Bacteria*. El hecho de que los extremófilos puedan ser encontrados en los tres dominios de la vida, evoca al planteamiento de que las primeras formas de vida en la Tierra hayan sido extremófilas debido a las condiciones “hostiles” que predominaban en el planeta (Rampelotto., 2013).

El primero en acuñar el término extremófilo fue el investigador R.D MacElroy en 1974 en su documento llamado “*Some comments on the evolution of extremophiles*” (Horikoshi., 2011) en el que, entre otras cosas, señala que los extremófilos modernos son el resultado de la transferencia horizontal de material genético, mediante los mecanismos de conjugación, transducción y/o transformación, entre organismos primitivos adaptados a una gran variedad de ambientes extremos, lo que podría explicar por qué la mayoría de estas especies son poliextremófilas, es decir, que son capaces de habitar ambientes que contengan uno o más factores fisicoquímicos extremos. Esto indica que para estos organismos las condiciones extremas fueron y son completamente normales debido a los procesos de adaptabilidad que han experimentado a través del tiempo (Horikoshi., 2011).

Cabe mencionar que existen diferencias entre los organismos extremófilos y los organismos extremotolerantes. Por definición los organismos extremófilos son aquellos que necesitan de una o más condiciones extremas para crecer óptimamente, es decir

que no solamente toleran dichas condiciones sino que les son requeridas para sobrevivir y los organismos extremotolerantes son aquellos que toleran valores extremos de uno o más parámetros fisicoquímicos pero que pueden crecer óptimamente bajo condiciones normales (Rampelotto., 2013).

Por otro lado muchas especies pueden sobrevivir en condiciones extremas en estado latente pero no son capaces de crecer o reproducirse indefinidamente bajo estas condiciones (Horikoshi., 2011).

### **1.1.1 Microorganismos termófilos: Características y clasificación**

Los microorganismos capaces de crecer, sobrevivir y proliferar de manera óptima en ambientes con valores de temperatura iguales o mayores a los 45°C son llamados microorganismos termófilos (Zeldes *et al.*, 2015). Estas formas de vida capaces de habitar en ambientes con temperaturas cercanas a la ebullición fueron ampliamente descritas por el microbiólogo Thomas Brock en Junio de 1965 en la Universidad de Indiana (Seckbach *et al.*, 2013). Brock logró aislar bacterias de respiradores termales y de distintas zonas geotérmicas de Yellowstone National Park, pero quizá el primero en acuñar el término termófilo fue Pierre Miquel en 1879, quien lograra aislar microorganismos termófilos de muestras de agua del río Seine en París, Francia en las cuales observó especies pertenecientes al género *Bacillus spp* capaces de sobrevivir a 70°C (Phillips and Perry., 1976).

### **Características que favorecen la termofilia en las bacterias termófilas**

Como consecuencia de habitar en ambientes con temperaturas elevadas estos microorganismos han desarrollado una serie de características estructurales,

metabólicas y bioquímicas únicas las cuales les permiten sobrevivir a dichas condiciones. Los factores cruciales necesarios para que estos microorganismos habiten en ambientes con temperaturas extremas son los siguientes:

### **Características estructurales y metabólicas**

Las características estructurales de la membrana celular de los microorganismos termófilos enlistadas a continuación son cruciales para que dichos microorganismos logren llevar a cabo sus procesos metabólicos con eficiencia bajo condiciones de altas temperaturas.

Permeabilidad de la membrana celular: La membrana celular funge como barrera selectiva al flujo de entrada y salida de compuestos de bajo peso molecular. Las temperaturas elevadas incrementan la permeabilidad de la membrana por lo que el paso de protones hacia el interior celular es mayor, debido a esto las bacterias termófilas han adoptado mecanismos de bombas de sodio y altas velocidades de retorno de las bombas de protones, con la finalidad de lograr una mejor regulación. Lo anteriormente expuesto significa un mayor gasto energético que repercute directamente en su reproducción, ya que en comparación con las arqueas termófilas y otros microorganismos mesófilos, que presentan una permeabilidad más baja de su membrana celular, las bacterias termófilas muestran un ritmo de crecimiento más lento (Suárez *et al.*, 2004). Tal es el caso de *Geobacillus stearothermophilus*, bacteria cuya temperatura de crecimiento óptima es de 55°C y que presenta un ritmo de crecimiento más lento en comparación a las arqueas termófilas y especies mesófilas del género *Bacillus spp* debido al gran gasto energético que representan las altas velocidades de retorno de las bombas de protones de la cadena respiratoria de este microorganismo (Tolner *et al.*, 1997).

Presencia de lípidos termoestables en la membrana celular: También llamados lípidos termófilos, son aquellos que confieren estabilidad química a la membrana celular de los microorganismos termófilos. Son lípidos de cadenas largas con grupos acilos saturados (C-18–C-24 o más), que forman entre sí enlaces hidrófobos normalmente covalentes, los cuales se adecuan a altas temperaturas, dentro de ellos se encuentran lípidos de volumen, anulares y de enlace (Suárez *et al.*, 2004), éstos pertenecen a los denominados lípidos de éter (específicamente lípidos tetraéter a base de caldarqueol y arqueol cíclico), los cuales confieren rigidez a la membrana debido a que unen covalentemente a las láminas de la bicapa lipídica e incluso llegan a atravesarlas. El ácido graso que se ve mayormente incrementado en las bacterias termófilas es el ácido iso-pentadecanóico (Iso-C15) el cual, debido a la longitud de su cadena y a sus múltiples ramificaciones, confiere una mayor rigidez a la membrana plasmática lo que garantiza protección al contenido intracelular, evitando la desnaturalización del ADN por las altas temperaturas a las que estos microorganismos proliferan (Koga., 2012) .

Fluidez de la membrana celular: La presencia de lípidos de cadena larga y saturados incrementan la temperatura de transición de fase (Tolner *et al.*, 1997), por lo que la membrana conserva su fluidez y su estado líquido-cristalino incluso estando expuesta a altas temperaturas lo que facilita el desplazamiento de lípidos y proteínas favoreciendo el transporte de sustancias, la actividad enzimática y la transducción de señales.

### **Características bioquímicas**

Contenido de Guaninas y Citosinas: Biomoléculas como el ARNr y el ARNt de los microorganismos termófilos presentan un mayor contenido de Guaninas (G) y Citosinas (C) con respecto a los microorganismos mesófilos. El apareamiento de las bases

Guanina-Citosina involucra la formación de un enlace de hidrógeno más que el apareamiento de las bases Adenina-Timina (Mehta *et al.*, 2016), por lo que los ácidos nucleicos con mayor cantidad de G + C son más resistentes a la desnaturalización, ya que se requiere mayor energía para romper estos enlaces. Un ejemplo es *Thermus aquaticus* Y51MC23, cuya temperatura óptima es de 70-75°C (Datta and LiCata., 2003), y posee un contenido de G y C en sus cromosomas del 68% (Brumm *et al.*, 2015), mientras que el porcentaje de contenido de G y C de los cromosomas para *Escherichia coli* DH1, cuya temperatura óptima es 37°C, es del 50.8% (Lang *et al.*, 2009), sin embargo el alto contenido de G y C en los ácidos nucleicos de los microorganismos termófilos y su supuesta ventaja evolutiva en ambientes con altas temperaturas continúa en discusión.

Conformación de las proteínas: La región de superficie de las proteínas termófilas posee una mayor cantidad de aminoácidos con carga que de aminoácidos polares sin carga, los residuos de cargas opuestas de los primeros son capaces de formar un número mayor de interacciones electrostáticas (puentes salinos) (Mehta *et al.*, 2016), dichas interacciones proporcionan termoestabilidad, especificidad conformacional y oligomerización de las proteínas, generan mayor rigidez y disminuyen la energía libre lo que ayuda a prevenir daños al interior de las proteínas ya que estas se encuentran mayormente empaquetadas. Los puentes salinos se forman cuando dos grupos opuestamente cargados interactúan (en particular el ion catiónico del amonio del residuo del aminoácido básico y el ion carboxilato aniónico del residuo del aminoácido ácido). Estos puentes pueden generar redes de interacción con otras estructuras similares generando conformaciones geométricas rígidas (Lee *et al.*, 2014), lo cual

proporciona protección al sitio activo de las enzimas. Estas interacciones electrostáticas parecen tener mayor presencia en las proteínas de los organismos termófilos que en las proteínas de los organismos mesófilos, como lo muestra el estudio realizado por Lam *et al.*, 2011, en el cual compararon las superposiciones de estructuras cristalinas de las acilfosfatasas termófilas de *Pyrococcus horikoshii*, *Thermus thermophilus* y *Sulfolobus solfataricus*, las cuales presentan un enlace del tipo puente salino que confiere protección al sitio activo, y las superposiciones de estructuras cristalinas de las acilfosfatasas mesófilas de *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Drosophila melanogaster* y *Bacillus subtilis*, las cuales no presentan uniones por puentes salinos, comparación que es mostrada en la figura 1.1.1.

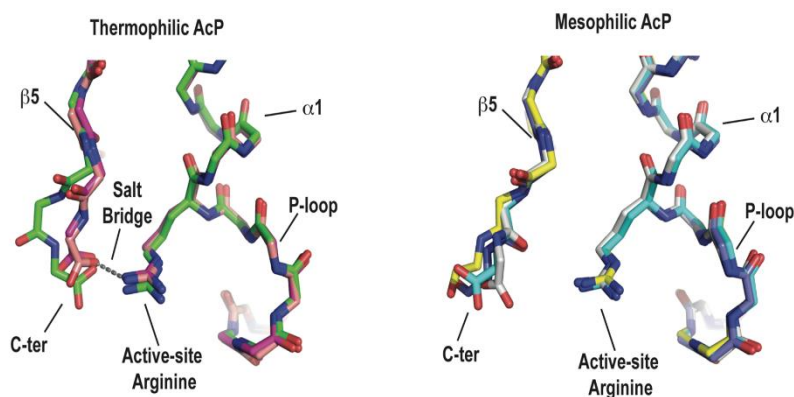


Figura 1.1.1 modificada de Lam *et al.*, 2011: Superposición de AcP's termófilas de *P. horikoshii* (verde), *T. thermophilus* (rosa) y *S. solfataricus* (magenta) (izquierda) y AcP's mesófilas de *H. sapiens* (blanco), *B. taurus* (cian), *D. melanogaster* (azul) y *B. subtilis* (amarillo) (derecha).

Otro tipo de conformaciones en la estructura proteica de los organismos termófilos son la presencia de un mayor número de puentes disulfuro, grados más altos de empaquetamiento hidrófobo en las regiones centrales, estructuras loop más cortas, una

mayor cantidad de residuos de valinas e isoleucinas (Rigoldi *et al.*, 2018) y un mayor número de elementos estructurales secundarios como  $\alpha$ -helices y láminas  $\beta$ -plegadas que las proteínas mesófilas (Chang *et al.*, 2004).

Las proteínas más importantes para los microorganismos termófilos son las enzimas termoestables o termoenzimas, las cuales son resistentes a la desnaturalización y proteólisis causadas por el aumento de la temperatura.

### **Clasificación de los microorganismos termófilos en base a su temperatura óptima de crecimiento**

Los microorganismos termófilos se pueden clasificar en base a los rangos de temperatura a los cuales son capaces de crecer de manera óptima, de ese modo se clasifican en termófilos moderados (aquellos que crecen óptimamente en temperaturas entre los 45-70°C), termófilos extremos (aquellos que crecen óptimamente a temperaturas mayores o iguales a los 70°C) e hipertermófilos (aquellos que crecen óptimamente a temperaturas mayores o iguales a los 80°C) (Zeldes *et al.*, 2015) como se muestra en la figura 1.1.2.

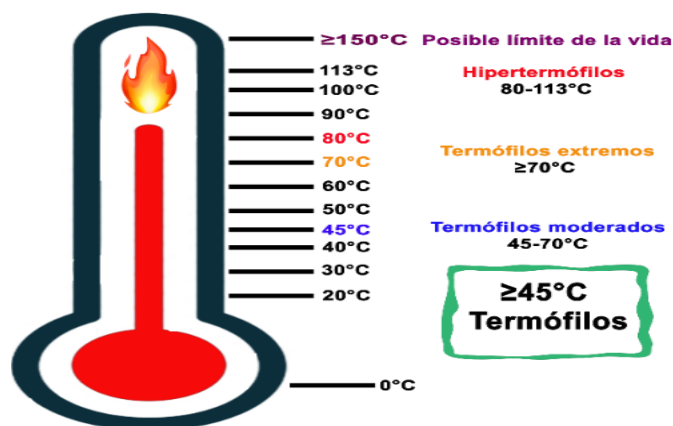


Figura 1.1.2 (Elaboración propia): Clasificación de los microorganismos termófilos en base a los rangos de temperatura óptima de crecimiento.

Por el momento los cultivos puros de hipertermófilos han llegado a crecer de manera óptima hasta los 110-113°C (Ramírez., 2005). Aún es desconocido cuál es la temperatura a la cual ningún organismo pudiera sobrevivir, es decir, se desconocen los límites de la vida, sin embargo, es probable que a temperaturas por encima de los 150°C la ruptura de los enlaces en las biomoléculas de los seres vivos sea inevitable (Ramírez., 2005).

## **1.2 Aguas termales**

Las aguas termales son aquellas aguas naturales con características de temperatura, composición química y origen particulares (Martínez., 2015), cuando estas aguas emergen del subsuelo pueden formar manantiales termales que alcanzan temperaturas que se acercan al punto de ebullición del agua (Pantoja., 2000) y de acuerdo a su origen se pueden clasificar en aguas magmáticas o telúricas, las primeras son aquellas que nacen en zonas volcánicas y que se encuentran en equilibrio con otros fluidos provenientes del magma, sus temperaturas son elevadas y en promedio superiores a los 50°C, generalmente suelen contener boro, fósforo, arsénico, bromo, cobre y nitrógeno (Ficosecco., 2001), mientras que las segundas pueden surgir de cualquier terreno, se forman cuando las corrientes subterráneas de agua rozan con rocas calientes durante su recorrido (PROFECO., 2006), su temperatura rara vez llega a los 50°C y generalmente suelen contener sales de cal y magnesio, cloruros, bicarbonatos, etc (Ficosecco., 2001). En la tabla 1.2.1 se muestra la clasificación de las aguas termales en base a su origen.



Tabla 1.2.1:

Clasificación de las aguas termales en base a su origen.

<b>Agua termal</b>	<b>Origen</b>	<b>Temperatura</b>
Magmática	Zonas volcánicas	Mayor a los 50°C
Telúrica	Cualquier terreno (roce con rocas calientes en el subsuelo)	Por debajo de los 50°C (rara vez alcanza los 50°C)

Otra manera de clasificarlas es mediante su composición, de esta manera puede haber manantiales de aguas termales cloruradas, sulfatadas, sulfuradas, bicarbonatadas, carbogaseosas, radioactivas y ferruginosas (PROFECO., 2006).

El agua natural es considerada termal de acuerdo a la temperatura que esta alcanza al momento de emerger, por lo que se estima que la diferencia de temperatura entre el agua termal con relación a la temperatura del ambiente debe ser superior a los 4-5°C. Schoeller en 1962 clasificó a las aguas en hipotermas, ortotermas e hipertermas, considerando la temperatura media anual del ambiente ( $T_{ma}$ ) y la temperatura del suelo ( $T_s$ ) en donde se encuentra el cuerpo de agua (Martínez., 2015) como se muestra en la tabla 1.2.2.

Tabla 1.2.2 modificada de Schoeller, 1962:

Clasificación de las aguas termales en base a su temperatura.

<b>Tipo de agua</b>	<b>Temperatura del agua (T) en relación a la T<sub>ma</sub></b>	<b>Temperatura del agua (T) en relación a la T<sub>s</sub></b>
Hipotermal	$T < T_{ma}$ por 4°C o menos	$T < T_s$ por 2°C o más
Ortotermal	$T = T_{ma}$	$T = T_s$
Hipertermal	$T > T_{ma}$ por 4°C o más	$T > T_s$ por 2°C o más

Nota: T es la temperatura del agua proveniente del cuerpo de agua, T<sub>ma</sub> es la temperatura media anual del ambiente y T<sub>s</sub> es la temperatura del suelo. Se suele asumir que las aguas hipotermas tienen temperaturas de 21-35°C, las ortotermas de 35-45°C y las hipertermas >45°C.

### 1.3 Aguas termales de Chignahuapan, Puebla

El municipio de Chignahuapan (cuyo significado en Náhuatl es “sobre los nueve ojos de agua”) ubicado al occidente de la región I de la Sierra Norte del Estado de Puebla y rodeado por complejos montañosos, zonas boscosas, cerros y barrancas y con una altitud de 2260 metros sobre el nivel del mar (INAFED., 1999), es bien conocido por la fabricación de sus tradicionales esferas navideñas, su clima frío que oscila en promedio entre los 5°C y los 24°C y que rara vez supera los 25°C y por su diversidad de cuerpos de agua entre los que destacan la Laguna de Chignahuapan, las Cascadas de Quetzalapan y las Aguas Termales de Chignahuapan. La ubicación del municipio de Chignahuapan, Puebla puede ser visualizada en la figura 1.3.1.



Figura 1.3.1 tomada de Wright *et al.*, 2012 p.p 74: Mapa del Estado de Puebla en donde se resalta en un círculo color rojo la ubicación del municipio de Chignahuapan. Coordenadas: 19°50'3" N 97°59'41" W

Las aguas termales de Chignahuapan son de origen magmático ya que provienen del complejo volcánico Tulancingo-Acocolco, el cual comprende desde el sureste de Tulancingo, Hidalgo hasta Acocolco, Puebla destacando dos calderas, la de Tulancingo y la de Acocolco, teniendo la primera más de 3 millones de años y un diámetro de 32 Km y la segunda con 1.7-0.9 millones de años de antigüedad aproximadamente y un diámetro de 18 Km, es en esta última donde se han encontrado indicios de recientes explosiones hidrotermales, lo que sugiere un origen magmático activo cuyos productos volcánicos pertenecen a la serie calco-alcalina, con composiciones de dacitas y riolitas (Díaz y González., 2016). Este complejo volcánico forma parte de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), que recorre desde Nayarit hasta Veracruz y la cual se sobrepone con la provincia de la Sierra Madre Oriental, que a su vez es paralela a la costa del Golfo de México (Martínez., 2015).

El centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” mostrado en la figura 1.3.2, ubicado en el barrio de Tenextla, es un destino turístico que representa uno de los principales valores socioeconómicos del municipio, ya que de este centro recreativo dependen las actividades, turísticas, hoteleras, gastronómicas, etc.



Figura 1.3.2: Centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan.”

Se estima que la temperatura promedio del manantial de agua termal, ubicado dentro del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan”, es de 50°C (Gutiérrez-Cirlos., 2010) por lo que de acuerdo con la clasificación de Schoeller son aguas hipertermales.

Según estudios realizados por el Instituto de Geología de la UNAM el hecho de que se hayan encontrado en las aguas termales de Chignahuapan elementos como el cloro, boro y litio indica la presencia de fluidos magmáticos (Gutiérrez-Cirlos., 2010). Los elementos que forman parte de la composición de estas aguas se presentan en la tabla 1.3.1.

Tabla 1.3.1 tomada de Hotel y Balneario Aguas Termales de Chignahuapan. (Sin Fecha). <https://www.termalchignahuapan.com.mx/es/>:

Elementos químicos y su concentración en mg/L identificados en los estudios de composición química del agua termal de Chignahuapan, Puebla.

<b>Elementos químicos</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
Sílice (SiO <sub>2</sub> )	11.2
Anión bicarbonato (HCO <sup>-3</sup> )	790.5
Cloro (Cl)	117.81
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	25.64
Boratos (BO <sub>3</sub> <sup>-3</sup> )	Huellas
Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	0.08
Hierro (Fe)	0.03
Manganeso (Mn)	0.03
Calcio (Ca)	191.89
Magnesio (Mg)	27.24
Sodio (Na)	107.32
Potasio (K)	12.24
Litio (Li)	Huellas
Fosfato de hidrógeno (HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	0.01

## 1.4 Microbiota de las aguas termales

Al conjunto de microorganismos que residen en un mismo nicho ecológico y que interactúan entre sí y con el ambiente se le denomina microbiota. Las aguas termales albergan su propia microbiota, la cual es diferente dependiendo del origen, composición y características fisicoquímicas del cuerpo de agua termal.

En los cuerpos de agua termal predominan de manera autóctona las bacterias heterótrofas oligotróficas seguidas de las autótrofas, especialmente aquellas quimiolitótrofas y fotótrofas, la mayoría son aerobios o anaerobios facultativos, poseen motilidad, son de tamaño pequeño, producen pigmentos y suelen ser Gram positivas (De la Rosa y Mosso., 2000).

De manera general los géneros bacterianos *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Micrococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *Enterobacter spp*, *Acinetobacter spp* y *Arthrobacter spp* son los más comunes (De la Rosa y Mosso., 2000). Las especies de *Bacillus spp* son las más numerosas y mayormente distribuidas en aguas termales mineromedicinales junto con las especies de *Micrococcus spp* y *Staphylococcus spp* debido a las altas concentraciones de sales que estas especies son capaces de tolerar (De la Rosa y Mosso., 2000).

Un ejemplo obligado cuando se habla de microorganismos de ambiente termal son los manantiales termales de Yellowstone National Park (YNP). Según la página oficial en internet de YNP, los filos bacterianos que predominan en sus aguas termales son: *Cyanobacteria*, *Chlorobi* (bacterias verdes del azufre), *Chloroflexi* (bacterias verdes no sulfúricas), *Aquificae* y *Deinococcus-Thermus* (Información recuperada del sitio web de

Yellowstone National Park: <https://www.nps.gov/yell/learn/nature/thermophilic-bacteria.htm>).

Por otro lado, se han identificado especies bacterianas patógenas en manantiales termales como lo son algunas especies sulfito reductoras del género *Clostridium spp* entre otros microorganismos coliformes, sin embargo, la presencia de la especie *Pseudomonas aeruginosa* llama mucho la atención ya que es un microorganismo no deseable en las aguas termales mineromedicinales, debido a que es considerado un patógeno oportunista capaz de producir infecciones en personas inmunocomprometidas (De la Rosa y Mosso., 2000).

*P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa con forma de bastón corto cuyo rango de temperatura de crecimiento es de 4°C a 42°C, es considerada una bacteria ubicua debido a su capacidad de sobrevivir en una gran variedad de ambientes, incluyendo aquellos con altas temperaturas, además de ser capaz de adaptarse a diferentes fuentes de nutrientes gracias a su extensa diversidad metabólica (LaBauve and Wargo., 2012).

La característica que más resalta en *P. aeruginosa* es su pigmentación verde la cual es debida a la producción de pioverdina, un sideróforo que cuenta en su composición con un cromóforo del tipo dihidroquinolina responsable de la fluorescencia de esta bacteria (Schalk., 2012), este pigmento ha sido asociado como factor de virulencia de *P. aeruginosa* debido a que forma parte importante en la ruta de adquisición de hierro en estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), un nutriente esencial para el crecimiento y la formación de biopelículas de este microorganismo., la pioverdina se une con gran afinidad al  $\text{Fe}^{3+}$ , por lo que *P. aeruginosa* es capaz de extraer este metal de las proteínas secuestradoras de hierro como la transferrina (Takase *et al.*, 2000).

## 2.- ANTECEDENTES

El uso de las aguas termales para fines terapéuticos tuvo sus inicios en las épocas de la antigua Grecia, donde los manantiales termales eran ampliamente utilizados para aliviar el dolor muscular y articular, así como para el tratamiento de enfermedades de la piel, posteriormente los romanos construyeron una gran cantidad de centros termales a los que denominaron SPA (“Sanus per Aquam”) dedicados a la balneoterapia, la relajación y socialización (Gianfaldoni *et al.*, 2017). Los centros recreativos y terapéuticos modernos ofrecen los mismos atractivos que los SPAs de la antigua Roma y son visitados frecuentemente por locatarios y turistas de todo el mundo debido a las propiedades terapéuticas que se les han atribuido a las aguas termales mineromedicinales.

En los estudios realizados por Lee *et al.*, 2016 se evaluó el efecto antiinflamatorio del agua termal proveniente del centro recreativo Deokgu en Corea del Sur cuya fuente es un manantial de agua termal de origen magmático, sus estudios concluyeron que la inmersión prolongada en estas aguas es recomendable para pacientes con dermatitis atópica, por otro lado, los estudios realizados por Krause *et al.*, 2015 mostraron una reducción del 1% de la unidad de hemoglobina glicada, por lo que recomiendan la exposición a aguas termales a pacientes con Diabetes mellitus tipo 2.

Sin embargo, existen estudios que revelan la presencia de microorganismos patógenos en los manantiales termales los cuales podrían comprometer la salud de quienes hacen uso de las aguas termales mineromedicinales, especialmente de aquellas personas inmunocomprometidas.



En la investigación realizada por Ghilamicael *et al.*, 2018 se expone la presencia de microorganismos patógenos en cinco diferentes manantiales termales ubicados en Eritrea, cuya temperatura osciló entre los 45°C y 60°C y los cuales son visitados constantemente por locatarios y turistas de todo el mundo, debido a que estos manantiales son promocionados como terapéuticos y recreacionales, además de que el agua de estos manantiales es embotellada para su venta., el género bacteriano predominante en los manantiales termales de Eritrea fue *Pseudomonas spp* y se destacó el aislamiento de otros patógenos como *Legionella pneumophila*, *Brucella melitensis* y *Brucella papionis*, por lo que se concluyó que la identificación de microorganismos patógenos provenientes de aguas termales en Eritrea debe ser un foco de alerta para quienes hacen uso terapéutico de las piscinas termales y que se necesita una mayor regulación y monitoreo de los recursos geotermales, además de mejores técnicas de desinfección debido a que se ha comprobado que los microorganismos patógenos poseen la capacidad de crecer y sobrevivir en los manantiales termales, por otro lado, los estudios realizados por Medina *et al.*, 2016 revelan la presencia de especies bacterianas de los géneros *Aeromonas spp*, *Brevundimonas spp* y *Pseudomonas spp* las cuales, además de ser microorganismos patógenos, presentaron resistencia a antibióticos, por lo que se concluyó que la exposición a aguas termales mineromedicinales no es recomendada para personas inmunocomprometidas como lo sugieren algunos estudios.

### 3.- JUSTIFICACIÓN

El centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” ofrece espacios destinados a la balneoterapia, cuyo principal atractivo es la utilización de agua termal proveniente del manantial ubicado dentro del recinto, por lo que se ha convertido en un espacio turístico prácticamente obligatorio para quienes visitan el municipio de Chignahuapan, Puebla.

El número de personas que buscan en las aguas termales un medio alternativo para tratar distintas enfermedades ha ido incrementando considerablemente en los últimos años, sin embargo, los estudios realizados por Ghilamicael *et al.*, 2018 y Medina *et al.*, 2016 han demostrado la presencia de microorganismos patógenos en las aguas termales mineromedicinales, por lo que la identificación mediante técnicas microbiológicas y de biología molecular de los microorganismos presentes en las aguas termales de Chignahuapan, Puebla es de gran importancia debido a que la exposición prolongada a las aguas termales podría resultar contraproducente para las personas con problemas de salud que acuden al centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” ya que en lugar de encontrar una solución a sus enfermedades pueden resultar infectadas por patógenos oportunistas, lo que agravaría significativamente sus condiciones de salud, especialmente en personas inmunocomprometidas.

Son escasos los estudios en los que se han identificado microorganismos patógenos en las aguas termales de México y no existe información acerca de la microbiota presente en las aguas termales de Chignahuapan, Puebla, factor que hace aún más significativo el presente trabajo.

## 4.- OBJETIVOS

### Objetivo general

Aislar e identificar bacterias provenientes de agua termal de Chignahuapan, Puebla mediante técnicas microbiológicas y de biología molecular, con el fin de determinar la presencia de microorganismos patógenos.

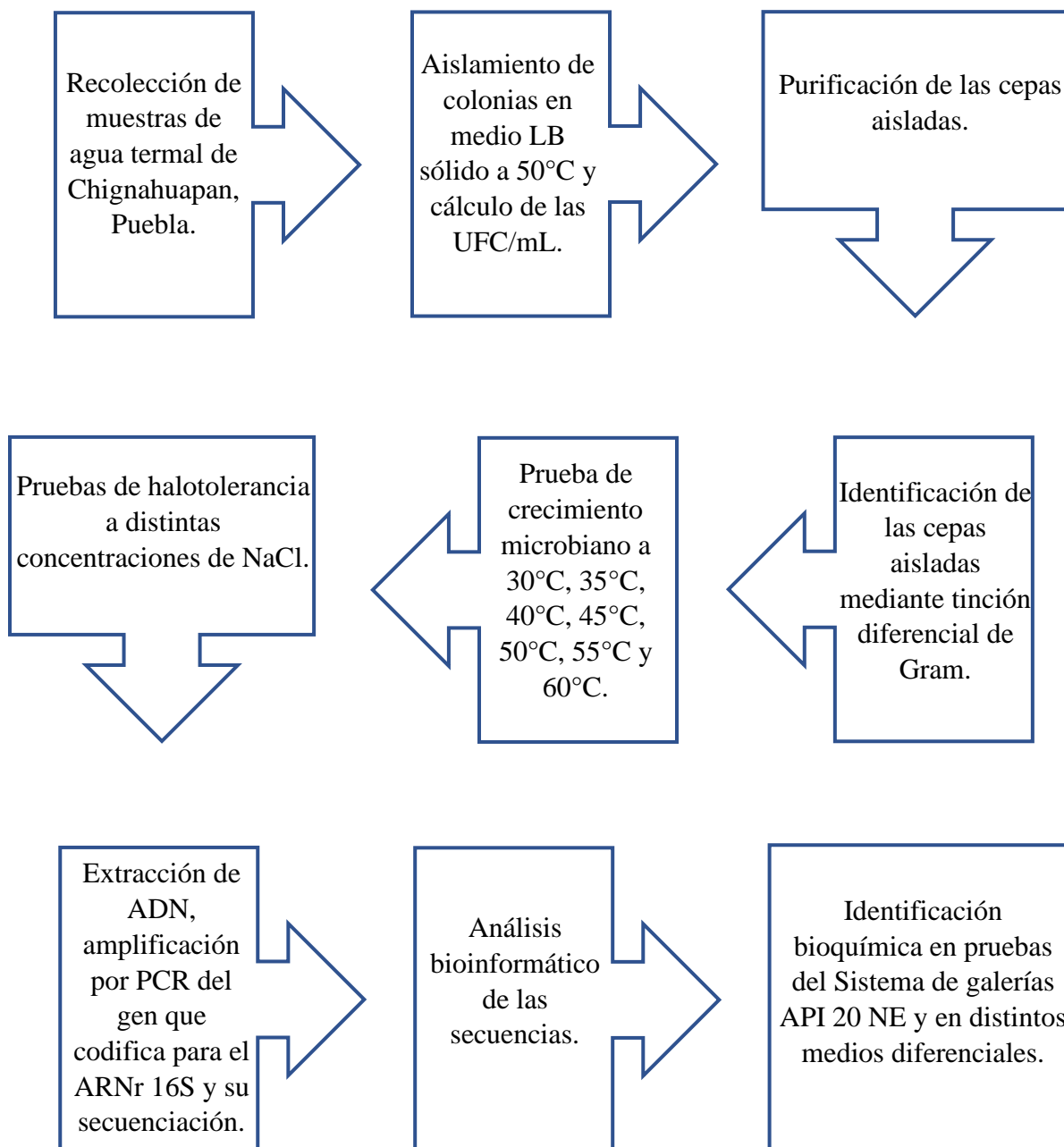
### Objetivos específicos

- Aislar bacterias de agua termal en las zonas de los brotes y albercas del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” en Chignahuapan, Puebla.
- Diferenciar y describir la morfología colonial de las bacterias aisladas de las aguas termales de Chignahuapan, Puebla.
- Identificar el tipo de Gram de los aislados mediante tinción diferencial de Gram.
- Evaluar la tolerancia de los aislados a valores de temperatura altos.
- Evaluar la tolerancia de los aislados a diferentes concentraciones de NaCl.
- Identificación molecular de algunos aislados de interés mediante la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.
- Identificación bioquímica de los microorganismos aislados de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

## 5.- MATERIALES Y MÉTODOS

### Metodología

El desarrollo de la metodología fue llevado a cabo como es indicado en el diagrama de trabajo presentado a continuación:



## 5.1 Microorganismos utilizados

En la tabla 5.1.1 se presentan las cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla, agrupadas de acuerdo con la pigmentación mostrada por las cepas, las cuales fueron utilizadas en este trabajo.

Tabla 5.1.1:

Cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla, agrupadas de acuerdo con la pigmentación presentada.

Cepa	Pigmentación
DBA01, DBA02, DBA03, DBA04, DBA05, DBA06, DBA07, DBA08, DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05, DBD06, DBD07, DBD08, DBD09, DBE01, DBE02, DBF01, DBF02, DBG01, DBG02, DAA01, DAA02, DAA03, DAA04, DAA05, DAA06, DAA07, DAA08, DAA09, DAA10, DAA11, DAA12, DAA13, DAC01, DAC02	Verde/Azul
DBC01, DBC02, DBC03, DBC04, DBC05, DBC06, DBC07, DBC08	Verde pálido
DAB01, DAB02, DAB03, DAB04	Blanca
DAB05, DAB06, DAB07, DAB08	Amarilla

## 5.2 Medios de cultivo y medios diferenciales

Para el aislamiento de los microorganismos provenientes de las muestras de agua termal, así como para el cultivo de las cepas en medios diferenciales que permitieran la realización de la identificación bioquímica se emplearon diversos medios que se enlistan a continuación:

**LB (Luria-Bertani):** Tipo de Medio de cultivo que fue utilizado de manera rutinaria para el aislamiento y crecimiento bacteriano en sólido y líquido.

**SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad):** Tipo de medio de cultivo semisólido especializado para la detección de la producción de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) e indol, así como de la movilidad.

**KIA (Kligler Hierro Agar):** Tipo de medio de cultivo sólido especializado para la detección de la fermentación de los carbohidratos glucosa y lactosa y la producción de gas.

**Citrato de Simmons:** Tipo de medio de cultivo sólido especializado para la determinación de la capacidad de las cepas aisladas para utilizar al citrato como fuente de carbono y energía.

**Caldo Urea de Stuart:** Tipo de medio de cultivo líquido especializado para la determinación de la presencia de la enzima ureasa.

**Agar-Almidón:** Tipo de medio de cultivo sólido especializado para la determinación de la presencia de la enzima amilasa.

**King B:** Tipo de medio de cultivo sólido especializado para la detección de síntesis de pioverdina (pigmento producido por *Pseudomonas aeruginosa*).

### **5.3 Recolección de muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla**

Se colectaron muestras de agua termal cuyos brotes pueden ser encontrados a lo largo de la barranca ubicada en el barrio de Tenextla y dentro del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” en el municipio de Chignahuapan, Puebla. Los brotes ubicados dentro del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” son utilizados para distribuir el agua termal del manantial, cuya temperatura es de  $50^{\circ}C$ , a

las albercas mediante tuberías metálicas, por lo que se colectó agua proveniente de las albercas las cuales se dividen en “terapéuticas” y “recreativas”, las primeras se encuentran en un espacio cerrado y el flujo de agua termal es constante mientras que las segundas se encuentran al aire libre y el flujo de agua termal no es constante.

En total fueron colectadas diez muestras representativas de agua termal de 10 mL cada una en tubos tipo Falcon estériles. Las primeras tres muestras provienen de diferentes brotes ubicados en la parte alta, media y baja de la barranca, mientras que las siguientes cuatro muestras provienen de los cuatro brotes ubicados dentro del centro recreativo, las tres muestras restantes provienen de las albercas más concurridas: dos de las muestras fueron colectadas de albercas “terapéuticas” y la última muestra fue colectada de una alberca “recreativa”, la toma de muestra se apegó a lo establecido en la Norma Mexicana NMX-AA-3-1980. Los parámetros de temperatura y pH fueron medidos en las distintas zonas de muestreo con el uso de un pH-metro portátil Jenco Vision Plus.

Las diez muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente y transportadas al laboratorio 402 de microbiología ubicado en el edificio Multiaulas 6 de la BUAP y se incubaron a 50°C y 150 r.p.m por 24 horas. Adicionalmente se tomó una muestra de 500 mL de agua termal proveniente del manantial de Chignahuapan, Puebla con el propósito de analizar las propiedades fisicoquímicas del agua.

El centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” otorgó el permiso para la toma de muestras de agua termal dentro del recinto. La recolección, transporte y almacenamiento de muestras se realizaron siguiendo la metodología descrita por Rojas *et al.*, 2016. No se utilizó medio de transporte o caldo nutritivo ni tampoco se realizó la

siembra inmediata de las muestras con el fin de aislar microorganismos con bajos requerimientos nutritivos adaptados a las condiciones de las aguas termales mineromedicinales (De la Rosa y Mosso., 2000).

#### **5.4 Aislamiento de microorganismos presentes en agua de origen termal**

El aislamiento de microorganismos de las muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla fue realizado de la siguiente manera:

En placas Petri con medio LB sólido se realizó un sembrado inoculando 100  $\mu$ L de agua de cada una de las muestras utilizando una espátula de Drigalsky (no se realizaron diluciones para la siembra). Las placas fueron incubadas a 28°C por 24 horas, debido a que no hubo crecimiento microbiano a 50°C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las colonias aisladas y se calcularon las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colonias por placa} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volúmen en mL de la muestra sembrada}}$$

Las colonias aisladas fueron sembradas por estría cruzada e incubadas a 28°C por 24 horas. Una vez obtenidas colonias puras estas fueron sembradas por estría en “cola de ratón” en medio LB sólido e incubadas, posteriormente fueron seleccionadas cinco cepas representantes de las morfologías aisladas, las cuales fueron sembradas en medio LB sólido por estría cruzada e incubadas a las mismas condiciones.



### **5.5 Criopreservación de las cepas aisladas**

El total de cepas aisladas fueron conservadas por ultracongelación de la siguiente manera:

A partir de un cultivo puro de 24 horas de incubación fue tomada una asada de cada una de las cepas aisladas la cual fue colocada en tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían 200  $\mu$ L de glicerol al 50% estéril, se resuspendió mediante el uso de vórtex y los tubos fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **5.6 Identificación de las cepas aisladas mediante tinción diferencial de Gram**

Las cepas aisladas fueron identificadas mediante tinción diferencial de Gram mediante el siguiente protocolo:

En un portaobjetos y bajo condiciones de esterilidad se colocó una gota de solución salina, se tomó una asada del cultivo, se realizó un frotis de la muestra y se fijó con calor, posteriormente se adicionó una gota de colorante cristal-violeta al 2%, se dejó actuar al colorante por 1 minuto y se realizó un lavado con agua destilada, posteriormente se colocaron unas gotas de Lugol al 5%, se dejó actuar por 30 segundos y se realizó un lavado con agua destilada, se adicionó una gota de alcohol-acetona en dilución 1:1, se dejó actuar por 15 segundos y se realizó un lavado con agua destilada, posteriormente se colocaron unas gotas de colorante de contraste safranina al 0.25% y se dejó actuar por 1 minuto, se realizó un lavado con agua destilada y finalmente las preparaciones se dejaron secar antes de visualizarlas al microscopio óptico de la marca Motic, empleando el objetivo 100x.

## 5.7 Crecimiento microbiano a diferentes temperaturas

Con la finalidad de determinar la tolerancia de los aislados a valores de temperatura altos se evaluó el crecimiento microbiano a las siguientes temperaturas: 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C y 60°C. Para este ensayo se seleccionó un representante de cada morfología.

El procedimiento para llevar a cabo la prueba de crecimiento fue el siguiente:

Las cepas seleccionadas fueron inoculadas en 50 mL de medio LB líquido en matraces Erlenmeyer de 100 mL y se incubaron a 28°C y 150 r.p.m por 24 horas, se realizaron diluciones seriadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  (llegando en algunos casos hasta  $10^{-12}$ ), fueron sembrados 20  $\mu$ L de las diluciones seriadas en placas Petri con medio LB sólido debido a que este volumen es fácilmente absorbido en el medio de cultivo, las placas Petri fueron incubadas a la temperatura correspondiente por 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se eligió la dilución a la cual el número de colonias fuera contable, se realizó la cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias de cada dilución mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = (\text{Número de colonias})(50)(\text{Factor de dilución})$$

Finalmente se determinó el logaritmo en base 10 de cada uno de los datos de UFC/mL y los resultados fueron graficados.

## **5.8 Pruebas de halotolerancia de las 54 cepas aisladas**

Con la finalidad de determinar la halotolerancia de las cepas aisladas se prepararon medios LB sólidos con las siguientes concentraciones de NaCl: 0.5M, 1 M, 1.5 M y 2 M.

Las cepas aisladas fueron inoculadas por estría “cola de ratón” en placas Petri con medio LB con las distintas concentraciones de NaCl y fueron incubadas a 28°C por 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se registraron los resultados de crecimiento de las cepas aisladas a las distintas concentraciones de NaCl.

## **5.9 Identificación molecular de cuatro cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla**

### Extracción de ADN genómico

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico por el método Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico de la siguiente manera:

A partir de cultivos en placa de 24 horas de incubación se tomó una colonia de cuatro de las cepas representantes de cada morfología la cual fue inoculada en tubos con 3 mL de medio LB líquido, los tubos fueron incubados a 30°C y 200 r.p.m por 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación el cultivo fue dividido en dos tubos Eppendorf los cuales fueron centrifugados a 12,000 r.p.m por 5 minutos, el sobrenadante fue decantado y los restos fueron removidos con la ayuda de una micropipeta, fueron añadidos 400 µL de buffer de lisis (Tris 50 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 50mM, NaCl 1M pH 8) y los tubos fueron sometidos a vórtex hasta resuspender, se agregaron 100 µg de lisozima a cada uno de los tubos con la punta de un palillo estéril, se llevó a cabo una homogenización por inversión suave y se dejaron incubar a 37°C por 30 minutos,

transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 22  $\mu\text{L}$  de SDS al 20% y los tubos fueron homogeneizados por inversión suave, se agregó un volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico en dilución 25:24:1 a cada uno de los tubos, los cuales fueron homogeneizados por inversión suave y centrifugados a 12,000 r.p.m por 10 minutos, las fases acuosas de cada uno de los tubos fueron separadas de la fase orgánica con ayuda de una micropipeta con la punta recortada y transferidas a nuevos tubos, se agregó un volumen de cloroformo a cada tubo, fueron sometidos a vórtex y se centrifugaron a 12,000 r.p.m por 10 minutos, las fases acuosas de cada uno de los tubos fueron separadas y transferidas a tubos nuevos, se añadieron a cada uno de los tubos un 10% de volumen de acetato de sodio 3M pH 7 y se homogeneizaron por inversión suave, se añadió a cada tubo un volumen de etanol absoluto frío y se dejó precipitar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, transcurrido el tiempo de precipitación los tubos fueron centrifugados a 12,000 r.p.m por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%, los tubos fueron homogeneizados por inversión suave y centrifugados a 12,000 r.p.m por 10 minutos, se decantó el sobrenadante, los tubos se dejaron secar en posición invertida a temperatura ambiente y finalmente el ADN genómico de cada tubo fue resuspendido en 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril y fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se realizó una electroforesis para visualizar el ADN genómico en un gel de agarosa al 0.8%, el cual fue teñido con 1  $\mu\text{L}$  de agente intercalante Smartglow Loading Dye y se utilizó el marcador de peso molecular 1KB Plus DNA Ladder, finalmente el ADN genómico fue visualizado en un transiluminador Maestrogene.

### Amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S

Para la identificación molecular de las cepas seleccionadas se amplificó por PCR el gen que codifica para el ARNr 16S, para lo cual se prepararon mezclas de reacciones de acuerdo con lo que se presenta en la tabla 5.9.1.

Tabla 5.9.1:

Componentes para la reacción de PCR de 25  $\mu$ L.

<b>Componente</b>	<b>Reacción de 25 <math>\mu</math>L</b>
Taq Buffer Accuris con magnesio ( $Mg^{2+}$ )	1X
dNTP's	1 mM
Primer TXBA 1 (Forward)	400 nM
Primer TXBA 101 (Reverse)	400 nM
Taq polimerasa Accuris	1 unidad/25 $\mu$ L

Se adicionaron 1  $\mu$ L de ADN genómico y agua estéril hasta completar el volumen de la reacción.

Los oligonucleótidos empleados son de tipo universal para el gen ARNr 16S, fueron sintetizados y previamente utilizados por Pérez, V *et al.*, 2014 y tenían las siguientes secuencias:

TXBA1: 5'AGAGTTTGATCATGGCTCA3'

TXBA 101: 5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3'.

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94°C por 1:30 minutos, hibridación a 55°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 2 minutos. En total fueron realizados 25 ciclos de PCR.

Finalizada la amplificación por PCR se llevó a cabo una electroforesis para visualizar los productos amplificados del gen que codifica para el ARNr 16S.

#### Purificación por columna de los productos de PCR

Con la finalidad de enviar a secuenciar los amplificados por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S se realizó la purificación de los productos de amplificación mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA siguiendo las especificaciones del proveedor.

#### Secuenciación y análisis bioinformático

Los fragmentos purificados fueron enviados a secuenciar al laboratorio de LANGEBIO del CINVESTAV.

Con la finalidad de identificar molecularmente a las cuatro cepas representantes se realizó el análisis bioinformático de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S mediante su alineamiento con otras secuencias en la base de datos del GenBank de NCBI utilizando la herramienta BLASTn (BLAST nucleotide) con el propósito de seleccionar aquellas con mayor homología a las secuencias de las cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

## 5.10 Identificación bioquímica de las cepas aisladas

### Pruebas bioquímicas realizadas a las cinco cepas representativas de las morfologías aisladas

Con el propósito de complementar la información obtenida de la identificación molecular, se realizaron pruebas bioquímicas en el sistema de galerías API (Analytical Profile Index) de bioMérieux para la identificación de no enterobacterias (API 20 NE), así como pruebas de movilidad en medio SIM para las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

Los procedimientos llevados a cabo para las pruebas bioquímicas en el sistema de galerías API 20 NE y la prueba de movilidad en medio SIM son descritos a continuación:

#### Pruebas bioquímicas en sistema de galerías API 20 NE

El procedimiento para llevar a cabo las pruebas bioquímicas en el sistema de galerías API 20 NE para los aislados consistió en tomar una colonia de la cepa representativa correspondiente a partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación y preparar una suspensión del microorganismo en tubos de cultivo con solución salina al 0.8% hasta obtener una turbidez equivalente al valor de 1 en la escala de McFarland, posteriormente los microtubos del sistema de galerías API 20 NE correspondientes a las pruebas de producción de indol (TRP), fermentación de glucosa (GLU), hidrólisis de urea (URE) e hidrólisis de gelatina (GEL) fueron llenados hasta la cúpula con la suspensión del microorganismo correspondiente con ayuda de una micropipeta, posteriormente las galerías API 20 NE fueron cerradas e incubadas a 29°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron los resultados y se compararon con la tabla de

identificación proporcionada en el manual del sistema de galerías API 20 NE presentada en la tabla 5.10.1.

Tabla 5.10.1 modificada de bioMérieux, 2003 p.p 4:

Indicadores negativos y positivos de las pruebas realizadas en el sistema de galeríasAPI 20 NE.

<b>Prueba</b>	<b>Resultados</b>	
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
TRP	Sin coloración, verde pálido/amarillo	Coloración rosa
<u>GLU</u>	Coloración de azul a verde	Coloración amarilla
<u>URE</u>	Coloración amarilla	Coloración naranja/rosa/rojo
GEL	Sin difusión de pigmento	Difusión de pigmento negro

### Prueba de movilidad en medio SIM

El procedimiento para llevar a cabo las pruebas de movilidad en medio SIM para los aislados consistió en tomar una colonia de la cepa representativa correspondiente a partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación e inocularla en el centro de las placas Petri con medio SIM, las cuales fueron incubadas y monitoreadas a las 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación correspondiente se observó si se había producido un halo de movilidad más allá de la zona de siembra. Los métodos de siembra e interpretación de los resultados se realizaron de acuerdo con la metodología planteada por Morales-Soto *et al.*, 2015. El tipo de movilidad evaluado en esta prueba fue Swarming y los halos producidos fueron medidos mediante el programa Photo Measure.



## **Pruebas bioquímicas realizadas a las 54 cepas aisladas**

Para la identificación bioquímica de las 54 cepas aisladas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

### Prueba de fermentación de carbohidratos en medio KIA

Con la finalidad de determinar la fermentación de los carbohidratos glucosa y lactosa y la producción de gas de los aislados se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación se tomó una colonia, la cual fue inoculada por picadura en tubos de cultivo que contenían el medio KIA en pico de flauta, los tubos fueron incubados a 35°C y monitoreados a las 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la coloración de la superficie y el fondo del medio causada por la acidificación y/o alcalinización de estas zonas.

### Prueba de catalasa

Con la finalidad de determinar la presencia de la enzima catalasa en los aislados se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación se tomó una colonia la cual fue resuspendida en agua destilada estéril sobre un portaobjetos, posteriormente se agregó una gota de agua oxigenada y se observó si se producía un burbujeo (indicativo de que el microorganismo es positivo a la prueba).

### Prueba de Indol-H<sub>2</sub>S-Movilidad en medio SIM

Con la finalidad de determinar la producción de indol y H<sub>2</sub>S, así como la movilidad de los aislados, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación se tomó una colonia la cual fue inoculada por picadura en tubos de cultivo que contenían medio SIM, los tubos fueron incubados a 35°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observó si se había producido el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de siembra (indicativo de que el microorganismo es positivo a la producción de H<sub>2</sub>S), posteriormente se agregaron 5 gotas de reactivo de Ehrlich a los tubos y se observó si se producía una coloración rojiza en la superficie del medio (indicativo de que el microorganismo es positivo a la producción de indol).

Para la prueba de movilidad las colonias fueron inoculadas en el centro de una sección delimitada en placas Petri con medio SIM, las cuales fueron incubadas a 35°C y monitoreadas a las 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observó si se había producido un halo de movilidad más allá de la zona de siembra. Este ensayo se realizó en placa y no en tubo con la finalidad de conseguir una apreciación más clara del movimiento de las distintas cepas. Los métodos de siembra e interpretación de los resultados se realizaron de acuerdo con la metodología planteada por Morales-Soto *et al.*, 2015. El tipo de movilidad evaluado en esta prueba fue Swarming.

### Prueba de asimilación de citrato en medio Citrato de Simmons

Con la finalidad de determinar si los aislados poseen la capacidad de utilizar al citrato como fuente de carbono y energía se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación se tomó una colonia la cual fue sembrada en línea vertical en una sección delimitada en placas Petri con medio Citrato de Simmons las cuales fueron incubadas a 35°C y fueron monitoreadas a las 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observó si se había producido crecimiento microbiano y/o un cambio de coloración de verde a azul a lo largo de la línea de siembra (indicativo de que el microorganismo es positivo a la prueba).

La prueba se llevó a cabo en placas Petri como alternativa al método tradicional en tubo y se llevó a cabo de acuerdo a lo señalado en la página web de Thermo Fisher: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0155B#/CM0155B>

### Prueba de Ureasa en medio Caldo Urea de Stuart

Con la finalidad de determinar la capacidad de los aislados de hidrolizar la urea se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación se tomó una colonia la cual fue inoculada en tubos de cultivo que contenían el medio Caldo Urea de Stuart, los tubos fueron agitados manualmente e incubados a 37°C. Los tubos fueron observados a las 24, 48 y 72 horas de incubación con el propósito de identificar un cambio de coloración en el medio de naranja a rosa (indicativo de que el microorganismo es positivo a la prueba).

### Prueba de hidrólisis de almidón en medio Agar-Almidón

Con la finalidad de determinar la capacidad de los aislados para hidrolizar el almidón se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación se tomó una colonia la cual fue sembrada en línea vertical en una sección delimitada en placas Petri con medio Agar-Almidón, las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó lugol el cual fue esparcido por toda la superficie de las placas lo que dio como resultado una coloración violeta-azul oscuro producto de la inclusión del yodo entre las moléculas del almidón, se eliminó el exceso de lugol y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente y monitoreadas a las 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observó si existía aclaramiento alrededor de las zonas de siembra (indicativo de que el microorganismo es positivo a la prueba).

### Prueba de síntesis de pioverdina en medio King B

Con la finalidad de identificar la síntesis de pioverdina, pigmento producido por *P. aeruginosa*, de los aislados se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de cultivos en medio LB sólido de 24 horas de incubación se tomó una colonia la cual fue sembrada en estría “cola de ratón” en placas Petri con medio King B, las placas fueron incubadas a 30°C por 48 horas como lo indica el protocolo recomendado por el proveedor Bio-Rad. Transcurrido el tiempo de incubación se observó si se producía un color verde fluorescente en la zona de siembra (indicativo de que el microorganismo es positivo a la prueba), posteriormente las placas fueron expuestas al transiluminador y se observó la fluorescencia del pigmento.

## 6.- RESULTADOS

### 6.1 Recolección de muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla

Se colectaron diez muestras representativas de agua termal en distintos puntos del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan”, en la tabla 6.1.1 se muestran las zonas de muestreo, así como los valores de temperatura y pH correspondientes.

Tabla 6.1.1:

Muestras colectadas de agua termal de Chignahuapan, Puebla, zona de muestreo y sus respectivos valores de temperatura y pH.

<b>Muestras (10 mL)</b>	<b>Zona de muestreo</b>	<b>Temperatura (°C) del agua de la zona de muestreo</b>	<b>pH del agua de la zona de muestreo</b>
MBA	Brote de agua A de la barranca de Tenextla	45.7	5.90
MBB	Brote de agua B de la barranca de Tenextla	45.9	5.93
MBC	Brote de agua C de la barranca de Tenextla	45.7	5.93
MBD	Brote de agua D dentro del centro recreativo	45.6	5.91
MBE	Brote de agua E dentro del centro recreativo	45.5	5.93
MBF	Brote de agua F dentro del centro recreativo	46.1	5.93
MBG	Brote de agua G dentro del centro recreativo	45.7	5.91
MAA	Alberca terapéutica A	45.2	6.24
MAB	Alberca recreativa B	38.7	7.21
MAC	Alberca terapéutica C	45.3	6.60

La zona de muestreo de agua con la temperatura más alta registrada es la del “Brote F” ubicado dentro del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” cuya temperatura fue de 46.1°C y con un valor de pH de 5.93, mientras que la zona de muestreo de agua con la temperatura más baja registrada es la “Alberca Recreativa B” cuya temperatura fue de 38.7°C y con un valor de pH de 7.21.

El agua recorre la barranca de Tenextla y tras su descenso forma el manantial de agua termal de Chignahuapan, Puebla el cual se presenta en la figura 6.1.1.



Figura 6.1.1: Manantial de agua termal de Chignahuapan, Puebla ubicado dentro del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan”.

Los valores de temperatura y pH del manantial fueron registrados en el momento de la toma de muestra y fueron de 50°C y 6.0 respectivamente. El valor de la temperatura coincide con lo reportado previamente por Gutiérrez-Cirlos., 2010 en su tesis de licenciatura, donde reporta una temperatura constante de 50°C del manantial durante épocas secas.

Los resultados del análisis fisicoquímico de la muestra de agua termal proveniente del manantial son presentados en la tabla 6.1.2.

Tabla 6.1.2:

Valores de los parámetros fisicoquímicos analizados del agua termal del manantial de Chignahuapan, Puebla.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Calidad*</b>	<b>MÉTODO</b>
pH	7.02	Normal	NMX-AA-008
Conductividad eléctrica dS m <sup>-1</sup>	1.52	Media	Conductímetro
Calcio (Ca <sup>2+</sup> mg l <sup>-1</sup> )	203.1	Mala	Método EDTA
Magnesio (Mg <sup>2+</sup> mg l <sup>-1</sup> )	33.2	Buena	Método EDTA
Sodio (Na <sup>+</sup> mg l <sup>-1</sup> )	102.0	Media	Flamometría
Potasio (K <sup>+</sup> mg l <sup>-1</sup> )	14.6	Sin restricción	Flamometría
Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	16.9	Buena	NMX-AA-079
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	25.6	Sin restricción	NMX-AA-074
Fosfatos (PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	4.2	Media	NMX-AA-029
Carbonatos (CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	0		Volumetría
Bicarbonatos (HCO <sub>3</sub> <sup>-1</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	780.8	Mala	Volumetría
Cloruros (Cl <sup>-1</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	196.0	Media	NMX-AA-073

\*(JONES Y WOLF, 1984)

Los valores de los parámetros de bicarbonatos, cloruros, sulfatos, calcio, magnesio, sodio y potasio obtenidos tras el análisis fisicoquímico del agua termal del manantial resultaron ser similares a los valores obtenidos por el Instituto de Geología de la UNAM

presentados en la tabla 1.3.1, mientras que los valores de nitratos y fosfatos resultaron ser más altos que los reportados por el Instituto de Geología de la UNAM.

## 6.2 Aislamiento de microorganismos presentes en agua de origen termal

Al realizar el aislamiento de los microorganismos presentes en las muestras de agua termal se encontró que a una temperatura de incubación de 50°C el número de colonias era muy bajo, con respecto a otras muestras ambientales, por lo cual las muestras fueron mantenidas a una temperatura de 28°C. Los valores de UFC/mL de cada muestra son presentados en la tabla 6.2.1.

Tabla 6.2.1:

Número de colonias y valores de UFC/mL de las muestras colectadas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

<b>Muestra de agua</b>	<b>UFC/mL</b>
MBA	$2.7 \times 10^2$
MBB	0
MBC	$7.7 \times 10^2$
MBD	$2.7 \times 10^2$
MBE	$8.6 \times 10^2$
MBF	$1.08 \times 10^3$
MBG	$7.8 \times 10^2$
MAA	$1.5 \times 10^3$
MAB	$1.13 \times 10^3$
MAC	$1.83 \times 10^3$

La muestra con mayor cantidad de colonias fue MAC cuyo valor de UFC/mL fue de  $1.83 \times 10^3$ . La zona de muestreo de donde proviene la muestra MAC es la “Alberca Terapéutica C”, cuya temperatura fue registrada de 45.3°C y cuyo valor de pH fue de 6.60, es la alberca más cercana a la zona del manantial de agua termal, por lo que es la primera en recibir el flujo de agua.



Las muestras con menor cantidad de colonias fueron MBA y MBD cuyo valor de UFC/mL fue de  $2.7 \times 10^2$ . Las zonas de muestreo de donde provienen las muestras MBA y MBD fueron el “Brote A”, ubicado en la parte más alta de la barranca de Tenextla, cuya temperatura fue registrada de  $45.7^\circ\text{C}$  y cuyo valor de pH fue de 5.90, y el “Brote D”, ubicado dentro del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” cuya temperatura fue registrada de  $45.6^\circ\text{C}$  y cuyo valor de pH fue de 5.91, respectivamente.

Cabe destacar que no hubo crecimiento de colonias de la muestra MBB cuya zona de muestreo fue el “Brote B” el cual se ubica en la parte más alta de la barranca de Tenextla. La temperatura registrada en esta zona fue de  $45.9^\circ\text{C}$  y el valor de pH fue de 5.93.

La comparativa de los valores de UFC/mL entre las distintas muestras de agua termal es presentada en la figura 6.2.1.

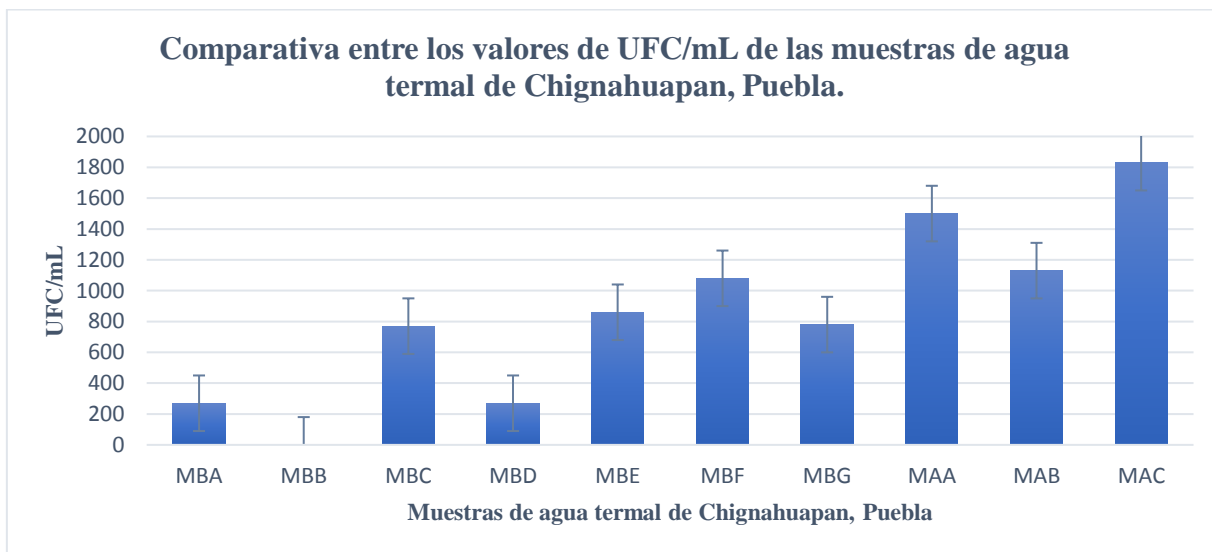


Figura 6.2.1: Comparativa entre los valores de UFC/mL de las muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

En total fueron aisladas 54 cepas las cuales fueron sembradas y purificadas. El total de los aislados es presentado en la tabla 6.2.2.

Tabla 6.2.2:

Cepas aisladas de las muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

<b>Muestra</b>	<b>Cepas</b>
MBA	DBA01, DBA02, DBA03, DBA04, DBA05, DBA06, DBA07, DBA08
MBB	-----
MBC	DBC01, DBC02, DBC03, DBC04, DBC05, DBC06, DBC07, DBC08
MBD	DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05, DBD06, DBD07, DBD08, DBD09
MBE	DBE01, DBE02
MBF	DBF01, DBF02
MBG	DBG01, DBG02
MAA	DAA01, DAA02, DAA03, DAA04, DAA05, DAA06, DAA07, DAA08, DAA09, DAA10, DAA11, DAA12, DAA13
MAB	DAB01, DAB02, DAB03, DAB04, DAB05, DAB06, DAB07, DAB08
MAC	DAC01, DAC02

Es posible observar las diferentes pigmentaciones que presentan los 54 aislados en la figura 6.2.2.

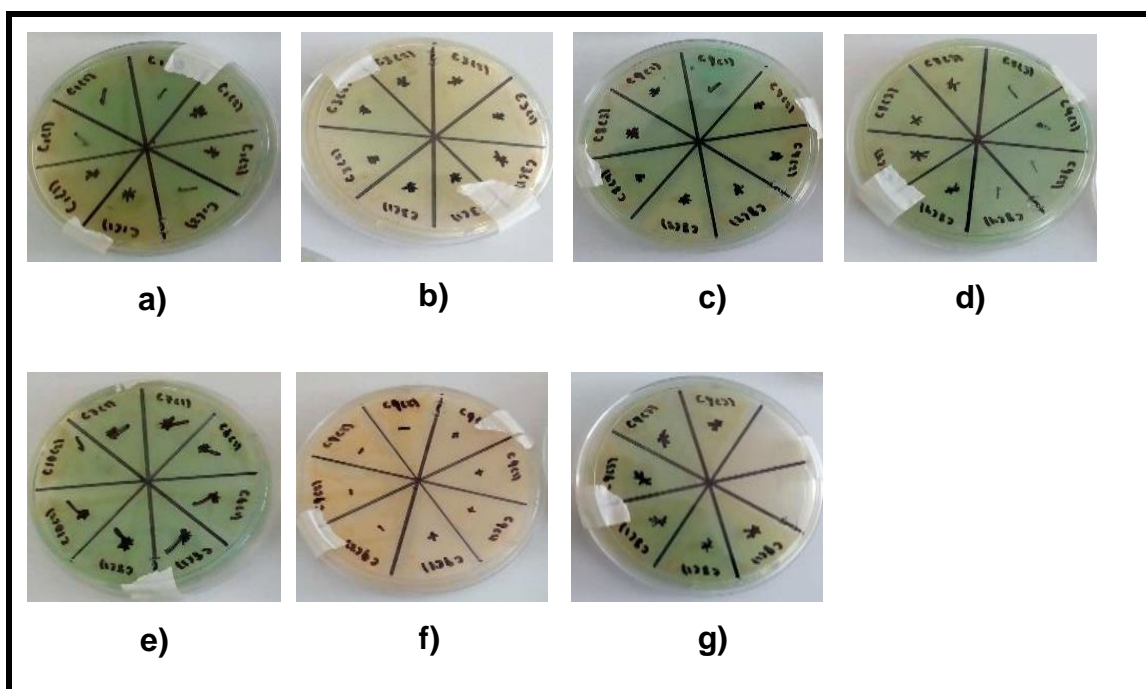


Figura 6.2.2: Cepas aisladas de las muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

Para algunos ensayos fueron seleccionadas cinco representantes de las cepas aisladas, es decir uno por cada grupo morfológico.

En la tabla 6.2.3 se presentan las cepas aisladas de las muestras de agua termal con su respectiva cepa representante, la cual fue elegida en base a las distintas morfologías de los aislados.

Tabla 6.2.3:

Cepas aisladas de las muestras de agua termal de Chignahuapan, Puebla con su respectiva cepa representante de las morfologías aisladas.

Cepas aisladas	Cepa representante de las morfologías aisladas
DBA01, DBA02, DBA03, DBA04, DBA05, DBA06, DBA07, DBA08, DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05, DBD06, DBD07, DBD08, DBD09, DBE01, DBE02, DBF01, DBF02, DBG01, DBG02, DAA01, DAA02, DAA03, DAA04, DAA05, DAA06, DAA07, DAA08, DAA09, DAA10, DAA11, DAA12, DAA13, DAC01, DAC02	CSV01
DBC01, DBC02, DBC03, DBC04, DBC05, DBC06, DBC07, DBC08	CSV02
DAB01, DAB02	CSB01
DAB03, DAB04	CSB02
DAB05, DAB06, DAB07, DAB08	CSA01

En la figura 6.2.3 se presentan las cinco cepas representantes de los aislados.

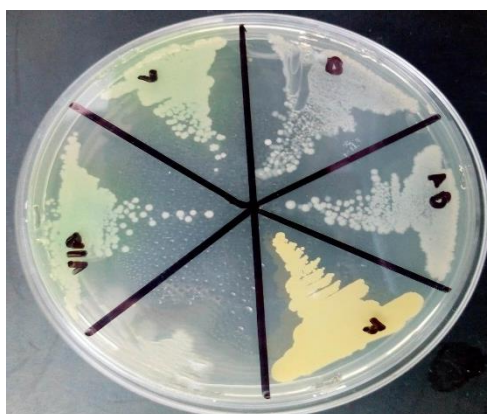


Figura 6.2.3: Cepas representantes de los aislados. Se muestran en orden de izquierda a derecha las cepas CSV01, CSV02, CSB01, CSB02 y CSA01.

En la tabla 6.2.4 se presentan las diferencias de la pigmentación y forma de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas.

Tabla 6.2.4:

Diferencias en la pigmentación y la forma de las colonias de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas.

<b>Cepa</b>	<b>Pigmento</b>	<b>Forma</b>
CSV01	Verde/Azul	Fusiforme
CSV02	Verde pálido	Fusiforme
CSB01	Blanco	Irregular
CSB02	Blanco	Circular
CSA01	Amarillo	Puntiforme

### **6.3 Identificación de las cepas aisladas mediante tinción diferencial de Gram**

En la tabla 6.3.1 se presentan los resultados de la tinción diferencial de Gram de las 54 cepas aisladas, así como la detección de movilidad en algunas de ellas. Los resultados indicaron que 50 de las 54 cepas aisladas son Gram negativas, mientras que 46 de las 54 cepas aisladas mostraron movilidad.

Las fotografías de las observaciones al microscopio óptico de los 54 aislados son mostradas dentro del apartado de Anexos.

Tabla 6.3.1:

Resultados de la tinción diferencial de Gram y detección de movilidad de las 54 cepas aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

<b>Cepas Gram (-) y Movilidad (+)</b>	<b>Cepas Gram (-) y Movilidad (-)</b>	<b>Cepas Gram (+) y Movilidad (-)</b>
DBA01, DBA02, DBA03, DBA04, DBA05, DBA06, DBA07, DBA08, DBC01, DBC02, DBC03, DBC04, DBC05, DBC06, DBC07, DBC08, DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05, DBD06, DBD07, DBD08, DBD09, DBE01, DBE02, DBF01, DBF02, DBG01, DBG02, DAA01, DAA02, DAA03, DAA04, DAA05, DAA06, DAA07, DAA08, DAA09, DAA10, DAA11, DAA12, DAA13, DAC01, DAC02	DAB01, DAB02, DAB03, DAB04	DAB05, DAB06, DAB07, DAB08

En la tabla 6.3.2 se presentan los resultados de la tinción diferencial de Gram de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas, así como la detección de movilidad en algunas de ellas.

Tabla 6.3.2:

Resultados de la tinción diferencial de Gram y detección de movilidad de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas.

<b>Cepa</b>	<b>Gram</b>	<b>Movilidad</b>
CSV01	(-)	(+)
CSV02	(-)	(+)
CSB01	(-)	(-)
CSB02	(-)	(-)
CSA01	(+)	(-)

Cuatro de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas resultaron ser Gram negativas y una de ellas es positiva, las cepas en las que se observó movilidad fueron CSV01 y CSV02.

Las fotografías de las observaciones al microscopio óptico de las cepas CSV01, CSV02, CSB01, CSB02 y CSA01 se presentan en la figura 6.3.1.

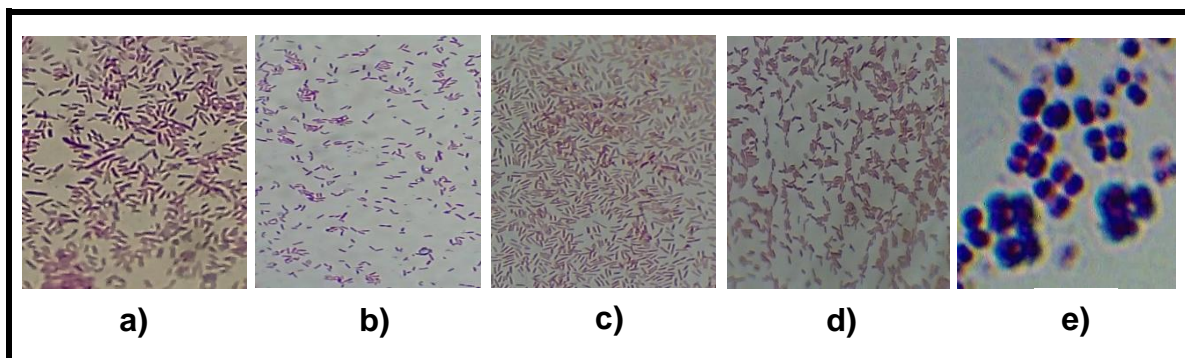


Figura 6.3.1: a) Cepa CSV01 Gram negativa. b) Cepa CSV02 Gram negativa. c) Cepa CSB01 Gram negativa. d) Cepa CSB02 Gram negativa. e) Cepa CSA01 Gram positiva.

#### 6.4 Crecimiento microbiano a diferentes temperaturas

Para determinar la tolerancia a valores de temperatura altos de los aislados se realizó una prueba de crecimiento microbiano a 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C y 60°C a partir de inóculos de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas. Los resultados obtenidos de la contabilización de las UFC/mL a partir de las diluciones seriadas realizadas son mostrados en las tablas 6.4.1, 6.4.2, 6.4.3 y 6.4.4 respectivamente.

Tabla 6.4.1:

Prueba de crecimiento microbiano a 30°C.

<b>Cepa</b>	<b>Dilución de crecimiento</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>log(UFC/mL)</b>
CSV01	1x10 <sup>-9</sup>	1x10 <sup>11</sup>	11.0
CSV02	1x10 <sup>-9</sup>	3x10 <sup>11</sup>	11.5
CSB01	1x10 <sup>-8</sup>	1.05x10 <sup>11</sup>	11.0
CSB02	1x10 <sup>-8</sup>	6x10 <sup>10</sup>	10.8
CSA01	1x10 <sup>-9</sup>	5x10 <sup>10</sup>	10.7

Tabla 6.4.2:

Prueba de crecimiento microbiano a 35°C.

<b>Cepa</b>	<b>Dilución de crecimiento</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>log(UFC/mL)</b>
CSV01	1x10 <sup>-7</sup>	5x10 <sup>8</sup>	8.7
CSV02	1x10 <sup>-6</sup>	1x10 <sup>8</sup>	8.0
CSB01	1x10 <sup>-6</sup>	6x10 <sup>8</sup>	8.8
CSB02	1x10 <sup>-5</sup>	1.5x10 <sup>7</sup>	7.2
CSA01	1x10 <sup>-8</sup>	1.55x10 <sup>11</sup>	11.2

Tabla 6.4.3:

Prueba de crecimiento microbiano a 40°C.

<b>Cepa</b>	<b>Dilución de crecimiento</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>log(UFC/mL)</b>
CSV01	1x10 <sup>-9</sup>	2.5x10 <sup>11</sup>	11.4
CSV02	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>7</sup>	7.0
CSB01	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>6</sup>	6.0
CSB02	1x10 <sup>-2</sup>	4.5x10 <sup>4</sup>	4.6
CSA01	1x10 <sup>-7</sup>	8.5x10 <sup>9</sup>	10.0



Tabla 6.4.4:

Prueba de crecimiento microbiano a 45°C.

Cepa	Dilución de crecimiento	UFC/mL	log(UFC/mL)
CSV01	$1 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^6$	6.4
CSV02	$1 \times 10^{-3}$	$9.5 \times 10^5$	6.0
CSB01	0	0	0
CSB02	0	0	0
CSA01	$1 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^6$	6.1

Los resultados de las pruebas de crecimiento de las cepas representantes de las distintas morfologías son mostrados en la figura 6.4.1 en donde se puede observar el cambio de los valores del logaritmo de las UFC/mL de cada cepa en función de cada una de las siete temperaturas evaluadas.

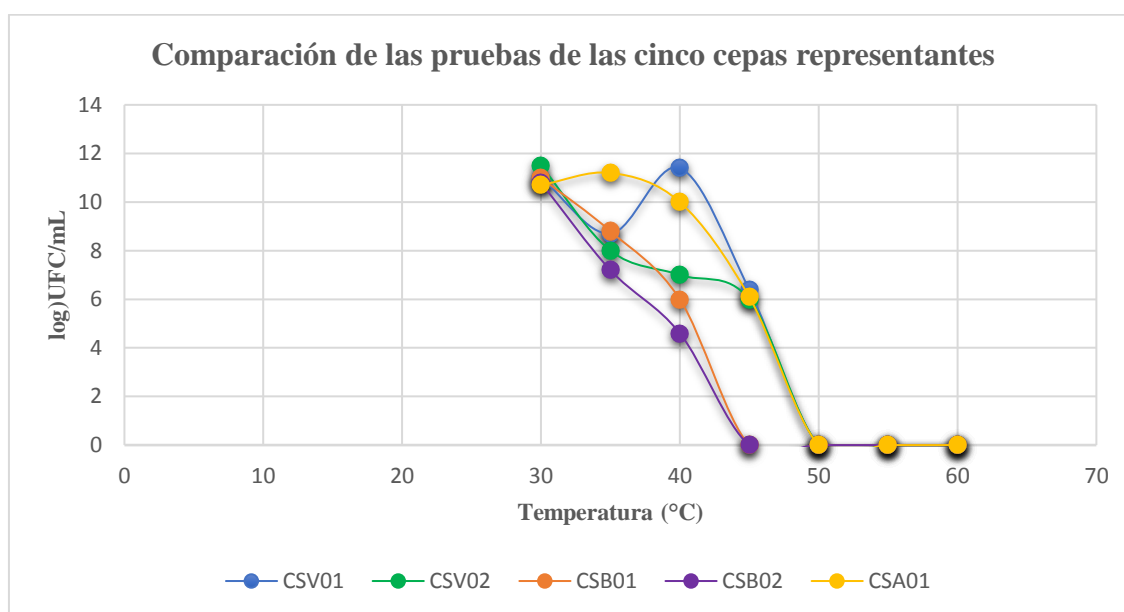


Figura 6.4.1: Comparación de las pruebas de crecimiento de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas.

Las cepas CSV01, CSV02 y CSA01 mostraron crecimiento hasta 45°C mientras que las cepas CSB01 y CSB02 mostraron crecimiento hasta 40°C, ninguna de las cepas creció a partir de 50°C.

La cepa CSV01 mostró su mayor crecimiento a 40°C, las cepas CSV02, CSB01 y CSB02 mostraron su mayor crecimiento a 30°C y la cepa CSA01 mostró su mayor crecimiento a 35°C.

### **6.5 Pruebas de halotolerancia de las 54 cepas aisladas**

Se realizaron pruebas de halotolerancia a las 54 cepas aisladas, las concentraciones de NaCl empleadas fueron 0.5M, 1M, 1.5M y 2M cuyos valores expresados en porcentaje son 3%, 5.8%, 8.7% y 11.7% respectivamente (se incluyen los valores en porcentaje de las concentraciones de NaCl debido a que en la mayoría de los estudios de halotolerancia reportan sus resultados en porcentajes).

Los resultados se muestran en la tabla 6.5.1, la halotolerancia de los aislados fue evaluada por su crecimiento en el medio o su ausencia. Las fotografías del crecimiento bacteriano de los aislados a las diferentes concentraciones de NaCl se presentan dentro del apartado de Anexos.

Tabla 6.5.1:

Evaluación de las pruebas de halotolerancia a distintas concentraciones de NaCl de las 54 cepas aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

Cepas	Crecimiento bacteriano			
	0.5M	1M	1.5M	2M
DBA01, DBA02, DBA03, DBA04, DBA05, DBA06, DBA07, DBA08, DBC01, DBC02, DBC03, DBC04, DBC05, DBC06, DBC07, DBC08, DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05, DBD06, DBD07, DBD08, DBD09, DBE01, DBE02, DBF01, DBF02, DBG01, DBG02, DAA01, DAA02, DAA03, DAA04, DAA05, DAA06, DAA07, DAA08, DAA09, DAA10, DAA11, DAA12, DAA13, DAC01, DAC02	(+++)	(++)	(-)	(-)
DAB01, DAB02, DAB03, DAB04	(+++)	(+)	(-)	(-)
DAB05, DAB06, DAB07, DAB08	(+++)	(+++)	(++)	(+)

Nota: La halotolerancia de los aislados fue evaluada mediante la siguiente escala:

(-): Sin crecimiento bacteriano.

(+): Crecimiento bacteriano bajo (difuso).

(++): Crecimiento bacteriano disminuido.

(+++): Crecimiento bacteriano normal.

Las cepas que mostraron la mayor halotolerancia fueron DAB05, DAB06, DAB07 y DAB08, las cuales pertenecen al género *Micrococcus spp*, ya que crecieron a las cuatro diferentes concentraciones de NaCl evaluadas.

## **6.6 Identificación molecular de cuatro cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla**

### Extracción de ADN genómico

Se obtuvo el ADN genómico total de las cepas representantes de las morfologías aisladas: CSV01, CSV02, CSB01 y CSB02 (la cepa CSA01 fue identificada como especie perteneciente al género *Micrococcus spp* mediante las pruebas microbiológicas, por lo que no fue tomada en cuenta para la identificación molecular). La electroforesis en gel de agarosa al 0.8% se muestra en la figura 6.6.1 a) en la cual es posible observar el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN genómico de los cuatro aislados, el cual fue de 20,000 pb. La cantidad de ADN genómico extraído de las cepas fue suficiente para ser empleado en la técnica de PCR, ya que se extrajeron 120 ng/ $\mu$ L.

### Amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S

Los productos de amplificación del ARNr 16S de las cepas CSV01, CSV02, CSB01 y CSB02 fueron visualizados mediante electroforesis y se observan en la figura 6.6.1 b).

En el trabajo realizado por Farrance y Hong., 2015 se menciona que el tamaño aproximado del gen ARNr 16S es de 1500 pb. El tamaño aproximado de los productos de amplificación por PCR identificados tras la realización de la electroforesis es de 1500 pb, lo cual indica que se logró amplificar el ARNr 16S de los cuatro aislados.

### Purificación por columna de los productos de PCR

Los productos de amplificación purificados ARNr 16S de las cuatro cepas se presentan en la figura 6.6.1 c).

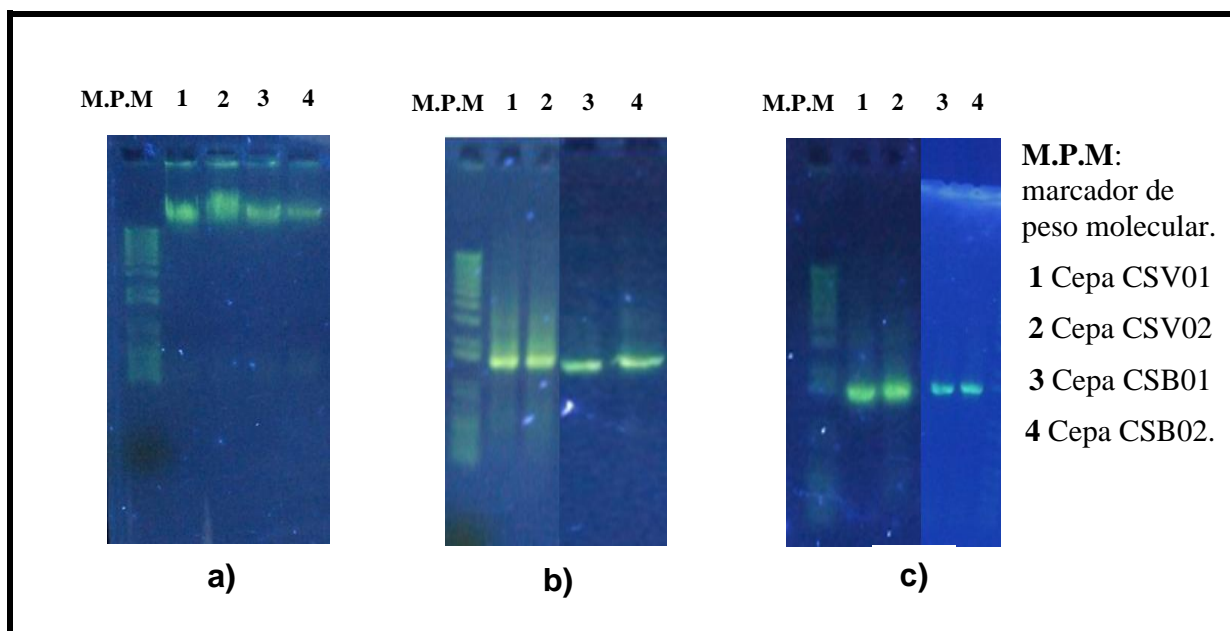


Figura 6.6.1: a) Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de ADN genómico. b) Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S. c) Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de amplificación purificados.

### Secuenciación y análisis bioinformático

Tras haber realizado el alineamiento de las secuencias del ARNr 16S mediante BLASTn, se determinaron las especies bacterianas a las que corresponden las cepas CSV01, CSV02, CSB01 y CSB02.

En la tabla 6.6.1 se presentan las especies bacterianas a las que corresponden los cuatro aislados junto con el porcentaje de identidad obtenido en el alineamiento.

Tabla 6.6.1:

Determinación de las especies bacterianas correspondientes de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

<b>Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Porcentaje de Identidad (Alineamiento)</b>
CSV01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91.68%
CSV02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94.20%
CSB01	<i>Pseudomonas mendocina</i>	96.63%
CSB02	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	96.12%

Los resultados obtenidos tras la realización de la identificación molecular confirman la presencia de especies pertenecientes al género *Pseudomonas spp*, principalmente de *P. aeruginosa*, además también fueron identificadas *P. mendocina* y *P. pseudoalcaligenes*.

## 6.7 Identificación bioquímica de las cepas aisladas

### Pruebas bioquímicas realizadas a las cinco cepas representativas de las morfologías aisladas

Los resultados de la identificación bioquímica de las cinco cepas representantes se presentan a continuación:

#### Pruebas bioquímicas en sistema de galerías API 20 NE

En la tabla 6.7.1 se presentan los resultados obtenidos tras haber realizado las pruebas de producción de indol (TRP), fermentación de glucosa (GLU), hidrólisis de urea (URE) e hidrólisis de gelatina (GEL) mediante el sistema de galerías API 20 NE de las cepas CSV01, CSV02, CSB01, CSB02 y CSA01.

Tabla 6.7.1:

Pruebas bioquímicas realizadas mediante el sistema de galerías API 20 NE de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

<b>Cepa</b>	<b>TRP</b>	<b><u>GLU</u></b>	<b><u>URE</u></b>	<b>GEL</b>
CSV01	(-)	(-)	(-)	(+)
CSV02	(-)	(-)	(-)	(+)
CSB01	(-)	(+)	(-)	(+)
CSB02	(-)	(-)	(-)	(+)
CSA01	(-)	(-)	(-)	(+)

Las cinco cepas resultaron negativas a las pruebas de producción de indol e hidrólisis de urea y positivas a la prueba de hidrólisis de gelatina. La cepa CSB01, identificada como *P. mendocina*, es la única cepa que resultó positiva a la prueba de fermentación de glucosa.

#### Prueba de movilidad en medio SIM

En la tabla 6.7.2 se presentan los resultados obtenidos tras haber realizado la prueba de movilidad en medio SIM de las cinco cepas representantes.

Tabla 6.7.2:

Prueba de movilidad en medio SIM de las cinco cepas representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

Cepa	Movilidad
CSV01	(+)
CSV02	(+)
CSB01	(+)
CSB02	(+)
CSA01	(-)

Las fotografías de las pruebas de movilidad en medio SIM de las cepas CSV01, CSV02, CSB01, CSB02 y CSA01 se presentan en la figura 6.7.1.

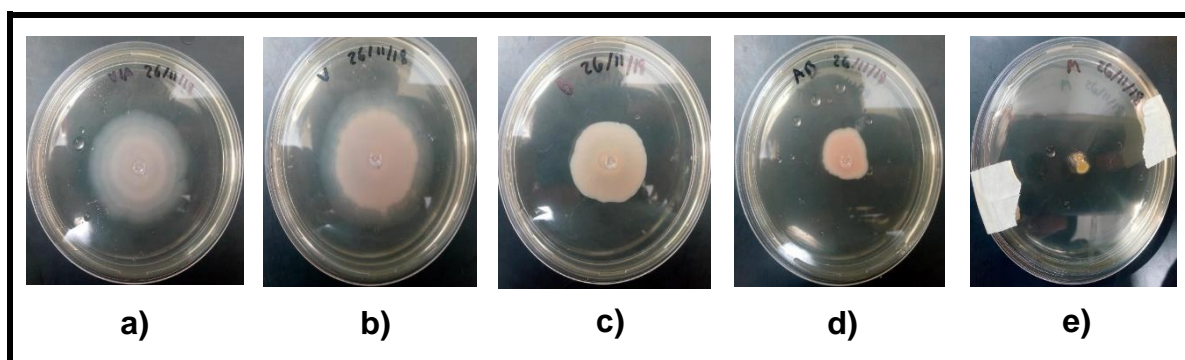


Figura 6.7.1: a) Cepa CSV01 con presencia de halo de movimiento. b) Cepa CSV02 con presencia de halo de movimiento. c) Cepa CSB01 con presencia de halo de movimiento. d) Cepa CSB02 con presencia de halo de movimiento. e) Cepa CSA01 sin halo de movimiento.

En la tabla 6.7.3 se muestran las longitudes de los halos de movilidad de las cepas que resultaron positivas a la prueba transcurridas las 24, 48 y 72 horas de incubación respectivamente.



Tabla 6.7.3:

Longitudes de los halos de movilidad de las cepas representantes de las morfologías aisladas.

<b>Cepa</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
CSV01	3 mm	6.9 mm	14.5 mm
CSV02	2.95 mm	4.8 mm	9.4 mm
CSB01	3.5 mm	3.5 mm	4 mm
CSB02	3 mm	3 mm	3 mm

Las cepas que mostraron la mayor movilidad fueron CSV01 y CSV02, las cuales fueron identificadas como *P. aeruginosa*, su crecimiento se extendió más allá de la zona de siembra y sus halos de movilidad alcanzaron los 14.5 mm y 9.4 mm respectivamente, las cepas CSB01 y CSB02, las cuales fueron identificadas como *P. mendocina* y *P. pseudoalcaligenes*, mostraron movilidad ya que su crecimiento se extendió más allá de la zona de siembra, aunque los tamaños de sus halos no superaron los 4 mm. La cepa CSA01 perteneciente al género *Micrococcus spp* no creció más allá de la zona de siembra y tampoco produjo halo de movilidad, por lo que resultó negativa a la prueba.

### **Pruebas bioquímicas realizadas a las 54 cepas aisladas**

Los resultados obtenidos de la identificación bioquímica de las 54 cepas aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla fueron capturados en la tabla 6.7.4 en la cual se despliegan todas las pruebas bioquímicas realizadas.

Las fotografías de las pruebas de movilidad, asimilación de citrato, hidrólisis de almidón y síntesis de pioverdina se presentan en el apartado de anexos.

Tabla 6.7.4:

Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas de las 54 cepas aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla.

Cepa	Glucosa (F)*	Lactosa (F)*	Catalasa	Producción de indol	Producción de H <sub>2</sub> S	Movilidad	Asimilación de citrato	Hidrólisis de urea	Hidrólisis de almidón	Síntesis de pioverdina
DBA01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBA02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBA03	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBA04	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBA05	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBA06	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBA07	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBA08	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBC01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBC02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBC03	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBC04	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBC05	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBC06	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBC07	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBC08	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD03	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD04	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD05	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD06	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD07	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD08	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBD09	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBE01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBE02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBF01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)

DBF02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DBG01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DBG02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DAA03	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DAA04	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA05	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA06	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA07	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA08	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA09	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA10	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA11	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA12	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
DAA13	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DAB01	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAB02	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAB03	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAB04	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAB05	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAB06	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAB07	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAB08	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
DAC01	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
DAC02	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)**	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)

Nota: (F)\* se refiere a fermentación.

\*\* : reacción débil.

A lo largo de las pruebas bioquímicas se asoció a cada una de las 54 cepas aisladas con la cepa representante correspondiente de acuerdo con la similitud entre las morfologías presentadas. Dicha asociación se llevó a cabo como se indica en la tabla 6.2.3 en el apartado de resultados.

#### Prueba de fermentación de carbohidratos en medio KIA

Las 46 cepas aisladas representadas por las cepas CSV01 y CSV02, identificadas como *P. aeruginosa*, resultaron negativas a la fermentación de glucosa y lactosa, las cepas DAB01 y DAB02, representadas por la cepa CSB01 identificada como *P. mendocina*, resultaron positivas a la fermentación de glucosa y negativas a la fermentación de lactosa, las cepas DAB03 y DAB04, representadas por la cepa CSB02 identificada como *P. pseudoalcaligenes*, resultaron negativas a la fermentación de glucosa y solamente la cepa DAB04 resultó positiva a la fermentación de lactosa, finalmente las cepas DAB05, DAB06, DAB07 y DAB08, representadas por la cepa CSA01, resultaron negativas a la fermentación de glucosa y lactosa.

#### Prueba de catalasa

Las 54 cepas aisladas resultaron ser positivas a la prueba de catalasa.

#### Prueba de Indol-H<sub>2</sub>S-Movilidad en medio SIM

Las 46 cepas aisladas representadas por las cepas CSV01 y CSV02, identificadas como *P. aeruginosa*, las cepas DAB01 y DAB02, representadas por la cepa CSB01 identificada como *P. mendocina* y las cepas DAB03 y DAB04, representadas por la cepa CSB02 identificada como *P. pseudoalcaligenes*, resultaron negativas a la producción de indol, positivas a la producción de H<sub>2</sub>S y positivas a la prueba de movilidad, las cepas

DAB05, DAB06, DAB07 y DAB08, representadas por la cepa CSA01, resultaron negativas a las tres pruebas.

#### Prueba de asimilación de citrato en medio Citrato de Simmons

Las 54 cepas aisladas resultaron ser positivas a la asimilación del citrato como fuente de carbono.

#### Prueba de Ureasa en medio Caldo Urea de Stuart

Las 54 cepas aisladas resultaron ser negativa a la prueba de ureasa.

#### Prueba de hidrólisis de almidón en medio Agar-Almidón

Algunas de las 46 cepas aisladas representadas por las cepas CSV01 y CSV02, identificadas como *P. aeruginosa* mostraron actividad amilolítica, la cual fue evaluada en base a la cantidad de almidón degradado estimada por una mayor o menor superficie de aclaramiento producida alrededor de la zona de siembra. Dicha evaluación es presentada en la tabla 6.7.5.

Tabla 6.7.5:

Evaluación de la actividad amilolítica de las cepas aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla positivas a la prueba de hidrólisis de almidón.

<b>Cepas</b>	<b>Actividad amilolítica</b>
DBC01, DBC06, DBC07, DBC08, DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05, DBD08, DBD09, DBE01, DBE02,	(++++)
DBC02, DBC05, DBD06, DBD07, DBF01, DBF02, DAA02, DAA03	(+++)
DBC03, DAC01	(++)
DAA13, DAC02	(+)

Nota: La actividad amilolítica de los aislados fue evaluada mediante la siguiente escala:

- (+): Aclaramiento muy cercano a la zona de siembra.
- (++): Aclaramiento un poco más allá de la zona de siembra.
- (+++): Aclaramiento más allá de la zona de siembra.
- (++++): Aclaramiento de toda la sección de la placa en donde se sembró.

### Prueba de síntesis de pioverdina en medio King B

Las 46 cepas aisladas representadas por las cepas CSV01 y CSV02, identificadas como *P. aeruginosa*, resultaron positivas a la síntesis de pioverdina y a la emisión de fluorescencia, el resto de los aislados resultaron negativos a las pruebas.

## 7.- DISCUSIÓN

En México existen diversos manantiales de agua termal los cuales son reservorios de distintos organismos termófilos y termo-tolerantes, el aislamiento e identificación de los microorganismos de estos ambientes resulta importante debido a la posible presencia de patógenos en las aguas termales mineromedicinales destinadas para uso terapéutico.

Las aguas termales de Chignahuapan, Puebla son consideradas mineromedicinales debido a su composición química rica en calcio, magnesio, sodio y potasio (Gutiérrez-Cirlos., 2010), tal como se comprobó tras el análisis fisicoquímico del agua del manantial, sin embargo, tras la siembra de las muestras de agua de los brotes y las albercas termales se aislaron 54 cepas bacterianas termo-tolerantes posiblemente patógenas. Los 54 aislados fueron colocados en cuatro grupo en función de la similitud con las morfologías de cinco cepas representantes (CSV01, CSV02, CSB01, CSB02 y CSA01), las cuales fueron identificadas mediante la secuenciación del ARNr 16S y/o pruebas bioquímicas como *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes* y *Micrococcus spp* respectivamente, la mayoría de los aislados resultaron ser Gram negativos ya que solo las cuatro cepas pertenecientes al grupo CSA01 resultaron ser positivas, lo cual contrasta con lo expuesto por De la Rosa y Mosso en el 2000, quienes sugieren una mayor presencia de bacterias Gram positivas, además los 46 aislados pertenecientes a los grupos CSV01 y CSV02 mostraron tolerar concentraciones de NaCl más altas que las que se reportan en la literatura: Deshwal y Kumar., 2013 determinaron que las cepas de *P. aeruginosa* detienen su crecimiento a una concentración de NaCl 3% mientras que los 46 aislados crecieron hasta una concentración de NaCl 5.8%, los cuatro aislados pertenecientes al grupo CSA01 poseen la mayor halotolerancia ya que crecen a

concentraciones de NaCl 11.7% mientras que Agu *et al.*, 2017 reportan que *Micrococcus luteus* crece hasta una concentración de NaCl 10%, las dos cepas pertenecientes al grupo CSB01 y las dos cepas pertenecientes al grupo CSB02 mostraron una tolerancia baja a las concentraciones de NaCl evaluadas.

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas tanto de las cinco cepas representantes como de las 54 cepas aisladas coinciden con lo reportado en la literatura para los microorganismos identificados de cada grupo morfológico: los resultados de las pruebas bioquímicas de los 46 aislados pertenecientes a los grupos CSV01 y CSV02 coinciden con lo reportado por Ningthoujam y Shovarani., 2008 para *P. aeruginosa*, los resultados de las pruebas bioquímicas de los dos aislados pertenecientes al grupo CSB01 coinciden con lo reportado por Aragone *et al.*, 1992 para *P. mendocina*, los resultados de las pruebas bioquímicas de los dos aislados pertenecientes al grupo CSB02 coinciden con lo reportado por Goto., 1983 para *P. pseudoalcaligenes*, finalmente los resultados de las pruebas bioquímicas de los cuatro aislados pertenecientes al grupo CSA01 coinciden con lo reportado por Abro *et al.*, 2009 para *M. luteus*.

Las cepas representantes CSV01 y CSV02 así como los 46 aislados pertenecientes a ambos grupos mostraron movilidad tipo swarming formando un patrón irregular denominado bull's eye caracterizado por la aparición de ondas cíclicas de movilidad, las cepas representantes CSB01 y CSB02 así como los cuatro aislados pertenecientes a ambos grupos mostraron movilidad tipo swarming formando un patrón dendrítico caracterizado por largas regiones de colonización en forma de dendritas que emanan desde la zona de siembra original (Kearns, D., 2010). Las cepas pertenecientes al género *Micrococcus spp* no mostraron movilidad.



Los datos obtenidos tras la realización de la identificación microbiológica, molecular y bioquímica de los aislados de agua termal de Chignahuapan, Puebla indicaron que la especie predominante es *P. aeruginosa* lo cual es un foco de alarma debido a que esta especie es bien conocida por ser un patógeno oportunista causante de infecciones en personas inmunocomprometidas (Bassetti., 2018), además se identificó la presencia de *P. mendocina*, microorganismo que es considerado patógeno oportunista, aunque las enfermedades infecciosas causadas por esta bacteria son mucho menos comunes (Gani., 2019). Otras especies identificadas fueron *P. pseudoalcaligenes* y *M. luteus* las cuales pueden ser utilizadas en procesos de biorremediación (Goto., 1983 & Abro *et al.*, 2009).

Las especies identificadas corresponden a aquellas encontradas comúnmente en albercas recreativas lo que hizo pensar en primera instancia que estas bacterias provenían del exterior probablemente acarreadas por las personas que hacen uso de las albercas del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan, sin embargo el hecho de que *P. aeruginosa* haya sido aislada de los brotes de agua termal ubicados en la barranca de Tenextla y de los brotes ubicados junto al manantial de agua termal indica que esta bacteria tiene la capacidad de crecer naturalmente en las aguas termales aprovechando su capacidad de habitar ambientes con pocos nutrientes y de tolerar temperaturas moderadamente altas (Paz *et al.*, 2019)

El hecho de que se recomiende la exposición prolongada a las aguas termales de Chignahuapan, Puebla a adultos mayores y a personas que padecen enfermedades de la piel como dermatitis (Lee *et al.*, 2016) y enfermedades crónicas como diabetes mellitus (Krause *et al.*, 2015), en las cuales el sistema inmune se encuentra debilitado, puede

resultar peligroso, ya que la presencia de microorganismos patógenos oportunistas podría desencadenar efectos adversos a la salud (Thorolfsson and Marteinson, 2013), por lo que es necesaria una mayor regulación de estos centros recreativos, además hay que tener en cuenta que estas albercas no son desinfectadas con frecuencia debido a la creencia de que los procesos utilizados para este fin podrían alterar las propiedades y composición originales del agua aunado a que uno de los atractivos es la posibilidad de entrar en contacto, de la forma más natural posible, con estas aguas (Valeriani *et al.*, 2018). Las cepas identificadas como *P. aeruginosa*, *P. mendocina* y *P. pseudoalcaligenes* aisladas de las aguas termales de Chignahuapan poseen distintos factores de virulencia como lo son su resistencia a temperaturas moderadamente altas y a diferentes concentraciones de NaCl, la movilidad que les permite migrar, dispersarse, adherirse y que les facilita la generación de sitios de infección (Kearns, D., 2010), la síntesis de pioverdina en el caso particular de *P. aeruginosa*, además es posible que presenten resistencia a antibióticos (Medina *et al.*, 2016), factores que serían interesantes de estudiar en futuros trabajos.

## 8.- CONCLUSIONES

La identificación microbiológica, bioquímica y por secuenciación de los aislados de agua termal de Chignahuapan, Puebla permitió identificar a los microorganismos presentes en los brotes ubicados dentro y fuera del centro recreativo “Aguas Termales de Chignahuapan” y de las albercas dentro del recinto, se aislaron en total 54 cepas, la identificación mediante tinción diferencial de Gram indicó que 50 de las cepas aisladas son Gram negativas, mientras que las cuatro cepas restantes son Gram positivas, se determinó la tolerancia de cinco cepas representantes a distintos valores de temperatura: 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C y 60°C lo que ayudó a concluir que algunas de las cepas son termo-tolerantes ya que son capaces de crecer a 45°C, se determinó que las cepas aisladas correspondientes a especies pertenecientes al género *Pseudomonas spp* toleran concentraciones de NaCl por arriba de 0.5M, llegando a tolerar concentraciones de 1M, la bacteria identificada como *M. luteus* mostró la capacidad de tolerar concentraciones de NaCl de 2M. La identificación molecular determinó que cuatro cepas de interés representantes de las morfologías aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla corresponden a las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* las cuales son patógenas oportunistas, por lo que la exposición a estas aguas no es recomendable para personas inmunocomprometidas, mediante la identificación microbiológica y bioquímica se confirmó la presencia de estas especies y de *M. luteus* y se determinó que algunas cepas poseen la enzima amilasa, la cual es una enzima ampliamente utilizada a nivel industrial.

## 9.- PERSPECTIVAS

- Colectar muestras de agua termal del manantial de Chignahuapan, Puebla, aislar e identificar a los microorganismos presentes y comparar los resultados con los de este estudio.
- Realizar pruebas de resistencia a antibióticos en los microorganismos aislados.
- Evaluar la afinidad de la pioverdina de *P. aeruginosa* aislada de las muestras de agua termal hacia el Fe<sup>3+</sup> en presencia de otros metales.
- Realizar pruebas de antagonismo de los aislados con distintas cepas productoras de antimicrobianos.
- Realizar ensayos enzimáticos de la amilasa presentada por los aislados que mostraron la actividad amilolítica más alta.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Abro, S., Wagan, R., Tunio, M., Kamboh, A., & Munir, M. (2009). Biochemical Activities of Bacterial Species Isolated from the Frozen Semen of Cattle. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 5(4), 109-113. ISSN: 1813-2235
2. Agu, K., Nmecha, C., Nwaiwu, M., Ikedinma, J., Awah, N., Eneite, H., Victor-Aduloju, A., Umeoduagu, N., & Onwuatuwegwu, J. Isolation and Characterization of Halotolerant Bacteria from Ezzu River Amansea, Awka, Anambra State. (2017). *Bioengineering and Bioscience*, 5(4), 86-90. doi: 10.13189/BB.2017.050404
3. Aragone, M., Maurizi, D., Clara, L., Navarro, J., & Ascione, A. (1992). *Pseudomonas mendocina*, an Environmental Bacterium Isolated from a Patient with Human Infective Endocarditis. *American Society of Microbiology*, 30(6), 1583-1584. ISSN: 0095-1137
4. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to Manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, (7), 212527. doi: 10.7573/dic.212527
5. Brumm, P.J., Monsma, S., Keough, B., Jasinovica, S., Ferguson, E., Schoenfeld, T., Lodes, M., & Mead, DA. (2015). Complete Genome Sequence of *Thermus aquaticus* Y51MC23. *PloS one*, 10(10), e0138674. doi: 10.1371/journal.pone.0138674

6. Chang, C-H., Liang, H-K., Hsiao, N-W., Ko, M-T., Lyu, P-C., & Hwang, J-K. (2004). Relationship between local structural entropy and protein thermostability. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57(4), 684-691. doi: 10.1002/prot.20263
7. Datta, K., & LiCata, VJ. (2003). Thermodynamics of the binding of *Thermus aquaticus* DNA polymerase to primed-template DNA. *Nucleic acids research*, 31(19), 5590-7. doi: 10.1093/NAR/GKG774
8. De la Rosa, M., & Mosso, M. (2000). Diversidad Microbiana de las Aguas Minerales Termales. En López, J., & Pinuaga, J (Eds.), *Panorama Actual de las Aguas Minerales y Minero-Medicinales en España (153-158)*. Madrid, España: Editorial Instituto Tecnológico Geominero de España. ISBN: 9788478403929
9. Deshwal, V., & Kumar, P. (2013). Effect of Salinity on Growth and PGPR Activity of Pseudomonads. *Journal of Academia and Industrial Research*, 2(6), 353-356. ISSN: 2278-5213
10. Díaz, F., & González, E. (2016). Aplicación de fluorescencia de rayos X (FRX) en la caldera de Acoculco, Puebla, México. *Tlamati Sabiduría*, 7(2), 1-15.
11. Farrance, C., & Hong, S. (2015). Is it Essential to Sequence the Entire 16S rRNA Gene for Bacterial Identification? *American Pharmaceutical Review*, 2015.
12. Ficosecco, N. (2001). Termalismo en Argentina. Recuperado de [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/termalismo\\_en\\_argentina.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/termalismo_en_argentina.pdf)
13. Gani, M., Rao, S., Miller, M., & Scoular, S. (2019). *Pseudomonas mendocina* Bacteremia: A Case Study and Review of Literature. *The American Journal of Case Reports*, (20), 453-458. doi: 10.12659/AJCR.914360
14. Ghilamical, A., Boga, H., Anami, S., Mehari, T., & Budambula, N. (2018) Potential Human Pathogenic Bacteria in Five Hot Springs in Eritrea Revealed by Next Generation Sequencing. *PLoS One*, 13(3), e0194554. doi: 10.1371/journal.pone.0194554
15. Gianfaldoni, S., Tchernev, G., Wollina, U., Rocchia, M., Fioranelli, M., Gianfaldoni, R., & Lotti, T. (2017). History of the Baths and Thermal Medicine. *Journal of Medical Sciences*, 5(4), 566-568. doi: 10.3889/oamjms.2017.126
16. Goto, M. (1983). *Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. Konjaci subsp. nov.*, the Causal Agent of Bacterial Leaf Blight of Konjac. (*Amorphophallus konjac* Koch.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3), 539-545. doi: 10.1099/00207713-33-3-539
17. Gutiérrez-Cirlos, A. (2010). *Análisis de las variaciones termo-geoquímicas estacionales y resiliencia del manantial Chignahuapan, Puebla* (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
18. Horikoshi, K. (Ed). (2011). *Extremophiles Handbook*. Tokyo, Japón: Editorial Springer. doi: <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1>

19. Hotel y Balneario Aguas Termales de Chignahuapan. Puebla, México: Aguas termales de Chignahuapan. <https://www.termalchignahuapan.com.mx/es/>
20. INAFED. (1999). Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Ciudad de México, México: Chignahuapan.
21. Koga, Y. (2012). Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 2012, 789652. doi: 10.1155/2012/789652
22. Krause, M., Ludwig, M., Heck, T., & Takahashi, H. (2015). Heat Shock Proteins and Heat Therapy for Type 2 Diabetes: pros and cons. *Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(4), 374-380. doi: 10.1097/MCO.000000000000183
23. Kearns D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 634–644. doi:10.1038/nrmicro2405
24. LaBauve, A., & Wargo, M. (2012). Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Current Protocols in Microbiology*, 6(6E.1). doi:10.1002/9780471729259.mc06e01s25
25. Lam, S.Y., Yeung, R.C.Y., Yu, T-H., Sze, K-H., & Wong, K-B. (2011). A Rigidifying Salt-Bridge Favors the Activity of Thermophilic Enzyme at High Temperatures at the Expense of Low-Temperature Activity. *PLoS Biology*, 9(3), e1001027. doi: 10.1371/journal.pbio.1001027
26. Lang, E., Lapidus, A., Chertkov, O., Brettin, T., Detter, J.C., Han, C., Copeland, A., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Chen, F., Lucas, S., Tice, H., Cheng, J-F., Land, M., Hauser, L., Chang, Y-J., Jeffries, C.D., Kopitz, M., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ovchinnikova, G., Pati, A., Ivanova, N., Mavrommatis, K., Chen, A., Palaniappan, K., Chain, P., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Göker, M., Rohde, M., Kyrpides, N.C., & Klenk, H-P. (2009). Complete genome sequence of *Dyadobacter fermentans* type strain (NS114T). *Standards in Genomic Sciences*, 1(2), 133-140. doi: 10.4056/sigs.19262
27. Lee, C-W., Wang, H-J., Hwang, J-K., & Tseng, C-P. (2014). Protein Thermal Stability Enhancement by Designing Salt Bridges: A Combined Computational and Experimental Study. *PLoS ONE*, 9(11), e112751. doi: 10.1371/journal.pone.0112751
28. Lee, Y., Kim, S., Park, S., Lee, K., Han, H., Yu, D., Woo, S., Yun, S., Hamm, S., Kim, H., & Kim, J. (2016). Immunomodulatory Effects of Deokgu Thermomineral Water Balneotherapy on Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis Murine Model. *Annals of dermatology*, 28(2), 192–198. doi:10.5021/ad.2016.28.2.192
29. Martínez, T. (2015). *Caracterización hidrogeoquímica del sistema de manantiales termales de Ixtapan de la Sal-Tonatico, Estado de México* (tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México.
30. Medina, G., Naranjo, C., Escobar, S., Araque, J., Djabayan, P., & Andueza, F. (2016). Microbiota extremófila y resistomas ambientales de la fuente termal “Termas La Merced” Quito-Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 2(7), 33-37. ISSN: 1390-7042

31. Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D., & Sharma, A.K. (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, 6(1), 81. doi: 10.1007/s13205-016-0368-z
32. Mohammad, B.T., Al Daghistani, H.I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology*, 2017, 1-12. doi: 10.1155/2017/6943952
33. Morales-Soto, N., Anyan, M., Mattingly, A., Madukoma, C., Harvey, C., Alber, M., Déziel, E., Kearns, D., & Shrout, J. (2015). Preparation, Imaging, and Quantification of Bacterial Surface Motility Assays. *Journal of Visualized Experiments*, (98), e52338. doi: doi:10.3791/52338
34. National Park Service. (Última actualización 18 de Octubre de 2018). Yellowstone National Park. Wyoming, Estados Unidos: Thermophilic Bacteria. <https://www.nps.gov/yell/learn/nature/thermophilic-bacteria.html>
35. Ningthoujam, D., & Shovarani, N. (2008). Isolation and Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain DN1 Degrading p-Nitrophenol. *Research Journal of Microbiology*, 3(5), 345-351. ISSN: 1816-4935
36. Pantoja, J., & Gómez, A. (2000). Géiseres y Manantiales de México. *Ciencias*, 59, 23-25. ISSN: 0187-6376
37. Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180-189. doi: 10.4067/S0716-10182019000200180
38. Pérez, V., López, J., Vázquez, C., Sánchez, P., Olmedo, G., Vaca, S., & Negrete, E. (2014). Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from Layer Hens Showing Clinical Signs of Infectious Coryza. *American Association of Avian Pathologists*, 58(4), 638-641. doi: 10.1637/10798-021314-Case.1
39. Phillips, W., & Perry, J. (1976). Thermomicrobium fosteri sp. nov., a Hydrocarbon-Utilizing Obligate Thermophile. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26(2), 220-225. doi: 10.1099/00207713-26-2-220
40. PROFECO. (2006). Brújula de compra de PROFECO. Agua y Salud: balnearios y parques acuáticos de aguas termales. Recuperado de <https://www.gob.mx/profeco>
41. Ramírez, N., Serrano, J., & Sandoval, H. (2005). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71. ISSN: 1870-0195
42. Rampelotto, P. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(3), 482-5. doi: 10.3390/life3030482

43. Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2(1), 011501. doi: 10.1063/1.4997367
44. Rojas, N., Muñoz, G., Sosa, A., & Baqueiro, I. (2016). Determinación de la calidad microbiológica del agua de la laguna de Chapulco, Puebla. *Investigación y Ciencia*, 24(68), 29-35. ISSN: 1665-4412
45. Schalk, I. (2012). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, 15(6), 1661-1673. doi: 10.1111/1462-2920.12013
46. Schoeller, H. (1962). *Les eaux souterraines*. Paris: Ed. Masson.
47. Seckbach, J., Oren, A., & Stan-Lotter, H. (Eds). (2013). *Polyextremophiles*. New York, Estados Unidos: Editorial Springer. doi: 10.1007/978-94-007-6488-0
48. Suárez, C., Ramírez, F., Monroy, Ó., Alazard, D., & Fernández, L. (2004). La Vida a altas temperaturas: adaptación de los microorganismos y aplicación industrial de sus enzimas. *Ciencia – Academia Mexicana de Ciencias*, 55(1), 56-66. ISSN: 1405-6550
49. Takase, H., Nitani, H., Hoshino, K., & Otani, T. (2000). Impact of Siderophore on *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Immunosuppressed Mice. *Infection and Immunity*, 68(4), 1834-1839. doi:10.1128/iai.68.4.1834-1839.2000
50. Thermo Fisher Scientific. (Sin Fecha). Agar Citrato de Simmons (deshidratado). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0155B#/CM0155B>
51. Thorolfsdottir, B. O., & Marteinson, V. T. (2013). Microbiological analysis in three diverse natural geothermal bathing pools in Iceland. *International journal of environmental research and public health*, 10(3), 1085–1099. doi:10.3390/ijerph10031085
52. Tolner, B., Poolman, B., & Konings, W. (1997). Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology*, 118(3), 423-8. doi: 10.1016/s0300-9629(97)00003-0
53. Valeriani, F., Margarucci, L. M., & Romano Spica, V. (2018). Recreational Use of Spa Thermal Waters: Criticisms and Perspectives for Innovative Treatments. *International journal of environmental research and public health*, 15(12), 2675. doi:10.3390/ijerph15122675
54. Wright, D., Ferro, L., & Contreras, R. (2012). *En los Márgenes de la Memoria: Una Multiculturalidad Relatada*, Guanajuato, México: eumed.net. ISBN: 13: 978-84-695-2396-4
55. Zeldes, B.M., Keller, M.W., Loder, A.J., Straub, C.T., Adams, M.W., & Kelly, R.M. (2015). Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Frontiers in microbiology*, 6, 1209. doi: 10.3389/fmicb.2015.01209



## 11.- ANEXOS

### 11.1 Tinciones de Gram de las cepas aisladas de agua termal de Chignahuapan, Puebla

En la figura 11.1.1 se presentan fotografías de las observaciones al microscopio óptico de cepas representativas de cada muestra de agua termal de Chignahuapan, Puebla, provenientes de las diferentes zonas muestreadas, tras haber realizado la tinción de Gram de los 54 aislados.

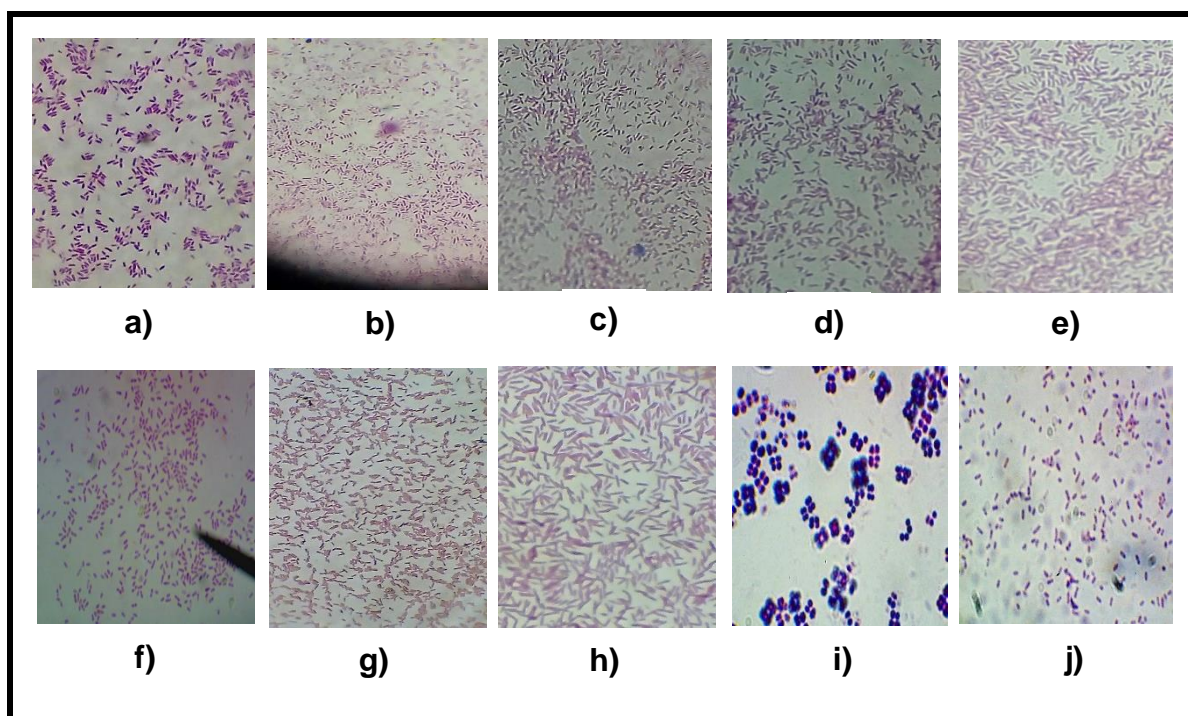


Figura 11.1.1: Observaciones al microscopio óptico tras haber realizado tinciones de Gram de los aislados.

a) Cepa representante de los 8 aislados de la muestra DBA. b) Cepa representante de los 8 aislados de la muestra DBC. c) Cepa representante de los 9 aislados de la muestra DBD. d) Cepa representante de los 2 aislados de la muestra DBE. e) Cepa representante de los 2 aislados de la muestra DBF. f) Cepa representante de los 2 aislados de la muestra DBG. g) Cepa representante de los 13 aislados de la muestra DAA. h) Cepa representante de 4 de los 8 aislados de la muestra DAB. i) Cepa representante de 4 de los 8 aislados de la muestra DAB. j) Cepa representante de los 2 aislados de la muestra DAC.

## 11.2 Crecimiento de los 54 aislados a diferentes concentraciones de NaCl

### Crecimiento colonial en medio LB con NaCl 0.5M (3%)

En la figura 11.2.1 se presentan las fotografías del crecimiento colonial de los 54 aislados a una concentración de NaCl de 0.5M.

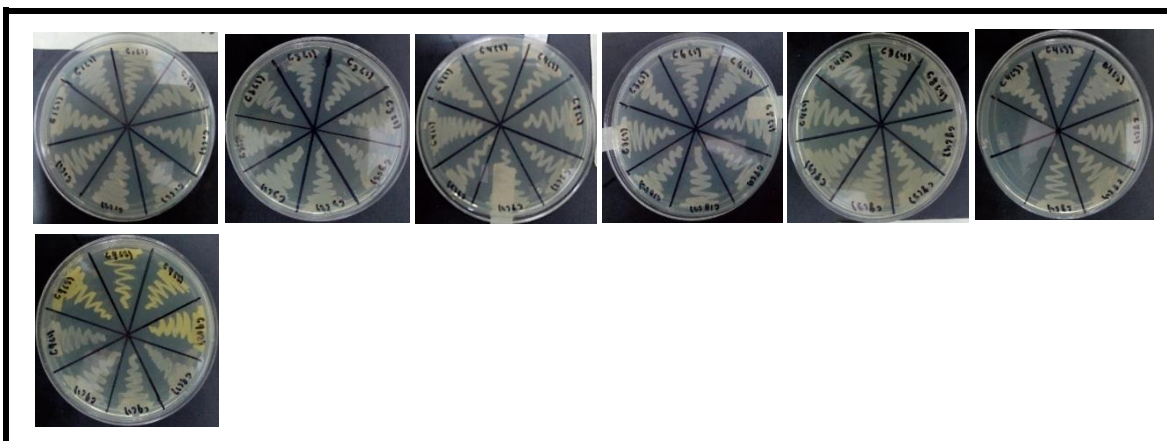


Figura 11.2.1: Los 54 aislados mostraron tolerancia a concentraciones de NaCl de 0.5M.

### Crecimiento colonial en medio LB con NaCl 1M (5.8%)

En la figura 11.2.2 se presentan las fotografías del crecimiento colonial de los 54 aislados a una concentración de NaCl de 1M.

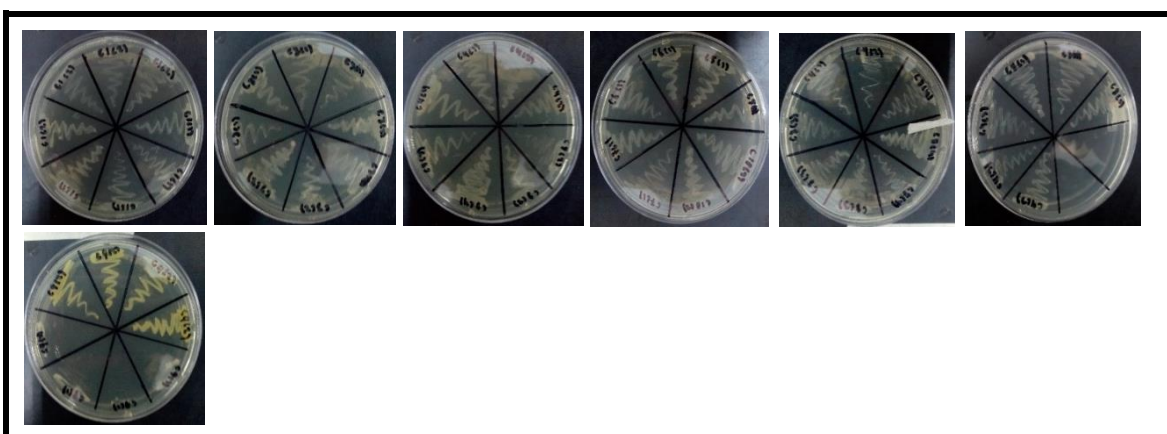


Figura 11.2.2: 50 aislados mostraron tolerancia a concentraciones de NaCl de 1M mientras que las cepas DAB01, DAB02, DAB03 y DAB04 mostraron un crecimiento bacteriano bajo.

### Crecimiento colonial en medio LB con NaCl 1.5M (8.7%) y 2M (11.7%)

En la figura 11.2.3 se presentan las fotografías de las cuatro cepas que toleraron concentraciones de NaCl de 1.5M y 2M.

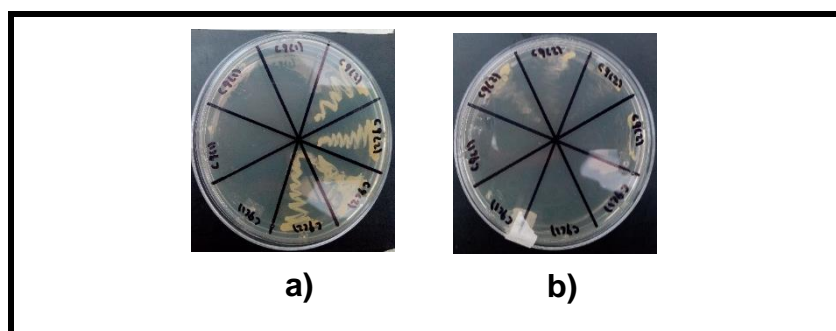


Figura 11.2.3: a) Cepas tolerantes a concentraciones de NaCl de 1.5M. b) Cepas con bajo crecimiento a concentraciones de NaCl de 2M.

### 11.3 Prueba de movilidad de los aislados en medio SIM

En la figura 11.3.1 se presentan las fotografías de las pruebas de movilidad realizadas en medio SIM. Debido a que la mayoría de las cepas aisladas resultaron ser móviles sólo se presentan dos fotografías, una en la cual se muestran cepas que presentan el halo de movilidad y otra donde se muestran cepas que no presentan el halo de movilidad.

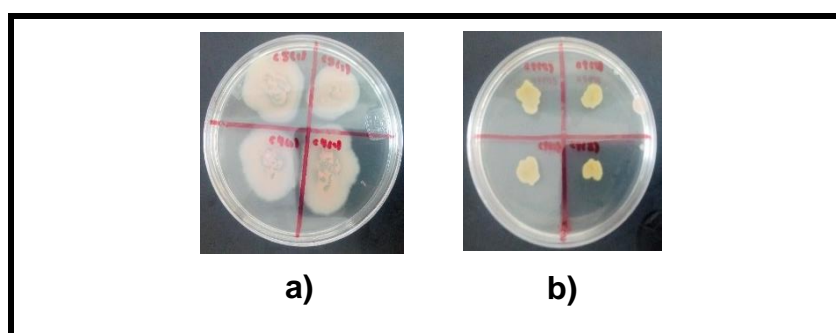


Figura 11.3.1: a) Cepas que presentan el halo de movilidad. b) Cepas que no presentan el halo de movilidad.

#### 11.4 Prueba de asimilación del citrato en medio Citrato de Simmons

En la figura 11.4.1 se presenta una fotografía en la que se distinguen cuatro cepas positivas a la prueba de asimilación del citrato.

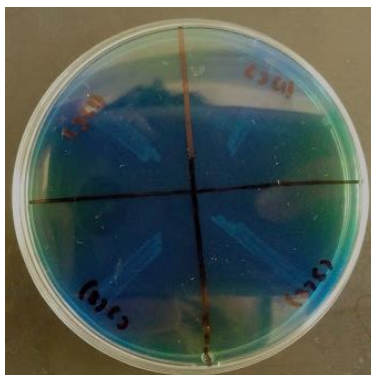


Figura 11.4.1: Cepas positivas a la prueba de citrato, poseen una coloración azul en la zona de siembra.

#### 11.5 Prueba de hidrólisis de almidón en medio Agar-Almidón

En la figura 11.5.1 se muestran las fotografías de las cepas que presentaron actividad amilolítica tras la realización de la prueba de hidrólisis de almidón.

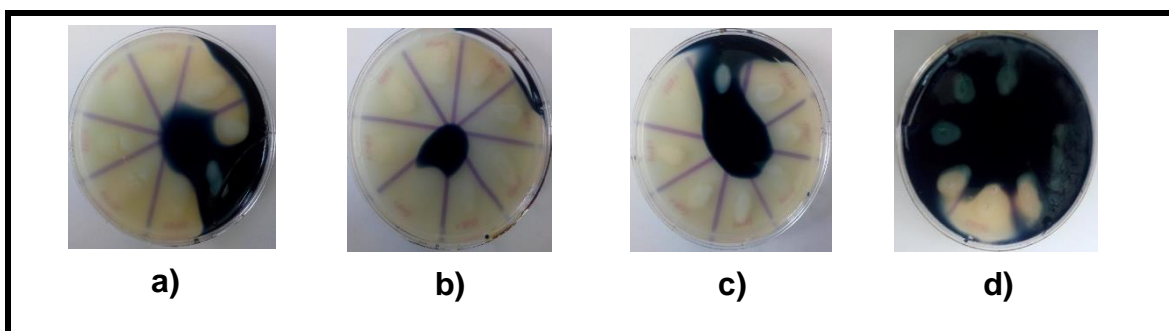


Figura 11.5.1: a) Cepas DBC01, DBC02, DBC03, DBC05, DBC06, DBC07 y DBC08. b) Cepas DBE01, DBE02, DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05 y DBD06. c) DBF01, DBF02, DBD07, DBD08, DBD09, DAA02 y DAA03. d) Cepas DAA13, DAC01 y DAC02.

## 11.6 Prueba de síntesis de pioverdina en medio King B

En la figura 11.6.1 se presentan las fotografías de las cepas que resultaron ser positivas a la prueba de síntesis de pioverdina en medio King B en las cuales es posible visualizar la pigmentación verde intensa de las cepas, así como la emisión de fluorescencia tras la exposición de las placas a luz UV.

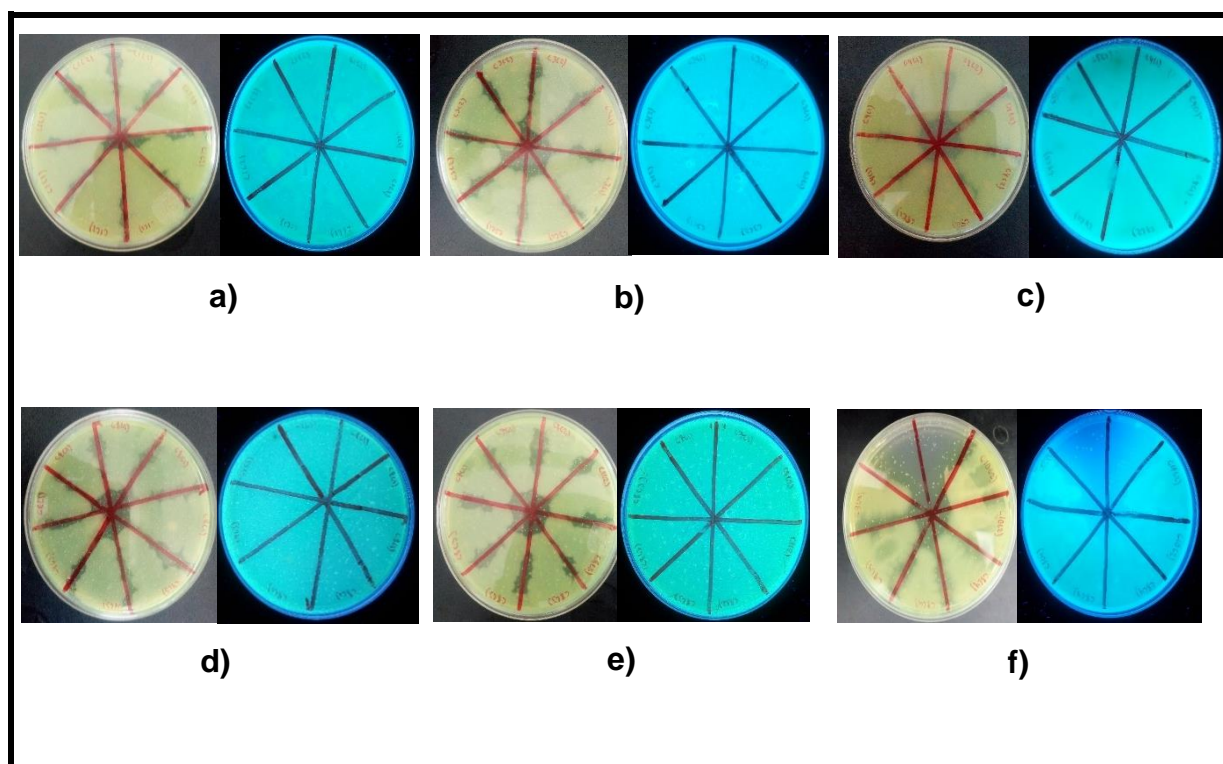


Figura 11.6.1: a) Cepas DBA01, DBA02, DBA03, DBA04, DBA05, DBA06, DBA07 y DBA08. b) Cepas DBC01, DBC02, DBC03, DBC04, DBC05, DBC06, DBC07 y DBC08. c) Cepas DBE01, DBE02, DBD01, DBD02, DBD03, DBD04, DBD05 y DBD06. d) Cepas DBF01, DBF02, DBD07, DBD08, DBD09, DAA01, DAA02 y DAA03. e) Cepas DBG01, DBG02, DAA04, DAA05, DAA06, DAA07, DAA08 y DAA09. f) Cepas DAA10, DAA11, DAA12, DAA13, DAC01 y DAC02.