



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE AGUAS
TERMALES CARACTERIZADAS HIDROGEOQUÍMICAMENTE CON
POTENCIALES APLICACIONES INDUSTRIALES:
CASO XILANASAS**

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Ambientales

PRESENTA

IBt. Rosangel Ortega Villar

Directora

Dra. Claudia Coronel Olivares

Comité tutorial

Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez
Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Dra. María Eugenia Hidalgo Lara
Dra. Liliana Guadalupe Lizárraga Mendiola

Pachuca de Soto, Hgo., México, noviembre de 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 11 de noviembre de 2025

Número de control: ICBI-D/2059/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la I.B.T. Rosangel Ortega Villar, alumna del Doctorado en Ciencias Ambientales (Directo) con número de cuenta 214835, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado **"Aislamiento e identificación de bacterias de aguas termales caracterizadas hidrogeoquímicamente con potenciales aplicaciones industriales: caso xilananas"**, en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dra. María Eugenia Hidalgo Lara
SECRETARIO	Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez
1 ^{er} VOCAL	Dra. Claudia Coronel Olivares
2 ^{do} VOCAL	Dr. José Adelfo Escalante Lozada
3 ^{er} VOCAL	Dra. Liliana Guadalupe Lizárraga Mendiola
1 ^{er} SUPLENTE	Dra. Rosa Icela Beltrán Hernández
2 ^{do} SUPLENTE	Dr. Carlos Alexander Lucho Constantino

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI

CRG/APDV

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001
dirección_icbi@uaeh.edu.mx, vergarar@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Laboratorio de Biocatálisis y Microbiología Industrial del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco.

DEDICATORIA

La culminación de este proyecto doctoral es gracias a mi asesora, la Dra. Claudia Coronel Olivares, quien siempre estuvo apoyándome, incluso cuando no se trataba de aspectos académicos. A mi comité tutorial por ayudarme a resolver mis dudas y aconsejarme académicamente y personalmente, al Dr. José Adelfo Escalante Lozada por permitirme trabajar en su laboratorio, en donde hice nuevos amigos, Fernando y Angélica, y por las herramientas adquiridas gracias a sus asesorías. A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara por la confianza brindada en su laboratorio, así como su orientación en temas que desconocía, al Mtro. Alejandro Santiago Hernández por su amistad y asesoramiento. A la Dra. Liliana Lizárraga Mendiola y a la Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez, por sus asesorías, por las pláticas que me ayudaron a tomar mejores decisiones y por escucharme cuando lo necesité. A Marcelino Zúñiga, por asesorarme en mis dudas y sus consejos. Al Mtro. en Ciencias Ulises Iturbe Acosta por su apoyo para enriquecer este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, por la beca 745857 otorgada, gracias a la cual fue posible la realización de este proyecto.

A mis amigos que hicieron que las jornadas en el laboratorio se disfrutaran, convirtiéndolo en un segundo hogar, a Bri, Luis, Ari, Moni, Andrés, Kevin, Rubí, Fany, Alethia y Arnold. Por los nuevos amigos con los que compartí charlas y experiencias, Mariana, Fer, Erick, Óscar, Milton y Alfredo.

Al Dr. Carlos Lucho Constantino y a la Dra. Rosa Icela Beltrán por apoyarme en mis dudas y hacer amena la convivencia en el laboratorio.

A mis padres, Apolinar y Graciela, por siempre estar a mi lado, por apoyarme en cada aspecto de mi vida y por sus consejos. A mis hermanos Josué y Noé, por aconsejarme y escucharme. A mi cuñada Miriam y a mis sobrinos, Mariam, Josie, Gael y Aizel.

A Melito, por animarme a ser una mejor versión de mí, por impulsarme a lograr mis objetivos.

PUBLICACIONES

Este trabajo se presentó en los siguientes eventos:

Congreso organizado por la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A. C. (AMIDIQ), en el encuentro XLIII, celebrado del 23 al 26 de agosto de 2022, con la ponencia “Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias termófilas productoras de xilanosas”.

Congreso organizado por la Red Mexicana de Extremófilos (REMEX), en su IV reunión, celebrada del 13 al 16 de noviembre de 2022, con el póster “Prospecting isolated thermophilic bacteria from a thermal water area in the state of Hidalgo”.

Congreso organizado por la Red Iberoamericana de Medio Ambiente, en la IX Convención Iberoamericana sobre Ambiente y Sustentabilidad (IX CIAS 2023), organizado de manera virtual del 5 al 9 de junio de 2023, con la ponencia titulada “Importancia de la biodiversidad bacteriana en aguas termales”.

En la primera Jornada Ambiental, organizada por el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo del 13 al 17 de mayo de 2024, con la ponencia titulada “Xilanosas termoestables en la industria de pulpa y papel”.

De este trabajo se publicó un artículo en la revista *Microorganisms* de la editorial MDPI, con un factor de impacto de 4.5, bajo el título de “Isolation and characterization of thermophilic bacteria from a hot springs in the State of Hidalgo, Mexico, and geochemical analysis of the thermal water”.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12061066>

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Extremófilos	7
2.2. Bacterias termófilas	11
2.3. Generalidades de las enzimas	18
2.4. Termoenzimas	21
2.5. Aplicaciones industriales de las termoenzimas	22
2.6. Xilanases	24
2.6.1. Clasificación de las xilanases	26
2.6.2. Importancia industrial y biotecnológica de las xilanases	27
2.6.3. Bacterias productoras de xilanases	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo general	36
5.2. Objetivos específicos	36
6. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA E HIDROGEOQUÍMICA DE LAS AGUAS TERMALES	37
6.1. Introducción	37
6.2. Materiales y métodos	39
6.2.1. Muestreo y medición in situ de agua termal de ambos pozos	39
6.2.2. Análisis fisicoquímico del agua termal Z2	40
6.2.3. Análisis hidrogeoquímico del agua termal	40
6.2.4. Análisis geoquímico del agua termal	41
6.3. Resultados y discusiones	43

6.3.1.	Muestreo y medición in situ de agua termal de ambos pozos	43
6.3.2.	Análisis fisicoquímico del agua termal de Z2	46
6.3.3.	Análisis hidrogeoquímico del agua termal.....	47
6.3.4.	Análisis geoquímico del agua termal.....	50
6.4.	Conclusiones	51
7.	TIPIFICACIÓN MICROSCÓPICA, MORFOLÓGICA, PRUEBAS DE TOLERANCIA Y BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS	52
7.1.	Introducción	52
7.2.	Metodología	54
7.2.1.	Muestreo y aislamiento de cepas bacterianas.....	55
7.2.2.	Aislamiento y caracterización de cepas	55
7.2.3.	Observación microscópica	55
7.2.4.	Caracterización morfológica	56
7.2.5.	Caracterización fisiológica	56
7.2.6.	Caracterización bioquímica.....	57
7.2.7.	Fermentación de azúcares, producción de ácido sulfídrico y gas....	57
7.2.8.	Prueba de indol	57
7.2.9.	Actividad catalasa	57
7.2.10.	Hidrólisis de caseína	57
7.2.11.	Hidrólisis de almidón	57
7.2.12.	Hidrólisis de gelatina	58
7.2.13.	Hidrólisis de celulosa, pectina y xilano	58
7.3.	Resultados y discusiones	59
7.3.1.	Aislamiento y caracterización de las cepas.....	59
7.3.2.	Observación microscópica	59
7.3.3.	Caracterización morfológica	64
7.3.4.	Tolerancia fisiológica.....	67
7.3.5.	Caracterización bioquímica.....	72
7.4.	Conclusiones.....	75
8.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS	77
8.1	Introducción	77
8.2.	Metodología	79
8.3.	Resultados y discusiones	81

8.4. Conclusiones.....	88
9. PRUEBAS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD XILANOLÍTICA	89
9.1. Introducción	89
9.2. Metodología.....	90
9.2.1. Selección de cepas con actividad xilanolítica	91
9.2.2. Ensayos de cinéticas de actividad xilanolítica	91
9.2.3. Ensayos de actividad enzimática a diferentes rangos de pH	91
9.3. Resultados y discusiones.....	92
9.3.1. Selección de cepas con actividad xilanolítica	92
9.3.2. Ensayos de cinéticas de actividad xilanolítica	93
9.3.3. Ensayos de actividad enzimática a diferentes rangos de pH	95
9.4. Conclusiones.....	96
10. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	97
10.1. Conclusiones generales	97
10.2. Perspectivas de investigación.....	98
11. REFERENCIAS	99
ANEXOS.....	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de extremófilos de acuerdo con diversos autores.	9
Tabla 2. Ejemplos de prospección de bacterias y arqueas termófilas moderadas, termófilas e hipertermófilas en el mundo.	14
Tabla 3. Ejemplos de endo-1,4- β -xilananas en el mercado	28
Tabla 4. Ejemplos de bacterias productoras de xilananas termoestables y sus parámetros de termoestabilidad.	32
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos medidos in situ de ambos pozos.	43
Tabla 6. Clasificación de las aguas termales de acuerdo con los valores de pH.	43
Tabla 7. Clasificación de aguas termales de acuerdo con diferentes rangos de temperatura.	44
Tabla 8. Clasificación de las aguas termales de acuerdo con diferentes concentraciones de sólidos totales disueltos.	44
Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del agua termal de Z2.	46
Tabla 10. Características morfológicas en sólido y líquido de las cepas aisladas en Z1.	64
Tabla 11. Características morfológicas en sólido y líquido de las cepas aisladas en Z2.	65
Tabla 12. Rangos de temperatura y pH de crecimiento y pruebas de tolerancia de Z1.	67
Tabla 13. Rangos de temperatura y pH de crecimiento y pruebas de tolerancia de Z2.	68
Tabla 14. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas en Z1.	72
Tabla 15. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas en Z2.	73
Tabla 16. Caracterización taxonómica de las cepas aisladas.	82
Tabla 17. Actividad enzimática de las cepas aisladas.	92
Tabla 18. Actividad enzimática (UI) a diferentes rangos de pH.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los microorganismos termófilos de acuerdo con diversos autores.	12
Figura 2. Localización de bacterias y arqueas termófilas en diferentes zonas alrededor del mundo.	17
Figura 3. Ejemplos de algunos sectores industriales que emplean enzimas.	20
Figura 4. Ejemplos de aplicaciones industriales de algunas termoenzimas.	23
Figura 5. Clasificación de las familias GH 10 y GH 11 propuesta por CAZy.org.	26
Figura 6. Clasificación de las xilanases y otras enzimas para la hidrólisis de hemicelulosa.	27
Figura 7. Diagrama general de metodología para la caracterización fisicoquímica e hidrogeoquímica del agua.	39
Figura 8. Ejemplo de un diagrama de Piper.	41
Figura 9. Ubicación aproximada de los sitios de muestreo. a) Sitio de muestreo por Camargo et al. (2022), b) Sitio de muestreo para Z2, c) Sitio de muestreo para Z1 y d) Distribución del balneario de agua termal de Santa María Amajac.	47
Figura 10. Diagrama de Piper de agua termal de Z2 de Santa María Amajac y su comparación con Camargo et al., (2022).	48
Figura 11. Geoquímica del agua termal de Z2 de Santa María Amajac.	50
Figura 12. Diagrama general de la caracterización microscópica, morfológica y bioquímica de las cepas aisladas.	54
Figura 13. Cepa Z1-1. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	59
Figura 14. Cepa Z1-2. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	59
Figura 15. Cepa Z1-3. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	60
Figura 16. Cepa Z1-4. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	60
Figura 17. Cepa Z1-5. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	60
Figura 18. Cepa Z1-6. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	60

Figura 19. Cepa Z1-7. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	60
Figura 20. Cepa Z2-1. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	61
Figura 21. Cepa Z2-2. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	61
Figura 22. Cepa Z2-3. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	61
Figura 23. Cepa Z2-4. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	61
Figura 24. Cepa Z2-5. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	61
Figura 25. Cepa Z2-6. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	62
Figura 26. Cepa Z2-7. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	62
Figura 27. Cepa Z2-8. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	62
Figura 28. Cepa Z2-9. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	62
Figura 29. Cepa Z2-10. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	62
Figura 30. Cepa Z2-11. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).	63
Figura 31. Diagrama general de la metodología para la identificación molecular de las cepas aisladas. La imagen de amplificación fue tomada de Ramírez-Pacheco et al. (2013).	79
Figura 32. Clasificación taxonómica de las cepas aisladas.	83
Figura 33. Árbol filogenético de las cepas aisladas, utilizando el método de máxima verosimilitud con el modelo Jukes-Cantor y bootstrapping de n=1000 réplicas. No se dan valores para los grupos con bootstrap inferiores al 80%.	86
Figura 34. Diagrama general de los ensayos de actividad enzimática.	90
Figura 35. Cinéticas de actividad enzimática de las cepas seleccionadas.	93

ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA

>: Mayor que

<: Menor que

°C: Grados Celsius

µg/mL: microgramos por mililitro

µL: microlitros

µm: micrómetros

µS/cm: microsiemens por centímetro

ATCC: American Type Culture Collection

c.b.p.: completar con buffer/agua para (hasta completar el volumen final)

CE: Conductividad eléctrica

CE: Carbohidrato esterasas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribosomal

g/L: gramos por litro

GH: Glicosil Hidrolasas

h: horas

Kb: Kilo base

kDa: Kilo Daltons

L: Litro

mL: Mililitros

mg/L: miligramo por litro

M: molar

min: minutos

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nm: nanómetros

nr: no redundante

OD: Oxígeno disuelto

ORP: Potencial óxido reducción

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PSU: Unidades prácticas de salinidad

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SDT: Sólidos totales disueltos

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UI: Unidades Internacionales de Actividad Enzimática

UI/mL: Unidades Internacionales de actividad enzimática por mililitro

UI/mg: Unidades Internacionales de actividad enzimática por miligramo de proteína

Z1: Pozo 1

Z2: Pozo 2

RESUMEN

Las aguas termales son reservorios de microorganismos termófilos, es decir, que tienen la capacidad de crecer a elevadas temperaturas. Su importancia biotecnológica yace en los metabolitos que se pueden obtener de estos, por ejemplo, las enzimas termoestables, que se pueden aplicar en procesos industriales con condiciones extremas, coadyuvando en la reducción de sustancias tóxicas empleadas en estos procesos, por lo que se pueden reducir costos y al mismo tiempo, beneficiar al medio ambiente.

La presente investigación versó sobre el agua termal del balneario de Santa María Amajac en el estado de Hidalgo, México. Se tomaron muestras de agua de dos pozos, Z1 y Z2, mismas que fueron caracterizadas fisicoquímicamente y analizadas desde un enfoque hidrogeoquímico con el propósito de comprender el papel que desempeñan los minerales en un entorno termal, particularmente en relación con los procesos de interacción aguarraca y su influencia en la presencia y actividad de comunidades bacterianas especializadas.

Se aislaron siete cepas de Z1 y once de Z2. Las cepas se observaron al microscopio para comprobar su forma celular, tinción de Gram y capacidad de producir endosporas. La caracterización morfológica se realizó en medio sólido y líquido, se determinó su capacidad de tolerancia a diferentes rangos de temperatura, pH y concentraciones de NaCl. Se realizaron pruebas bioquímicas para verificar su potencial producción de enzimas de importancia industrial.

Las cepas se identificaron por secuenciación del gen 16S rDNA por análisis en la base de datos GenBank y se construyó un árbol filogenético para soportar su identidad. Las cepas se asociaron con los géneros bacterianos *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Aneurinibacillus*, *Paenibacillus* y *Deinococcus*. Se seleccionaron las cepas presuntivas para la producción de xilanases termoestables.

Finalmente, se realizaron ensayos de cinéticas enzimáticas con la finalidad de evaluar el tiempo en el que se obtiene mayor actividad xilanolítica y reconocer las condiciones óptimas a pH alcalinos para comprobar su potencial aplicación en procesos industriales.

ABSTRACT

Thermal waters are considered a source of thermophilic microorganisms, which have the ability to grow at high temperatures. Their biotechnological significance lies in the metabolites that can be obtained from them, such as thermostable enzymes, applicable in industrial processes under extreme conditions, aiding in reducing toxic substances used in these processes, thereby reducing costs, and benefiting the environment.

This research was carried out on the thermal water of Santa María Amajac spa, located in the state of Hidalgo, Mexico. Samples were collected from two wells, Z1 and Z2, which were physicochemically characterized and analyzed from a hydrogeochemical perspective, in order to understand the role that minerals play in a thermal environment, particularly in relation to water-rock interaction processes and their influence on the presence and activity of specialized bacterial communities.

Seven strains were isolated from Z1 and eleven from Z2. The strains were observed under a microscope to confirm their cellular morphology, Gram staining, and spore-forming ability. Morphological characterization was carried out in both solid and liquid media, and their tolerance ability to different temperature ranges, pH levels, and NaCl concentrations was determined. Biochemical tests were performed to assess their potential for producing industrially important enzymes.

The strains were identified by sequencing of the 16S rDNA gene and analyzed using the GenBank database. A phylogenetic tree was constructed to support their taxonomic identity. The strains were associated with the bacterial genera *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Aneurinibacillus*, *Paenibacillus*, and *Deinococcus*. Presumptive strains were selected to produce thermostable xylanases.

Finally, enzymatic kinetics were conducted to evaluate the time at which maximum xylanolytic activity was achieved and recognize the optimal conditions at alkaline pH to confirm their potential industrial applications.

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos extremófilos se encuentran en diversas partes de la Tierra, principalmente en ambientes con condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad, presión hidrostática y radiación ionizante, entre otros factores (Irwin, 2020), por lo que son considerados como aquellos que tienen la capacidad metabólica y bioquímica de operar bajo condiciones de estrés (Merino *et al.*, 2019).

Los extremófilos se clasifican de acuerdo al ambiente extremo en el que se desarrollan, por ejemplo, los que se encuentran a elevadas temperaturas se pueden clasificar como termófilos moderados (60-80 °C), termófilos extremos (60-80 °C) e hipertermófilos (80-110 °C) (Bankar *et al.*, 2022). Se encuentran en diversos ambientes termales, entre los cuales las aguas termales son uno de los más estudiados (Verma *et al.*, 2018) y por ende una fuente importante de microorganismos termófilos (Kumar y Sharma, 2020).

Este tipo de microorganismos y sus extremoenzimas han tomado un gran interés biológico y biotecnológico debido a que en los procesos industriales suelen emplearse condiciones extremas (Kumar *et al.*, 2019).

Algunos ejemplos de enzimas de microorganismos termófilos y sus aplicaciones son: celulasa, xilanasa y lacasa (industria de la pulpa y papel y biocombustibles); proteasa y amilasa (industria de detergentes); lipasa, pectinasa, amilasa y proteasa (industria alimentaria y de bebidas); xilanasa, fitasa y proteasa (industria de alimentos para animales); amilasa, glucosidasa y lipasa (industria cosmética y otros procesos) (Rigoldi *et al.*, 2018).

Este trabajo se divide en cinco secciones. La primera desarrolla el marco teórico derivado de una investigación bibliográfica para delimitar los microorganismos extremófilos y su clasificación; seguida por la definición de termófilos y su clasificación; asimismo, se presentan las bacterias termófilas; las termoenzimas y su importancia industrial. Por último, se enfoca en xilanosas y sus aplicaciones en diversos sectores industriales.

A continuación, se presentan el planteamiento del problema, la justificación y los objetivos.

Las cuatro secciones sucesivas detallan la parte experimental de la presente investigación, mismas que se desglosan del siguiente modo: introducción, materiales y métodos, resultados y discusiones, y finalizan con las conclusiones.

La primera de estas secciones se enfoca en la caracterización fisicoquímica e hidrogeoquímica de las aguas termales ubicadas en Santa María Amajac, Hidalgo, México, consideradas en el presente estudio. La caracterización fisicoquímica *in situ* permitió la clasificación de acuerdo con la temperatura, el pH y los sólidos totales disueltos. Seguido de la elaboración del diagrama de Piper en cuyo caso se consideraron los iones y cationes mayoritarios. Por último, la caracterización hidrogeoquímica se centró en demostrar la posible presencia de minerales en la zona de estudio y cómo estos pueden influir en el tipo de agua termal.

La segunda sección muestra los resultados de la tipificación bacteriana de las cepas. Para ello, las bacterias aisladas se caracterizaron microscópicamente mediante el reconocimiento de sus formas y tinciones; morfológicamente en medios sólidos y líquidos; se realizaron pruebas de tolerancia fisiológica a diferentes rangos de temperatura, pH y concentración de sal. Finalmente, se llevaron a cabo pruebas bioquímicas *in vitro*, revelando la presencia de diversas enzimas para conocer su potencial aplicación industrial.

La tercera sección se enfoca en la diversidad bacteriana encontrada en ambos pozos de agua termal. Presenta la identificación molecular de las cepas aisladas, misma que inicia con la extracción del material genético y su purificación, seguida de la amplificación del gen 16S rDNA por PCR. Las secuencias obtenidas de cada una de las cepas aisladas se sometieron a un análisis bioinformático con Nucleotide BLAST y su asociación con las secuencias tipo en la base de datos GenBank, lo cual permitió identificar los taxones más cercanos a las cepas bacterianas y la obtención de un árbol filogenético con MEGA Software.

La cuarta sección presenta las cinéticas enzimáticas de actividad xilanolítica de algunas de las cepas aisladas en el presente estudio. El objetivo fue conocer el tiempo en el que se obtiene mayor actividad enzimática, así como una breve evaluación en diferentes rangos de pH para establecer su potencial aplicación industrial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Extremófilos

Los ambientes extremos son estudiados desde hace varias décadas debido a la diversidad microbiológica que albergan, así como a las capacidades metabólicas que poseen los seres vivos que allí habitan; esto ha creado gran interés industrial, además del científico (Maier y Neilson, 2015).

En junio de 1965, el microbiólogo Thomas Brock descubrió microorganismos a temperaturas cercanas a las de ebullición, entre estos, la bacteria *Thermus aquaticus*, en las pozas termales del parque nacional Yellowstone en Estados Unidos. Estos microorganismos fueron denominados extremófilos por primera vez en 1974 por R. D. Macelroy en la publicación titulada “Some comments on the evolution of extremophiles” (Horikoshi y Bull, 2011).

Los microorganismos extremófilos son aquellos capaces de desarrollarse en ambientes extremos y con ello exhiben una increíble capacidad de adaptación a niveles de estrés (Maier y Neilson, 2015; Seckbach, 2013), dado que operan metabólica y bioquímicamente bajo estas condiciones (Merino *et al.*, 2019). Por definición, los extremófilos son aquellos organismos que se encuentran en nichos ambientales considerados como “extremos” según los estándares de la mayoría de los organismos vivos, particularmente los mamíferos. Los ambientes extremos presentan las características fisicoquímicas como altas o bajas temperaturas, pH ácido o alcalino, altas presiones, altas concentraciones de sal y alta radiación ionizante (Von Hegner, 2019). Por tanto, la definición de extremófilos puede limitarse según la o las condiciones extremas que se perciban en un ambiente (Kumar y Satyanarayana, 2013; Rothschild y Mancinelli, 2001). Asimismo, se ha acuñado el término “extremotolerantes” o “extremótrofos” para designar aquellos microorganismos que se desarrollan en condiciones normales, pero también con la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales extremas (Salwan y Sharma, 2020a; Horikoshi y Bull, 2011).

Así, los microorganismos extremófilos que son capaces de desarrollarse a elevadas temperaturas son conocidos como termófilos, y los que prosperan a bajas

temperaturas, psicrófilos; los acidófilos son aquellos que se desarrollan a pH bajos, y alcalófilos los que crecen a pH elevado; piezófilos o barófilos, aquellos que crecen en altas presiones; halófilos, a altas concentraciones salinas; osmófilos, a altas concentraciones de solutos orgánicos; oligótrofos, a bajas concentraciones de solutos o nutrientes y xerófilos, aquellos que se encuentran en ambientes secos (Capece *et al.*, 2013; Kanekar *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2019). También existen los llamados metalotolerantes, que pueden desarrollarse en presencia de altas concentraciones de metales, y los endolitos, es decir, aquellos que habitan dentro de las rocas (Horikoshi y Bull, 2011). En la Tabla 1 se ejemplifican microorganismos extremófilos tomados de Bacterial Diversity Metadatabase (BacDive) (Reimer *et al.*, 2019) y del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2023; Schoch *et al.*, 2020) con su respectiva clasificación.

Además, la combinación de condiciones extremas como, por ejemplo, altas concentraciones de sal, elevadas temperaturas y pH alcalino, ha llevado a definir a los poliextremófilos, los cuales tienen la capacidad de combinar múltiples mecanismos bioquímicos (Abbamondi *et al.*, 2019; Irwin, 2020; Kumar y Satyanarayana, 2013). Debido a lo anterior, pueden habitar diversos nichos y se han tomado como ejemplo de posibles hábitats extraterrestres. Sin embargo, a diferencia de los extremófilos, no se han podido clasificar en virtud de las numerosas combinaciones de condiciones extremas posibles (Capece *et al.*, 2013).

La mayoría de los organismos extremófilos son unicelulares y una gran diversidad de ellos puede incluirse en los tres dominios de la vida, Archaea, Eucarya y Bacteria; no obstante, la mayoría pertenecen a Archaea y en menor medida a Bacteria (Aanniz *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2020). En el caso de Eucarya, predominan algunos hongos y algas (Horikoshi y Bull, 2011).

Los microorganismos extremófilos se pueden encontrar en diferentes nichos ambientales, tales como ventanas hidrotermales, aguas termales, lagos salinos, cristales de halita, hielo y lagos polares, áreas volcánicas y desiertos (Abbamondi *et al.*, 2019). En términos fisiológicos, los extremófilos son diversos, ya que pueden ser aerobios, anaerobios, quimioorganótrofos, quimiolítotrofos y fotoheterótrofos (Irwin, 2020).

Tabla 1. Clasificación de extremófilos de acuerdo con diversos autores.

Característica fisicoquímica	Nombre	Rango	Ejemplo de microorganismos	Referencia
Presión	Piezófilo (barófilo)	Piezófilo: ≤ 50 MPa	<i>Thermococcus barophilus</i> MP BacDive ID: 16869	Yayanos (2009)
		Hiperpiezófilo: ≥ 50 MPa	<i>Shewanella oneidensis</i> CIP 106686 BacDive ID: 136795	
pH	Acidófilos	pH < 4	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 BacDive ID: 118	Sharma et al. (2012)
Alcalófilos		Obligados: pH 9 y superior	<i>Alakalihalobacillus halodurans</i> PN 80 BacDive ID: 1112	Preiss et al. (2015)
		Facultativos: pH neutro a 9	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> AL 15-21 BacDive ID: 13129	
Salinidad	Halófilo	Tolerantes: 0-5% NaCl	<i>Rhodovulum strictum</i> DSM 11289 BacDive ID: 13743	Kanekar et al. (2012)
		Ligeros: 2-5% NaCl	<i>Roseospira mediosalina</i> 86672 NCBI: txid86672	
		Moderados: 5-20% NaCl	<i>Rhodovibrio salinarum</i> DSM 9154 BacDive ID: 13958	
Temperatura		Extremos: 20-30% NaCl	<i>Salinibacter ruber</i> M31 BacDive ID: 17796	
		Termófilos	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> BacDive ID: 550	
		Mesófilos	<i>Escherichia coli</i> BacDive ID: 4907	Merino et al. (2019)
Psicrófilos		Estenopsicrófilos o psicrófilos obligados: ≤ 15 °C	<i>Psychromonas arctica</i> BacDive ID: 13520	Capece et al. (2013)
		Europsicrófilos o mesotolerantes: -15 °C y >15 °C	<i>Psychrobacter arcticus</i> 273-4 BacDive ID: 8203	

Radiación	Radiófilos	Radiación ionizante alta 10,000 Gy	<i>Deinococcus radiodurans</i> BacDive ID: 3852	Merino <i>et al.</i> (2019) Bruckbauer y Cox (2021)
Baja actividad de agua	Xerófilos	Valores inferiores a 0.85 A _w	<i>Xeromyces bisporus</i> NCBI: txid89491	Irwin (2020)
Tolerancia a metales pesados	Metalotolerantes (No existe una clasificación establecida)	Zn 15 mM Cd 6 mM Zn 10 mM Cd 6 mM Zn 10 mM Cd 4 mM	<i>Rhodococcus erythropolis</i> A1-22 BacDive ID: 11030 <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 BacDive ID: 7592 <i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651 BacDive ID: 7618	Jarosławiecka y Piotrowska-Seget (2022)
Alta concentración de azúcares	Osmófilos (Supervivencia en sacarosa al 20%)	38% 46.17% 11%	<i>Lysinibacillus endophyticus</i> lGA-C9, C9 BacDive ID: 133050 <i>Bacillus subtilis</i> WA NCBI: txid 1423 <i>Bacillus subtilis</i> MO NCBI: txid 1423	Walaa <i>et al.</i> (2018)
Crecimiento dentro de la rocas	Endolitos	Criptoendolito Casmendoendolitos Euendolitos Autoendolitos	<i>Desmochloris halophila</i> NCBI: txid138176	Sajjad <i>et al.</i> (2022)
Combinación de dos o más condiciones extremas (poliextremófilos)	Temperatura y pH	Psicroacidófilos Psicroalcalófilos Termoacidófilos Termoalcalófilos	<i>Acidicapsa borealis</i> KA1 BacDive ID: 142 <i>Alkalibacterium psychrotolerans</i> BacDive ID: 138552 <i>Sulfurisphaera ohwakuensis</i> TA-1 BacDive ID: 16639 <i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i> BacDive ID: 572	Capece <i>et al.</i> (2013)
	Temperatura y salinidad	Psicrohalófilos	<i>Photobacterium profundum</i> DSJ4 BacDive ID: 17230	

Temperatura y presión	Termopiezófilos <i>Marinitoga piezophila</i> KA3 BacDive ID: 17041
Psicropiezófilos	<i>Colwellia piezophila</i> ATCC BAA-637 NCBI: txid1265503
Temperatura y radiación	<i>Thermococcus</i> <i>gammatolerans</i> EJ3 BacDive ID: 16885
pH y salinidad	<i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i> 91-R6 BacDive ID: 5912
pH y presión	<i>Colwellia piezophila</i> Y223G BacDive ID: 133697
pH y radiación	<i>Deinococcus</i> <i>radiodurans</i> R1 BacDive ID: 3852
Salinidad y presión	<i>Halorhabdus</i> <i>utahensis</i> AX-2 BacDive ID: 5881

2.2. Bacterias termófilas

Los microorganismos capaces de desarrollarse a elevadas temperaturas se pueden clasificar según diferentes rangos de este parámetro, como se describe en la Figura 1. La mayoría de los termófilos pertenecen al dominio Bacteria, aunque los más extremos, llamados hipertermófilos, pertenecen en su mayoría al dominio Archaea (Benammar *et al.*, 2020; Capece *et al.*, 2013). La biodiversidad microbiológica de los termófilos puede proporcionar una visión general, no solo de la organización de las comunidades, sino también de sus potenciales aplicaciones, por lo que esta diversidad se ha estudiado en diferentes zonas alrededor del mundo (Benammar *et al.*, 2020).

Los microorganismos termófilos se pueden encontrar en diversos ambientes extremos alrededor del mundo, pero los más comunes son las aguas termales y los ambientes adyacentes volcánicos, que en su mayoría son ácidos. También existen aquellos que se desarrollan con pH neutro o alcalino y en altas concentraciones de sales (Urbieta *et al.*, 2015). En general, se encuentran en zonas geotérmicas o en superficies calentadas por la radiación solar, en la profundidad

del mar, en desiertos, en áreas volcánicas ricas en azufre o en metales tóxicos, y en sitios de compostaje y plantas de biogás (Escuder-Rodríguez *et al.*, 2018; Ghosh *et al.*, 2020).

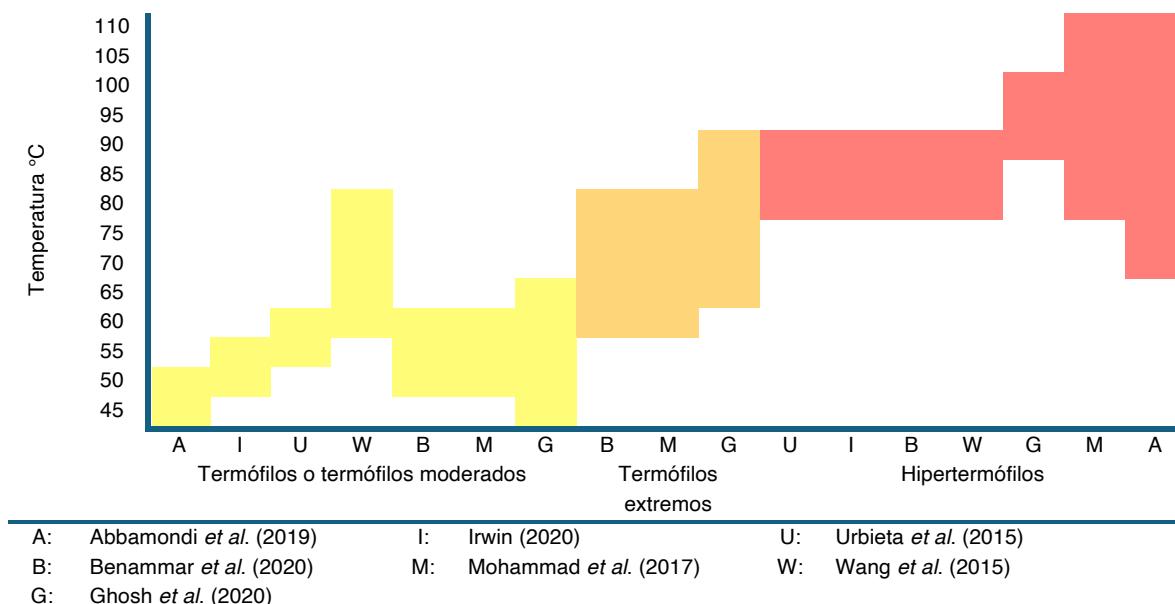


Figura 1. Clasificación de los microorganismos termófilos de acuerdo con diversos autores.

Una de las zonas más reportadas por diversos autores se refiere a las aguas termales, en las que se puede encontrar una diversidad de microorganismos extremófilos debido a la temperatura, el pH y la geoquímica del agua (Verma *et al.*, 2018); en su mayoría, pertenecen a los termófilos moderados (Ghosh *et al.*, 2020).

La capacidad de estos microorganismos de desarrollarse en tales ambientes se debe a varios mecanismos, muchos de ellos relacionados con el funcionamiento de sus proteínas (Madhusudan Makwana y Mahalakshmi, 2015). En los termófilos se previene la desnaturalización gracias a la alta fluidez de la membrana, derivada del aumento de los ácidos grasos, permitiendo mantener una estructura más cristalina y ordenada, además de un plegamiento de proteínas más compacto y la presencia de capas hidrofóbicas (Capace *et al.*, 2013).

Otros mecanismos se relacionan con la estabilidad de la membrana lipídica, la barrera de permeabilidad que controla el flujo de entrada y salida de nutrientes, los altos contenidos de guanina y citosina en las moléculas de DNA, además de puentes intramoleculares de sal, que contribuyen a la adaptación a elevadas

temperaturas (Salwan y Sharma, 2020b). Esta flexibilidad genómica, proteómica y metabólica explica el interés de nuevos productos industriales y biotecnológicos basados en microorganismos termófilos (Ghosh *et al.*, 2020).

Así, se denomina bioprospección a la búsqueda de recursos bioquímicos y genéticos en diferentes ambientes para lograr un fin comercial, en la que los termófilos ocupan un lugar destacado (Acharya y Chaudhary, 2012). Con el propósito de conocer la diversidad de bacterias termófilas, se realizó una búsqueda de trabajos publicados en los últimos cinco años con las palabras clave “Isolation of thermophilic bacteria” en el buscador PubMed Central de la base de datos del NCBI (Bethesda, 1988).

En la Tabla 2 se presenta la información obtenida de la búsqueda bibliográfica, misma que arrojó diversas publicaciones, de las cuales se seleccionaron las que tomaran en cuenta principalmente productos de interés biotecnológico que, a su vez, reportaran los géneros o especies, la temperatura de la zona de aislamiento, así como su localización por continente. Cabe resaltar que, en el intervalo de los años de búsqueda seleccionados, para el caso de Europa, Asia, África y la Antártida, en los reportes abundan estudios de aguas termales; se citan ejemplos de bacterias termófilas, aunque también se incluyeron datos de bacterias termófilas moderadas e hipertermófilas. Además, algunos de los trabajos citados son meramente de prospección, ya que los autores no profundizan en el conocimiento de la diversidad de estos seres vivos y su consecuente estudio para su potencial aplicación.

También, entre los ejemplos de los microorganismos mencionados, se observa similitud entre los géneros o especies identificados y la temperatura de los ambientes de los que fueron aislados. En contraste, para el caso del continente americano queremos hacer mención que tuvimos que extender a una década de la búsqueda de información ya que no necesariamente los trabajos se llevaron a cabo en aguas termales, sino que se han explorado nuevos ambientes para el aislamiento de los termófilos como es el rumen de alces o yacimientos petrolíferos, por citar algunos ejemplos. Además, para este continente se reporta la presencia del dominio *Archaea*.

Tabla 2. Ejemplos de prospección de bacterias y arqueas termófilas moderadas, termófilas e hipertermófilas en el mundo.

Producto de interés	Géneros o especies aislados	Fuente	Localización	Referencia
Europa				
Poliprenol	<i>Bacillus, Geobacillus</i>	Muestreo en cuatro zonas de aguas termales: Sandov: 42 °C Mlynsky: 58 °C Stepanka: 58 °C Vridlo: 58 °C	Carlsbad (Karlovy Vary), República Checa	Gharwalová et al. (2021)
Degradoras de plásticos	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	Cinco fuentes de aguas termales en cercanías de desechos plásticos: 55-72°C Rupi Levunovo Marikostinovo Simitli Dolno Osenovo	Suroeste de Bulgaria	Atanasova et al. (2021)
Diversidad microbiana	<i>Anoxybacillus flavithermus, Anoxybacillus karvacharensis</i>	Muestras de lodos y sedimentos de un manantial geotérmico en Karvachar: 70 °C	Karvachar, Nagorno-Karabaj	Panosyan et al. (2021)
África				
Enzimas hidrolíticas	<i>Bacillus, Anoxybacillus, Aeribacillus, Aneurinibacillus, Brevibacillus, Thermoactinomyces, Meiothermus, Geobacillus, Thermus, Laceylla, Thermobifida, Saccharomonospora</i>	Muestreo en ocho zonas de aguas termales: Guerdjima: 40.6 °C Saida: 62.2 °C Sidi El Hadj: 40.5 °C Belhachani: 72.2 °C Debagh: 96.0 °C Guerfa: 60.0 °C Essalihine: 52.7 °C El Knif :50.1 °C	Batna, Biskra, Guelma y Khenchel, Argelia	Benammar et al. (2020)
Oxidadoras de metano	<i>Methylococcaceae sp.</i>	Aguas termales cercanas al lago	Este del Rift de Etiopía	Islam et al. (2020)

(bacterias metanótrofas)		alcalino-salino Shalla: 55.4 °C		
Asia				
Glicosil hidrolasas	<i>Bacillus tequilensis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Muestreo en tres zonas de aguas termales: Manikaran: 95 °C Kalath: 50 °C Vasist: 65 °C	Himachal Pradesh, India	Thankappan et al. (2018)
Xilanásas	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Muestreo en dos zonas de aguas termales: Vashisht: 65 °C Kalath: 65 °C	Himachal Pradesh, India	Joshi et al. (2022)
Enzimas hidrolíticas	<i>Bacillus aerius</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus sonorensis</i>	Muestreo en tres zonas de aguas termales: Al-Khubah: 70 °C Al-Ardah: 60 °C Al-Majardah: 55 °C	Región sur de Arabia Saudita	Alrumman et al. (2018)
Consorcio para productividad en agricultura	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus sp.</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Muestreo de suelo y agua en tres zonas de aguas termales: Chumathang Ladakh, Kashmir	Distrito Leh, región de Jammu, India	Prakesh et al. (2018)
Reducers de niveles de CO ₂	<i>Parageobacillus</i> , <i>Carboxydocella</i> , <i>Caldanaerobacter</i> , <i>Carboxydothermus</i>	Muestreo de sedimentos en zonas hidrotermales terrestres: 33.8-99.0 °C	Japón	Omae et al. (2019)
Productoras de bioemulsionantes	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Muestreo en aguas termales en Ambikapur: 92 °C	Chhattisgarh, India	Dhagat y Jujavarapu (2020)
Proteasas	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	Parque de aguas termales Sungai Klah: 89.0-90.5 °C	Perak, Malasia	Suleiman et al. (2020)
Fijadoras de nitrógeno fermentativas	<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> , <i>Caldicellulosiruptor krotonskiyensis</i>	Muestreo en aguas termales en Nakabusa: 78.3 °C	Nagano, Japón	Chen, et al. (2021)

Celulasas	<i>Geobacillus kaustophilus</i> , <i>Geobacillus thermoleovorans</i>	Aguas termales de Kharpani: 69.5 °C	Norte de Pokhara, Nepal	Khadka et al. (2022)
Bacterias degradadoras de lignocelulosa	<i>Acidimicrobium</i> , <i>Caldilinea</i> , <i>Chloracidobacterium</i> , <i>Chloroflexus</i> , <i>Desulfurobacterium</i> , <i>Fervidobacterium</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Meiothermus</i> , <i>Melioribacter</i> , <i>Roseiflexus</i> , <i>Thermoanaerobacter</i> , <i>Thermoanaerobacterium</i> , <i>Thermoanaerobaculum</i> y <i>Thermosiphon</i>	Follaje degradado en las aguas termales de Sungai Klah: 60-70 °C	Perak, Malasia	Lee et al. (2017)
Antártida				
Degradoras de hidrocarburos de petróleo y productoras de biosurfactantes	<i>Geobacillus</i> , <i>Anoxybacillus</i> , <i>Brevibacillus</i>	Muestreo en dos sitios geotérmicos activos Bahía Balleneros: 50-60 °C Bahía Fumarola: 55-100 °C	Isla Decepción, Antártida	Schultz et al. (2022)
Transaminasas	<i>Albidovulum</i>	Muestreo en un sitio geotérmico activo: Bahía Balleneros: 50 °C	Isla Decepción, Antártida	Marquez y Blamey (2019)
América				
Acidificación del yacimiento conferida a los microorganismos	<i>Archaeoglobus</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Geobacillus</i>	Yacimiento petrolífero: 95 °C	Terra Nova, costa este de Canadá	Okpala et al. (2017)
Diversidad microbiológica anaerobia	<i>Desulfubacterium</i> HR11	Fluidos hidrotermales: 19-341 °C. Fumarola Boardwalk	Segmento Endeavour en el noreste del Océano Pacífico	Stewart et al. (2016)
Bacterias fibrolíticas	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>	Rumen de alces norteamericanos: 37-55 °C	Vermont, Estados Unidos	Ishaq et al. (2015)

usadas como probióticos				
Caracterización microbiológica y fisicoquímica	<i>Thermoanaeroseptum fracticlavis</i>	Acuífero hidrogeológico con rocas carbonatadas paleozoicas: 55 °C	Sitios de Seguridad Nacional, La Gran Cuenca, Estados Unidos	Hamilton-Brehm <i>et al.</i> (2019)

Para hacer más visibles las zonas geográficas en las que se han aislado termófilos alrededor del mundo, se realizó un mapa en el programa Datawrapper (de libre acceso), el cual se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Localización de bacterias y arqueas termófilas en diferentes zonas alrededor del mundo.

Elaboración propia con Datawrapper (<https://www.datawrapper.de>).

Como se demostró, la diversidad de termófilos en el mundo y sus productos de interés son vastos, por lo que su estudio se ha incrementado en los últimos años y resulta ser muy prometedor en el campo de la biotecnología (Mehta *et al.*, 2016). Los termófilos son una fuente de enzimas termoestables (Mohammad *et al.*, 2017), las que, debido a su estabilidad, pueden emplearse como biocatalizadores en industrias que empleen condiciones ambientales extremas, pues son más tolerantes y resistentes (Fontana *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2016).

En algunos procesos industriales se utilizan cloro, fósforo inorgánico, aceites y productos químicos de blanqueo, entre otros, que principalmente se vierten en los

efluentes y suelen ocasionar problemas ambientales (Jegannathan y Nielsen, 2013). Gracias a la biotecnología, se ha logrado sustituir o minimizar el empleo de estos tóxicos por enzimas (Acharya y Chaudhary, 2012). Esto ha despertado el interés en la prospección de enzimas aplicables en procesos industriales (Turner *et al.*, 2007). Se han empleado en la producción textil, de cuero, pulpa y papel, transformación de frutas y verduras y alimentos para animales, por mencionar algunos ejemplos. Además, las enzimas se pueden extraer de diversas fuentes, ya sea de microorganismos o de tejidos animales y vegetales. Estos últimos son de particular interés, pues se pueden cultivar en grandes cantidades y en períodos de tiempo cortos, por lo que se consideran un suministro abundante (Acharya y Chaudhary, 2012).

De esta sección se ejemplifica la diversidad de ambientes y condiciones en las que se han aislado bacterias termófilas de todo el mundo, ya que se reportan ejemplos de casi todos los continentes. Además, los diferentes grupos de investigación dedicados al estudio de los extremófilos proponen una clasificación que no necesariamente concuerda con la de otros autores. Por ejemplo, los termófilos no cuentan con una clasificación oficial; la mayoría de los autores establecen diferentes rangos dependiendo de la temperatura a la que son aislados. También encontramos que los termófilos de los que se tienen más investigaciones; son aquellos con un rango de temperatura que puede ir de 45 °C hasta 70 °C. Este límite inferior puede llevar a una prospección errónea, ya que se relaciona con el rango de temperatura de los mesófilos. De tal modo, sería conveniente que grupos de expertos definan los rangos de temperatura que permitan clasificar globalmente a los termófilos y se unifiquen criterios para las descripciones taxonómicas, ya sea de procariotas o eucariotas termófilos.

2.3. Generalidades de las enzimas

Dentro de las diferentes ramas de la biotecnología, como son la gris (ambiental), roja (farmacéutica) y blanca (procesos industriales) (Salwan y Sharma, 2020a), las enzimas han tenido un papel preponderante debido a la diversidad de aplicaciones que habilitan sus propiedades catalíticas. Las enzimas pueden ayudar a reemplazar o disminuir el uso de sustancias peligrosas empleadas en procesos industriales y, por ende, la toxicidad de sus efluentes (Sharma *et al.*, 2019).

Las enzimas se han clasificado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB por sus siglas en inglés) en siete grupos, de acuerdo con el mecanismo de acción de las reacciones que catalizan. Dicha clasificación es la siguiente: 1. Oxidoreductasas, 2. Transferasas, 3. Hidrolasas, 4. Liasas, 5. Isomerasas, 6. Ligasas y 7. Translocasas (Chang *et al.*, 2021; Rigoldi *et al.*, 2018). En función de las reacciones que catalizan, el nombre se relaciona con la proteína enzimática o grupo de proteínas con las mismas características catalíticas, tras lo cual se asigna un número de la Comisión de Enzimas (CE) (Porto de Souza-Vandenbergh *et al.*, 2020).

La base de datos de nomenclatura de enzimas ENZYME Expasy es un repositorio público, gratuito, disponible desde el año 1993, operado por el Instituto de Bioinformática Suizo y actualizado en mayo de 2023. Este repositorio está basado en IUBMB y CE, el cual clasifica a las enzimas de la siguiente manera: número CE, nombre recomendado, nombres alternativos (cuando proceda), actividad catalítica, así como indicadores de la secuencia de proteínas e incluso de enfermedades humanas asociadas a su deficiencia (Bairoch, 2000). Los cuatro dígitos que conforman el CE corresponden a la clase de la enzima, la subclase, la sub-subclase y la sub-sub-subclase, respectivamente (Porto de Souza-Vandenbergh *et al.*, 2020).

Las enzimas son las encargadas de llevar a cabo procesos que catalizan reacciones metabólicas en los seres vivos. Debido a su alta especificidad de acción, las enzimas se han empleado en diferentes procesos industriales, como se muestra en la Figura 3. Además, permiten el desarrollo de procesos verdes, reciclables, ecoamigables y evitan o disminuyen el uso de materiales tóxicos (Atalah *et al.*, 2019; Sahoo *et al.*, 2019).

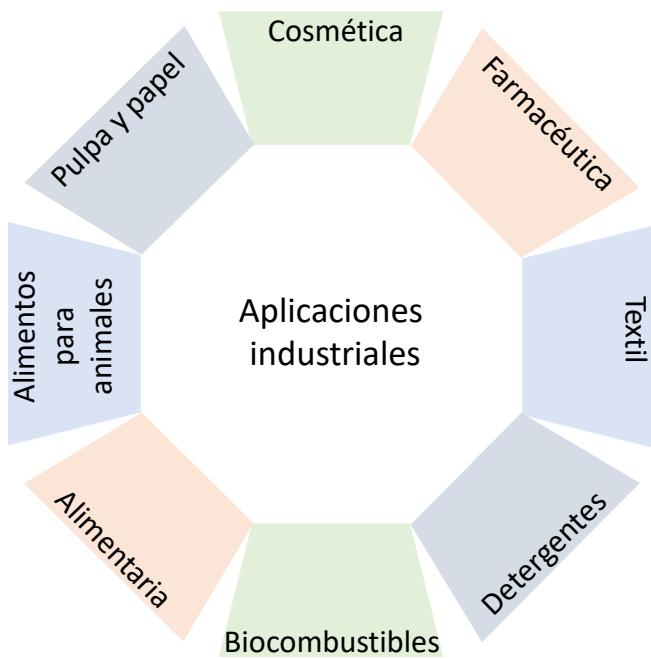


Figura 3. Ejemplos de algunos sectores industriales que emplean enzimas.

(Atalah *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019).

La demanda de las enzimas con aplicaciones industriales ha aumentado desde su introducción en la década de 1960. En 2004, el mercado de enzimas industriales se valoró en 2,000 millones de dólares, en tanto que en 2017 se estimó en 6,300 millones de dólares. Se calcula que el mercado mundial de enzimas en 2024 llegará a los 10,500 millones de dólares (Atalah *et al.*, 2019; Sahoo *et al.*, 2019).

No todas las enzimas son aptas para su aplicación en los sectores industriales por sus condiciones operacionales. Las mesoenzimas, es decir, enzimas de microorganismos mesófilos, presentan un parecido con las termoenzimas, ya que para ambas existen factores que las hacen resistentes, como la secuencia de aminoácidos y las estructuras tridimensionales; además, comparten los mismos mecanismos catalíticos (Vielle y Zeikus, 1996). En términos industriales, la aplicación de las enzimas de microorganismos mesófilos tiene grandes desventajas, ya que muchos de estos procesos requieren de condiciones extremas, como elevadas temperaturas mismas que a su vez reducen el riesgo de contaminación por otros microorganismos (Sharma *et al.*, 2019; Dumorné *et al.*, 2017; Samanta *et al.*, 2022). Por tanto, surge el interés de las enzimas de microorganismos extremófilos debido a la capacidad de funcionar en condiciones fisicoquímicas extremas (Rigoldi *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

2.4. Termoenzimas

Las enzimas de los termófilos e hipertermófilos, también llamadas termoenzimas o extremoenzimas (Hough y Danson, 1999), presentan actividad entre temperaturas de 60 y 125 °C (Vielle *et al.*, 1996). También se considera que son activas a temperaturas entre 40 y 80 °C (Escuder-Rodríguez *et al.*, 2018). Esto les confiere una ventaja sobre las enzimas de los mesófilos, las cuales requieren modificarse genéticamente para soportar condiciones extremas (Turner *et al.*, 2007; Atalah *et al.*, 2019). A continuación, se detallarán sus particularidades estructurales como resultado de un proceso de adaptación a estas elevadas temperaturas.

Las enzimas termófilas poseen una estabilidad inusual frente a la desnaturización por calor, por lo que pueden usarse como biocatalizadores en condiciones ambientales extremas. Esta resistencia no se puede atribuir a un solo mecanismo, sino que existe una variedad de efectos estabilizadores, tales como interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos y de hidrógeno, enlaces disulfuro y metálicos, entre otros (Vielle *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que las principales fuerzas estabilizadoras se encuentran en el efecto hidrófobo y en los enlaces de hidrógeno (Ravzi y Scholtz, 2006).

La estructura primaria de las termoenzimas es diferente de la que presentan las mesoenzimas; por ejemplo, tienen un mayor número de aminoácidos aromáticos y no polares; estos últimos incrementan la rigidez de la proteína y, por tanto, su hidrofobicidad. Por otro lado, presentan una disminución en el número de residuos polares no cargados y de metionina (Sharma *et al.*, 2019).

A continuación, se presentan algunas características de las termoenzimas según Vielle *et al.* (1996), Fontana *et al.* (1998) y Li *et al.* (2005).

- Rigidez: Tanto el intercambio de hidrógeno como la degradación proteolítica son bajos, lo cual ayuda a mantener la actividad catalítica.
- Puentes disulfuro: Estabilizan las proteínas al disminuir la entropía del estado desplegado de la proteína.
- Interacciones hidrofóbicas: Proporcionan la energía necesaria para que las proteínas se plieguen en soluciones acuosas, lo cual se correlaciona con la termoestabilidad de las proteínas.

- Eficiencia de embalaje/empaquetamiento: Dado que los núcleos de proteínas suelen ser hidrofóbicos, la mayor eficiencia del empaquetamiento a menudo se correlaciona con una mayor hidrofobicidad.
- Puentes salinos o puentes de sal: Permiten interacciones para la estabilización de proteínas y estructuras secundarias, por lo que aumentan su rigidez y mantienen un equilibrio en las enzimas. Su presencia es mayor respecto a las enzimas de mesófilos.
- Enlaces de hidrógeno: Existe una mayor cantidad de puentes de hidrógeno en los microorganismos termófilos, mismos que ayudan a la estabilización de las proteínas.
- Resistencia a la destrucción covalente: Menos residuos susceptibles y una mayor rigidez participan en la resistencia de las termoenzimas a la modificación covalente.

2.5. Aplicaciones industriales de las termoenzimas

Los microorganismos extremófilos producen una gran variedad de productos con potenciales aplicaciones industriales y biotecnológicas, como lípidos, polisacáridos, solutos compatibles y enzimas (Abbamondi *et al.*, 2019).

Las enzimas termoestables se han empleado en diferentes sectores industriales y biotecnológicos, tales como alimentos, salud, cosméticos, agricultura, química y energía, entre otros (Rigoldi *et al.*, 2018). Algunas de estas enzimas son: amilasas, celulasas, pectinasas, quitinasas, xilanases, proteasas, lipasas y DNA polimerasas (Escuder-Rodríguez *et al.*, 2018; Mohammad *et al.*, 2017). De tal modo que el interés por las aplicaciones industriales de las termoenzimas no solo se debe a su estabilidad térmica; también resisten condiciones fisicoquímicas como pH ácido o alcalino y el contacto con agentes desnaturalizantes, lo que les confiere interés para otros procesos industriales.

Además, el empleo de enzimas termoestables reduce el uso de compuestos y solventes tóxicos, lo que representa un beneficio para la protección del medio ambiente, así como la reducción de costos de producción (Atalah *et al.*, 2019).

Para finalizar con las aplicaciones de las enzimas termoestables, en la Figura 4 se muestran algunos ejemplos de sus potenciales usos industriales (Sharma *et al.*, 2019; Samanta *et al.*, 2022). Como se pudo apreciar, las enzimas, pero sobre todo las termoenzimas presentan una amplia posibilidad de aplicaciones industriales y biotecnológicas en cuyo caso continúan siendo de interés por sus potenciales usos en procesos industriales con condiciones extremas, mismas que coadyuvan en el cuidado del medio ambiente debido a las ventajas de su empleo en comparación con las mesoenzimas, tanto de procariotas como de eucariotas.

Enzimas	Industrias	Aplicaciones
Xilanásas	Pulpa y papel	Bioblanqueo, alternativa al uso de cloro lo que reduce el impacto ambiental
	Alimentaria	Clarificación de cerveza y jugos de frutas, extracción de azúcares Digestibilidad de los alimentos para animales
	Panadería	Mejora de características reológicas de la masa
	Detergentes	Eliminación de manchas de frutas, verduras, tierra y pasto
Pectinásas	Bioetanol	Hidrólisis de material de plantas a azúcares fermentables
	Detergentes	Mayor capacidad para la eliminación de manchas
	Alimentaria	Desarrollo de sabores
Lipasas	Detergentes	Aditivo en la formulación de detergentes
	Pulpa y papel	Remoción de compuestos hidrofóbicos en la madera
	Alimentaria	Clarificación de jugos de frutas y vegetales, disminución de la viscosidad de los néctares y purés de frutas tropicales
	Textil	Crear aspecto de lavado en piedra de jeans, biopulido en algodón y otras telas
Lipasas	Detergentes	Aditivo en los detergentes, devuelven la superficie lisa y el color original a las prendas
	Pulpa y papel	Bioblanqueo, partículas reducidas en la pulpa, menos uso de sustancias alcalinas y brillo mejorado en la fibra
	Alimentaria	Desarrollo de sabores
Amilásas		
Lacásas	Pulpa y papel	Solubilizan lignina y celulosa

Figura 4. Ejemplos de aplicaciones industriales de algunas termoenzimas.

(Atalah *et al.*, 2019; Rigoldi *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2019).

2.6. Xilanisas

La pared celular de las plantas está constituida principalmente por lignocelulosa y representa más del 90% del peso seco de la biomasa de las plantas, así como la fuente de carbono más abundante en la Tierra (Benedetti *et al.*, 2019). El papel principal de la lignocelulosa es dar estructura a la pared celular; además, proporciona resistencia mecánica y protege a la planta contra patógenos. Se forma a partir de tres polímeros principales: celulosa (30-60%), hemicelulosa (20-40%) y lignina (10-25%) (Benedetti *et al.*, 2019).

En particular, la hemicelulosa se encuentra en el parénquima axial, en los radios celulares y principalmente en las paredes celulares secundarias de las plantas; actúa como adhesivo, forma enlaces covalentes y no covalentes con los demás polímeros de la pared celular (Heinen *et al.*, 2017). La hemicelulosa es un heteropolímero normalmente ramificado, cuyo componente principal es el xilano (Kulkarni *et al.*, 1999), aunque también está conformado por dos o cuatro residuos de azúcares, ya sea de tipo hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), pentosas (D-xilosa y D-arabinosa) o ácidos urónicos (Cooper-Bribiesca, 2013).

El xilano es el polisacárido hemicelulósico más abundante en las paredes celulares de las plantas, puesto que representa un 30-35 % del total de su peso seco (Cooper-Bribiesca, 2013). Se encuentra en mayores cantidades en las maderas duras de las angiospermas (15-30 %) del contenido de la pared celular y en menor abundancia en las maderas blandas de las gimnospermas (7-12 %) (Heinen *et al.*, 2017).

La solubilidad del xilano depende del grado de sustituciones o ramificaciones. En maderas duras, el xilano tiene de 150 a 200 monómeros, por lo que son cadenas muy largas, en tanto que en maderas blandas, el xilano tiene de 70 a 130 monómeros, por lo que las cadenas son más cortas y con menor grado de ramificación (Cooper-Bribiesca, 2013; Kulkarni *et al.*, 1999).

Los xilanos se pueden clasificar como arabinoxilano, glucuronoxilano y glucuronoarabinoxilano. El glucuronoxilano es la principal hemicelulosa de las maderas duras, como las del álamo, el temblón, el abedul y el haya. Los xilanos de

madera blanda se componen principalmente de glucuronoarabinoxilano (Bourcheba *et al.*, 2017; Heinen *et al.*, 2017).

Por una parte, el xilano se degrada por glucosidasas, también llamadas glicósido hidrolasas, glicosidasas o glicosil hidrolasas (GH), que hidrolizan el enlace glicosídico de los glucósidos y forma ya sea un hemiacetal o un hemiacetal de azúcar y el correspondiente aglicón libre. Estas enzimas pueden catalizar la hidrólisis de glicósidos ligados a O, N y S (Drula *et al.*, 2022). Por la otra parte, el xilano se degrada por carbohidrato esterasas (CE) que hidrolizan los enlaces éster (Cooper, 2013).

La hidrólisis completa de las estructuras de xilano requiere varias actividades enzimáticas que actúan de manera sinérgica para convertir el xilano en azúcares monoméricos. La degradación del polímero de xilano se produce mediante la acción de las endo-1,4-beta-xilanásas, que escinden el esqueleto de xilano en oligosacáridos formados por unidades de D-xilosa, llamados xiloooligosacáridos (Heinen *et al.*, 2017) y enzimas accesorias que contribuyen a la liberación de todas las sustituciones presentes en el esqueleto principal y, por lo tanto, logran la degradación completa de los polímeros de xilano (Bhalla *et al.*, 2015).

Las endo-1,4-beta-xilanásas, o simplemente xilanásas, son un tipo de glicosidasas que despolimerizan el xilano y representan un papel clave en la hidrólisis del enlace β -1,4 presente en este polímero para su posterior conversión en fracciones de xilosa (Chadha *et al.*, 2019b; Veeresh y Chuan Wu, 2012). Se trata de enzimas con una elevada estabilidad a elevadas temperaturas, debida a interacciones intermoleculares e intramoleculares (como enlaces de hidrógeno y disulfuro), interacciones con unidades de unión a carbohidratos y extremos C- y N-terminales estabilizados. A través de estas interacciones, la región N-terminal aumenta la estabilidad conformacional y evita la desestabilización de las proteínas a temperaturas altas (Chadha *et al.*, 2019a). Además, en las interacciones intramoleculares la formación de un enlace disulfuro aumenta el pKa superficial y los enlaces de hidrógeno, lo que estabiliza la estructura aleatoria N-terminal, y determina la actividad catalítica en condiciones de temperatura y pH elevados (Chadha *et al.*, 2019a; Chadha *et al.*, 2019b).

2.6.1. Clasificación de las xilanases

A continuación, se presentan las dos clasificaciones más utilizadas en enzimología para situar a las xilanases con aplicaciones industriales. La primera clasificación se refiere a la base de datos Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy.org), misma que fue desarrollada por el laboratorio de Arquitectura y función de macromoléculas biológicas de la Universidad de Aix-Marseille, Francia (Drula *et al.*, 2022). La base de datos se actualiza cada año desde 1998. Describe los grupos catalíticos y de unión a carbohidratos relacionados con enzimas que degradan, modifican y crean enlaces glucosídicos (Porto de Souza-Vandenbergh *et al.*, 2020). De acuerdo con CAZy, las endoxilanases de importancia industrial pertenecen a la clase de glicósido hidrolasas (GH) como se muestra en la Figura 5, que a su vez se clasifican en familias. Las endoxilanases se encuentran en las familias 5, 7, 8, 10, 11, 26, 30 y 43 (Chadha *et al.*, 2019a). En particular, las de la familia 10 son enzimas de alto peso molecular, > 30 kDa (Bajpai, 2014), por lo que su tamaño reducido puede atravesar los poros de la red de hemicelulosa y, a su vez, producir una hidrólisis eficiente (Veeresh y Chuan Wu, 2012). Por otro lado, las de la familia 11 contienen enzimas de bajo peso molecular, debido a su tamaño pequeño, alta selectividad de sustratos y adaptación a un amplio rango de valores de pH y temperaturas, por lo que han cobrado importancia en aplicaciones biotecnológicas (Ya-Shan *et al.*, 2014).

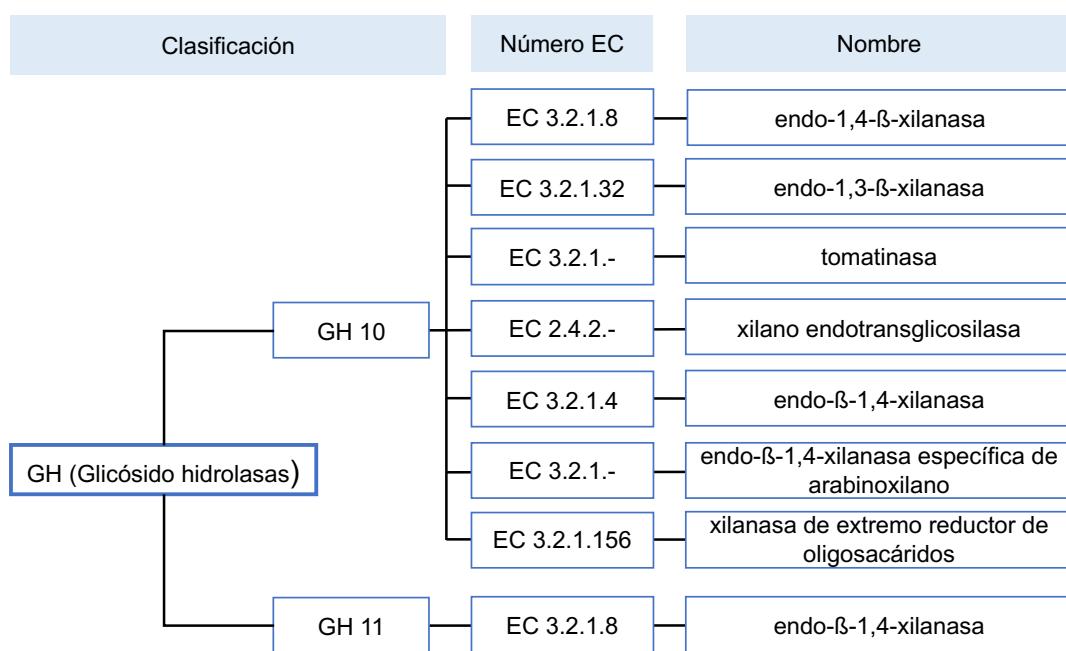


Figura 5. Clasificación de las familias GH 10 y GH 11 propuesta por CAZy.org.

La segunda clasificación es una compilación de datos para cada clase de enzima que corresponde con la Braunschweig Enzyme Database (BRENDA), fundada en 1987 en el Centro Nacional de Investigación en Biotecnología de Braunschweig. Actualmente se encuentra en el Centro Integrado de Biología de Sistemas, en el Instituto de Bioquímica y Bioinformática de la Universidad Técnica en Braunschweig, Alemania (Porto de Souza Vandenberghe *et al.*, 2020). Esta base de datos clasifica a las xilanases como hidrolasas que corresponden a la clase EC 3 (Chang *et al.*, 2021). En la Figura 6 se ejemplifican las xilanases de importancia industrial y las reacciones que catalizan. Para su elaboración se tomó la información de BRENDA y se seleccionaron las enzimas que, junto con las xilanases, son necesarias para la hidrólisis completa de la hemicelulosa (Ergün y Çalik 2016; Chadha *et al.*, 2019b).

Clasificación	Número EC	Nombre aceptado	Reacción
3.1 Actúan en los enlaces éster			
3.1.1 Hidrolasas de ésteres carboxílicos	EC 3.1.1.72	Acetilxilano esterasa	Desacetilación de xilanos y xilo-oligosacáridos
	EC 3.1.1.73	feruloil esterasas	Feruloil-polisacárido + H ₂ O = ferulato + polisacárido
3. Hidrolasas	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-β-xilanasa	Endohidrólisis de enlaces (1→4)-β-D-xilosídicos en xilanos
3.2 Glicosilasas	EC 3.2.1.22	α-galactosidasa	Hidrólisis de residuos, no reductores, de α-D-galactosa en α-D-galactósidos, incluidos oligosacáridos de galactosa, galactomananos y galactolípidos
3.2.1 Glicosidasas	EC 3.2.1.25	β-manosidasa	Hidrólisis de residuos β-D-manova terminales no reductores en β-D-manósidos
	EC 3.2.1.37	Xilano 1,4-β-xilosidasa	Hidrólisis de (1→4)-β-D-xilanos, para eliminar los sucesivos residuos de D-xilosa de los terminales no reductores
	EC 3.2.1.55	Extremo no reductor α-L-arabinofuranosidasa	Hidrólisis de residuos α-L-arabinofuranósidos terminales no reductores en α-L-arabinósidos
	EC 3.2.1.139	α-glucuronidasa	Un α-D-glucuronósido + H ₂ O = un alcohol + D-glucuronato

Figura 6. Clasificación de las xilanases y otras enzimas para la hidrólisis de hemicelulosa.

2.6.2. Importancia industrial y biotecnológica de las xilanases

Los métodos enzimáticos ofrecen ventajas sobre los pretratamientos físicos y químicos como un método ecoamigable, ya que no necesitan reactivos peligrosos

con efectos en el ambiente, a diferencia de la mayoría de los procesos industriales (Ajeje *et al.*, 2021). Es por ello por lo que las xilananas han llamado la atención de la comunidad científica y cuentan con diversas aplicaciones biotecnológicas (Chadha *et al.*, 2019a; Kumar *et al.*, 2016). El mercado estimado de las xilananas se encuentra entre 200 y 300 millones de dólares y se calculó que a finales de 2023 alcanzó los 500 millones de dólares (Chadha *et al.*, 2019a). Este mercado específico está geográficamente dividido en cinco regiones clave, que incluyen Norteamérica, América Latina, Europa, Asia-Pacífico y el este de África; la principal es Asia-Pacífico, representada por China e Indonesia. Actualmente, existen empresas comerciales que se dedican a la venta de xilananas purificadas. En la Tabla 3 se muestran ejemplos de algunas especies de microorganismos de las que se obtienen endo-1,4- β -xilananas comerciales. La variación de los precios se debe a las características de la enzima.

Tabla 3. Ejemplos de endo-1,4- β -xilananas en el mercado

Tipo de microorganismo	Especie de procedencia	Cantidad	Precio	Empresa
Bacteria	<i>Cellvibrio japonicus</i> NCIBM 10462 (CAA33469)	2700 UI	\$ 54.69	Prozomyx
	<i>Cellvibrio mixtus</i> ATCC 12120 (AAD09439)	1350 UI	\$ 54.69	
	<i>Cellvibrio mixtus</i> ATCC 12120 (AF049493, O68541)	ND	\$ 54.69	
	<i>Clostridium thermocellum</i> F1 (BAA21516)	112.5 UI	\$ 54.69	
	<i>Clostridium thermocellum</i> F1 (CAA58242)	1500 UI	\$ 54.69	
	<i>Clostridium thermocellum</i> YS (CAA58242)	1400 UI	\$ 54.69	
	<i>Clostridium thermocellum</i> YS (P51584)	487.5 UI	\$ 54.69	
	<i>Clostridium thermocellum</i> F1/YS (AAC04579)	2800 UI	\$ 54.69	
Hongo	<i>Clostridium thermocellum</i> F1/YS (AAC04579)	3750 UI	\$ 54.69	Megazyme
	<i>Clostridium thermocellum</i> F1/YS (AAC04579)	315 UI	\$ 54.69	
	<i>Neocallimastix patriciarum</i> (CAA46498, P29127)	ND	\$ 10.72	
	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	20,000 UI	\$ 218.75	Megazyme
	<i>Trichoderma viride</i>	250 UI	\$ 490.43	

<i>Trichoderma viride</i>	1000 UI	\$ 1389.4	Sigma Aldrich
---------------------------	---------	-----------	---------------

Las cantidades y precios se reportan como se especifica en la página web, homogenizados en dólares americanos.

Prozomyx: <https://www.prozomix.com>

Megazyme: <http://www.megazyme.com>

Sigma Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com>

ND: Costo por mg, no declaran las unidades

La xilananas se emplean principalmente en la producción de biocombustibles; en panadería se usan junto con amilasas para mejorar el volumen específico; como aditivos en alimento para aves con el fin de ganar peso; en la extracción de almidón, café y aceites vegetales; tratamiento de aguas residuales; mejoramiento de las propiedades nutricionales de ensilados y granos; obtención de proteínas celulares, combustibles y sustancias químicas; obtención de xilitol y etanol a partir de biomasa lignocelulósica; clarificación de mostos y jugos de frutas junto con celulasas y pectinasas (Cooper, 2013; Heinen *et al.*, 2013; Veeresh y Chuan Wu, 2012); así como en la formulación de detergentes y en la industria de papel (Mhiri *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

2.6.2.1. Industria de pulpa y papel

La extracción de la hemicelulosa de las células vegetales se lleva a cabo mediante pretratamientos químicos con reactivos alcalinos, que reducen la cristalinidad de la celulosa y aumentan la porosidad de los materiales lignocelulósicos (Heinen *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Las xilananas se han reportado como una alternativa efectiva a los reactivos tóxicos que remueven la lignina de la pulpa Kraft, por lo que se usan comercialmente en el blanqueo (Battan *et al.*, 2007). El uso de xilananas a menudo se denomina proceso de preblanqueo, debido a la naturaleza de su efecto, que consiste en mejorar la eficiencia de los productos químicos de blanqueo en lugar de eliminar la lignina directamente. Estas enzimas atacan la red de xilano que rodea y atrapa las partículas de lignina residuales (Walia *et al.*, 2017). Además, el uso de xilananas permite disminuir la cantidad de agentes químicos, el volumen de los efluentes a tratar y, en consecuencia, sus impactos ambientales (Heinen *et al.*, 2017; Kulkarni *et al.*, 1999; Mhiri *et al.*, 2020). También se ha señalado que el tratamiento enzimático mejora las características físicas del papel (Sridewi *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2017).

2.6.2.2. Industria alimentaria

El uso de xilananasas en panificación aumenta el volumen del pan y la absorción de agua, y mejora la fermentación (Polizeli *et al.*, 2005). Las xilananasas hidrolizan la hemicelulosa presente en la harina de trigo, ayudando a la redistribución de agua, por lo que mejoran la formación de la red de gluten en la masa, lo que a su vez proporciona elasticidad, extensibilidad y suavidad (Bajpai, 2022). En la industria cervecera, las xilananasas hidrolizan la pared celular de la cebada, por lo que se reduce la viscosidad de la cerveza, mejoran la eficiencia de la filtración y disminuyen la apariencia turbia del producto (Ajeje *et al.*, 2021; Heinen *et al.*, 2017).

Los jugos de fruta contienen polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, almidón, pectina y lignina) que afectan su calidad al hacerlos más turbios y viscosos. El uso de enzimas en la extracción y clarificación de jugos de frutas disminuye la viscosidad e impide la formación de cúmulos (Bhardwaj *et al.*, 2019).

2.6.2.3. Industria farmacéutica

Las xilananasas, junto con otras enzimas, suelen añadirse como suplementos dietéticos o para el tratamiento de problemas digestivos. También, con ayuda de las xilananasas, se puede obtener xilitol, empleado como edulcorante dirigido a pacientes con obesidad y diabetes. De igual forma, se pueden emplear en la prevención de infecciones respiratorias, trastornos del metabolismo lipídico, lesiones renales y parentales (Polizeli *et al.*, 2005).

Las características de los xilooligosacáridos, unidades de D-xilosa, los convierten en buenos candidatos para la formulación de fármacos y aplicaciones farmacéuticas. Pueden utilizarse como componentes bioactivos y como agentes preventivos contra el estrés oxidativo, anemia, aterosclerosis, diabetes, osteoporosis y ciertos tipos de cáncer (Heinen *et al.*, 2017).

2.6.2.4. Alimentos para animales

Las xilananasas hidrolizan el arabinoxilano presente en el trigo, triticale, centeno, cebada y soya que se emplea en los piensos para reducir la viscosidad de estos materiales lignocelulósicos, que a su vez dificultan la digestión. Lo anterior permite una ganancia de peso a los animales, ya que mejora la utilización de los nutrientes

atrapados dentro de las células vegetales (Bhardwaj *et al.*, 2019; Polizeli *et al.*, 2005) y facilita su compostaje (Bajpai, 2022).

2.6.2.5. Producción de biocombustibles

A partir de la biomasa lignocelulósica se pueden generar biocombustibles como el etanol y el xilitol. Este etanol o bioetanol es producto del proceso en el que las enzimas degradan los polisacáridos en monosacáridos fermentables, por lo que el bioetanol obtenido se considera amigable con el ambiente (Ajeje *et al.*, 2021). La producción de etanol inicia con la deslignificación de las lignocelulosas, que libera celulosa y hemicelulosa de la lignina, y que a su vez produce azúcares libres, pentosas y hexosas, las cuales se fermentan para producir etanol (Goswami y Pathak, 2013). En cuanto al xilitol, este se produce a partir de la xilosa, lo que requiere un pretratamiento químico de lignocelulosa y luego una hidrogenación de xilosa a xilitol (Juturu y Chuan Wu, 2012). En este contexto, las xilanásas, junto con otras enzimas accesorias, pueden usarse de manera eficiente para aumentar la despolimerización de los polímeros de carbohidratos de la biomasa lignocelulósica, lo que es más económico (Heinen *et al.*, 2017).

2.6.3. Bacterias productoras de xilanásas

Diversos microorganismos, como bacterias, arqueas, hongos y algas, pueden producir xilanásas extracelulares, las cuales actúan sobre el material hemicelulósico y liberan xilosa como producto final, lo que permite a estos organismos crecer sobre el xilano (Kulkarni *et al.*, 1999). Sin embargo, las bacterias y los hongos son los que más se han citado como productores de xilanásas (Battan *et al.*, 2007). De igual forma, se ha reportado la presencia de múltiples xilanásas en un mismo organismo, debido a la naturaleza heterogénea del polímero xilano (Cooper, 2013).

En diversos trabajos en los que se describen enzimas, un común denominador es reportar el valor de pH óptimo y la temperatura óptima, así como obtener los datos de la actividad específica de dicha enzima. Esta última se puede reportar en unidades internacionales (UI) o simplemente en unidades por proteína (UI/mg). En el caso de las xilanásas, una de las técnicas más reportadas para medir su actividad enzimática es la de azúcares reductores por DNS (3,5-ácido

dinitrosalicílico), en la cual se determina la xilosa, que es el azúcar reductor, como resultado de la hidrólisis del xilano. Esta actividad enzimática se representa como UI, haciendo referencia a la cantidad de enzima que se requiere para producir 1 µmol de xilosa por minuto (Fernandes de Souza *et al.*, 2022). Por otro lado, también es común reportar datos de la termoestabilidad, es decir, el tiempo y la temperatura en los que se alcanza la mayor actividad de la enzima. Por lo anterior, en la Tabla 4 se presentan algunos ejemplos de bacterias productoras de xilanases termoestables con los parámetros antes mencionados.

Tabla 4. Ejemplos de bacterias productoras de xilanases termoestables y sus parámetros de termoestabilidad.

Microorganismos	pH óptimo	T óptima	Actividad específica	Termoestabilidad	Referencia
<i>Rhodothermus marinus</i>	7.5	65 °C	ND	ND	Karlsson <i>et al.</i> (2004)
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	6.5	70 °C	23.8 UI/mL	18 y 12 días a 60 y 70 °C	Bhalla <i>et al.</i> (2015)
<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	5 a 7	90 °C	ND	Menos de 3 h a 90 °C	Benedetti <i>et al.</i> (2019)
<i>Caldicoprobacter algeriensis</i>	6.5	80 °C	117 UI/mg	20 min a 80 °C	Mhiri <i>et al.</i> (2020)
<i>Thermotoga maritima</i>	6.5	80 °C	6200 UI/mg	5 min a 80 °C	Yang <i>et al.</i> (2020)
<i>Bacillus halodurans</i> S7	9 y 10	75 y 70 °C	342 UI/mg	ND	Mamo <i>et al.</i> (2006)
<i>Paenibacillus campinasensis</i> BL11	7	60 °C	2392 UI/mg	8 h a 60 °C	Ko <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus</i> sp. N16-5	7	70 °C	92.5 UI/mg	30 min a 60 °C	Zhang <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus pumilus</i> ARA	6.6	50 °C	0.05 UI/mL	1 h a 60 °C	Qu y Shao (2011)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	8.5	80 °C	270 UI/mg	50-60 min a 80 °C	Verma y Satyanarayana (2012)
Expresión en <i>Escherichia coli</i>	9	80 °C	ND	2 h a 80 °C y 15 min a 90 °C	Verma <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> VSDB5	6	50 °C	1.0 UI/mL	30 min a 60 °C	Joshi <i>et al.</i> (2022)
<i>Bacillus licheniformis</i> KBFB4	6	50 °C	0.76 UI/mL	30 min a 60 °C	
<i>Bacillus oceanisediminis</i> SJ3	5 a 10	55 °C	ND	6 h a 55 °C	Boucherba <i>et al.</i> (2017)

<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	6	90 °C	350 ± 27 UI/mg	12 min a 90 °C	Barabote <i>et al.</i> (2010)
<i>Paenibacillus</i> sp. PCH8	7.0	50 °C	20.25 UI/mg	ND	Thakur <i>et al.</i> (2022)
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> B6A-RI	6	70 °C	41 UI/mg	ND	Lee <i>et al.</i> (1993)
<i>Alicyclobacillus</i> sp. A4	7	55 °C	420.2 UI/mg	1 h a 60 °C	Bai <i>et al.</i> (2010)
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> NASTPD13	9	65 °C	33 UI/mg	ND	Yadav <i>et al.</i> (2018)
<i>Enterobacter</i> sp.	9	100 °C	90 UI	ND	Khandeparkar y Bhosle (2006)
<i>Enterobacter ludwigii</i>	7	40 °C	1.29 ± 0.05 UI/mL	ND	Zhang <i>et al.</i> (2018)

Como se ha explicado a lo largo de la sección 2.6, las xilanases, como ejemplos de termoenzimas, presentan amplias aplicaciones y no dejan de ser un campo de estudio para profundizar en los genes que las conforman, así como su modificación genética y su consecuente aumento en la actividad; además creemos que es importante que se pueda comparar entre sus características de pH y temperatura óptimos, así como los valores de su termoestabilidad. El estudio de las xilanases es crucial en la biotecnología, en la industria e incluso en la economía, ya que su demanda continúa en aumento. Es por ello que la búsqueda de microorganismos en ambientes extremos y el conocimiento de sus metabolitos siguen siendo un campo de exploración, por lo que México no es la excepción, ya que cuenta con diversos sitios con condiciones extremas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos han sido poco estudiados en comparación con los mesófilos. Sin embargo, los termófilos son ampliamente utilizados en la industria, debido a su alta tolerancia a pH alcalinos o ácidos y a su adaptabilidad a temperaturas elevadas, lo que refleja una ventaja en términos de eficiencia de los procesos, en contraparte con el uso de microorganismos mesófilos. La búsqueda de tecnologías más sostenibles y ecoamigables ha impulsado el desarrollo de alternativas para reducir el impacto de la contaminación, que pongan de manifiesto soluciones biotecnológicas.

Por tanto, las enzimas termofílicas producidas por microorganismos extremófilos permiten innovar en procesos industriales convencionales, en diferentes campos como: agricultura, medicina, industria alimentaria, textil, farmacéutica, entre otros.

Las xilanásas termofílicas operan a elevadas temperaturas y su uso representa una alternativa ecológica. Por ejemplo, se utilizan en la producción de biocombustibles, el blanqueo de pulpa de papel, el mejoramiento de la reología de la masa en panificación, así como la digestibilidad de alimentos para el ganado, por mencionar algunos.

El reconocimiento de microorganismos extremófilos y sus extremoenzimas en Hidalgo es escaso. Teniendo en cuenta que las aplicaciones industriales minimizan el consumo de productos químicos, las xilanásas termófilas y otras termoenzimas aisladas se presentan como una alternativa prometedora por su alta estabilidad térmica y eficiencia catalítica. Gracias a este potencial, su estudio, caracterización y aplicación siguen siendo limitados frente al uso de enzimas mesofílicas.

En este contexto, este trabajo plantea la necesidad de reconocer el potencial de los microorganismos termófilos, mediante su caracterización y la posible aplicación de algunas de sus termoenzimas, con énfasis en las xilanásas, como una oportunidad para desarrollar bioprocessos más eficientes y sostenibles.

4. JUSTIFICACIÓN

México cuenta con aguas termales y géiseres de los cuales se pueden aislar microorganismos termófilos y el estado de Hidalgo no es una excepción. Incluye zonas que pertenecen al Cinturón Volcánico Transmexicano, por lo que es factible aislar microorganismos extremófilos de ambos recursos geotérmicos con interés biotecnológico.

Debido a que los microorganismos extremófilos han desarrollado la capacidad de adaptarse a ambientes extremos como temperaturas altas, acidez o alcalinidad, por mencionar algunos factores, el reconocimiento de su actividad enzimática continúa siendo de interés en distintos procesos industriales.

Las actividades enzimáticas de bacterias, arqueas y hongos extremófilos presentan valores altos de actividades específicas, expresadas en unidades internacionales por miligramo de proteína (UI/mg), por lo que las aplicaciones industriales obtenidas de bacterias y hongos han tenido una aceptabilidad en el mercado de hasta 500 millones de dólares, como, por ejemplo, las xilanásas.

Por tanto, la presente investigación pretende aislar microorganismos en aguas termales que permita caracterizar los recursos geotérmicos y ampliar el catálogo de especies reconocidas en el estado de Hidalgo, para identificar la fuente de enzimas útiles con potenciales aplicaciones en procesos industriales ecoamigables, con énfasis en xilanásas que pueden ser usadas en el blanqueo de la pulpa de papel, la clarificación de jugos, el mejoramiento de la reología de la masa de panificación, entre otros.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Aislar, tipificar e identificar molecularmente bacterias de aguas termales, caracterizadas hidrogeoquímicamente, evaluando su actividad xilanolítica, con el fin de explorar su potencial biotecnológico y su aplicabilidad en procesos industriales que operen bajo condiciones extremas.

5.2. Objetivos específicos

- 1) Analizar y caracterizar un manantial de aguas termales mediante análisis fisicoquímicos e hidrogeoquímicos para clasificar el tipo de agua, así como los posibles minerales presentes en la zona.
- 2) Aislar y tipificar bacterias presentes en aguas termales a través de pruebas microscópicas, morfológicas, de tolerancia y bioquímicas, con el fin de integrar un cepario.
- 3) Identificar y validar molecularmente las bacterias termófilas aisladas por medio de técnicas moleculares para determinar su pertenencia taxonómica.
- 4) Comparar la actividad xilanolítica de las cepas identificadas mediante ensayos de cinéticas enzimáticas y evaluar condiciones de pH alcalino, con el propósito de prospectar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas o industriales.

6. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA E HIDROGEOQUÍMICA DE LAS AGUAS TERMALES

6.1. Introducción

Las aguas termales se localizan en todos los continentes del planeta Tierra y son originadas por fenómenos geológicos naturales. Su composición está determinada por la interacción química entre las rocas del yacimiento y los minerales formadores de rocas a lo largo del camino de ascenso hacia la superficie. Por tanto, el agua subterránea presenta características fisicoquímicas que la hacen única, como su temperatura, contenido mineral y acidez o alcalinidad (Chan *et al.*, 2017; Porowski, 2017).

La información química de los sistemas termales permite conocer el tipo de rocas presentes en la zona, así como obtener una idea de la interacción agua-roca (Mahala, 2018). Por tanto, se pueden encontrar minerales disueltos como magnesio, calcio, sodio, cloruro, sulfatos o sílice, comunes en zonas de agua geotérmica (Najar *et al.*, 2018). A su vez, la formación de estos minerales puede asociarse con la interacción de gases volcánicos con diferentes tipos de rocas, por ejemplo, cuando las aguas subterráneas y gases volcánicos interactúan con rocas compuestas por silicatos (Des Marais y Walter, 2019). El conjunto de estos minerales da lugar a niveles elevados de sólidos disueltos y gases; cuya cantidad se ve influenciada por la geografía, geología y temperatura de los manantiales (Chalise *et al.*, 2023).

Las aguas termales tienen su origen en las elevadas temperaturas en el interior de la tierra y al estar en contacto con rocas porosas o fisuras, se permite su ascenso hacia la superficie (Farhat *et al.*, 2021). Las temperaturas altas de las aguas termales se deben a reacciones exotérmicas, energía geotérmica y la desintegración de elementos radiactivos, por lo que suelen ser ricas en sólidos disueltos y en la presencia de varios minerales, así como metales alcalinos, carbonatos, bicarbonatos, sulfatos, elementos traza y gases (Farhat *et al.*, 2021; Chalise *et al.*, 2023).

La importancia de las aguas termales yace en su uso recreativo y mineromedicinal, ya que se han comprobado sus efectos positivos en algunas enfermedades como dermatitis atópica, enfermedades cardiovasculares, artritis inflamatoria y asma, por mencionar algunas (Farhat *et al.*, 2021). Sin embargo, para fines científicos, las aguas termales son uno de los ambientes más estudiados en la búsqueda de numerosos seres vivos termófilos e hipertermófilos (Verma *et al.*, 2018). Generalmente, estos sitios no solo presentan temperaturas elevadas entre 50 y 80 °C, sino que el pH y las concentraciones de sales también pueden ser extremos para el desarrollo de la vida (Urbieta *et al.*, 2015).

La clasificación de las aguas termales puede variar entre países según sus leyes y regulaciones sobre su uso y protección. Aunque se consideran sus características geofísicas, como el contenido de elementos minerales disueltos, temperatura, magnitud de las descargas desde la fuente, es decir, el caudal, así como el pH, ya sea ácido, neutro o alcalino, no existe un consenso internacional que permita una clasificación (Erfurt, 2021).

En México se han detectado diferentes áreas hidrotermales pertenecientes a las provincias de la Sierra Madre Occidental, el Golfo de California y el Cinturón Volcánico Transmexicano. Este último está asociado a la placa de Cocos bajo la placa Norteamericana y se caracteriza por tener elevados valores de flujo térmico de 180 mW/m². Lo anterior conlleva a que las aguas termales presenten gradientes superiores a los 80 °C/km en la mayoría de las zonas (Martínez-Florentino *et al.*, 2021).

Las aguas termales de Santa María Amajac se encuentran en el municipio de Atotonilco el Grande, en el estado de Hidalgo. El nombre del municipio proviene de la lengua náhuatl “en las aguas termales” (Piñero-Ramírez *et al.*, 2011). Dicho municipio confluye en las provincias geológicas del Cinturón Volcánico Transmexicano, así como del Cinturón Mexicano de Pliegues y Fallas (Ortíz-Hernández, *et al.*, 2014).

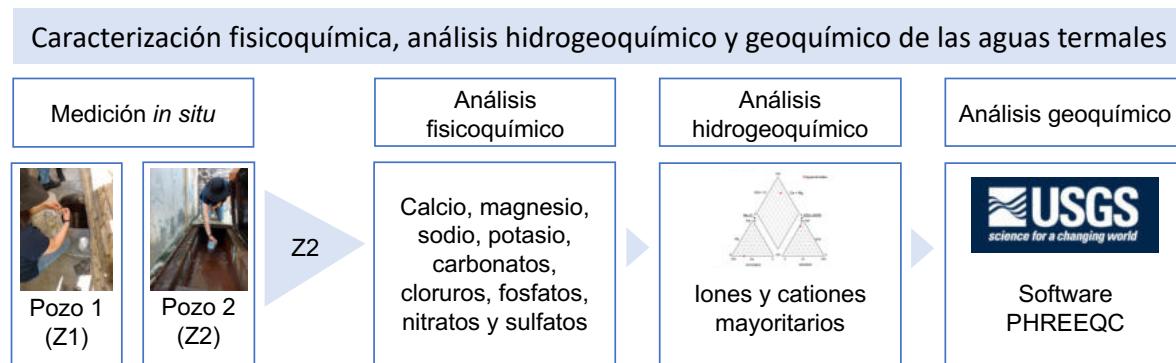
Las aguas termales de Santa María Amajac se forman parte del Cinturón Volcánico Transmexicano en direcciones oeste-noroeste del país, tal como se menciona en el Inventario Físico de los Recursos Minerales de la Carta Actopan F14-D17 (Piñero Ramírez, 2011). Gracias a sus propiedades mineromedicinales, su uso está

registrado como balneoterapia ya que se emplean como agentes terapéuticos (Saz *et al.*, 2011).

6.2. Materiales y métodos

En la Figura 7 se observa el diagrama general relacionado con los muestreos de agua termal, que comprende: 1) la medición *in situ* de los parámetros fisicoquímicos del pozo 1 y 2; 2) análisis fisicoquímico de la muestra de agua termal del pozo 2, mismo que se detallará en el apartado 6.2.2., y 3) análisis hidrogeoquímico y geoquímico de las aguas termales, a desarrollarse en los apartados 6.2.3 y 6.2.4, respectivamente.

Figura 7. Diagrama general de metodología para la caracterización fisicoquímica e hidrogeoquímica del agua.



6.2.1. Muestreo y medición *in situ* de agua termal de ambos pozos

El muestreo y las mediciones *in situ* se realizaron el cinco de mayo de 2021 en la localidad de Santa María Amajac, Hidalgo, México, cuyas coordenadas son: longitud -98.742222 y latitud 20.323889. Con un multiparámetro portátil, HANNA HI 9828 (Woonsocket, Rode Island, USA) se midieron los parámetros de oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE), sólidos totales disueltos (SDT) y salinidad de dos pozos distintos de aguas termales. El primer pozo se identificó como Z1, el cual corresponde a un pozo abierto, sujeto a contaminación por fauna, flora y antrópica; el segundo pozo, Z2, se encuentra tapado mediante una plancha de concreto sin contacto con el público ni operarios del balneario, por lo cual se garantiza que no está expuesto a factores

antropogénicos. Con los datos obtenidos se obtuvo una clasificación de las aguas del sitio de estudio en cuanto al pH, la temperatura y los sólidos totales disueltos mediante la comparación con diversos autores.

6.2.2. Análisis fisicoquímico del agua termal Z2

Se tomó una muestra de 1 L de agua, exclusivamente de Z2, en un recipiente estéril para el análisis fisicoquímico. Dicha muestra fue entregada al laboratorio Análisis Técnicos S.A. de C.V., acreditado por EMA (Laboratorio de ensayo, acreditado A-0618-060/15). Los métodos de análisis emitidos por dicho laboratorio fueron: para pH (NMX-F-534-1992, valor de pH de la muestra a 20 °C); Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} (ICP Plasma); NO_3^- (columna de cadmio); CO_3^{2-} , HCO_3^- (titulación con H_2SO_4); Cl^- (titulación con AgNO_3 y lectura potenciométrica) y conductividad eléctrica (lectura potenciométrica). Cabe señalar que este análisis se realizó con la única intención de caracterizar la hidrogeoquímica del lugar.

6.2.3. Análisis hidrogeoquímico del agua termal

Con los datos resultantes de la caracterización fisicoquímica del agua termal, el siguiente paso fue realizar el análisis hidrogeoquímico del agua, mismo que se realizó mediante un diagrama de Piper elaborado con el programa Easy-Quim.4 (Vazquez-Suñe y Serrano-Juan, 2012). En este diagrama se muestra la proporción entre cationes y aniones representados por dos triángulos y un rombo; en el triángulo de la izquierda se encuentran los cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Na}^+ + \text{K}^+$), en el triángulo de la derecha se representan los aniones (Cl^- , SO_4^{2-} , $\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$), mientras que en el rombo se muestra la proporción de ambos (Moreno-Merino *et al.*, 2021). Las lecturas de los cationes aumentan de derecha a izquierda; los aniones aumentan de izquierda a derecha, y en ambos casos, los porcentajes aumentan de abajo hacia arriba, por lo que en el rombo se muestran los grupos químicos que predominan en las aguas termales, como se indica en el siguiente ejemplo (Figura 8) (Moreno-Merino *et al.*, 2021).

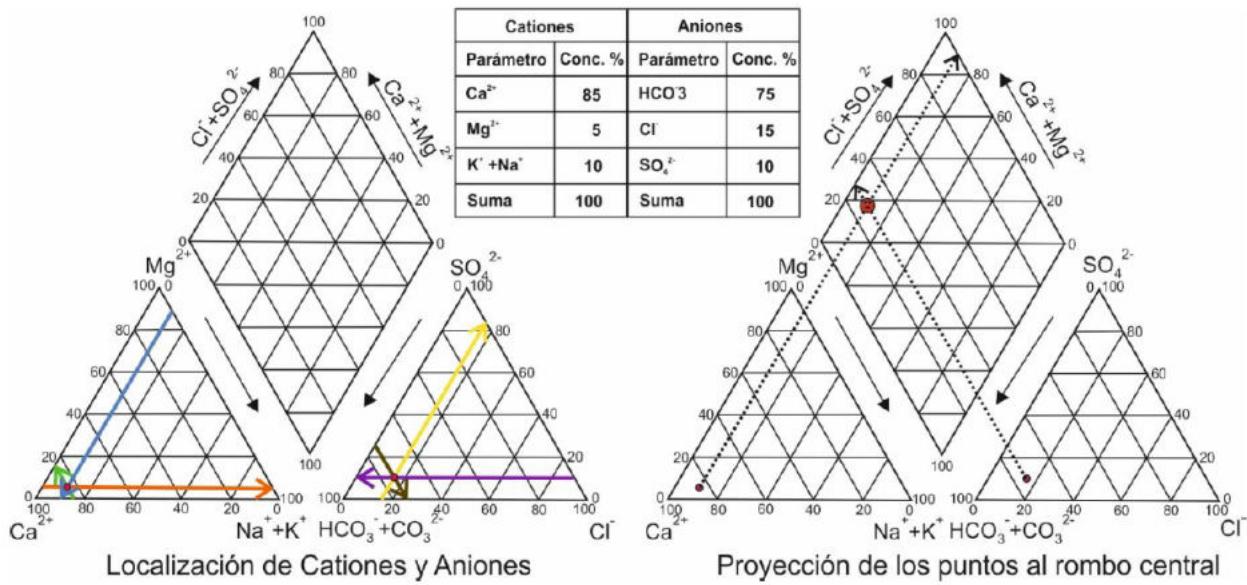


Figura 8. Ejemplo de un diagrama de Piper.

(Moreno-Merino et al., 2021).

6.2.4. Análisis geoquímico del agua termal

Con los datos de la caracterización fisicoquímica del agua termal se realizó un modelado geoquímico mediante el software libre PHREEQC (Parkhurst y Appelo, 2013) (USGS, USA); para ello se emplearon los valores de pH, conductividad eléctrica, la temperatura del agua al momento de realizar los análisis (26.1 °C) y la concentración iónica. Para modelar las reacciones de intercambio iónico y de complejización de superficies se eligieron las opciones de “especiación acuosa” y “equilibrio de fases”. Para analizar la correlación entre la fuerza iónica y la composición química del agua fue necesario seleccionar la base de datos WATEQ4F, lo que permitió determinar las fases minerales que posiblemente participen en el intercambio geoquímico.

PHREEQC es un programa informático desarrollado por el Servicio Geológico de Estados Unidos de América que permite el modelado geoquímico (Lu, 2022); es empleado para calcular los índices de saturación de las fases acuosas. El índice de saturación es una medida que indica si un mineral tiende a disolverse o precipitarse (Banks, s.f.), lo que permite la modelación de procesos de precipitación o disolución, reacciones de óxido-reducción, así como procesos de

adsorción (Parkhurst y Appelo, 1999). La modelación hidrogeoquímica permite visualizar la relación entre los minerales presentes en el medio geológico y el agua (superficial o subterránea) con la que entran en contacto; así como identificar los procesos naturales en los que interviene (Morán-Ramírez *et al.*, 2013).

Por otra parte, WATEQ4F es un código del programa informático PHREEQC, el cual mediante los parámetros de pH, temperatura, oxígeno disuelto, alcalinidad y los datos del análisis químico de la muestra de agua a analizar, permite conocer la especiación que ocurren en las aguas naturales así como la distribución de las especies acuosas, actividades iónicas e índices de saturación de minerales, lo que ayuda a identificar la tendencia que tiene el agua a disolver o precipitar varios minerales (Ball y Nordstrom, 1991). Cuando los índices de saturación son inferiores a cero (es decir, valores negativos), existe subsaturación del medio acuoso, mientras que, cuando los valores son superiores a cero, se asume que existe sobresaturación mineral.

Con esta información, se pueden comparar las constantes de equilibrio y determinar el grado de saturación del agua respecto a cada uno de los minerales analizados (Truesdell y Jones, 1974). Por otro lado, el programa PHREEQC se emplea para calcular los índices de saturación y evaluar si una muestra de agua presenta condiciones de subsaturación o sobresaturación, lo que permite interpretar los procesos de interacción e intercambio geoquímico que ocurren entre el agua y las fases minerales.

El principal objetivo del programa WATEQ4F es calcular los índices de saturación, ya que, al tomar una muestra de agua, esta deja de estar en contacto con las fases minerales. Este programa busca determinar con qué fases minerales el agua está saturada o casi saturada mediante la deducción de los iones disueltos; con estos datos se puede hacer una comparación de la constante de equilibrio para mostrar el grado de saturación del agua con cada mineral considerado (Truesdell y Jones, 1974).

6.3. Resultados y discusiones

6.3.1. Muestreo y medición *in situ* de agua termal de ambos pozos

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del agua termal de Santa María Amajac para los pozos Z1 y Z2, medidas *in situ*, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* de ambos pozos.

Parámetros	Unidades	Z1	Z2
Oxígeno disuelto (DO)	mg/L	4.00	2.45
pH	pH	6.76	6.73
Temperatura	°C	44.74	53.77
Conductividad	µS/cm	3170	2778
Sólidos totales disueltos	mg/L	1585	1389
Salinidad	PSU	1.60	1.37
Redox	ORP	226.8	248.8

PSU: Unidades Prácticas de Salinidad, por sus siglas en inglés

ORP: Potencial Oxido-Reducción, por sus siglas en inglés

Es común encontrar en la literatura que para la caracterización de las aguas mineromedicinales se tomen en cuenta el pH, la temperatura y los sólidos totales disueltos. Sin embargo, no existe una clasificación universal, ya que las propiedades físicas del agua fluctúan debido al sitio en el que se encuentran (Saz *et al.*, 2011). De acuerdo con el pH de las aguas termales, Subtavewung *et al.* (2005), proponen la clasificación que se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de las aguas termales de acuerdo con los valores de pH.

Tipo del manantial	pH
Ácido fuerte	< 2
Ácido	2 ≤ pH ≤ 4
Ácido débil	4 ≤ pH ≤ 6
Neutro	6 ≤ pH ≤ 7.5
Alcalino débil	7.5 ≤ pH ≤ 9
Alcalino	9 ≤ pH

Con los valores de pH registrados *in situ*, 6.73 y 6.76, Z1 y Z2, respectivamente, se puede considerar como manantial neutro.

Algunos autores proponen la clasificación de las aguas termales de uso terapéutico de acuerdo con diferentes rangos de temperatura superficial, los cuales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación de aguas termales de acuerdo con diferentes rangos de temperatura.

Erfurt (2021)	Subtavewung <i>et al.</i> (2005)	Saz <i>et al.</i> (2011)
Frío: < 25 °C	Frío: < 20 °C	Fría: Menos de 28 °C
Templado: 25-34 °C	Hipotermal: 20 ≤ 30 °C	Hipotermal: 28-34 °C
Cálido: 34-42 °C	Termal: 30 ≤ 50 °C	Mesotermal: 34-38 °C
Termal: > 42 °C	Hipertermal: 50 °C ≤	Hipertermal: Más de 38 °C
Termal extremo: > 100 °C		

Las temperaturas registradas *in situ*, 44.74 y 53.77, Z1 y Z2, respectivamente, permiten considerarlas como aguas termales, de acuerdo con Erfurt (2021), ya que la temperatura supera los 42 °C. De acuerdo con la clasificación propuesta por Subtavewung *et al.* (2005), también se pueden clasificar a Z1 como termal y a Z2 como hipertermal, ya que este último es superior a los 50 °C. Finalmente, las aguas termales de Santa María Amajac también corresponden a la clasificación de hipertermales de acuerdo con Saz *et al.* (2011) ya que, en este caso, superan temperaturas de 38 °C.

En la Tabla 8 se muestra la clasificación de aguas termales de acuerdo con su contenido de sólidos totales disueltos.

Tabla 8. Clasificación de las aguas termales de acuerdo con diferentes concentraciones de sólidos totales disueltos.

Davis (1964) (SDT-ppm)	Krieger (1963) (SDT-ppm)	Pazdro y Kozerski (1990) (SDT- g/L)
Dulce: 0-1000	Dulce: 1-1000	Ultradulce: < 0.1
Salobre: 1000-10,000	Ligeramente salino: 1000-3000	Dulce: 0.1-0.5
Salina: 10,000-100,000	Moderadamente salino: 3000-10,000	Mineral: 1.0-35.0
Salmuera: > 100,000	Muy salino: 10,000-35,000 Salmuera: >35,000	Salmuera: >35.00

En cuanto a la concentración de sólidos totales disueltos medidos *in situ*, de acuerdo con Davis (1964), se pueden clasificar como agua salobre (1000-10,000 ppm), como agua ligeramente salina (1000-3000 ppm) de acuerdo con la

clasificación de Krieger (1963) y finalmente como agua mineral (1000-3500 ppm), de acuerdo con Pazdro y Kozerski (1990).

En diversos trabajos con aguas termales se han reportado valores de pH y temperaturas semejantes a los obtenidos en el presente estudio, aunque no siempre se reportan los sólidos totales disueltos. Camargo y col. (2022) realizaron un estudio en la misma zona; asimismo, llevaron a cabo una caracterización fisicoquímica del agua de Santa María Amajac (latitud norte 20° 06' 50'', latitud oeste 98° 44' 50''), aunque la muestraron en una salida distinta a los puntos de muestreo del presente estudio. Dichos autores reportaron un pH de 6.84, de tal modo que la clasificaron como ligeramente ácida; de igual forma, reportaron una temperatura de 55 °C, en cuyo caso la clasificaron como hipertermal.

Rupasinghe *et al.* (2022) estudiaron seis fuentes de aguas termales ubicadas en Sri Lanka; reportaron valores de pH entre 6.25 y 8.35, por lo que se clasifican como ácidas y alcalinas, y un rango de temperatura de 39-59 °C. Chan *et al.* (2017) analizaron diversas fuentes de aguas termales en Malasia, en las siguientes localidades: Semenyih, con un rango de temperatura de 40-50 °C y un pH de 6.9; Ayer Hangast, con temperaturas entre 40-50 °C y un pH neutro de 7.1; y Dusun Tua, con temperaturas de 55-75 °C y un pH de 7. Lee *et al.* (2022) estudiaron cinco sitios de aguas termales en la República de Corea, de los cuales dos se asemejan al presente estudio: Baegam con una temperatura de 45.9 °C y un pH de 8.93 y Dongnae, con una temperatura de 59.4 °C y un pH de 7.6. Por otro lado, Prieto-Barajas *et al.* (2017) realizaron un estudio en cada estación del año en dos fuentes termales en Michoacán, México (Tina y Bonita); cabe resaltar que estas zonas también se encuentran en el Cinturón Volcánico Transmexicano. En el muestreo de primavera, misma estación en la que se tomaron muestras de este estudio, en Tina se reportó una temperatura de 66 °C y un pH de 7.64, mientras que en Bonita se reportó una temperatura de 45 °C y un pH de 7.03. Por último, Najar *et al.* (2018) analizaron una fuente de agua termal ubicada en India, en la zona de Borong, para la cual reportaron una temperatura de 52.3 °C, un pH de 5.32 y una concentración de sólidos totales disueltos de 1330 mg/L.

Cabe resaltar que los sitios de aguas termales anteriormente citados presentan similitudes con los parámetros de temperatura y pH observados en el presente estudio; en el caso del trabajo de Najar *et al.* (2018), los sólidos totales disueltos también se asemejan a los reportados en Santa María Amajac.

6.3.2. Análisis fisicoquímico del agua termal de Z2

El informe de resultados del análisis de agua emitido por el laboratorio certificado permitió caracterizar fisicoquímicamente el agua termal del pozo Z2, cuyos datos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del agua termal de Z2.

Parámetros	Concentración (mg/L)
Ca ²⁺	234.12
Mg ²⁺	41.67
Na ⁺	114.25
K ⁺	11.72
PO ₄ ³⁻	1.87
NO ₃ ⁻	0
CO ₃ ²⁻	0
HCO ₃ ⁻	203.79
Cl ⁻	13.37
SO ₄ ²⁻	895.95
Dureza	729.23
*CE	2651
SE	8.698

La dureza es la suma de CaCO₃ + MgCO₃; *CE: Conductividad eléctrica (μS/cm); SE: Salinidad efectiva

Son escasos los estudios que reportan la calidad del agua termal de Santa María Amajac. Sin embargo, los resultados mostrados en este estudio difieren de los resultados de los resultados de Camargo *et al.* (2022), cuyos valores fueron 0.09 mg/L de carbonatos, 250.60 mg/L de bicarbonatos, 236.00 mg/L de cloruros, 486.40 mg/L de sulfatos, dureza total de 1172.30 mg/L, calcio de 390.00 mg/L, magnesio de 48.20 mg/L, 8.10 mg/L de potasio y 128 mg/L de sodio. Cabe señalar, que a pesar de que los valores son superiores a los reportados por nosotros, las diferencias se pueden atribuir al entorno cerrado o abierto del punto de muestreo (Figura 9), así como a las distancias entre sí de los sitios exactos de cada muestreo: el presente estudio (20°32'38'' latitud norte y -98°74'22'' longitud oeste) y Camargo *et al.* (2022) (20°06'50" latitud norte y -98°44'50" longitud oeste), en línea recta aproximadamente 220 metros.



Figura 9. Ubicación aproximada de los sitios de muestreo. a) Sitio de muestreo por Camargo *et al.* (2022), b) Sitio de muestreo para Z2, c) Sitio de muestreo para Z1 y d) Distribución del balneario de agua termal de Santa María Amajac.

6.3.3. Análisis hidrogeoquímico del agua termal

A continuación, se presenta el análisis fisicoquímico con la proporción existente entre cationes y aniones mayoritarios, la cual se puede visualizar en el diagrama de Piper resultante (Figura 10). Cabe señalar que también se tomó en cuenta el valor de los sólidos totales disueltos medidos *in situ* en Z2, así como su comparación con los valores reportados por Camargo *et al.* (2022).

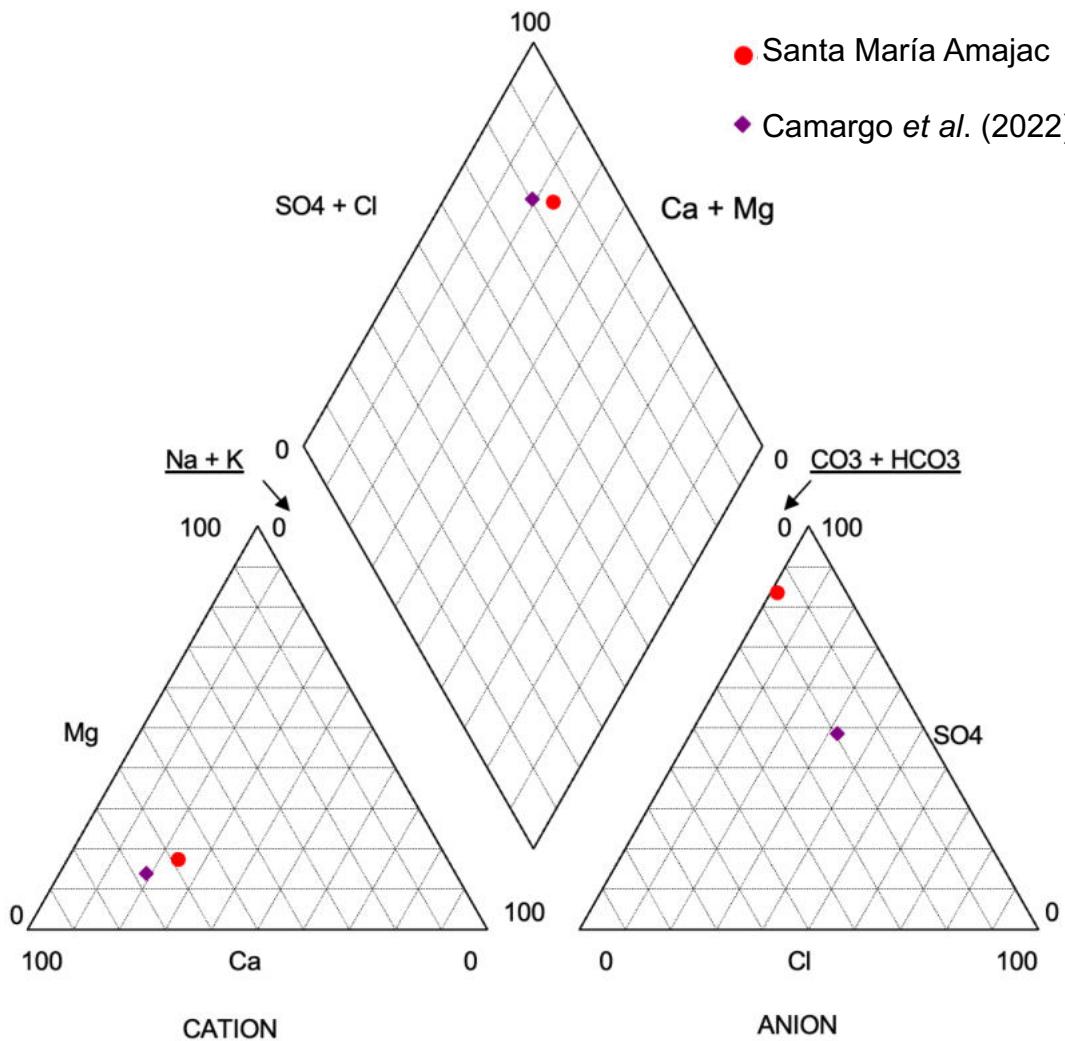


Figura 10. Diagrama de Piper de agua termal de Z2 de Santa María Amajac y su comparación con Camargo *et al.*, (2022).

El análisis fisicoquímico resultante mostró que los cationes mayoritarios son: Ca²⁺ (57.33%), Na⁺ (25.80%) y Mg²⁺ (16.87%), por lo que las aguas termales de Z2 se pueden clasificar como cálcico-magnésicas (57.33% de Ca²⁺ + 16.87% de Mg²⁺). Por otro lado, los aniones mayoritarios son 83.39 % de SO₄²⁻ y 14.93 % de HCO₃⁻.

Camargo y colaboradores en el año 2022 clasificaron el agua de Santa María Amajac como cálcica-sódica-sulfatada-clorurada. A pesar de que ambas fuentes de aguas termales se encuentran en la misma zona, como ya se mencionó anteriormente, no fueron tomadas exactamente de los mismos puntos; por tanto, los valores y ambas clasificaciones presentan diferencias.

Otros estudios han clasificado las fases hidrogeoquímicas de aguas termales alrededor del mundo, como es el caso de Hsu y Yeh (2020), en el que analizaron once zonas de aguas termales del grupo volcánico Tatun, situado al norte de la Cuenca de Taipei, Taiwán. Dos sitios de aguas termales, Tireku y Matsao, presentan temperaturas superficiales de 55.80 y 53.40 °C, respectivamente, cuyos valores son cercanos a los reportados en la zona de estudio del presente proyecto. El diagrama de Piper clasificó a Tireku como agua rica en cloruros, con concentraciones de 2684 y 4284 mg/L, mismas que superan a la reportada en Santa María Amajac, de 13.37 mg/L. Matsao se clasificó como agua termal rica en bicarbonatos, encontrando que el HCO_3^- de este manantial se origina en la roca huésped andesita. Por tanto, las características geológicas del sitio influyen en las variaciones de las concentraciones de los iones.

Baba *et al.* (2019) muestrearon aguas termales en la región de Anatolia, Turquía, zona que es considerada una de las más activas sísmicamente del mundo, además de contar con un sistema geotérmico en la Región de Anatolia Sudoriental. En dos sitios de aguas termales, Diyarbakir y Mardin, se reportaron temperaturas de 51 y 56.6 °C y las clasificaron como sódica-bicarbonatada-clorurada y cálcica-sulfatada, respectivamente, indicando que son una mezcla de agua profunda y aguas subterráneas poco profundas.

Bouaicha *et al.* (2019) realizaron análisis hidrogeoquímicos de diferentes aguas termales alrededor de Guelma, Argelia, reportando que estas tienen origen meteórico con un rango de temperaturas de 33.07 - 80.47 °C. Dividieron por grupos las aguas termales estudiadas, de acuerdo con la distribución geográfica de las zonas. Del primer grupo, reportaron abundancia de iones en el siguiente orden: $\text{Ca}^+ > \text{Na}^+ > \text{Mg}^+ > \text{K}^+$ y $\text{SO}_4^{2-} > \text{HCO}_3^- > \text{Cl}^-$, clasificándola del tipo hidrogeoquímico cálcica-sódica. El segundo grupo presentó una abundancia de $\text{Ca}^+ > \text{Na}^+ > \text{Mg}^+ > \text{K}^+$ y $\text{HCO}_3^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^-$, y se atribuyó la predominancia de Ca^+ y HCO_3^- a la geología del lugar. En el tercer grupo abundaron los sulfatos en primer lugar, seguidos de calcio, bicarbonatos y cloruros, por lo que se concluyó que el agua de Guelma está fuertemente influenciada por la geología de la zona.

6.3.4. Análisis geoquímico del agua termal

A continuación, se presentan los resultados del análisis geoquímico de los minerales identificados a través de la base de datos WATEQ4F del software PHREEQC (Figura 11).

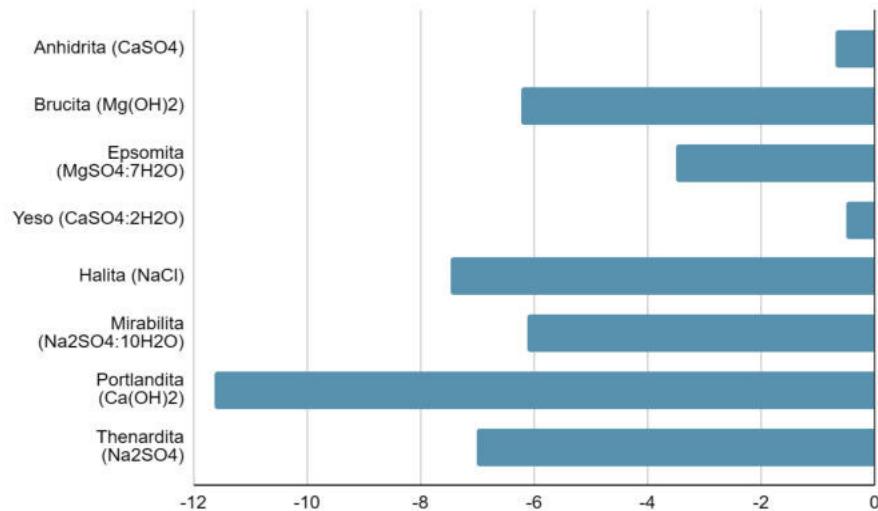


Figura 11. Geoquímica del agua termal de Z2 de Santa María Amajac.

El análisis geoquímico mostró que todos los minerales asociados a los iones presentes en la muestra de agua analizada indican saturación mineral ($IS < 0$), lo que sugiere una interacción geoquímica entre el agua termal y la geología local, favoreciendo la disolución mineral y, por ende, la presencia de estos iones en solución.

Los índices de saturación son aproximadamente iguales a cero cuando el agua está en equilibrio. Cuando el índice de saturación es superior a cero, el agua está sobresaturada con el mineral y tiende a precipitarlo. Cuando el índice de saturación es inferior a cero, el agua está subsaturada con respecto al mineral, y este puede presentar disolución al entrar en contacto con el agua (Ball y Nordstrom, 1991).

La capacidad de disolución de los minerales detectados en la zona de estudio (Figura 11) en orden decreciente es la siguiente: portlandita > halita > thenardita > brucita > mirabilita > epsomita > anhidrita > yeso. De acuerdo con Bratcher y

colaboradores (2021), esto podría deberse a la fuerza iónica del agua. Con esta asociación, es factible que el calcio provenga principalmente de la interacción portlandita > anhidrita, mientras que el magnesio provenga de la interacción brucita > epsomita.

Es bien sabido que la mineralogía del área de estudio permite reconocer los grupos de rocas predominantes, y aunque no fue objeto de estudio del presente trabajo, la bibliografía reporta que predominan las rocas calcáreas, clásticas y volcánicas (Arellano-Gil *et al.*, 2005), mismas que presentan una relación con el grupo químico predominante del agua ($\text{Ca}^+ + \text{Mg}^+$).

Camargo *et al.* (2022) describen que la zona de aguas termales se encuentra en las laderas del río Amajac, conformada por depósitos sedimentarios cubiertos por rocas ígneas; además, señalan que las aguas termales tienen salida en rocas calizas y depósitos de travertino, lo que coincide con la descripción geomorfológica mencionada por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), México (2015), misma que especifica que la zona está constituida por rocas ígneas compuestas por andesitas y dacitas y rocas sedimentarias constituidas por lutitas con areniscas y calizas.

6.4. Conclusiones

El agua termal de Santa María Amajac se puede clasificar, de acuerdo con el pH, como manantial neutro; de acuerdo con su temperatura, como termal e hipertermal; por la concentración de sólidos totales disueltos, como salobre, ligeramente salina y mineral.

El diagrama de Piper permitió clasificar hidrogeoquímicamente el agua termal como cárlico-magnésica, debido a la concentración de cationes y iones mayoritarios.

Los posibles minerales identificados en la zona fueron portlandita > halita > thenardita > brucita > mirabilita > epsomita > anhidrita > yeso, lo cual corrobora la naturaleza cárlico-magnésica del agua termal. La posible presencia de estos minerales es atribuida a la geología de la zona y la presencia de rocas ígneas y sedimentarias.

7. TIPIFICACIÓN MICROSCÓPICA, MORFOLÓGICA, PRUEBAS DE TOLERANCIA Y BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS

7.1. Introducción

Los procariontes, arqueas y bacterias, son las formas de vida más abundantes (Jiao *et al.*, 2024) y constituyen la mayor parte del ecosistema; se pueden encontrar en cualquier entorno de la Tierra, como agua, suelo, animales e incluso en el cuerpo humano (Razmi *et al.*, 2023). Además de jugar un papel importante en los nichos ecológicos, son de gran importancia en las áreas de salud humana, biotecnología, agricultura y medio ambiente (Jiao *et al.*, 2024).

El estudio de estas formas de vida está a cargo de la microbiología, disciplina de la biología que analiza microorganismos, es decir, seres vivos diminutos imposibles de ser observados a simple vista (Ogodo *et al.*, 2022), por lo que es imprescindible el empleo del microscopio (Sheikh *et al.*, 2024). Para su estudio se toman muestras de diferentes ambientes, las cuales son transportadas a laboratorios de investigación. Posteriormente, en condiciones asépticas, se siembran en medios de cultivo para poder cuantificar e identificar los microorganismos presentes (Ogodo *et al.*, 2022).

Los métodos fenotípicos ayudan a identificar a los microorganismos (Ochoa-Díaz *et al.*, 2018); según Madigan *et al.* (2015) estos métodos se basan en diferentes categorías:

- Caracterización morfológica, se enfoca en la forma de las colonias y su crecimiento en medios sólidos y líquidos
- Tinciones, simples y diferenciales por ejemplo Gram, cápsula o endosporas
- Motilidad para evidenciar la presencia de flagelos y su distinción con el deslizamiento
- Metabolismo, utilización de fuentes de C, H, O, N, P, S y factores de crecimiento

- Pruebas fisiológicas para los rangos de temperatura, pH, sales, presencia o ausencia de catalasa, oxidasa y enzimas extracelulares
- Perfil de los lípidos de la membrana celular
- Estructura de la pared celular
- Producción de pigmentos
- Luminiscencia
- Resistencia a antibióticos, metales pesados y desinfectantes
- Producción de antibióticos

Cabe señalar que los métodos fenotípicos pueden ayudar a clasificar e identificar a las bacterias a nivel de género y en algunas ocasiones a nivel de especie (Arbefeville *et al.*, 2024).

El crecimiento a diferentes rangos de temperatura y pH de las cepas bacterianas puede conducir a cambios metabólicos de las mismas, lo que afecta la tasa de crecimiento e influye en la supervivencia, así como en el intercambio de genes de resistencia. Del mismo modo, las diferentes concentraciones de cloruro de sodio pueden favorecer la resistencia a antibióticos, por ejemplo, en el caso de las especies de *Pseudomonas* (Tabassum, 2024).

Las pruebas bioquímicas hacen referencia a la capacidad de cada especie bacteriana de metabolizar sustratos definidos, en cuyo caso se relaciona con su tipo de metabolismo, es decir, de carbohidratos y enzimas, que son específicos de cada microorganismo. De tal modo que los resultados en los medios de cultivo ayudan a la caracterización de los mismos basándose en sus reacciones (Arbefeville *et al.*, 2024).

7.2. Metodología

A continuación, en la Figura 12 se presenta un diagrama general de la metodología que se siguió en esta sección.

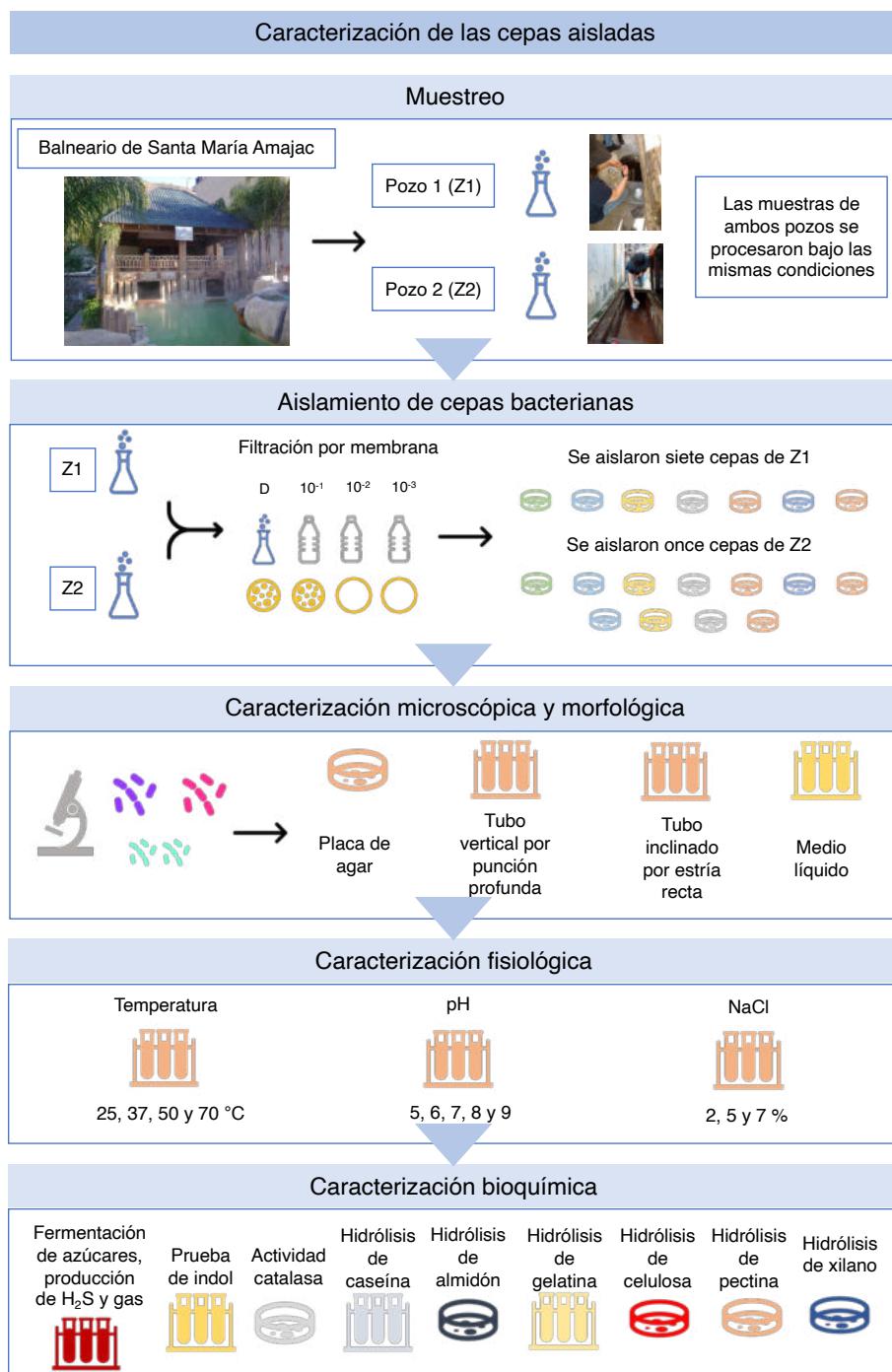


Figura 12. Diagrama general de la caracterización microscópica, morfológica y bioquímica de las cepas aisladas.

7.2.1. Muestreo y aislamiento de cepas bacterianas

Las muestras de agua se tomaron de dos pozos distintos, Z1 y Z2, del balneario de agua termal ubicado en la localidad de Santa María Amajac, Hidalgo, México, como se describió en la sección 6.2.1.

Para su análisis microbiológico, las muestras de ambos pozos se tomaron en bolsas estériles Whirl-Pak® (Nasco™, Wisconsin, USA) de 100 mL y se trasladaron en un contenedor aislante para conservar su temperatura, mismas que se analizaron el mismo día.

7.2.2. Aislamiento y caracterización de cepas

Las muestras de agua termal de los pozos Z1 y Z2, se sembraron por la técnica de filtración en membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Millipore Corporation, Billerica, USA), mediante diluciones decimales seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) en solución salina estéril al 0.85% de NaCl (Anexo 1).

Las membranas de la muestra directa y las diluciones se colocaron sobre cajas Petri con agar nutritivo suplementado con agar bacteriológico (Anexo 1), preparado con agua termal previamente filtrada, y las cajas se incubaron (Lab-Line Imperial III, Melrose Park, USA) durante 24 h a 50 °C.

Posteriormente, se seleccionaron distintas colonias aisladas entre sí, se resembraron en el mismo medio y en condiciones de incubación para obtener cultivos axénicos. A cada cepa aislada se le asignó una clave.

Todos los medios se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos en autoclave (All American 1941X, Manitowoc, USA).

7.2.3. Observación microscópica

Se realizó la tinción de Gram a cada una de las cepas aisladas siguiendo la técnica de Smith y Hussey (2005). Asimismo, se realizó la tinción de endosporas por el método de Shaeffer-Fulton (Hussey y Zayaitz, 2007). Las muestras se observaron a 100X con el microscopio binocular B3-220 PL (MOTIC®, España).

7.2.4. Caracterización morfológica

La caracterización de la morfología de las cepas tanto en medio sólido como en medio líquido se obtuvo de acuerdo con el manual *Microbiology Applications, Laboratory Manual in General Microbiology* (Smith, 2002).

Las pruebas en medio sólido se realizaron con agar nutritivo suplementado con agar bacteriológico (Anexo 1). Tanto las cajas como los tubos se incubaron a 50 °C durante 24 h. La visualización del crecimiento se facilitó con el uso del cuenta colonias tipo Quebec (Felisa, México).

La caracterización en medio sólido y líquido se realizó según Prescott (2002). La morfología colonial en placa de agar inoculado por estría cuadrada se realizó tomando en cuenta: forma, borde, elevación, textura y color. Para las pruebas en tubos de agar vertical inoculados por punción profunda, se tomó en cuenta el tipo de morfología (papilar, perlada o filiforme). En los tubos de agar inclinado inoculados por estría recta se tomó en cuenta la morfología (equinulada, rizoide, filiforme, difusa o perlada). Las pruebas en medio líquido se realizaron en caldo nutritivo (Anexo 1) y se tomaron en cuenta las características de crecimiento superficial, opacidad, sedimento y cantidad de sedimento.

7.2.5. Caracterización fisiológica

Para conocer los rangos de temperatura y pH óptimos de crecimiento de las cepas, estas se incubaron a diferentes temperaturas, 25, 37, 50 y 70 °C, así como a pH 5, 6, 7, 8 y 9, ajustado con soluciones 1 M de NaOH y HCl, respectivamente (Anexo 1).

Además, se realizaron pruebas de tolerancia a NaCl a 2, 5 y 7 % con respecto al volumen del medio (Anexo 1). Todas las pruebas se realizaron en caldo nutritivo y se incubaron durante 24 h a 50 °C, con excepción de las pruebas de temperatura (De Vos *et al.*, 2009).

Para determinar la tolerancia de las cepas bacterianas a estas condiciones, se observó el crecimiento y la cantidad de biomasa asignando un rango cualitativo de mayor a menor crecimiento.

7.2.6. Caracterización bioquímica

Para realizar las pruebas bioquímicas se emplearon cultivos frescos de no más de 24 h de crecimiento. Tanto las cajas como los tubos fueron incubados a 50 °C durante 24 h, salvo que se indique otro dato. Para validar todas las pruebas se emplearon dos cepas certificadas como controles: *Escherichia coli* CDBB-B-1010 y *Bacillus subtilis* CDBB-1349.

7.2.7. Fermentación de azúcares, producción de ácido sulfídrico y gas

Las cepas se inocularon en agar hierro y triple azúcar (Anexo 1) para determinar la capacidad de fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa, observada por el cambio de coloración a lo largo del tubo (acidificación o basificación del medio), producción de H₂S por coloración negra y acumulación de gas, ambos en la base del tubo (Alexander y Strete, 2001).

7.2.8. Prueba de indol

Las cepas fueron inoculadas en medio SIM por punción recta (Anexo 1). Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron unas gotas del reactivo de indol de Kovac (Sigma-Aldrich, USA); la presencia del color rojo indica la hidrólisis de triptófano (MacWilliams, 2009).

7.2.9. Actividad catalasa

A las placas de agar nutritivo suplementado con agar bacteriológico (Anexo 1) se les adicionó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% (Anexo 1). La prueba se considera positiva mediante la formación de efervescencia, resultado de la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Reiner, 2010).

7.2.10. Hidrólisis de caseína

Las cepas se inocularon en leche descremada en polvo (skim milk) (Anexo 1). La presencia de proteasas se observa debido a la formación de grumos en el medio (American Society for Microbiology, 2013).

7.2.11. Hidrólisis de almidón

Las cepas se inocularon en agar almidón (Anexo 1). Las enzimas extracelulares, α -amilasa y oligo-1,6-glicosidasa, hidrolizan el agar almidón, por lo que se agrega

yodo de Gram sobre la superficie de la caja, lo que facilita la observación del resultado (Lal y Cheepham, 2012).

7.2.12. Hidrólisis de gelatina

El medio para la hidrólisis de gelatina (Anexo 1) evidencia la actividad gelatinasa, misma que se observa por la licuefacción del medio con una duración máxima de siete días (De la Cruz y Torres, 2012).

7.2.13. Hidrólisis de celulosa, pectina y xilano

Para las pruebas de hidrólisis, las cepas se inocularon en medio mineral modificado de Santiago-Hernández *et al.* (2007) elaborado con buffer de fosfatos (Anexo 1). Todas las cepas inoculadas se incubaron durante 24 h a 50 °C.

7.2.13.1. Hidrólisis de celulosa

La hidrólisis de celulosa se realizó mediante la metodología modificada de Kasan *et al.* (2008), las cepas se inocularon en el medio anteriormente mencionado y se empleó como sustrato carboximetil celulosa (CMC). Posteriormente, las cajas se impregnaron de una solución de rojo Congo, finalizando con lavados de NaCl. La formación de un halo alrededor del cultivo indica la hidrólisis del sustrato CMC.

7.2.13.2. Hidrólisis de pectina

La hidrólisis de pectina se realizó siguiendo la metodología modificada de Villalba *et al.* (2004), con pectina sal potásica esterificada de cítricos. Posteriormente, se realizaron lavados de Buffer Tris-HCl, Buffer de acetatos y rojo de rutenio (Anexo 1). La formación de un halo alrededor de la colonia se interpreta como positiva para la hidrólisis de pectina.

7.2.13.3. Hidrólisis de xilano

La hidrólisis de xilano se realizó siguiendo la metodología modificada de Cayetano-Cruz *et al.* (2016). El medio se suplementó con xilano y 4-O-metil-D-glucurono-D-xilano con azul brillante de remazol (Anexo 1). La formación de un halo blanco alrededor del crecimiento microbiano se consideró como prueba positiva para la hidrólisis de xilano.

7.3. Resultados y discusiones

7.3.1. Aislamiento y caracterización de las cepas

La técnica de filtración por membrana permitió obtener, a primera vista, una diversidad de colonias, las cuales fueron seleccionadas al azar. De Z1 se aislaron un total de siete colonias, con diferencias morfológicas en la placa de agar, y de Z2 un total de once colonias. Estas últimas presentaron mayor diversidad en cuanto a tamaño, forma y color en comparación con las de Z1.

7.3.2. Observación microscópica

Las siete cepas de Z1 se muestran en las figuras 13-19 (izquierda), así como las once cepas de Z2, figuras 20-30 (izquierda). Con dichos cultivos se realizaron las tinciones de Gram y de endosporas, en todos los casos observados a 100X. Todas las cepas extraídas de Z1 tienen la forma celular de bacilo y son Gram positivas (Figuras 13-19, centro), con la capacidad de producir endosporas (Figuras 13-19, derecha). En Z2, diez de las cepas tienen forma celular de bacilo (Figuras 20-30, centro) y una tiene forma de coco (Figura 30). Además, todas las cepas extraídas de Z2 son Gram positivas (Figuras 20-30, centro) y diez tienen la capacidad de producir endosporas (Figuras 20-29, derecha), excepto la cepa Z2-11 (Figura 30).

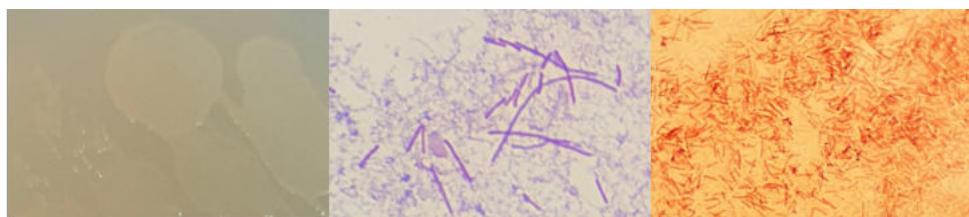


Figura 13. Cepa Z1-1. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

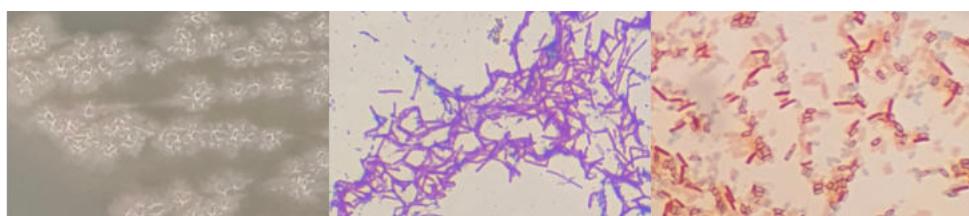


Figura 14. Cepa Z1-2. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

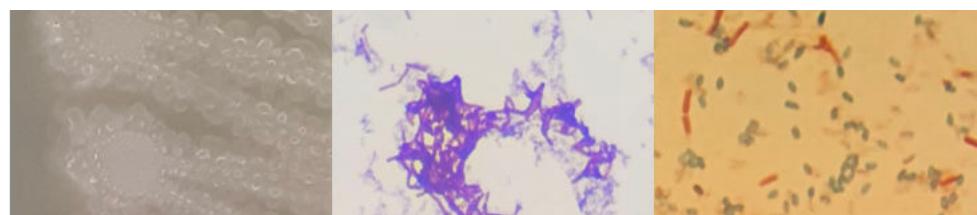


Figura 15. Cepa Z1-3. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

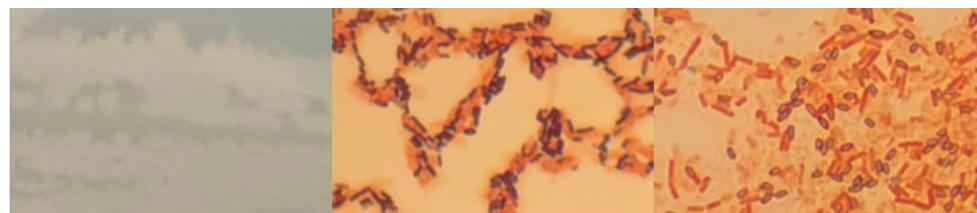


Figura 16. Cepa Z1-4. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

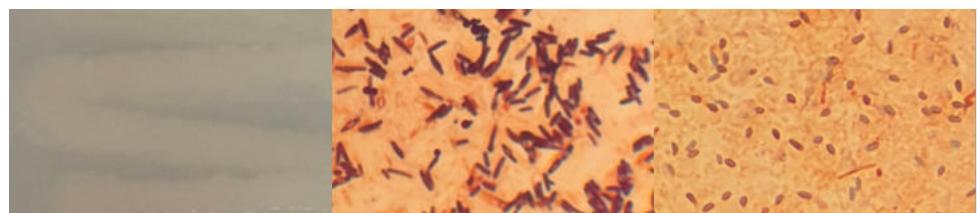


Figura 17. Cepa Z1-5. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

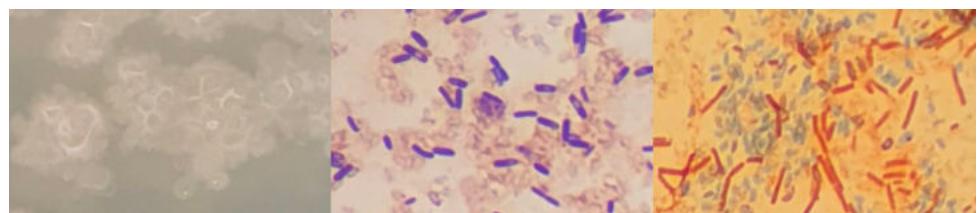


Figura 18. Cepa Z1-6. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).



Figura 19. Cepa Z1-7. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).



Figura 20. Cepa Z2-1. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

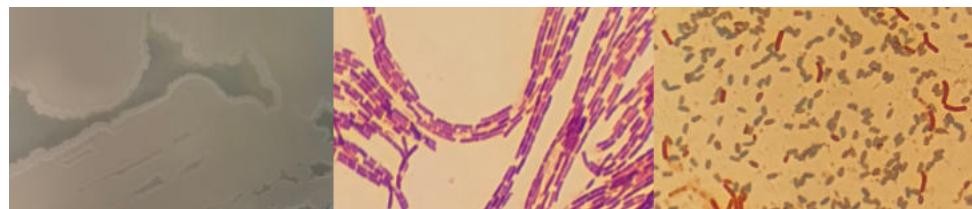


Figura 21. Cepa Z2-2. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

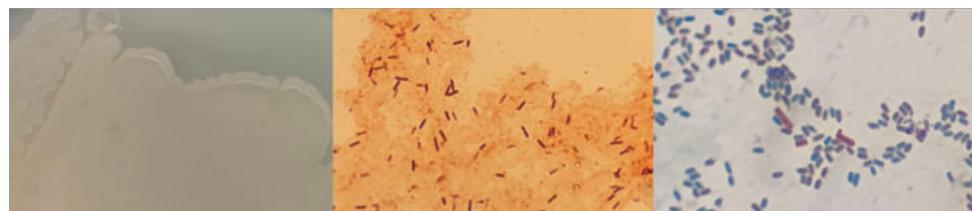


Figura 22. Cepa Z2-3. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

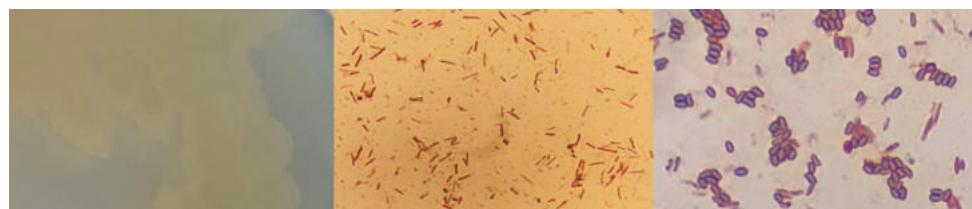


Figura 23. Cepa Z2-4. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

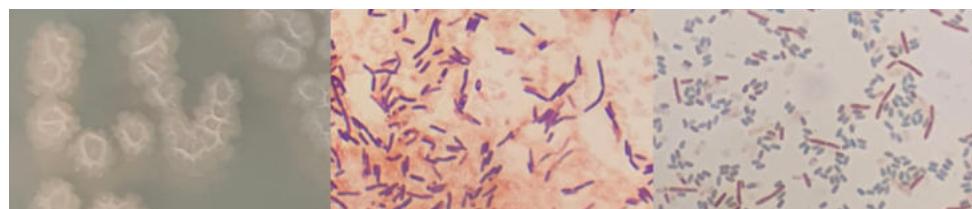


Figura 24. Cepa Z2-5. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).



Figura 25. Cepa Z2-6. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).



Figura 26. Cepa Z2-7. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

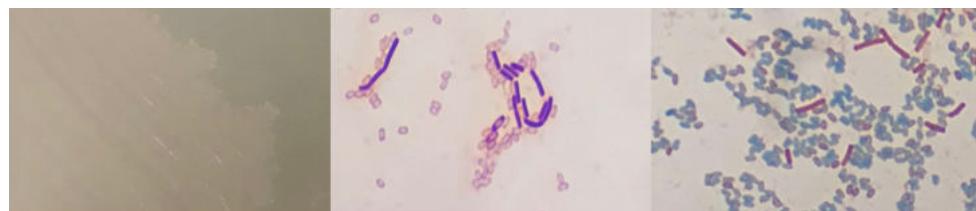


Figura 27. Cepa Z2-8. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).



Figura 28. Cepa Z2-9. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).



Figura 29. Cepa Z2-10. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

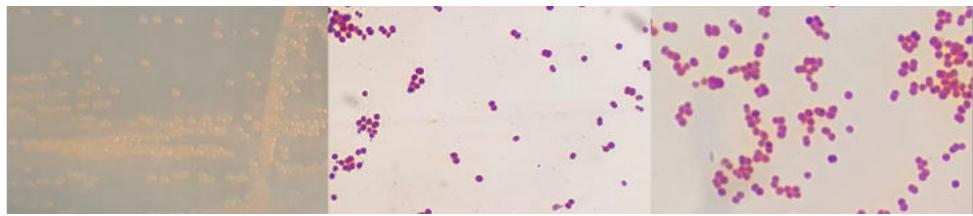


Figura 30. Cepa Z2-11. Morfología en placa de agar (izquierda), morfología celular y tinción de Gram (centro) y tinción de endosporas (derecha).

La caracterización microscópica de las cepas aisladas permitió reconocer la forma de las células, clasificarlas por la coloración de su pared celular y evaluar la capacidad de producción de endosporas. Tanto de Z1 como de Z2, diecisiete aislados correspondieron con la forma celular de bacilos y un aislado, la cepa Z2-11, con forma de coco.

En ambos sitios, Z1 y Z2, la totalidad de las cepas resultó ser positiva a la tinción de Gram (Figuras 13-30, centro). Por último, se observó que la mayoría de las cepas tienen la capacidad de formar endosporas (Figuras 13 a 29, derecha), con excepción de la cepa Z2-11 (Figura 30, derecha). La forma celular bacteriana está determinada genéticamente; sin embargo, la interacción entre las células y el ambiente puede afectar la forma, por lo que esta última contribuye a la versatilidad procarionte (van Teeseling *et al.*, 2017). Las diferentes formas bacterianas ayudan a las células a adaptarse a las condiciones extremas e incluso modifican su morfología para adaptarse al medio ambiente (Young, 2007).

En un estudio realizado por Mohammad *et al.* (2017), en el que aislaron 10 cepas bacterianas de cinco fuentes de aguas termales en Jordania, reportaron que la mayoría de las cepas son Gram positivas con capacidad de producir endosporas.

Ulucay *et al.* (2022) aislaron 83 cepas de siete diferentes sitios de aguas termales en las regiones este y sureste de Anatolia, Turquía. Reportaron que todas las cepas bacterianas aisladas son Gram positivas, con morfología celular de bacilos, a excepción de una cepa, con morfología de coco bacilo. De igual forma, la mayoría tiene la capacidad de producir endosporas y nueve cepas no pueden producir endosporas.

Valenzuela *et al.* (2024) aislaron 15 cepas bacterianas de cinco sitios de aguas termales del norte de Chile, reportando que todas las cepas son Gram positivas y

de morfología celular de bacilos; en este caso no se reportó la capacidad de producción de endosporas.

Obeidat y Al-Shomali (2023) aislaron 30 cepas bacterianas de cinco sitios de aguas termales en Jordania, de las cuales 19 cepas fueron Gram positivas con morfología celular de bacilos y con la capacidad de producir endosporas; también aislaron once cepas Gram negativas.

7.3.3. Caracterización morfológica

Las características culturales en medio sólido y líquido de las cepas aisladas en Z1 se muestran en la Tabla 10. La caracterización morfológica en placa de agar demostró que la mayoría de las cepas son de forma rizoide, con borde crenado, de elevación plana, con textura butirosa y membranosa y de color beige, a excepción de dos cepas de color blanco.

La mayoría de las cepas tiene una morfología papilar en tubo recto inoculado por punción profunda. La morfología en tubo inclinado es diversa, ya que las cepas pueden ser equinuladas, rizoides, filiformes o difusas. En medio líquido, la mayoría de las cepas presentaron un crecimiento superficial membranoso, con una opacidad transitoria, así como sedimento viscoso y escaso.

Tabla 10. Características morfológicas en sólido y líquido de las cepas aisladas en Z1.

Morfología	1	2	3	4	5	6	7
Placa de agar							
Forma	Circular	+			+		
	Rizoide		+	+	+		
	Amiboide					+	+
Borde	Ondulado	+			+		
	Lobulado					+	+
	Crenado		+	+	+		
Elevación	Plana	+			+	+	
	Rugosa		+	+			
	Papilar					+	+
Textura	Butirosa	+			+	+	
	Membranosa		+	+			+
	Viscosa						+
Color	Beige	+	+		+	+	+
	Blanca			+	+		

		Tubo recto						
Morfología	Papilar	+	+	+			+	+
	Perlada				+			
	Filiforme					+		
		Tubo inclinado						
Morfología	Equinulada	+	+		+		+	+
	Rizoide						+	+
	Filiforme				+			
		Medio líquido						
Crecimiento superficial	Membranoso	+	+	+		+	+	+
	Flocculento				+			+
Opacidad	Ligera		+				+	+
	Transitoria	+		+	+	+		
Sedimento	Viscoso	+	+			+		+
	Grumoso			+			+	
	Granular				+			
Cantidad de sedimento	Abundante	+						
	Escaso		+	+	+	+	+	+

En la Tabla 11 se muestran las características culturales en sólido y líquido de las cepas aisladas en Z2.

Se observó que la morfología en placa de agar predominan aquellas cepas de forma amiboide, con borde lobulado, de elevación plana, de textura butirosa y de color blanco, seguidas de aquellas cepas de color beige. También se observó una cepa de color amarillo (Z2-4) y una cepa de color naranja (Z2-11). La mayoría de las cepas tiene una morfología papilar en tubo recto y equinulada en tubo inclinado. En medio líquido, la mayoría de las cepas tiene un crecimiento superficial membranoso, de opacidad ligera y con sedimento viscoso y escaso.

Tabla 11. Características morfológicas en sólido y líquido de las cepas aisladas en Z2.

Morfología	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Placa de agar											
Forma	Circular	+					+		+		+
	Rizoide							+			
	Amiboide	+	+	+	+	+			+		
Borde	Ondulado	+			+		+	+			
	Lobulado		+	+		+		+		+	
	Entero								+		+

Elevación	Plana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Rugosa					+					+
Textura	Butirosa	+	+		+		+	+	+	+	+
	Membranosa			+		+				+	
Color	Beige	+					+	+	+	+	
	Blanca		+	+		+			+		+
	Amarilla				+						
	Naranja										+
Tubo recto											
Morfología	Papilar	+	+	+	+	+	+	+		+	+
	Filiforme								+	+	
Tubo inclinado											
Morfología	Equinulada		+	+	+		+			+	
	Rizoide					+					+
	Filiforme							+	+		
	Perlada	+									+
Medio líquido											
Crecimiento superficial	Membranoso	+	+		+	+	+		+	+	+
	Floculento								+		
	Anillado			+							
Nulo											
Opacidad	Ligera	+		+		+			+		+
	Mediana							+			
	Transitoria		+		+		+			+	
	Nula									+	
Sedimento	Viscosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Granular	+				+			+	+	+
Cantidad de sedimento	Abundante		+					+		+	+
	Escaso	+		+	+	+	+		+	+	+

Como se detalló en las Tablas 10 y 11, las cepas tienen una morfología colonial diversa entre sí, tal como se muestra en las figuras 8 a 25 (izquierda). Las colonias en medio sólido se pueden definir como una masa visible formada a partir de una célula madre, por lo que las características de forma, textura, elevación, pigmentación, así como los cambios en el crecimiento debido a los nutrientes del medio, son de importancia para su identificación (Tankeshwar, 2024).

Mohammad *et al.* (2017) también realizaron la caracterización morfológica de las cepas que aislaron y observaron diferencias entre ellas en lo concerniente al color, borde, forma y textura; describieron las cepas de color gris, crema y blanco,

opacas o translúcidas. Tomando en cuenta los estudios anteriormente mencionados, Valenzuela *et al.* (2024), reportaron que sus 15 cepas bacterianas aisladas presentaron la morfología colonial en placa de agar de color blanco, con borde uniforme o entero y de superficie convexa. Dichos resultados coinciden con las características de algunas cepas aisladas en el sitio Z2, como se muestra en la Tabla 11, y que, además, también son cepas Gram positivas y con morfología de bacilo; sin embargo, la diversidad morfológica celular continúa persistiendo entre las cepas aisladas en el presente estudio y en el de Valenzuela.

Un caso similar ocurre con el estudio presentado por Obedai y Al-Shomali (2023), de sus 19 bacterias aisladas se inocularon en agar nutritivo, lo que demuestra diversidad con respecto a la morfología colonial en placa de agar. Aislaron 13 cepas de color amarillo claro, dos de color beige, una transparente, una de color blanco (más parecida al color de la leche), una amarilla y una gris opaca. Además, las cepas presentaron morfologías coloniales rizoide, circular, ondulada y plana. En este caso, existe similitud con algunas de las características de las cepas descritas en las Tablas 10 y 11, que coinciden con el aislamiento de bacterias Gram positivas con forma de bacilo.

7.3.4. Tolerancia fisiológica

La caracterización fisiológica de las cepas aisladas en Z1, en distintos rangos de temperatura y pH, así como a diferentes concentraciones de NaCl, se muestra en la Tabla 12. Se usaron como controles dos cepas bacterianas, *E. coli* como Gram negativa y *B. subtilis* como Gram positiva, aunque cabe mencionar que ambos controles fueron incubados a la temperatura óptima de crecimiento, misma que fue de 37 °C.

Tabla 12. Rangos de temperatura y pH de crecimiento y pruebas de tolerancia de Z1.

Pruebas	1	2	3	4	5	6	7	C-	C+
Temperatura °C	25	--	++	++	++	++	++	+	+++
	37	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++
	50	++	+++	+++	+++	++	+++	--	++
	60	++	+++	+++	+++	++	+++	--	++
pH	5	--	--	--	--	+	+	--	++
	6	--	--	--	+	+	+	--	++
	7	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
	8	--	++	++	++	+	++	++	+
	9	--	+++	+++	+++	++	+++	++	-

	2%	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+
NaCl	5%	++	+++	+++	+++	--	+++	+++	++	++
	7%	+	+++	+	+++	+	+++	+++	+	+

Sin crecimiento (--); Crecimiento inhibido (-); Biomasa escasa (+); Biomasa media (++) ; Biomasa abundante (+++); *Escherichia coli* CDBB-B 1010 (C-); *Bacillus subtilis* CDBB-B 1009 (C+)

La mayoría de las cepas presenta biomasa abundante a temperaturas de 37, 50 y 60 °C, aunque algunas cepas como Z1-1 y Z1-5 mantienen una biomasa constante en los diferentes rangos de temperatura. Debido a la temperatura del agua termal en la que se aislaron las cepas y por los resultados de la tabla 12, las cepas se pueden clasificar como termófilas moderadas.

A partir de pH 7, 8 y 9, las cepas muestran una biomasa media o abundante, pero a pH de 5 y 6, las cepas no presentan crecimiento o crecimiento inhibido, por lo que podemos deducir que las cepas son neutrófilas y alcalófilas.

La cantidad de biomasa producida por las cepas aisladas a diferentes rangos de concentración de NaCl fue escasa, media o abundante; cada cepa presentó características diferentes conforme aumentó la concentración de NaCl y algunas cepas presentaron biomasa constante en los diferentes rangos de NaCl.

En la Tabla 13 se muestra la caracterización fisiológica de las cepas aisladas en Z2, mostrando los mismos parámetros y cepas de control de la Tabla 12.

Tabla 13. Rangos de temperatura y pH de crecimiento y pruebas de tolerancia de Z2.

Pruebas de tolerancia		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura °C	25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	37	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++
	50	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++
	60	++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	--	++	-
pH	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	++
	6	++	+	++	++	+++	++	+	++	+++	+++	++
	7	+	++	+++	++	++	++	++	+	+	+	++
	8	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+
	9	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	++	+
NaCl	2%	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+	+++	-
	5%	+++	+++	+++	+	+	+++	+	++	+++	+++	++
	7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--

Sin crecimiento (--); Crecimiento inhibido (-); Biomasa escasa (+); Biomasa media (++) ; Biomasa abundante (+++)

La producción de biomasa a una temperatura de 25 °C de las cepas aisladas fue media en la mayoría de las cepas de Z1 y Z2, a excepción de la cepa Z1-1 en la que no se observó crecimiento microbiano, basándose en la cantidad de biomasa observable. A 37 °C, la mayoría de las cepas presentaron biomasa abundante, a excepción de las cepas Z1-1, Z1-2, Z1-5, Z2-4, Z2-7 y Z2-11 cuya biomasa fue media. A 50 °C la mayoría de las cepas presentaron biomasa media a excepción de las cepas Z1-2, Z1-3, Z1-4, Z1-6, Z1-7 y Z2-5 en las que se observó biomasa abundante. Por último, a 60 °C la mayoría de las cepas presentaron biomasa abundante; otras cepas presentaron biomasa media, la cepa Z2-9 no presentó crecimiento y la cepa Z2-11 presentó crecimiento inhibido.

Como se observa en las Tablas 12 y 13, la producción de biomasa puede variar dependiendo de la cepa; algunas muestran una producción de biomasa constante, otras muestran cambios en la cantidad de biomasa producida, lo que podría evidenciar diversidad microbiológica basada en la cantidad de biomasa obtenida relacionada con los diferentes rangos de temperatura.

En diferentes estudios en los que se determinó la temperatura óptima de crecimiento de diferentes cepas bacterianas, también se reportó diversidad microbiológica basada en el crecimiento relacionado con diferentes rangos de temperatura, como el caso de Lee *et al.* (2022), en el que se probaron los rangos de 45, 50, 55, 60 y 65 °C, reportando un crecimiento diverso en las 19 cepas bacterianas que aislaron, aunque se tomó la temperatura de 60 °C como la óptima para la mayoría de esas cepas. Ulucay *et al.* (2022) aislaron 83 cepas bacterianas en siete sitios diferentes de aguas termales con temperaturas que van desde los 40 °C hasta los 90 °C. De tal forma que realizaron pruebas a diferentes rangos de temperatura, desde 40 °C hasta 85 °C, reportaron que el 97.5% de las cepas las clasificaron como termófilas obligadas, debido a que el rango óptimo de crecimiento es de 55-65 °C. El 2.5 % restante de las cepas fueron clasificadas por ellos como termotolerantes, debido a que los rangos óptimos de crecimiento van de 50-55 °C. El estudio realizado por Valenzuela *et al.* (2024), en el que aislaron 15 cepas bacterianas, de cinco sitios diferentes de aguas termales con rangos de temperatura desde los 18 °C hasta los 82 °C, por lo que se probaron rangos de 45-70 °C, en cuyo caso la temperatura de 60 °C resultó ser la óptima. Obedait y Al-Shomali (2023) aislaron 30 cepas bacterianas de cinco sitios de aguas termales,

de las cuales se evaluaron a diferentes rangos de temperatura, 40-60 °C, reportaron 50 °C como la temperatura óptima de crecimiento.

En el presente estudio en las pruebas a diferentes rangos de pH se observó biomasa media o abundante a partir de un pH 7 para las cepas aisladas de Z1, algunas de las cepas de este sitio no mostró crecimiento o crecimiento inhibido a pH 5 y 6, excepto las cepas Z1-5 y Z1-6 que presentaron biomasa escasa; la cepa Z1-5 también presentó biomasa escasa a pH 6. A partir de pH 7, cuatro cepas presentaron biomasa abundante y tres cepas presentaron biomasa media; a pH 8, cuatro cepas presentaron biomasa media, dos cepas presentaron biomasa escasa y una cepa no mostró crecimiento; a pH 9, cinco cepas mostraron biomasa abundante, una cepa mostró biomasa media y una cepa no mostró crecimiento.

Tomando en cuenta los datos mencionados, las cepas aisladas en Z1 pueden considerarse alcalófilas basándose en la relación de la producción de biomasa y pH alcalino (Tabla 12). Las cepas aisladas de Z2 presentan biomasa escasa a un pH de 5 a excepción de la cepa Z2-10 que no mostró crecimiento y Z2-11 mostró biomasa media; a pH 6, tres cepas mostraron biomasa abundante, seis cepas mostraron biomasa media y dos cepas biomasa escasa; a pH 7, una cepa mostró biomasa abundante, seis cepas mostraron biomasa media y cuatro cepas biomasa escasa; a pH 8, dos cepas mostraron biomasa media y 9 cepas biomasa escasa; a pH 9, seis cepas mostraron biomasa abundante, tres cepas biomasa media y dos cepas biomasa escasa. Tomando en cuenta los datos que se muestran en la Tabla 13, las cepas muestran una mayor producción de biomasa a pH alcalino (pH 9) y también se pueden considerar ligeramente ácidas (pH 6).

En el estudio realizado por Lee *et al.* (2022), las cepas aisladas se analizaron en los rangos de pH de 4, 7 y 9, reportando como pH óptimo el de 7, ya que ninguna de sus cepas aisladas crece en condiciones acidófilas o alcalófilas. Obedait y Al-Shomali (2023) reportaron diferentes rangos de pH óptimos para sus 30 cepas aisladas, los cuales varían de pH 5-11, 4-10, 6-9 y 4-11, tomando en cuenta que las cepas se aislaron de cinco sitios diferentes de aguas termales, cada uno con características fisicoquímicas diferentes y lo que puede influir en la variación de rangos de pH.

En este trabajo la producción de biomasa en diferentes concentraciones de NaCl de las cepas aisladas en Z1, mostró una producción de biomasa constante, como es el caso de las cepas Z1-2, Z1-4 y Z1-7, las demás cepas mostraron una producción de biomasa diferente, la cepa Z1-1 presentó biomasa media en las concentraciones de 2 y 5 %, en la concentración de 7 %, la biomasa fue escasa; la cepa Z1-3 presentó biomasa abundante en las concentraciones de 2 y 5 %, pero en la concentración de 7 % la biomasa presente fue escasa; la cepa Z1-5 mostró biomasa media a una concentración de 2 %, no presentó crecimiento a una concentración del 5% y biomasa escasa en una concentración de 7 %; la cepa Z1-6, presentó biomasa media a una concentración de 2 % y en las concentraciones de 5 y 7 % fue abundante. Los resultados presentados en la Tabla 12 evidencian diferencias con respecto a la producción de biomasa y las concentraciones de NaCl en el medio.

Las cepas aisladas de Z2, mostraron crecimientos diferentes similares a los descritos para las cepas de Z1, en la Tabla 13, se puede observar que las cepas Z2-1, Z2-2, Z2-3, Z2-6 y Z2-10 mostraron una producción de biomasa abundante en las concentraciones de 2 y 5 % y biomasa escasa en concentraciones de 7 %; las cepas Z2-4 y Z2-7 mostraron una producción de biomasa media en las concentraciones de 2 %, y biomasa escasa en las concentraciones de 5 y 7 %; la cepa Z2-5 mostró biomasa abundante en la concentración de 2 % y biomasa escasa en las concentraciones de 5 y 7 %; la cepa Z2-8, presentó biomasa media en las concentraciones de 2 y 5 % y biomasa escasa en la concentración de 7 %; la cepa Z2-9 presentó biomasa escasa en las concentraciones de 2 y 7 % y biomasa abundante en la concentración de 5 %; la cepa Z2-11, mostró crecimiento inhibido en concentraciones de 2 %, biomasa media en concentraciones de 5 % y no hubo crecimiento a una concentración del 7 %.

Las cepas de Z1 mostraron mayor resistencia a las diferentes concentraciones de NaCl, de tal modo que la producción de biomasa se mantuvo estable sin importar la concentración de NaCl. Las cepas de Z2 evidenciaron una disminución de biomasa conforme la concentración de NaCl aumentaba.

En contraste los resultados obtenidos por Lee *et al.* (2022), con relación a sus diferentes concentraciones de NaCl para sus 22 diferentes cepas bacterianas en las que probaron los rangos de 3, 6, 9, 12 y 15 %, reportaron que todas las cepas

aisladas pueden tolerar 3 %, 10 cepas pueden tolerar una concentración del 6 %, tres cepas un 9 %, pero ninguna cepa puede tolerar concentraciones de 12 y 15 %.

La producción de metabolitos y el crecimiento óptimo de los microorganismos están relacionados con la especificidad de temperatura, pH y salinidad. De tal modo que los parámetros inadecuados pueden afectar la producción de metabolitos y, de igual forma, se puede observar un crecimiento inhibido (Ali Akon *et al.*, 2016).

En el estudio de Mohammad *et al.* (2017), de acuerdo con la temperatura de las aguas termales (39.9-60 °C), clasificaron a sus cepas como termófilas moderadas y termófilas; de igual forma, con el pH de 7.03 a 8.6 de los sitios estudiados, catalogaron a las cepas como neutrófilas y alcalófilas.

7.3.5. Caracterización bioquímica

Los resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas aisladas en Z1 se muestran en la Tabla 14; de igual forma, se tomaron como controles *E. coli* y *B. subtilis*.

Tabla 14. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas en Z1.

Pruebas	1	2	3	4	5	6	7	C1	C2
Fermentación de azúcares	Glucosa	-	-	+	+	-	+	+	+
	Lactosa	-	-	+	-	-	-	+	+
	Sacarosa	-	-	+	-	-	-	+	+
Producción	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gas	-	-	-	-	-	-	+	-
Prueba	Indol	-	-	-	-	-	-	+	-
	Catalasa	-	+	+	+	+	+	-	+
Hidrolisis	Caseína	+	+	+	+	+	+	-	+
	Almidón	-	+	-	-	-	+	-	+
	Gelatina	-	+	+	+	+	+	-	+
	Celulosa	-	+	+	+	-	+	-	-
	Pectina	-	-	+	+	-	+	-	-
	Xilano	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo; (C1): *Escherichia coli* CDBB-B-1010; (C2): *Bacillus subtilis* CDBB-B 1349.

Las cepas Z1-3, Z1-4, Z1-6 y Z1-7 tienen la capacidad de fermentar glucosa y solo la Z1-3 tiene la capacidad de fermentar los tres azúcares, glucosa, lactosa y sacarosa. Ninguna cepa tiene la capacidad de producir H₂S y gas. Ninguna cepa dio un resultado positivo para la prueba de indol, pero para catalasa solo la cepa Z1-1 arrojó un resultado negativo, y las demás cepas un resultado positivo.

Todas las cepas tienen la capacidad de hidrolizar caseína; además Z1-2, Z1-6 y Z1-7 tienen la capacidad de hidrolizar almidón. La cepa Z1-1 es la única que no puede hidrolizar gelatina, al igual que celulosa. La cepa Z1-5 tampoco puede hidrolizar celulosa. Las cepas Z1-3, Z1-4, Z1-6 y Z1-7 son las únicas que pueden hidrolizar pectina. Ninguna cepa tiene la capacidad de hidrolizar xilano.

Los resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas aisladas en Z2 se muestran en la Tabla 15; de igual forma, se tomaron como controles las cepas bacterianas ya mencionadas en la Tabla 9.

Tabla 15. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas en Z2.

Pruebas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fermentación de azúcares	Glucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	Lactosa	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Producción	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	Gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prueba	Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis	Caseína	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Almidón	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	Gelatina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	Celulosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	Pectina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Xilano	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo

Casi todas las cepas pueden fermentar glucosa, pero solo las cepas Z2-5 y Z2-7 pueden fermentar los tres azúcares, glucosa, lactosa y sacarosa, en cambio las cepas Z2-4 y Z2-11 no fermentaron ningún tipo de azúcar.

En el caso de la producción de H₂S y gas, solo la cepa Z2-7 puede producir H₂S. Ninguna cepa produjo gas ni tampoco fue positiva para la prueba de indol.

En la prueba de hidrólisis de caseína, la cepa Z2-2 arrojó un resultado negativo. Las cepas Z2-1, Z2-2, Z2-5, Z2-6 y Z2-10 tienen la capacidad de hidrolizar almidón. Las cepas Z2-4 y Z2-11 son las únicas con un resultado negativo para la hidrólisis de gelatina y celulosa, las demás cepas mostraron un resultado positivo. La cepa Z2-5 fue la única con la capacidad de hidrolizar pectina. La hidrólisis de xilano solo la pueden llevar a cabo las cepas Z2-1, Z2-2, Z2-3, Z2-6 y Z2-10.

La diversidad aislada de bacterias termófilas en el agua termal de Santa María Amajac se puede confirmar con los resultados de las pruebas bioquímicas de las Tablas 14 y 15, ya que las cepas difieren entre sí; por lo tanto, también sus potenciales aplicaciones industriales pueden variar.

El caso más notorio fue en la hidrólisis de xilano y pectina. En el caso de las cepas de Z1, ninguna cepa arrojó un resultado positivo para la hidrólisis de xilano, mientras que en Z2 cinco cepas dieron resultado positivo.

En la hidrólisis de pectina, la mayoría de las cepas de Z1 tienen un resultado positivo y en Z2 solo una cepa arrojó un resultado positivo.

La importancia de las termoenzimas se debe a su estabilidad por encima de los 55 °C, temperatura a la que fueron aisladas las cepas de este estudio, lo cual indica su idoneidad para ciertos procesos industriales (Escuder-Rodríguez *et al.*, 2018).

Comparando los resultados con estudios en los que también se buscó aislar bacterias termófilas capaces de producir enzimas de interés industrial, como amilasa, celulasa, lipasa, pectinasa, proteasa y xilanasa. El estudio realizado por Lee *et al.* (2022) reportaron que de 22 cepas aisladas, 19 cepas evidenciaron la presencia de la enzima amilasa, 10 cepas la enzima proteasa y cinco cepas la enzima lipasa. Ulucay *et al.* (2022), aislaron 83 cepas bacterianas de aguas termales, reportando que 27 cepas tienen la capacidad de producir amilasa, celulasa, lipasa y proteasa, 68 cepas producen amilasa, 34 cepas producen celulasa, 69 cepas producen lipasa y 73 cepas producen proteasa.

Valenzuela *et al.* (2024), aislaron 15 cepas bacterianas para evaluar la capacidad de producir enzimas de tipo amilasa, lipasa, proteasa y celulasa. Reportaron que ninguna de las cepas tiene la capacidad de producir celulasa; ocho cepas

producen proteasas; ocho cepas producen amilasas; y tres cepas presentan actividad para lipasas.

Obeidat y Al- Shomali (2023), realizaron estudios de actividad enzimática para las enzimas proteasa, lipasa, xilanasa, celulasa, amilasa y poligalacturonasa, reportando que de las 19 cepas Gram positivas que aislaron. 18 cepas presentaron actividad para proteasas, 14 cepas para lipasa, 13 cepas para xilananas, nueve cepas para celulasa, 11 cepas para amilasas y finalmente, 11 cepas evidenciaron actividad para poligalacturonasa.

Los resultados de la hidrólisis de los aislados son de importancia biotecnológica por sus aplicaciones en las industrias farmacéutica, de detergentes, alimentaria y alimentos para animales, textilera, papelera, del curtido de piel y biorefinería, debido a que las principales enzimas de termófilos son: celulasas, amilasas, xilananas, pectinasas, proteasas, esterasas, fitasas y lipasas, especialmente debido a su aplicación industrial (Sharma *et al.*, 2019).

Las enzimas se consideran una alternativa ecoamigable para disminuir los catalizadores químicos, pues ayudan a reducir la generación de compuestos tóxicos y el empleo de solventes, lo que beneficia al medio ambiente, al mismo tiempo que se pueden reducir costos (Atalah *et al.*, 2019).

7.4. Conclusiones

La diversidad morfológica y fisiológica de las cepas bacterianas aisladas de ambos pozos presentan características morfológicas comunes, como ser Gram positivas y, en su mayoría, con forma de bacilo y capacidad de formar endosporas. Sin embargo, se observan algunas excepciones, lo que evidencia una cierta diversidad entre los microorganismos presentes en ambos ambientes.

Las características morfológicas observadas en placas de agar sugieren una mayor diversidad entre las cepas aisladas del pozo Z2, lo cual podría estar relacionado con diferencias ambientales o microecológicas entre los dos pozos.

Las cepas se pudieron clasificar como termófilas moderadas y alcalófilas o neutrófilas de acuerdo con las pruebas fisiológicas a temperaturas elevadas y condiciones alcalinas, lo que confirma su capacidad de adaptación a condiciones

extremas en valores mínimos y máximos del agua termal de donde fueron aisladas. Aunque las cepas son capaces de crecer en condiciones moderadas de salinidad, la presencia de biomasa disminuye considerablemente a concentraciones más altas de NaCl, lo que indica una tolerancia salina limitada.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas revelan una amplia variedad de actividades entre las cepas aisladas de Z1 y Z2, especialmente en lo que respecta a la hidrólisis de distintos sustratos. En particular, algunas cepas presentaron potencial para degradar xilano, lo que sugiere la presencia de enzimas con valor en procesos industriales, como xilanosas.

8. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS

8.1 Introducción

Las técnicas clásicas de laboratorio, como son la caracterización morfológica de cultivos puros, la clasificación mediante tinción de Gram y las pruebas bioquímicas, proporcionan una vasta información de la diversidad microbiológica de una comunidad o de la diversidad presente en un medio. Sin embargo, a pesar de la información que proporcionan estas técnicas convencionales para su identificación taxonómica continúan existiendo carencias que impiden una mayor precisión (Větrovský y Baldrian, 2013). Por ello, las técnicas de secuenciación han permitido obtener la correcta información con respecto a la diversidad y función de las bacterias, permitiendo el reconocimiento de sus similitudes y sus posiciones taxonómicas, coadyuvando a definir los nombres y características bacterianas (Jiao *et al.*, 2024).

Una técnica que se utiliza comúnmente para la determinación de la diversidad de comunidades bacterianas e incluso para identificar poblaciones bacterianas de diversos huéspedes es la secuenciación del gen 16S rDNA (Bertolo *et al.*, 2024; Regueira-Iglesias *et al.*, 2023). Esta técnica se basa en la amplificación y clonación de los genes del 16S rDNA, seguidas de la secuenciación e identificación, permitiendo establecer una asociación filogenética (Sanz y Köchling, 2007).

El gen del 16S rDNA es el más utilizado, ya que se encuentra altamente conservado en todas las células procariontes (bacterias y arqueas), lo que quiere decir que al menos una copia de este gen se halla en el genoma de los microorganismos de interés (Pérez-Bustamante *et al.*, 2024). Este gen tiene una longitud aproximada de 1500 pares de bases y cuenta con diez regiones altamente conservadas, mismas que son comunes en la mayoría de las bacterias; a su vez, son separadas entre sí por nueve regiones hipervariables (V1-V9) las cuales funcionan como un marcador fiable para la identificación bacteriana (Bertolo *et al.*, 2024; Jones *et al.*, 2022; Pérez-Bustamante *et al.*, 2024).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que permite la amplificación de fragmentos del

DNA mediante tres procesos primordiales: desnaturalización, hibridación y elongación (Khehra *et al.*, 2025). Por lo que se requiere desnaturalizar un segmento de DNA, es decir, empleando altas temperaturas se separan los segmentos de DNA en una sola hebra. Posteriormente, la enzima *Taq polimerasa* construye nuevas hebras de DNA utilizando las originales como plantillas, resultando en copias nuevas; este proceso se repite 30-40 veces hasta crear millones de copias exactas al DNA original (National Human Genome Research Institute, 2020).

Teniendo en cuenta el fundamento de la técnica de PCR podemos comprender por qué la mayoría de los estudios de diversidad microbiológica se basan en las subunidades del 16S (dos Santos *et al.*, 2016). Para identificar la diversidad bacteriana, las regiones hipervariables, anteriormente mencionadas, son la clave (Moorlag *et al.*, 2023). Una vez amplificados estos sitios informativos, se obtiene una secuencia para el estudio filogenético y taxonómico (Rusch *et al.*, 2022).

La construcción de árboles filogenéticos se basa en las secuencias (Hu *et al.*, 2019) y representan la historia evolutiva y similitudes genéticas entre especies; de tal modo que sus relaciones evolutivas permiten comprender la composición y dinámica de las comunidades microbianas (Liu *et al.*, 2024).

8.2. Metodología

La identificación molecular de las cepas aisladas se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por secuenciación del gen 16S rDNA. En la Figura 31 se muestra la metodología general realizada.

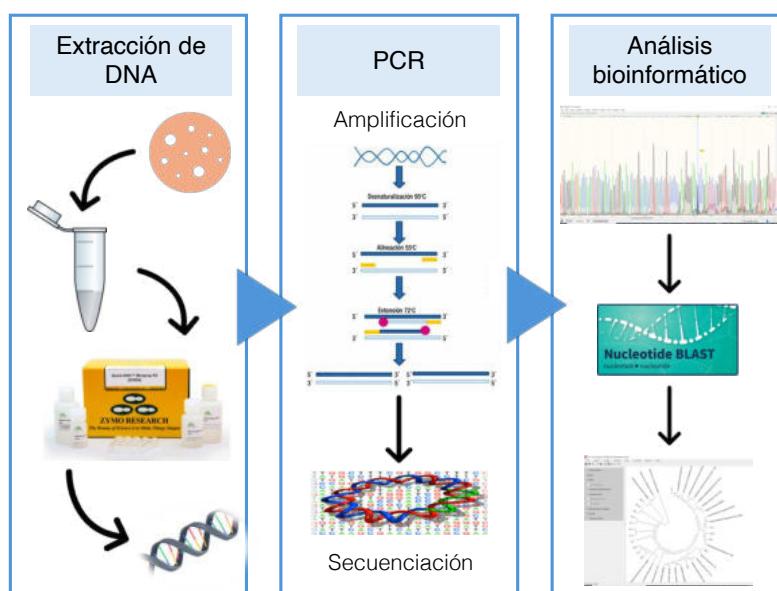


Figura 31. Diagrama general de la metodología para la identificación molecular de las cepas aisladas. La imagen de amplificación fue tomada de Ramírez-Pacheco *et al.* (2013).

Como se muestra en la Figura 31, primero se realizó la extracción del material genético empleando el Kit Quick-g DNA™ Miniprep Kit de Zymo Research (California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se verificó la integridad del DNA extraído visualizando el material genético en un gel de agarosa al 1 % (Sigma-Aldrich, USA), teñido con bromuro de etidio 0.4 µg/mL; además, se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania).

El gel de agarosa (Sigma Aldrich, USA) fue visualizado en un equipo Molecular Imager Gel Doc XR (System Bio-Rad Laboratories, California, USA). El DNA se cuantificó con el equipo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific (Wilmington, USA).

El material genético extraído del gen 16S rDNA fue amplificado por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (PerkinElmer, Singapore), empleando los primers P0mod (forward) (5'AGAGTTGATCMTGG3') y PC5 (reverse) (5'TACCTTGTTACGACTT3') (Wilson *et al.*, 1990) o fd1 (forward) (5'AGAGTTGATCCTGGCTCAG3') y rd1 (reverse) (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') (Weisburg *et al.*, 1991). Las condiciones de amplificación fueron de 95 °C por 5 minutos (1 ciclo); 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 1.5 minutos, con una extensión final de 72 °C por 5 minutos. El uso de ambos pares de primers permitió la amplificación de un producto de 1.5 Kb que corresponde al tamaño del 16S rDNA.

El producto de la amplificación de PCR (5 µL) se confirmó en un gel de agarosa como se describió previamente. Los productos de PCR fueron purificados empleando el kit GeneJET PCR Purification Kit de ThermoFisher Scientific (Vilnius, Lithuania) siguiendo las especificaciones del fabricante. La cuantificación de la concentración del producto de PCR purificado se realizó con un equipo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific (Wilmington, USA).

Las muestras se prepararon de acuerdo con las condiciones solicitadas de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM (U Sec), con una concentración de: 120 ng de DNA a secuenciar, 1 µL de los primers descritos previamente (P0mod, PC5 o fd1, rd1), y c.b.p. de agua grado molecular para un volumen total de 16 µL.

Los resultados proporcionados por la U Sec se analizaron con el programa SnapGene 7.0.2 para ensamblar el gen 16S rDNA a partir de las secuencias obtenidas. Cada secuencia ensamblada se analizó con la base de datos del GenBank empleando la aplicación Nucleotide BLAST® del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Bethesda, 2004), que arroja como resultado la mayor similitud de cada secuencia.

Se realizó un análisis filogenético de los ensambles obtenidos con secuencias de referencia de 16S rDNA, empleando el programa MEGA 11 (Molecular Evolution Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2021). Además, se incluyó un alineamiento en Muscle, seleccionando los parámetros predefinidos. El alineamiento resultante se

utilizó para construir una matriz de distancia empleando el modelo Jukes-Cantor con un *bootstrap* de $n = 1000$ réplicas. Finalmente, la matriz de distancia resultante se utilizó para construir un árbol filogenético empleando el método de Neighbor-Joining con el modelo de Jukes-Cantor y un *bootstrap* de $n = 1000$.

8.3. Resultados y discusiones

Las secuencias de 16S rDNA de las cepas aisladas proporcionadas por la U Sec, fueron procesadas y comparadas con bases de datos disponibles en línea con el fin de identificar las especies más cercanas filogenéticamente. Para ello se realizó una búsqueda de similitud en la base de datos Nucleotide BLAST del NCBI, obteniendo porcentajes de identidad superiores al 97% en todos los casos, lo que permitió una identificación confiable a nivel de género, e incluso, de especie.

De las siete cepas aisladas de Z1, seis se asociaron con la especie *Bacillus licheniformis* y una cepa con *Anoxybacillus gonensis*. De las once cepas aisladas de Z2, una cepa fue asociada con *Aneurinibacillus* sp., dos cepas con *Bacillus tequilensis*, dos cepas con *Bacillus licheniformis*, dos cepas con *Bacillus subtilis*, dos cepas con *Paenibacillus dendritiformis*, una cepa con *Deinococcus sahariensis* y una cepa no fue asociada con ningún género o especie, identificada como una cepa bacteriana. Lo anterior evidencia una mayor diversidad biológica en Z2, lo que coincide con las características fenotípicas mencionadas en el capítulo 7.

Es de importancia mencionar que el phylum, anteriormente Firmicutes, al que pertenecen la mayoría de los aislados, ha cambiado su nomenclatura y es actualmente reconocido como phylum Bacillota, esto bajo la estipulación del Comité Internacional de Sistemática de Procariontes (ICSP, por sus siglas en inglés *International Committee on Systematics of Prokaryotes*) basándose en la recién ajustada, regla 8, en la que se estipula que todos los nombres de rango formales se formen mediante la adición del sufijo “-ota” a la raíz del nombre del género de tipo designado (NCBI Staff, 2021). Es de importancia hacer esta aclaración, ya que algunos artículos aún manejan el phylum Firmicutes, pero para fines de discusión de resultados, se hará referencia al actual phylum Bacillota.

Del mismo modo, el phylum anteriormente conocido como Deinococcus-Thermus ha sido renombrado como phylum Deinococcota.

La identidad obtenida de las 18 cepas analizadas indicó que 17 corresponden a bacterias Gram positivas (phylum Bacillota), con excepción de la cepa Z2-11, identificada como *Deinococcus sahariensis*, misma que pertenece al phylum Deinococcota (Tabla 16).

Tabla 16. Caracterización taxonómica de las cepas aisladas.

Cepa	Pb	Identidad	Número de acceso	% de ident	% de cobert	Valor E
Z1-1	1428	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2	PP579944	99.86%	99%	0.0
Z1-2	1397	<i>Bacillus licheniformis</i> Ba2 16S rRNA	PP579945	100%	100%	0.0
Z1-3	1400	<i>Bacillus licheniformis</i> ZBT15 16S rRNA	PP579946	97.34%	99%	0.0
Z1-4	1396	<i>Bacillus licheniformis</i> ASMK2 16S rRNA	PP579947	97.86%	100%	0.0
Z1-5	1418	<i>Bacillus licheniformis</i> ASMK2 16S rRNA	PP579948	97.46%	99%	0.0
Z1-6	1422	<i>Bacillus licheniformis</i> RFNB2 16S rRNA	PP579949	97.40%	100%	0.0
Z1-7	1398	<i>Bacillus licheniformis</i> TB212 16S rRNA	PP579950	100%	100%	0.0
Z2-1	1383	<i>Aneurinibacillus</i> sp. Bac270 16S rRNA	PP579951	99.78%	100%	0.0
Z2-2	1403	<i>Bacillus tequilensis</i> SQA-76 16S rRNA	PP579952	100%	100%	0.0
Z2-3	1400	<i>Bacillus tequilensis</i> KHJP1 16S rRNA	PP579953	97.43%	100%	0.0
Z2-4	1384	Cepa bacteriana 23 16S rRNA	PP579954	99.86%	99%	0.0
Z2-5	1416	<i>Bacillus licheniformis</i> Ba2 16S rRNA	PP579955	99.22%	100%	0.0
Z2-6	1396	<i>Bacillus subtilis</i> ZG13-41 16S rRNA	PP579956	100%	100%	0.0
Z2-7	1399	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> ClaCZ2 16S	PP579957	100%	100%	0.0
Z2-8	1422	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> ClaCZ203	PP579958	99.44%	100%	0.0
Z2-9	1419	<i>Bacillus licheniformis</i> KaK2A 16S	PP579959	99.37%	100%	0.0
Z2-10	1403	<i>Bacillus subtilis</i> 3667 16S ribosomal	PP579960	99.93%	100%	0.0
Z2-11	1350	<i>Deinococcus sahariensis</i> HAN23 16S	PP579961	99.04%	100%	0.0

La secuencia de *Anoxybacillus gonensis* G2 es del genoma completo

% de ident: porcentaje de identidad

% de cobert: porcentaje de cobertura

De los aislados pertenecientes al phylum Bacillota, se identificó a la cepa Z1-1 como *Anoxybacillus gonensis* con un porcentaje de identidad del 99.86%, con relación a las secuencias de referencia en la base de datos nr del GenBank; las cepas Z1-2, Z1-3, Z1-4, Z1-5, Z1-6, Z1-7, Z2-5 y Z2-9 fueron identificadas como *Bacillus licheniformis* con un porcentaje de identidad del 97 % al 100 %; las cepas Z2-6 y Z2-10 fueron identificadas como *Bacillus subtilis* con un porcentaje de identidad del 100 % y 99.93 %, respectivamente.

La cepa Z2-1 se asoció con el género *Aneurinibacillus* sp. con un porcentaje de identidad del 99.78%, las cepas Z2-2 y Z2-3 con *Bacillus tequilensis* con un porcentaje de identidad del 100% y 99.78%, respectivamente. Las cepas Z2-7 y Z2-8 se asociaron con la especie *Paenibacillus dendritiformis*, con porcentajes de

identidad del 100% y 99.44%, respectivamente. La cepa Z2-4 no fue asociada con ningún género o especie conocidos; solo se caracterizó como una cepa bacteriana con un porcentaje de identidad del 99.86 %. La cepa Z2-11 fue la única clasificada dentro del phylum Deinococcota y asociada con la especie *Deinococcus sahariensis* con un porcentaje de identidad del 99.04%.

Así, la clasificación taxonómica de las bacterias aisladas se muestra en la Figura 32, de acuerdo con la base de datos Genome Taxonomy Database (GTDB, 2025). La cepa Z2-4 no se encuentra clasificada, ya que la secuenciación del gen 16S rDNA arrojó un resultado como cepa bacteriana. La cepa Z2-11 (*Deinococcus sahariensis*) tampoco cuenta con una clasificación oficial por parte de la base de datos GTDB; sin embargo, la base de datos del NCBI Taxonomy la clasifica como se muestra en la Figura 32.

Phylum	Bacillota					Deinococcota	
Clase	Bacilli					Deinococci	
Orden	Aneurinibacillales	Bacillales			Paenibacillales	Deinococcales	
Familia	Aneurinibacillaceae	Anoxybacillaceae	Bacillaceae		Paenibacillaceae	Deinococcaceae	
Género	Aneurinibacillus	Anoxybacillus	Bacillus		Paenibacillus	<i>Deinococcus</i>	
Especie			Bacillus subtilis	Bacillus licheniformis	Bacillus tequilensis	Paenibacillus_B_dendritiformis_A Paenibacillus_B_dendritiformis_C	
Cepa	Z2-1	Z1-1	Z2-6, Z2-10	Z1-2, Z1-3, Z1-4, Z1-5, Z1-6, Z1-7, Z2-5, Z2-9	Z2-2, Z2-3	Z2-17, Z2-8	Z2-11

Figura 32. Clasificación taxonómica de las cepas aisladas.

Kumar y Sharma (2020) realizaron muestreos en tres sitios de aguas termales en el Himalaya con distintas temperaturas y pH. En la localidad de Surya Kund (87.8 °C y pH 8.5) reportaron *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. tequilensis*, *B. thermoamylovorans*, *B. simplex*, *Paenibacillus dendritiformis*, *P. ehimensis*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Actinobacillus hominis*. En la localidad de Draupadi Kund (67 °C y pH 9.4), aislaron *B. subtilis*, *B. borstelensis*, *B. licheniformis*, *B. thermoamylovorans*, *G. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *A. hominis*, *B. tequilensis*, *Brevibacillus thermoruber*, *B. choshinensis* y *Streptococcus pyogenes*. El último sitio muestreado fue Yamunotri Tapt Kund (46.8 °C y pH 7.5), en el que aislaron *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *S. thermophilus*, *S. pyogenes*, *A. seminis*, *A. hominis*, *Brevibacillus choshinensis*, *Thiobacillus denitrificans*, *Paenibacillus thiominolyticus* y *Lysinibacillus sphaericus*. En los tres

sitios se observa variación en la diversidad, lo cual puede deberse a que los autores consideran que la temperatura es uno de los factores ambientales que pueden influenciar en mayor medida la diversidad microbiológica.

En otro estudio realizado por Lee *et al.* (2022), en la República de Corea, aislaron 29 cepas de cinco fuentes de aguas termales, con rangos de temperatura de 45-65 °C y pH predominantemente alcalófilo o neutrófilo que se asociaron con los géneros *Geobacillus*, *Caldibacillus*, *Aeribacillus* y con las especies de *Bacillus licheniformis* y *Thermoactinomyces vulgaris*. De estas, se encontró que el 75.8 % de las cepas presentaron actividad de amilasa, lipasa y proteasa.

Patel y Dudhagara (2020) aislaron *Bacillus tequilensis* de aguas termales en Maharashtra, India, con una temperatura de incubación de 45 °C, con la finalidad de caracterizar la enzima xilanasa y probar su potencial uso en el preblanqueo de pulpa de arroz. Las cepas Z2-2 y Z2-3 del presente estudio se asociaron con *B. tequilensis* y, de igual forma, tienen un resultado positivo de actividad xilanolítica.

Ulucay *et al.* (2022), aislaron 83 cepas bacterianas de siete sitios de aguas termales con rango de temperatura de los 40 a 90 °C, reportando las especies de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Geobacillus kaustophilus* y *Weizmannia coagulans*, cabe mencionar que aislaron más cepas bacterianas de las aguas termales con una temperatura de 40 °C, contrario al aislamiento de solo una cepa en aguas termales a temperatura de 55 °C.

Valenzuela *et al.* (2024) aislaron un total de 15 cepas bacterianas de cinco sitios de aguas termales, siendo más abundantes aquellas provenientes de aguas termales con temperaturas comprendidas entre 55 y 82 °C, reportando las especies *Aeribacillus pallidus*, *Anoxybacillus kamchatkensis*, *A. kualawohkensis*, *A. tepidamans*, *A. flavithermus*, *Geobacillus thermoleovorans* y *Parageobacillus thermoglucosidasius*.

Obedait y Al-Shomali (2023) aislaron 30 cepas bacterianas de aguas termales con rangos de temperatura de 42.1 y 62.3 °C de las cuales 19 son Gram positivas, reportando las especies *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus* sp. y *G. kaustophilus* y *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp.

A nivel mundial, se han realizado estudios buscando diversidad microbiológica aislada de aguas termales con la finalidad de identificar metabolitos que puedan ser aplicados en procesos industriales. La presencia recurrente de las mismas especies en distintos sitios de aguas termales sugiere que algunas de ellas son propias de estos ecosistemas.

Para soportar la identidad obtenida por el análisis de las secuencias en la base de datos nr del GenBank se realizó un análisis filogenético de las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas aisladas. Para lo cual se incluyeron secuencias de referencia del mismo gen, correspondientes a las bacterias con las que los aislados analizados mostraron una mayor identidad. El análisis estuvo conformado por un alineamiento de las secuencias de nuestros aislados con las secuencias de referencia; asimismo, las secuencias de 16S rDNA de *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 y de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 se incluyeron como grupos externos.

En la Figura 33 se presenta el árbol filogenético resultante en el que se puede apreciar que la mayoría de las cepas analizadas en este trabajo se ubicaron en una misma rama con las cepas de referencia, excepto Z2-11 que se ubicó en una rama independiente con las cepas de referencia del género *Deinococcus* y la secuencia del grupo externo *Sulfolobus acidocaldarius*.

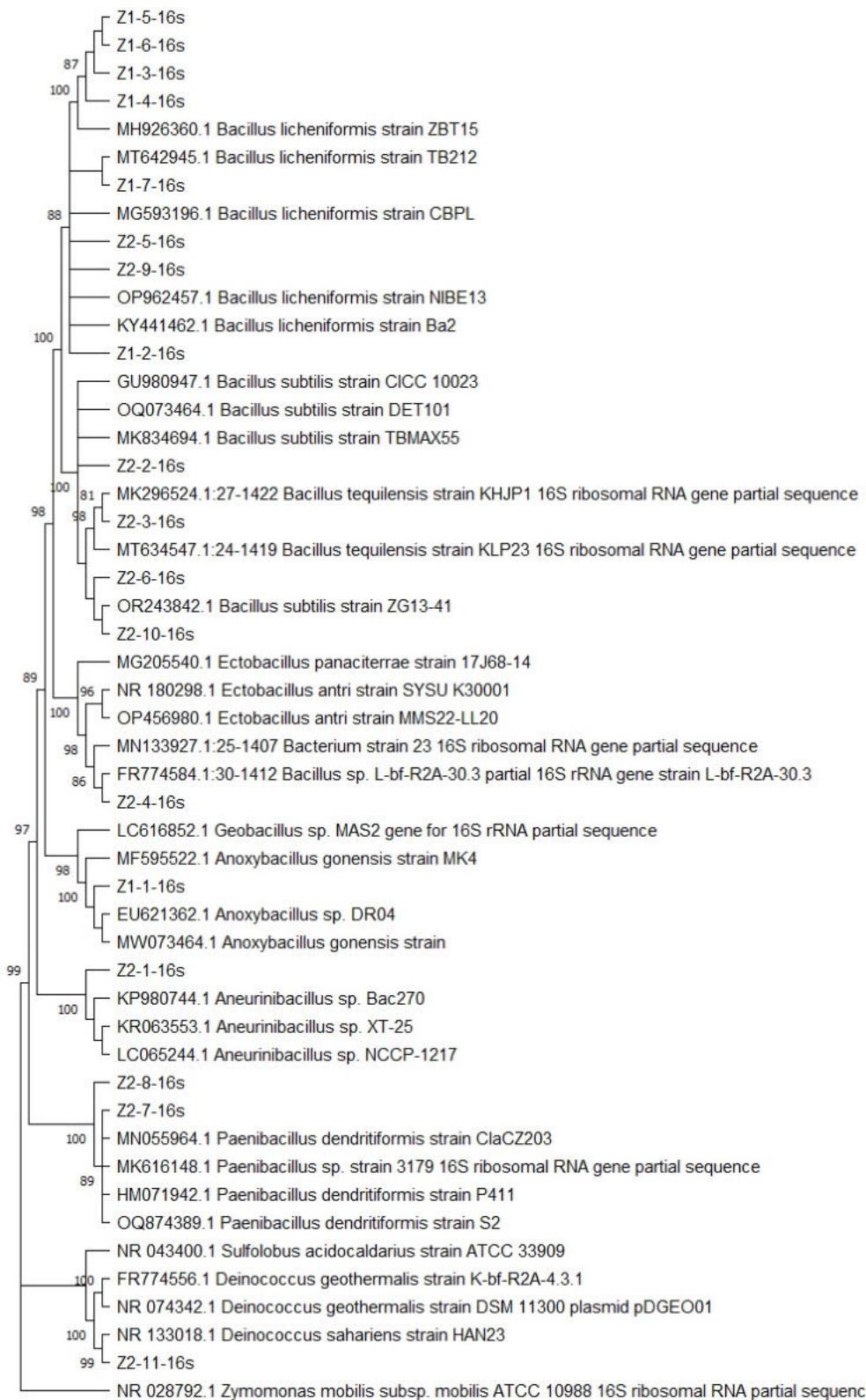


Figura 33. Árbol filogenético de las cepas aisladas, utilizando el método de máxima verosimilitud con el modelo Jukes-Cantor y *bootstrapping* de n=1000 réplicas. No se dan valores para los grupos con *bootstrap* inferiores al 80%.

Como se muestra en la figura 33, la mayoría de las cepas se clasificaron dentro del Phylum Bacillota, con excepción de la cepa Z2-11, que se clasificó como Deinococcota.

Las características de las cepas que se mencionan a continuación son tomadas de las descripciones de diversas especies bacterianas del Volumen III. Firmicutes, del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (De Vos *et al.*, 2009), por lo que en lo sucesivo solo se empleará esta referencia.

El phylum Firmicutes consiste en 26 familias y 233 géneros; las cepas identificadas en el árbol filogenético pertenecen a la clase “Bacilli”, en donde podemos encontrar a los géneros *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus* y *Aneurinibacillus*. Como generalidades del phylum Firmicutes resalta que la mayoría de las especies son Gram positivas, aunque se han reportado escasos ejemplos como Gram negativas. Son fenotípicamente diversas y aunque la mayoría crece a pH neutros, algunas pueden aislarse de ambientes ácidos y alcalinos. También está reportado que producen catalasa y endosporas resistentes a la congelación y al calor.

La figura 33 clasifica a las cepas Z1-2, Z2-2, Z2-3, Z2-5, Z2-6, Z2-9 y Z2-10 como distintas especies del género *Bacillus*, lo que además coincide con las generalidades anteriormente descritas. La morfología colonial en caja y tubo es variable entre las especies y todas ellas producen endosporas.

La cepa Z1-1 se clasificó como *Anoxybacillus*, descrito como bacilo Gram positivo, con crecimiento en un rango de temperatura de 30 a 60 °C, pH 8-10 y concentraciones de NaCl del 5 %, pero no así a una concentración del 10 %. En este trabajo no encontramos crecimiento a 25 °C y tampoco hubo crecimiento a 50 °C con pH de 5, 6, 8 y 9 (Tabla 12).

La cepa Z2-1 se clasificó como *Aneurinibacillus* la cual es Gram positiva y con endosporas elipsoidales. Las cepas Z2-7 y Z2-8 se clasificaron en el género *Paenibacillus*, que se caracteriza por ser Gram positiva; algunas especies pueden ser estrictamente aerobias, microaerófilas, anaerobias facultativas o anaerobias obligadas, son mesófilas o termófilas, se les clasifica como neutrófilas y alcalófilas e incluso pueden teñirse de forma variable. Las endosporas producidas por estas especies suelen ser ovaladas; asimismo, la mayoría de estas especies dan positivo

a catalasa. Se ha reportado que el crecimiento óptimo va de los 28 a los 40 °C, con un pH óptimo cercano al neutro, aunque algunas especies se han reportado como alcalófilas y con crecimiento inhibido a una concentración de NaCl del 10%. Las características anteriormente descritas coinciden con los resultados de este estudio, mismos que se pueden corroborar en las figuras 26 y 27, así como en la tabla 13.

La cepa Z2-11 se clasificó como parte del género *Deinococcus*, con las características de ser una bacteria Gram positiva de color anaranjado, lo cual coincide con la figura 30. *Deinococcus sahariensis* es estrictamente aerobia, con forma de coco no formadora de endosporas, y aislada de las aguas termales en Túnez. Además, tiene la característica de ser resistente a la radiación ultravioleta. Varias especies de este género poseen la misma característica, por lo que se ha llegado a conocer como un género radioresistente; un claro ejemplo es *Deinococcus radiodurans*. Se han reportado sus condiciones de crecimiento en rangos de temperatura de 30 a 65 °C, cuya óptima es de 50 °C, un rango de pH de 6-10, con un óptimo de 7.5, así como la tolerancia a NaCl del 0-4 %. Del mismo modo, existen coincidencias con algunas de las características que se presentan en la tabla 13 (Bouraoui *et al.*, 2012).

8.4. Conclusiones

La secuenciación del gen 16S rDNA permitió clasificar taxonómicamente a las cepas aisladas, asociándolas con los géneros y especies bacterianas correspondientes, confirmando estos resultados con la elaboración de un árbol filogenético.

Se confirmó una mayor diversidad de las cepas aisladas de Z2 y de Z1. La identificación taxonómica permitió ubicarlas principalmente en el phylum Bacillota (antes Firmicutes) con las especies de *Anoxybacillus gonensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus dendritiformis* y el género *Aneurinibacillus*. Además, se aisló una cepa del phylum Deinococcota (antes Deinococcus-Thermus) con la especie *Deinococcus sahariensis*. Al igual que otras investigaciones realizadas alrededor del mundo, el phylum Bacillota predominó en el área de estudio.

9. PRUEBAS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD XILANOLÍTICA

9.1. Introducción

Los microorganismos extremófilos poseen mecanismos de adaptación altamente especializados, así como proteínas o sistemas enzimáticos que les ayudan a vivir en ambientes extremos. Gracias a estas actividades metabólicas y su capacidad de tolerar este tipo de ambientes, los extremófilos pueden aplicarse en diversos sectores industriales, como el alimentario, bioenergético, cosmético, agrícola, farmacéutico, textil y químico (Bankar *et al.*, 2022).

Las enzimas de microorganismos termófilos que requieren altas temperaturas para crecer, presentan ventajas, tales como mejorar la solubilidad de sustratos, disminuir la viscosidad de distintos medios, velocidades de reacción más rápidas, además de eliminar la contaminación microbiana. Por lo anterior, tienen relevancia más allá de los sectores industriales ya mencionados, con la subsecuente aplicación en diversos procesos con elevadas temperaturas (Zeldes *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2019).

Las enzimas termoestables son aquellas óptimamente activas entre temperaturas de 60 °C y 125 °C y que se obtienen de termófilos e hipertermófilos (Vielle *et al.*, 1996), aunque también llevan a cabo su actividad entre 40 y 80 °C (Escudero-Rodríguez *et al.*, 2018).

La demanda de enzimas con aplicaciones industriales ha aumentado en las últimas décadas y se ha vuelto una industria millonaria (Atalah *et al.*, 2019).

En específico, las enzimas xilananas han sido de gran interés por sus diversas aplicaciones, como se mencionó en la sección 2.6, ya que estas enzimas son capaces de hidrolizar el enlace β -1,4 del xilano, el cual se encuentra en la hemicelulosa, por lo que ayudan a que el xilano se descomponga por completo en su monómero y así producir el azúcar xilosa (Pasalary y Homaei, 2022).

Una de las formas de poder cuantificar la actividad enzimática es midiendo la producción de xilosa, a través de la técnica de DNS. Esta es una técnica

colorimétrica basada en una reacción alcalina, en la que se emplea fenol, bisulfitos de sodio, hidróxido de sodio y 3,5-ácido dinitrosalicílico para reducir el azúcar, lo cual es notable mediante un cambio de coloración (Miller, 1959).

9.2. Metodología

En la Figura 34 se muestra un diagrama general de las actividades que se realizaron para la selección de cepas con actividad xilanolítica, así como las cinéticas enzimáticas preliminares y los ensayos de actividad a diferentes rangos de pH, con la finalidad de conocer sus potenciales aplicaciones industriales.

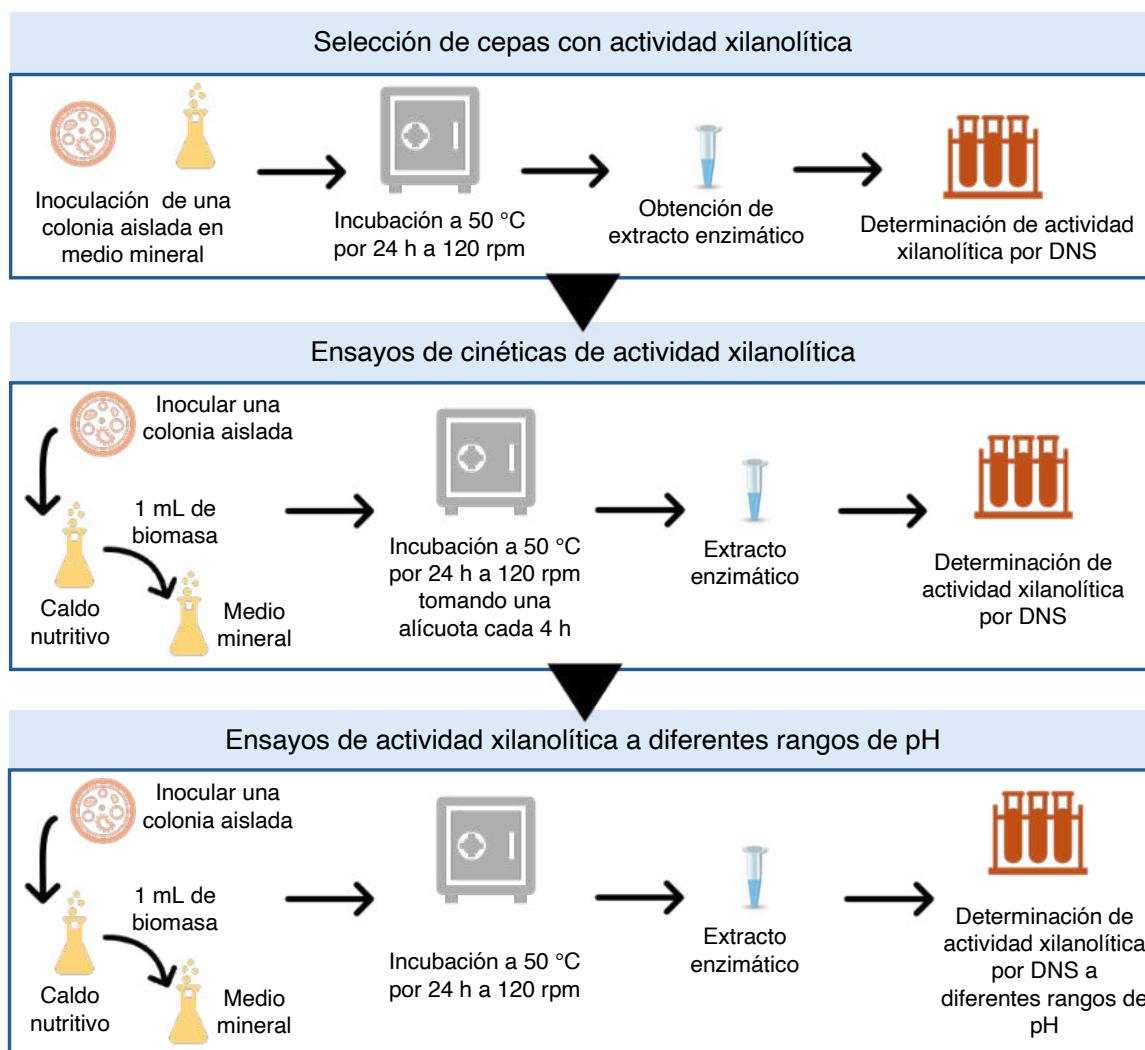


Figura 34. Diagrama general de los ensayos de actividad enzimática.

9.2.1. Selección de cepas con actividad xilanolítica

Las cepas de Z1 y Z2 se inocularon por estría en placa con agar nutritivo suplementado con agar bacteriológico. Se incubaron a 50 °C durante 24 horas para la obtención de colonias aisladas. Se seleccionó una colonia aislada para inocularla en medio mineral (Anexo 1), técnica modificada de Santiago-Hernández *et al.* (2007); a esta se le añadió 1 % de xilano (BIOpHORETICS, Sparks, USA), y se incubó a 50 °C durante 24 horas en agitación de 120 rpm. Transcurridas las 24 h, se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante resultante se empleó como extracto enzimático para la determinación de actividad xilanolítica, siguiendo el método de Miller (1959) para azúcares reductores (Anexo 3). Los valores de las absorbancias de la actividad xilanolítica se interpolaron en una curva estándar de D-Xilosa (BD Difco). La actividad enzimática se expresó en UI (Unidades Internacionales), haciendo referencia a la actividad enzimática como micromoles de sustrato transformado por minuto (King y Campbell, 1960).

9.2.2. Ensayos de cinéticas de actividad xilanolítica

El inóculo para las cinéticas de actividad xilanolítica se obtuvo siguiendo el procedimiento anterior bajo las mismas condiciones, con la diferencia de que la colonia se inoculó en caldo nutritivo y posteriormente se tomó 1 mL para inocular en medio mineral, tomando una alícuota cada cuatro horas para la determinación de la cinética enzimática por el método de Miller (1959) (Anexo 3).

9.2.3. Ensayos de actividad enzimática a diferentes rangos de pH

Una vez determinada la hora en que se obtuvo la mayor actividad enzimática de cada una de las cepas, estas se inocularon en medio mineral ajustando el pH a 8.6, 9.0, 9.5, 10 y 10.5 con el buffer Glicina-NaOH 100 mM (Anexo 3), con la finalidad de probar la actividad enzimática en pH alcalino.

9.3. Resultados y discusiones

9.3.1. Selección de cepas con actividad xilanolítica

En la Tabla 17 se muestran los resultados de actividad enzimática en UI de cada una de las cepas aisladas; después de 24 horas de incubación, se seleccionaron las cepas con mayor actividad para los ensayos subsecuentes de cinética enzimática, así como de las pruebas a diferentes rangos de pH.

Tabla 17. Actividad enzimática de las cepas aisladas.

Cepa	UI
Z1-1	0.324
Z1-2	0.363
Z1-3	0.403
Z1-4	0.391
Z1-5	0.411
Z1-6	0.423
Z1-7	0.382
Z2-1	1.00
Z2-2	0.913
Z2-3	0.896
Z2-4	0.289
Z2-5	0.348
Z2-6	1.003
Z2-7	0.289
Z2-8	1.120
Z2-9	1.046
Z2-10	1.036
Z2-11	0.251

En la Tabla 17 se observa que los resultados de la actividad enzimática de Z1 fueron menores que algunos de los valores obtenidos para Z2. De Z1, la cepa con mayor actividad fue Z1-6 con 0.423 UI; las demás cepas presentaron valores inferiores, siendo Z1-1 con 0.324 la que obtuvo el menor valor de UI.

Las cepas Z2-1, Z2-2, Z2-3, Z2-6, Z2-8, Z2-9 y Z2-10, fueron las que presentaron mayor actividad enzimática; sin embargo, las cepas Z2-2 y Z2-3 tuvieron valores inferiores a 1 UI y las cepas Z2-1, Z2-6, Z2-8, Z2-9 y Z2-10 tuvieron valores iguales o superiores a 1 UI, siendo la cepa Z2-8 la que presentó la mayor actividad.

Por lo anterior, se seleccionaron las cepas Z2-1, Z2-2, Z2-3, Z2-6, Z2-8, Z2-9 y Z2-10 para los ensayos de cinéticas de actividad xilanolítica y su relación con los rangos de pH. Como se mencionó en el capítulo 8 estas fueron clasificadas como: *Aneurinibacillus* sp. (Z2-1), *Bacillus tequilensis* (Z2-2 y Z2-3), *Bacillus subtilis* (Z2-6 y Z2-10), *Paenibacillus dendritiformis* (Z2-8) y *Bacillus licheniformis* (Z2-9).

En el estudio realizado por Malhotra y Chapadgaonkar (2021), en el que aislaron cepas bacterianas de aguas termales tanto mesófilas como termófilas, se realizaron ensayos de actividad enzimática. En los que reportaron dos cepas bacterianas con mayor actividad enzimática; una cepa mesófila con una temperatura óptima de crecimiento de 35 °C, identificada como *Bacillus licheniformis*, en la que se reportó 110 UI/mL en un tiempo de 72 h. A su vez, la cepa termófila identificada como *Brevibacillus* sp., con una temperatura óptima de crecimiento de 45 °C, reportó 70 UI/mL, en un lapso de 145 h, aproximadamente. Comparando la actividad xilanolítica de esas cepas con las aisladas en el presente estudio, queda en evidencia que las nuestras presentaron una actividad inferior.

9.3.2. Ensayos de cinéticas de actividad xilanolítica

En la Figura 35 se muestran las cinéticas de actividad enzimática de las cepas seleccionadas previamente.

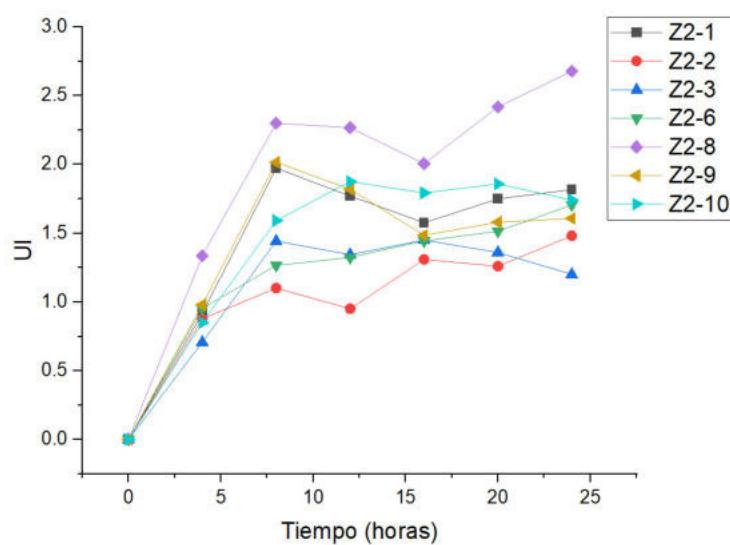


Figura 35. Cinéticas de actividad enzimática de las cepas seleccionadas.

Las cepas Z2-1 y Z2-9 muestran una tendencia muy similar, ya que el tiempo en el que se obtiene la mayor actividad xilanolítica para ambas cepas fue a las 8 horas, siendo de 1.974 y 2.016 UI, respectivamente.

Los valores de UI menores se muestran a las 16 horas con 1.576 y 1.485, respectivamente; sin embargo, a partir de las 20 horas las cepas presentaron un ligero incremento, de 1.750 y 1.580 UI.

Se puede deducir que el incremento de actividad xilanolítica es debido a la disminución del volumen del medio mineral y la acumulación de biomasa y xilano, ya que el volumen inicial fue de 35 mL, del cual se tomaron 6 mL (1 mL cada 4 horas para las determinaciones), y el volumen final fue de aproximadamente 20 a 21 mL. Es importante mencionar que esta tendencia se observó en todas las cepas, así como la disminución del medio.

La cepa Z2-2 mostró un incremento de actividad xilanolítica a las 8 horas de 1.101 UI; sin embargo, se observó un incremento mayor a las 16 horas de 1.310 UI y a las 24 horas de 1.482 UI. Esto puede deberse a la presencia de varias enzimas xilanolíticas y a la concentración de biomasa y xilano.

La cepa Z2-3 mostró mayor actividad a las 8 horas de 1.443 UI y a las 16 horas de 1.450 UI; este comportamiento también puede deberse a la presencia de diferentes enzimas.

El comportamiento de Z2-6 no demostró un punto máximo; su tendencia fue de incremento conforme pasan las horas, mostrando una mayor actividad xilanolítica a las 24 horas de 1.706 UI. Sin embargo, este valor puede verse afectado por la disminución del medio y la concentración de biomasa y xilano.

La cepa Z2-8 mostró una mayor actividad xilanolítica a las 8 horas de 2.301 UI, a las 12 y 16 horas se muestran valores inferiores y a las 20 horas un incremento con un valor de 2.419 UI y a las 24 de 2.678 UI.

La cepa Z2-10 mostró mayor actividad xilanolítica a las 12 horas, con un valor de 1.876 UI, a las 20 horas se volvió a mostrar un incremento con un valor de 1.859 UI.

En el estudio realizado por Malhotra y Chapadgaonkar (2021), también se realizaron ensayos de actividad enzimática a diferentes rangos de pH, reportando 115 U/mL a un pH de 6.5, aproximadamente, para la cepa *Brevibacillus* sp., y 100 U/mL a un pH de 7.5 para *Bacillus licheniformis*. Aunque la estabilidad enzimática, para ambas cepas se mantuvo estable en un rango de pH de 6.5-9.5.

9.3.3. Ensayos de actividad enzimática a diferentes rangos de pH

En la Tabla 18 se muestra la actividad enzimática en UI, a diferentes rangos de pH.

Tabla 18. Actividad enzimática (UI) a diferentes rangos de pH.

Cepa	pH				
	8.6	9	9.5	10	10.5
Z2-1	0.787	1.301	1.709	2.181*	2.135
Z2-2	0	1.081	1.329	1.658*	1.645
Z2-3	0.918	1.635	1.654	1.727*	1.658
Z2-6	0.793	1.323	1.643	2.137*	2.084
Z2-8	0.817	1.245	1.858	2.172*	2.115
Z2-9	0.899	1.425	1.743	2.198*	2.112
Z2-10	0.873	1.756	1.881	1.897	1.918*

*Mayor actividad enzimática reportada en este estudio

Aquí se muestran las cepas y el pH en el que presentaron mayor actividad enzimática; la mayoría de las cepas tuvo mayor actividad a un pH 10, excepto la cepa Z2-10, que presentó mayor actividad a pH 10.5.

La industria del papel es una de las más contaminantes del mundo, debido al requerimiento de energía y uso exhaustivo de agua, lo que genera desechos sólidos, gaseosos y líquidos. La fabricación de papel incluye obtención de pulpa y blanqueo. En particular, el blanqueo es la parte del proceso que genera más contaminantes, debido al empleo de químicos basados en cloruros, que a su vez genera compuestos clorados que posteriormente se desechan a cuerpos acuáticos. Este tipo de compuestos se han reportado como los principales

causantes de desórdenes respiratorios, irritación cutánea, alteraciones mutagénicas y reproductivas en organismos terrestres, incluyendo humanos y finalmente se generan compuestos orgánicos e inorgánicos como: ácidos grasos, clorofenoles, resinas, sales inorgánicas y fenoles (Dixit *et al.*, 2019).

Existen alternativas ecoamigables para reducir este impacto, tales como el empleo de peróxido de hidrógeno, ozonización y enzimas. Las enzimas son consideradas más fáciles de obtener y de mayor eficiencia para evitar el empleo de agentes químicos como los mencionados. La aplicación de enzimas como la xilanasa se ha probado en laboratorios de desarrollo y se ha comercializado principalmente en Asia, Europa y Norteamérica (Dixit *et al.*, 2019). Actualmente, la aplicación industrial de enzimas en el blanqueo de pulpas kraft se enfoca en la reducción del consumo de productos químicos de cloro. Las xilananas en el preblanqueo de pulpas kraft mejoran la fibrilación pulpar y retención de agua, reducen tiempos de batido en pulpas vírgenes, restauran la unión y mayor libertad en fibras recicladas, y eliminan selectivamente xilanos de las pulpas en disolución. En particular, en el blanqueo de pulpas de madera, las enzimas también aumentan su brillo, lo cual es de importancia clave en el desarrollo de productos totalmente libres de cloro (Walia *et al.*, 2017; Dixit *et al.*, 2019).

Las xilananas tienen diversos usos; el más estudiado ha sido el proceso de blanqueo de la industria papelera, en el que se ha reportado una disminución del 29% de cloro por el empleo de xilananas bacterianas (Malhorta y Chapadgaonkar, 2023). Los autores probaron la eficiencia de xilananas termoestables purificadas, en temperaturas por encima de los 70 °C y en pH alcalinos, reportando que valores de 20 UI/g de pulpa de papel en una hora de tratamiento fueron suficientes para el blanqueo de la misma.

9.4. Conclusiones

El ensayo de actividad xilanolítica permitió seleccionar las cepas con mayor actividad enzimática, siendo estas las aisladas de Z2. Las cinéticas de actividad xilanolítica demostraron que siete cepas aisladas de Z2 presentaron la mayor actividad en un tiempo aproximado de 8 horas. Los ensayos a diferentes rangos de pH demostraron su mayor actividad en pH alcalinos, en específico, a pH 10. Estas pruebas preliminares evidencian la potencial aplicación de las enzimas xilananas en procesos industriales con pH alcalino.

10. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

10.1. Conclusiones generales

El análisis de calidad del agua termal de Santa María Amajac permitió establecer su clasificación fisicoquímica e hidrogeoquímica, revelando una composición predominantemente cárlico-magnésica, coherente con la presencia de minerales como portlandita, halita, thenardita, brucita, mirabilita, epsomita, anhidrita y yeso. Esta mineralogía refleja la influencia directa de la geología local, caracterizada por la interacción entre formaciones ígneas y sedimentarias.

Desde el punto de vista microbiológico, la caracterización morfológica, fisiológica y taxonómica de las cepas bacterianas aisladas de los pozos termales evidenció una comunidad microbiana dominada por bacterias Gram positivas, mayoritariamente bacilos formadores de endosporas, pertenecientes al phylum Bacillota (antes Firmicutes), con especies representativas como *Anoxybacillus gonensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus dendritiformis*; además de la presencia destacada de *Deinococcus sahariensis* del phylum Deinococcota (antes Deinococcus–Thermus).

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas demostraron que las cepas presentan características de termófilas moderadas y alcalófilas/neutrófilas, con tolerancia limitada a la salinidad. Estas adaptaciones confirman su capacidad de sobrevivir en ambientes extremos propios de las aguas termales. Asimismo, la variabilidad metabólica observada, especialmente en la capacidad para hidrolizar diversos sustratos como el xilano, sugiere un potencial biotecnológico relevante para la obtención de enzimas termoestables aplicables en procesos industriales.

La comparación entre los pozos analizados evidenció una mayor diversidad bacteriana en Z2, posiblemente asociada a microdiferencias ambientales, tales como gradientes de temperatura, pH y concentración iónica. En conjunto, los resultados aportan información valiosa sobre la relación entre las condiciones geoquímicas y la diversidad microbiana en sistemas termales naturales de México.

10.2. Perspectivas de investigación

- Estudios genómicos y proteómicos avanzados de las cepas aisladas con la posible identificación de genes y rutas metabólicas relacionadas con la termotolerancia, alcalofilia y síntesis de enzimas industriales (xilanases, proteasas, lipasas, entre otras).
- Optimización y purificación de las enzimas termoestables producidas por estas bacterias que conduzcan al desarrollo de aplicaciones en industrias como la alimentaria, papelera, farmacéutica y energética (biocombustibles).
- Monitoreos estacionales de los pozos termales que permitan determinar variaciones en la composición microbiana y geoquímica, aportando información sobre la estabilidad ecológica del sistema.
- Análisis comparativos entre distintas zonas geotermales de México que contribuyan a establecer patrones de biodiversidad microbiana y sus vínculos con la geología regional.
- Estudios ecológicos integrales que incluyan metagenómica ambiental que permitan explorar la microbiota no cultivable y que a su vez amplíen el conocimiento sobre la diversidad y funciones ecológicas de los microorganismos termófilos presentes.
- Profundizar en la interacción entre los minerales y la biota microbiana, con el fin de comprender los procesos de biominerización y su relevancia en la dinámica geoquímica del ecosistema termal.

11. REFERENCIAS

- Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibijbijen, J., Ismaili, M. y Amar, M. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46 (2), 443-453. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140219>
- Abbamondi, R. G., Kambourova, M., Poli, A., Finore, I. y Nicolaus, B. (2019). Quorum sensing in extremophiles. G. Tommonaro, ed., En: Quorum Sensing, Molecular Mechanism and Biotechnological Application. Pozzuoli, Napoli. Academia Press. 97-123
- Acharya, S. y Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43 (3), 844-856. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300001>
- Ajeje, S. B., Hu, Y., Song, G., Peter, S. B., Afful, R. G., Sun, F., Asadollahi, M. A., Amiri, H., Abdulkhani, A. y Sun, H. (2021). Thermostable cellulases/xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: Current perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794304>
- Alexander, S. K. y Strete, D. (2001). Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory, 1st Ed., Pennsylvania, USA.
- Ali Akond, M., Jahan, M. N., Sultana, N. y Rahman, F. (2016). Effect of temperature, pH and NaCl on the isolates of Actinomycetes from straw and compost samples from Savar, Dhaka, Banglades. *American Journal of Microbiology and Immunology*. 1 (2): 10-15.
- Alruman, S., Mostafa, Y., Al-Qahtani, S. y Taha, T. (2018). Hydrolytic enzyme production by thermophilic bacteria isolated from Saudi hot springs. *Open Life Sciences*. 13 (1), 470-480. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0056>
- American Society for Microbiology. (2013). Casein Hydrolysis. Recuperado el 5 de febrero de 2023 de <https://asm.org/image-gallery/casein-hydrolysis>.
- Arbefeville, S. S., Timbrook, T. T. y Garner, C. D. (2024). Evolving strategies in microbe identification -a comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 79 (1), i2-i8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae275>
- Arellano-Gil, J., Velasco-de-León, P., Silva-Pineda, A., Salvador-Flores, R. y Beltrán-Romero, F. (2005). Origen y características geológicas del paleo-Lago de Amajac, Hidalgo. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 22: 199-211.

- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, S. y Blamey, M. J. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*. 280, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Atanasova, N., Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S., Radchenkova, N., Boyadzhieva, I., Petrov, K. y Kambourova, M. (2021). Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) by a thermophilic community and *Brevibacillus thermoruber* strain 7 isolated from Bulgarian hot springs. *Biomolecules*. 11, 1-17. <https://doi.org/10.3390/biom1101488>
- Baba, A., Saroğlu, F., Akkus, I., Ozel, N., Yesilnacar, M.I., Nalbantçilar, M. T., Demir, M. M., Gökçen, G., Arslan, S., Dursun, N., Uzelli, T., Yazdani, H. (2019). Geological and hydrogeochemical properties of geothermal systems in the southeastern region of Turkey. *Geothermics*. 78, 255-271. <https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2018.12.010>
- Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yang, P., Shi, P., Luo, H., Meng, K., Huang, H. y Yao, Bin. (2010). A new xylanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with broad-range pH activity and pH stability. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37 (2), 187-94. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0662-4>
- Bairoch, A. (2000). The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research*. 28 (1), 304-305. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.304>
- Bajpai, P. (2014). Microbial xylanolytic systems and their properties. Bajpai P, ed. En: *Microbial Xylanolytic Enzymes*, Oxford. Academia Press. 19-36.
- Bajpai, P. (2022). Industrial applications of xylanases. Bajpai P, ed. En: *Microbial Xylanolytic Enzymes*. London. Academia Press. 149-211.
- Ball, T. W, y Nosdtrom, D. K. (1991). User's manual for WATEQ4F, with revised thermodynamic data base and test cases for calculating speciation of major, trace, and redox elements in natural waters. U. S. Geological Survey. Menlo Park, California. Open File Report, 91-183.
- Bankar, A. Patil, S., Shinde, M., Shinde, S., Kowlgi, B. (2022). Chapter 7- Potential of microbial extremophiles for biotechnological applications: An overview. Kuddus M, ed. En: *Microbial Extremozymes*. Saudi Arabia. Academic Press. 89-109.
- Banks, D. (s. f.). Geochemistry and hydrochemistry. En DESTRESS Project. ETH Zurich. Recuperado el 17 de junio de 2025 de https://destress.ethz.ch/en/Best-Practices/Geochemistry-and-Hydrochemistry/?utm_source=chatgpt.com

- Barabote, R. D., Parales, J. V., Labavith, J. M., Parales, R. E. y Berry, A. M. (2010). Xyn10A, a thermostable endoxylanase from *Acidothermus cellulolyticus* 11B. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (21), 7363-7366. <https://doi.org/10.1128/AEM.01326-10>
- Battan, B., Sharma, J., Sudha Dhiman, S. y Chander Kuhad, R. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*. 41 (6-7), 733-739. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.006>
- Benammar, L., Bektas, I. K., Menasria, T., Belduz, A. O., Guler, I. H., Bedaida, I. K., Gonzalez, J. M. y Ayachi, A. (2020). Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51, 1987-2007. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00376-0>
- Benedetti, M., Vecchi, V., Betterle, N., Natali, A., Bassi, R., and Dall’Osto, L. (2019). Design of a highly thermostable hemicellulose-degrading blend from *Thermotoga neapolitana* for the treatment of lignocellulosic biomass. *Journal of Biotechnology*. 296, 42-52 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.005>
- Bertolo, A., Valido, E. y Stoyanov, J. (2024). Optimized bacterial community characterization through full-length 16S rRNA gene sequencing utilizing MinION nanopore technology. *BMC Microbiology*. 24 (58), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03208-5>
- Bethesda (1988). National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Recuperado el 15 de octubre de 2022 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Bhalla, A., Bischoff, K. M. y Kumar Sani, R. (2015). Highly thermostable xylanase production from a thermophilic bacteria *Geobacillus* sp. Strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3 (84), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00084>
- Bhardwaj, N., Kumar, B. y Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*. 6 (40), 2-36. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
- Bouaicha, F., Dib, H., Bouteraa, O., Manchar, N., Boufaa, K., Chabour, N., Demdoum, A., (2019). Geochemical assessment, mixing behavior and environmental impact of thermal waters in the Guelma geothermal system,

Algeria. *Acta Geochimica*. 38, 683-702. <https://doi.org/10.1007/s11631-019-00324-2>

Boucherba, N., Gagaoua, M., Bouanane-Darenfed, A., Bouiche, C., Bouacem, K., Kerbous, M. Y., Maafa, Y. y Benallaoua, S. (2017). Biochemical properties of a new thermos- and solvent -stable xylanase recovered using three phase partitioning from the extract of *Bacillus oceanisediminis* strain SJ3. *Bioresources and Bioprocessing*. 4 (29), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0161-9>

Bouraoui, H., Ben Aissa, M., Abbassi, F., Pierre Touzel, J., O'donohue, M., y Manai, M. (2012). Characterization of *Deinococcus sahariensis* sp. Nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a Saharan hot spring. *Archives of Microbiology*. 194, 315-322. DOI: 10.1007/s00203-011-0762-1

Bratcher, J. C., Kaszuba, J. P., Herz-Thyhsen, R. J. y Dewey, J. C. (2021). Ionic strength and pH effects on water-rock interaction in an unconventional siliceous reservoir: On the use of formation water in hydraulic fracturing. *Energy Fuels*. 35, 18414-18429.

Bruckbauer, S. T. y Cox, M. M. (2021). Experimental evolution of extremophile resistance to ionizing radiation. *Trends in Genetics*. 37 (9), 830-845. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.011>

Camargo Cruz T, Núñez Benítez J, Ángeles Hernández JG (2022). Aguas termales del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo, México.

Capece, M. C., Clark, E., Saleh, J. K., Halford, D., Heinl, N., Hoskins, S. y Rothschild L. J. (2013). Polyextremophiles and the Constraints for Terrestrial Habitability. J. Seckbach, A. Ore and H. Stan-Lotter, eds. En: Polyextremophiles. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Dordrecht. Springer. 3-59. Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy). Recuperado el 8 de febrero de 2023 de <http://www.cazy.org>

Cayetano-Cruz, M., Pérez de los Santos, A. I., García-Huante, Y., Santiago-Hernández, A., Pavón-Orozco, P., López y López, V. E. y Hidalgo-Lara, M. E. (2016). High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in an bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. *Biochemical Engineering Journal*. 112, 161-169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.014>

- Chadha, B.S., Kaur, B., Basotra, N., Tsang, A. y Pandey, A. (2019a). Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: *Current perspective*. *Bioresource Technology*. 277, 195-203.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.044>
- Chadha, B.S., Rai, R. y Mahajan, C. (2019b). Hemicellulases for lignocellulosics-based bioeconomy. A. Pandey, C. Larroche, C.G. Dussap, E. Dussap, S.K. Khanal, y S. Ricke, eds. En: Biomass, biofuels, biochemicals: biofuels: alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels. Amsterdam. Elsevier. 427-445.
- Chalise, B., Paudyal, P., Bahadur Kunwar, B., Thapa, B., Raj Pant, R., Bhakta Neupane, B. (2023). Water quality and hydrochemical assessments of thermal springs, Gandaki Province, Nepal. *Helijon*. 9 (6), e17353.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17353>
- Chan, C. S., Chan, K-G., Ee, R., Hong, K-W., Urbieta, M. S., Donati, E. R. Shamsir, M. S. y Goh, K. M. (2017). Effects of physiochemical factors on prokaryotic biodiversity in Malaysian circumneutral hot springs. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1-14.
- Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, S., Hofman, J., Koblitz, J., Schomburg, I., Neumann-Schaal, M., Jahn, D. y Schomburg, D. (2021). BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new development and updates. *Nucleic Acids Research*. 49 (D1), D498-D50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025>
- Chen, Y., Nishihara, A. y Haruta, S. (2021). Nitrogen-fixing ability and nitrogen fixation-related genes of thermophilic fermentative bacteria in the genus *Caldicellulosiruptor*. *Microbes and Environments*. 36 (2), 1-9.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME21018>
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2015). Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Amajac (1321), Estado de Hidalgo. Subdirección General Técnica, Gerencia de Aguas Subterráneas. Publicado en el Diario Oficial de la Federación, el 20 de abril de 2015.
- Cooper-Bribiesca, L. B. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 16 (1), 19-22.
- Davis, S. N. (1964). The chemistry of saline waters. Citado en Porowski, A. (2019). Mineral and Thermal Waters. En: J. LaMoreaux (Ed), *Environmental Geology*,

- pp. 149-181. Springer, New York https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8787-0_978
- De la Cruz y Torres (2012). Gealtin Hydrolysis Test Protocol. American Society for Microbiology.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., Whitman, W. B. (2009). The Firmicutes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed., Goodfellow, M., Kämper, P., De Vos, P., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., Whitman, W. B. (eds). Springer Dordrecht, Georgia, USA, 2009, 3, pp. 1-1476.
- Des Marais, J. D y Walter, R. M. (2019). Terrestrial hot spring system: Introduction. *Astrobiology*. 19 (12), 1419-1432. DOI: 10.1089/ast.2018.1976
- Dhagat, S. y Jujjavarapu, S. E. (2020). Isolation of a novel thermophilic bacterium capable of producing high-yield bioemulsifier and its kinetic modelling aspects along with proposed metabolic pathway. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51, 135-143. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00228-x>
- Dixit, M., Kumar Gupta, G., Liu, H. y Shuka, P. (2019). Pulp and paper industry based pollutants, their health hazards and environmental risks. *Environmental Science & Health*. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.09.010>.
- dos Santos, M. R. H., Argolo, S. C., Argôlo-Filho, C. R. y Lopes Loguericio, L. (2019). A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. *BMC Microbiology*. 19, 74. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>
- Drula, E., Garron, M. L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B. y Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*. 50 (D1), D571-D577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
- Dumorné, K., Camacho Córdova, D., Astorga-Eló, M. y Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A potential source for industrial applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27 (4), 649-659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>
- ENZYME Expasy. (s. f.) Recuperado el 15 de marzo de 2023 de <https://enzyme.expasy.org>
- Erfurt, P. (2021). Hot springs: A general perspectives. En: The Geoheritage of hot springs. Geoheritage, Geoparks and Geotourism. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60463-9_1

- Ergün, B. G. y Çalık, P. (2016). Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39 (1), 1–36. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1476-6>
- Escuder-Rodríguez, J. J., DeCastro, M. G., Becerra, M., Rodríguez-Belmonte, E. y González-Siso, M. I. (2018). Advances of functional metagenomics in harnessing thermostable enzymes. M. Nagarajan, ed. En: Metagenomics, Perspectives, Methods, and Applications. London. Academic Press. 289-307.
- Farhat, N., Hussain, S., Faisal, F., Batool, I. y Noreen, M. (2021). Physico-chemical characteristics and therapeutic potential of Chutrun thermal springs in Shigar Valley, Gilgit-Baltistan (Pakistan). *Applied Water Science*. 11 (19). <https://doi.org/10.1007/s13201-020-01354-5>
- Fernandes de Souza, H., Aguiar Borges, L., Dédalo Di Próspero Gonçalves, V., Vitor dos Santos, J., Sousa Bessa, M., Fronja Carosia, M., Vieira de Carvalho, M., Viana Brandi, I. y Setsuko Kamimura, E. (2022). Recent advances in the application of xylanases in the food industry and production by actinobacteria: A review. *Food Research International*. 162, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112103>
- Fontana, A., De Filippis, V., Polverino de Laureto, P., Scaramella, E. y Zambonin, M. (1998). Rigidity of thermophilic enzymes. *Progress in Biotechnology*. 15, 277-294. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(98\)80043-9](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(98)80043-9)
- Gharwalová, L., Palyzová, A., Marešová, H., Kolouchová, I., Kyselová, L. y Řezanka T. (2021). Identification of homologous polyisoprenols from thermophilic bacteria. *Microorganisms*. 9, 1-12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061168>
- Ghosh, S., Lepcha, K., Basak, A. and Mahanty, K. A. (2020). Thermophiles and thermophilic hydrolases. R. Salwan and V. Sharma, eds. En: Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles, London. Academic Press. 219-236.
- Gomes, E., Rodrigues de Souza, A., Ladino Orjuelas, G., Da Silva, R., Brito de Oliveira, T. y Rodrigues, A. (2016). Applications and benefits of thermophilic microorganisms and their enzymes for industrial biotechnology. M. Schmoll and C. Dattenböck, eds. En: Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. Switzerland. Springer Cham. 459-492.

- Goswami, G. K. y Pathak, R. R. (2013). Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2 (3), 237-246. <https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp20130602>
- Hamilton-Brehm, S. D., Stewart, L. E., Zavarin, M., Caldwell, M., Lawson, P. A., Onstott, T. C., Grzymski, J., Neveux, I., Lollar, B. S., Russell, C. E. y Moser, D. P. (2019). *Thermoanaerobacterium fractalcalcis* gen. nov. sp. nov., a novel fumarate-fermenting microorganism from a deep fractured carbonate aquifer of the US Great Basin. *Frontiers in Microbiology*. 10, 2224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02224>
- Heinen, R. P., Betini, H. A. J. y Polizeli, L. T. M. M. (2017). Xylanases. *Reference Module in Life Sciences*. 1-12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13127-9>
- Horikoshi, K. y Bull, T. A. (2011). Prologue: Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles. K. Horikoshi, eds. En: *Extremophiles Handbook*. Tokyo. Springer. 3-15.
- Hough, W. D. y Danson, J. M. (1999). Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3 (1), 39-46. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)80008-8)
- Hsu, H.-H., Yeh, H.-F. (2020). Factors controlling of thermal water hydrogeochemical characteristics in Tatun Volcano Group, Taiwan. *Water*. 12 (9), 2473. <https://doi.org/10.3390/w12092473>
- Hu, D., Liu, B., Wang, L. y Reeves, R. P. (2019). Living Trees: High-Quality reproducible and reusable construction of bacterial phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 372 (2), 563-575. DOI: 10.1093/molbev/msz241
- Hussey, M. A. y Zayaitz, A. (2007). *Laboratory Exercises in Microbiology*. The McGraw Hill. E. U. A. 466 pp.
- Irwin, A. J. (2020). Overview of extremophiles and their food and medical applications. R. Salwan and V. Sharma, eds. En: *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. London. Academic Press. 67-87.
- Ishaq, S. L., Kim, C. J., Reis, D. y Wright, A. D. (2015). Fibrolytic bacteria isolated from the rumen of north american moose (*Alces alces*) and their use as a probiotic in neonatal lambs. *PloS One*. 10 (12), 1-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144804>

- Islam, T., Gessesse, A., Garcia-Moyano, A., Murrell, C. J. y Øvreås, L. (2020). A novel moderately thermophilic type Ib methanotroph isolated from an alkaline thermal spring in the Ethiopian Rift Valley. *Microorganisms*. 8 (2), 1-18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020250>
- Jarosławiecka, K. y Piotrowska-Seget, Z. (2022). The effect of heavy metals on microbial communities in industrial soil in the area of Piekary Śląskie and Bukowno (Poland). *Microbiology Research*. 13, 626-642. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030045>
- Jegannathan, K. R. y Nielsen P. H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production*. 42, 228-240. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.11.005>
- Jiao, J.-Y., Abdugheni, R., Zhang, D.-F., Ahmed, I., Ali, M., Chuvochina, M., Dedysh, S. N., Dong, X., Göker, M., Hedlund, B. P., Hugenholtz, P., Jangid, K., Liu, S.-J., Moore, E. R. B., Rao, M. P. N., Oren, A., Rosello-Mora, R., Rekawad, B. N., Salam, N., Shu, W., Sutcliffe, I. C., Teo, W. F. A., Trujillo, M. E., Venter, S. N., Whitman, W. B., Zhao, G. y Li, W.-J. (2024). Advancements in prokaryotic systematics and the role of Bergey's International Society for Microbial Systematics in addressing challenges in the meta-data era. *National Science Review*. 11 (7), nwae168. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwae168>
- Jones, B. C., White, R. J., Ernst, E. S., Sfanos, S. K. y Peiffer, B. L. (2022). Incorporation of data from multiple hypervariable regions when analyzing bacterial 16S rRNA gene sequencing data. *Frontiers in Genetics*. 13, 799615. DOI: 10.3389/fgene.2022.799615
- Joshi, B. J., Priyadarshini, R. y Uthandi, S. (2022). Glycosyl hydrolase 11 (xynA) gene with xylanase activity from thermophilic bacteria isolated from thermal springs. *Microbial Cell Factories*. 21 (62), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01788-3>
- Juturu, V. y Chuan Wu, J. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30 (6), 1219-1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>
- Kanekar, P. P., Kanekar, S. P., Kelkar, A. S. y Dhakephalkar, P. K. (2012). Halophiles – Taxonomy, diversity, physiology and applications. T. Satyanarayana and B. Jhori, eds. En: *Microorganisms in Environmental Management*. Dordrecht. Springer. 1-34.

- Karlsson, E. N., Hachem, M. A., Ramchuran, S., Costa, H., Holst, O., Svennningse, A. F. y Hreggvidsson, G. O. (2004). The modular xylanase Xyn10A from *Rhodothermus marinus* is cell-attached, and its C-terminal domain has several putative homologues among cell-attached proteins within the phylum Bacteroidetes. *FEMS Microbiology Letters*. 241 (29), 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.026>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. y Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*. 57 (5): 503-507.
- Khadka, S., Khadka, D., Chandra Poudel, R., Bhandari, M., Baidya, P., Sijapati, J. y Maharjan, J. (2022). Production optimization and biochemical characterization of cellulase from *Geobacillus* sp. KP43 isolated from hot spring water of Nepal. *BioMed Research International*. 2022, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2022/6840409>
- Khandeparkar, R. y Bhosle, B. N. (2006). Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp. MTCC 5112. *Research in Microbiology*. 157, 315-325. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.12.001>
- Khehra, N., Padda, S. I. y Zubair, M. (7 de Julio de 2025). Polymerase Chain Reaction (PCR). National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- King, E. J. y Campbell, D. M. (1961). International enzyme units an attempt at international agreement. *Clinica Chimica Acta*. 6 (1961), 301.306.
- Ko, C. H., Tsai, C. H., Tu, J., Lee, H. Y., Ku, L. T., Kuo, P. A. y Lai Y. K. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochemistry*. 45 (10), 1638-1644. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.015>
- Krieger, R. A. (1963). The chemistry of saline waters. *Groundwater*. 1 (4), 7-12. Citado en Porowski, A. (2019). Mineral and Thermal Waters. En: J. LaMoreaux (Ed), *Environmental Geology*, pp. 149-181. Springer, New York https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8787-0_978
- Kulkarni, N., Shendye, A. y Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 23 (4), 411-456. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00006-6)

- Kumar y Sharma (2020). Microbial diversity in relation to physico-chemical properties of hot water ponds located in the Yamunotri landscape of Garhwal Himalata. *Helijon*. 6, e04850. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04850>
- Kumar, S., Dangi, A. K., Shukla, P., Baishya, D. y Khare, K. S. (2019). Thermozymes: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology*. 278, 372-382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.088>
- Kumar, V. y Satyanarayana, T. (2013). Thermoalkaliphilic microbes. J. Seckbach, A. Oren and H. Stan-Lotter, eds. En: Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress. Dordrecht. Springer. 71-296.
- Kumar, V., Dangi, A.K. y Shukla, P. (2018). Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. *Molecular Biotechnology*. 60, 226–235. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0059-6>
- Kumar, V., Marín-Navarro, J. y Shukla, P. (2016). Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-2005-0>
- Lal, A. y Cheeptham, N. (2012). Starch Agar Protocol. American Society for Microbiology.
- Lee, L. S., Goh, K. M., Chan, C. S., Tan, G. Y. A., Yin, W. F., Chong, C. S. y Chan, K. G. (2017). Microbial diversity of thermophiles with biomass deconstruction potential in a foliage-rich hot spring. *MicrobiologyOpen*. 7 (6), 1-13. <https://doi.org/10.1002/mbo3.615>
- Lee, Y-J., Ganbat, D., Oh, D., Kim, H., Jeong, G. E., Cha, I-T., Kim, S-B., Nam, G., Jung, Y-L. y Lee, S-J. (2022). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from hot springs in Republic of Korea. *Microorganisms*. 10, 2375. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122375>
- Lee, Y. E., Lowe, S. E. y Zeikus, J. G. (1993). Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (3), 763-771. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.763-771.1993>
- Li, W. F., Zhou, X. X. y Lu, P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances*. 23, 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.002>
- Liu, R., Qiao, X., Shi, Y., Peterson, B. C., Bush, S. W., Cominelli, F., Wang, M. y Zhang, L. (2024). Constructing phylogenetic trees for microbiome data

- analysis: A mini-review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 23, 3859-3868. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.10.032>
- Lorenz, M., Aisch, G. y Kokkelink, D. (2012). Datawrapper: Create Charts and Maps. Recuperado el 26 de junio de 2023 de <https://www.datawrapper.de/>
- Lu, P., Zhang, G., Apps, F. y Zhua, C. (2022). Comparison of thermodynamic data files for PHREEQC. *Earth-Science Reviews*. 225, 1-63. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2021.103888>
- MacWilliams (2009). Indole test protocol. American Society for Microbiology.
- Madhusudan Makwana, K. y Mahalakshmi, R. (2015). Implications of aromatic-aromatic interactions: From protein structures to peptide models. *Protein Science*. 24 (12), 1920-1933. <https://doi.org/10.1002/pro.2814>
- Madigan, T. M., Martinko, M. J., Bender, S. K., Buckley, H. D. y Stahl, A. D. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. 14th Ed. Pearson Educación, S. A. Madrid, España.
- Mahala, S. C. (2018). Geochemistry of thermal water. En: Geology, Chemistry and Genesis of Thermal Springs of Odisha, India. SpringerBriefs in Earth Sciences. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90002-5_5
- Maier, M. R. y Neilson, W. J. (2015). Extreme Environments. I. L. Pepper, C. P. Gerba and T. J. Gentry, eds. En: Environmental Microbiology (Third edition). San Diego. Academic Press. 139-153.
- Malhorta, G. y Chapadgaonkar, S. S. (2021). Production of thermo-alkali-stable xylanase from *Bacillus licheniformis* isolated from natural hot water geyser. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 9 (3), 131-135. DOI: 10.4103/JMAU.JMAU_21_20
- Malhotra, G. y Chapadgaonkar, S. S. (2023). Thermo-alkali stable bacterial xylanase for deinking of copier paper. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 21 (1), 2-5. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00563-0>
- Mamo, G., Hatti-Kaul, R. y Mattiasson, B. (2006). A thermostable alkaline active endo-beta-1,4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: Purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*. 39 (7), 1492-1498. <https://doi.org/10.1016/j.enzmotec.2006.03.040>
- Márquez, L. S. y Blamey, M. J. (2019). Isolation and partial characterization of a new moderate thermophilic *Albidovulum* sp. SLM16 with transaminase activity from Deception Island, Antarctica. *Biological Research*. 52 (5), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0210-7>

- Martínez-Florentino, T. A. K., Esteller-Alberich, M. V., Expósito, J. L., Domínguez-Mariani, E. y Morales-Arredondo, J. I. (2021). Hydrogeochemistry and geothermometry of thermal springs in the eastern Trans-Mexican Volcanic Belt. *Geothermics*. 96, 102176. <https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2021.102176>
- MEGAZYME (s. f.). Recuperado el 3 de febrero de 2023 <http://www.megazyme.com>
- Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D. y Sharma, A. K. (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*. 6, 2-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0368-z>
- Merino, N., Aronson, S. H., Bojanova, P. D., Feyhl-Buska, J., Wong, L. M., Zhang, S. y Giovannelli, D. (2019). Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology-Extreme Microbiology*. 10, 1-25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Mhiri, S., Bouanane-Darenfed, A., Jemil, S., Neifar, S., Ameri, R., Mezghani, M., Bouacem, K., Jaouadi, B. y Bejar, S. (2020). A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. *International Journal of Biological Macromolecules*. 164, 808-817. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.162>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society. 31 (3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mohammad, T. B., Al Daghistani, I. H., Jaouani, A., Abdel-Latif, S. y Kennes, C. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordania hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International Journal of Microbiology*. 2017, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/6943952>
- Moorlag, J. C. F. M. S., Coolen, P. M. J., van den Bosch, B., Hui-Mei Jin, E., Buli, B. J., Wertheim, F. L. H. y Melchers, J. G. W. (2023). Targeting the 16S rRNA gene by reverse complement PCR next-generation sequencing: Specific and sensitive detection and identification of microbes directly in clinical samples. *Microbiology Spectrum*. 11 (3), 1-12.
- Morán-Ramírez, J., Ramos-Leal, J. A., López-Álvarez, B., Carranco Lozada, S. y Santacruz-De León G. (2013). Comportamiento hidrogeoquímico de flujos subterráneos en acuíferos cársticos fracturados, aplicando modelación

- inversa: Caso Huasteca Potosina. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 65 (1), 71-82.
- Moreno-Merino, L., Aguilera Alonso, H., González Jiménez, M., Díaz Lozada, E. y Romero Prados, A. (2021). D-Piper (Diagrama Piper de Densidad) Representación de grandes conjuntos de datos mediante el diagrama de Piper, Manual de uso. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España. Serie: Hidrogeología y Aguas Subterráneas. Madrid, España. pp. 1-40.
- Najar, N. I., Thundu Sherpa, M., Das, S., Das, S. y Thakur, N. (2018). Microbial ecology of two hot springs of Sikkim: Predominate population and geochemistry. *Science of The Total Environment*. 637-638, 730-745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.037>
- National Center for Biotechnology Information. NCBI. (s. f.). Recuperado el 14 de febrero de 2023 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- National Human Genome Research Institute. NIH. (s. f.). Recuperado el 17 de agosto de 2020 de <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>
- NCBI Staff. (10 de diciembre de 2021). NCBI Taxonomy to include phylum rank in taxonomic names. NCBI insights. Recuperado 9 de noviembre de 2024 de https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2021/12/10/ncbi-taxonomy-prokaryote-phyla-added/?utm_source=chatgpt.com
- Obeidat, M. y Al-Shomali, B. (2023). Moderately thermophilic bacteria from Jordanian Hot Springs as possible sources of thermostable enzymes and leukemia cytotoxic agents. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 16 (3), 413-424. <https://doi.org/10.54319/jjbs/160304>
- Ochoa-Díaz, M. M., Daza-Giovannetty, S. y Doris-Gómez, C. (2017). Bacterial genotyping methods: from the basics to modern. En: Medina, C., López-Baena, F. (eds) Host-Pathogen Interactions. Methods in Molecular Biology, Vol. 1734. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_2
- Ogodo, A. C., Agwaranje, D. I., Daji, M. y Aso, R. E. (2022). Chapter 13- Microbial techniques and methods: basic techniques and microscopy. *Analytical Techniques in Biosciences*. 201-220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00003-8>
- Okpala, G. N., Chen, C., Fida, T. y Voordouw, G. (2017). Effect of thermophilic nitrate reduction on sulfide production in high temperature oil reservoir

- samples. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01573>
- Omae, K., Fukuyama, Y., Yasuda, H., Mise, K., Yoshida, T. y Sako, Y. (2019). Diversity and distribution of thermophilic hydrogenogenic carboxydrotrophs revealed by microbial community analysis in sediments from multiple hydrothermal environments in Japan. *Archives of Microbiology*. 201, 969-982. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01661-9>
- Ortíz-Hernández, L. E., Escamilla Casas, J. C., Blanco-Piñón, A., Cruz Chávez, E., & Ambrocio Cruz, P. (2014). Estructuras volcánicas lacustres en Amajac, estado de Hidalgo (México central). *Tópicos De Investigación En Ciencias De La Tierra Y Materiales*. 1 (1), 82-87. <https://doi.org/10.29057/aactm.v1i1.9939>
- Panosyan, H., Margaryan, A. y Birkeland, N. K. (2021). *Anoxybacillus karvacharensis* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from the Karvachar geothermal spring in Nagorno-Karabakh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 71, 1-9. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005035>
- Parkhurst, D. L. y Appelo, C. A. J. (2013). Description of input and examples for PHREEQC version 3—A computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations: U.S. Geological Survey Techniques and Methods, book 6, chap. A43, 497.
- Pasalari, A., y Homaei, A. (2022). Identification of Xylanase-Producing bacteria from *Ulva flexuosa* of the Persian Gulf. *Processes*. 10 (1834), 1-11. <https://doi.org/10.3390/pr10091834>
- Patel, K. y Dudhagara, P. (2020). Optimization of xylanase production by *Bacillus tequilensis* strain UD-3 using economical agricultural substrate and its applications in rice straw pulp bleaching. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 30, 1-9.
- Pazdro, Z. y Kozerski, B. (1990). Hydrogeology. Wydawnictwa Geologiczne, Warszawa. p. 624. Citado en Porowski, A. (2019). Mineral and Thermal Waters. En: J. LaMoreaux (Ed), *Environmental Geology*, pp. 149-181. Springer, New York https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8787-0_978
- Pérez-Bustamante, I. S., Cruz-Flores, R., López-Carvallo, J. A., Sánchez-Serrano, S. (2024). Effect of the 16S rRNA gene hypervariable region on the microbiome taxonomic profile and diversity in the endangered fish *Totoaba*

macdonaldi. Microorganisms. 12 (2119), 1-17.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12112119>

Piñero-Ramírez, D. H. (2011). Inventario Físico de los Recursos Minerales de la Carta Actopan F14-D17, Municipios de Actopan, Atotonilco el Grande, Mineral del Chico, Metztitlán y Santiago de Anaya, Estado de Hidalgo. Servicio Geológico Mexicano.

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. y Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67, 577-591.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>

Porowski, A. (2019). Mineral and Thermal Waters. En: J. LaMoreaux (Ed), *Environmental Geology*, pp. 149-181. Springer, New York
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8787-0_978

Porto de Souza-Vandenbergue, L., Karp, G. S., Binder Pagnoncelli, G. M., von Linsingen Tavares, M., Libardi Junior, N., Valadares-Diestra, K., Aparecida Viesser, J. y Soccol, C. R. (2020). Chapter 2 – Classification of enzymes and catalytic properties. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Dulberger, A. ed. Elsevier, Amsterdam. 11-30.

Prakesh Verma, J., Kumar Jaiswal, D., Krishna, R., Prakash, S., Yadav, J. y Singh, V. (2018). Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strain for developing plant growth promoting consortium from hot springs of Leh and Ladakh Region of India. *Frontiers in Microbiology*. 9, 1-15.

Preiss, L., Hicks, D. B., Suzuki, S., Meier, T. y Krulwich, T. A. (2015). Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3 (75), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00075>

Prescott, H. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology. 5th Ed. The McGraw-Hill Prieto-Barajas, C. M., Alfaro-Cuevas, R., Valencia-Cantero, E. y Santoyo, G. (2017). Effect of seasonality and physicochemical parameters on bacterial communities in two hot springs microbial mats from Araró, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 88, 616-624.

PROZOMYX. (s. f.). Recuperado el 3 de febrero de 2023 de <http://www.prozomyx.com>

Punekar, N. S. (2018). Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. Springer Singapore.

- Qu, W. y Shao, W. (2011). Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA. *Biotechnology Letters*. 33, 1407-1416. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0568-x>
- Ramírez-Pacheco, A., Moreno-Guerrero, S. S. y Medina-Sanson, A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cancer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 12 (3), 162-173.
- Razmi, N., Lazouskaya, M., Pajcin, I., Petrovic, B., Grahovac, J., Simic, M., Willander, M., Nur, O. y Stojanovic, G. M. (2023). Monitoring the effect of pH on the growth of pathogenic bacteria using electrical impedance spectroscopy. *Results in Engineering*. 20, 101425. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101425>
- Razvi, A. y Scholtz, M. (2006). Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Science*. 15, 1569-1578. <https://doi.org/10.1110/ps.062130306>
- Regueira-Iglesias, A., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T. y Tomás, I. (2023). Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis. *Molecular Oral Microbiology*. 1-53.
- Reimer, L. C., Vetcininova, A., Sardà Carbasse, J., Söhngen, C., Gleim, D., Ebeling, C. y Overmann, J. (2019). BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis Nucleic Acids Research; database issue 2019. Recuperado el 18 de diciembre de 2022 de <https://bacdive.dsmz.de>
- Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American Society for Microbiology.
- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E. y Gautieri, A. (2018). Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*. 2, 1-17. <https://doi.org/10.1063/1.4997367>
- Rothschild, L. J. y Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*. 409, 1092-1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Rupasinghe, R., Amarasena, S., Wickramarathna, S., Biggs, P. J., Chandrajith, R. y Wickramasinghe, S. (2022). Microbial diversity and ecology of geothermal springs in the high-grade metamorphic terrain of Sri Lanka. *Environmental Advances*. 7, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100166>
- Rusch, D. B., Huang, J., Hemmerich, C. y Hahn, W. M. (2022). High-resolution phylogenetic and population genetic analysis of microbial communities with RoC-ITS. *ISME Communications*. 2 (1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00183-8>.

- Sahoo, K., Kumar Sahoo, R., Gaur, M. y Subudhi, E. (2019). Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: a review. *Folia Microbiologica*. 65, 25-43. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00710-6>
- Sajjad, W., Ilahi, N., Kang, S., Bahadur, A., Zada, S. y Iqbal, A. (2022). Endolithic microbes of rocks, their community, function and survival strategies. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 169, 105387. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105387>
- Salwan, R. y Sharma, V. (2020a). Overview of extremophiles. R. Salwan and V. Sharma, eds. En: Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. London. Academic Press. 3-11.
- Salwan, R. y Sharma, V. (2020b). Physiology of extremophiles. R. Salwan and V. Sharma, eds. En: Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. London. Academic Press. 13-22.
- Samanta, D., Govil, T., Saxena, P., Thakur, P., Narayanan, A. y Sani, R. K. (2022). Extremozymes and their applications. N. K. Arora, S. Agnihotri and J. Mishra, eds. En: Extremozymes and Their Industrial Applications. London. Academic Press. 1-39.
- Santiago-Hernández, A., Vega-Estrada, J., Montes-Horcasitas, M. del C., Hidalgo-Lara, M. E. (2007). Purification and characterization of two sugarcane bagasse-absorbable thermophilic xylanases from the mesophilic *Cellulomonas flavigena*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34 (4), 331-338.
- Sanz, L. J. y Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*. 42 (2), 119-133. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.003>
- Saz, P., Gálvez, J. J., Ortiz, M. y Saz, S. (2011). Agua y Salud, Balnoterapia. Ambito Farmacéutico, Salud Integral. 30 (6), 66-70.
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S. y Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database: the journal of biological databases and curation, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schultz, J., Vilardi Argentino, C. I., Kallies, R., Nunes da Rocha, U. y Soares Rosado, A. (2022). Polyphasic analysis reveals potential petroleum hydrocarbon degradation and biosurfactant production by rare biosphere thermophilic

- bacteria from Deception Island, an active Antarctic volcano. *Frontiers in Microbiology*. 13, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.885557>
- Seckbach, J. (2013). Life on the Edge and Astrobiology: Who is who in the polyextremophiles world? J. Seckbach, A. Oren and H. Stan-Lotter, eds. En: Polyextremophiles. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Dordrecht. Springer. 7: 61-79.
- SGM, Servicio Geológico Mexicano (2023). Clasificación de yacimientos minerales. Publicado el 10 de enero de 2023. Recuperado de: https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Clasificacion-de-yacimientos-minerales.html
- Sharma, A., Kawarabayasi, Y. y Satyanarayana T. (2012). Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles*. 16, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0402-3>
- Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S. y Kumar Bajaj, B. (2019). Thermostable enzymes for industrial biotechnology. R. S. Singh, R. R. Singhania, A. Pandey and C. Larroche, eds. En: Advances in Enzyme Technology. Amsterdam. Elsevier. 469-495.
- Sheikh, J., Tian Swee, T., Malik, S., Saidin, S., Suan Chua, L. (2024). Bacterial morphology and microscopic advancements: Navigating from basics to breakthroughs. *Microbiological & Immunological Communications*. 03 (01), 03-41. DOI:10.55627/mic.003.01.0567
- SIGMA ALDRICH. (s. f.). Recuperado el 31 de marzo de 2023
<http://www.sigmaaldrich.com>
- Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O. y Madamwar, D. (2019). Microbial Community Dynamics of Extremophiles/Extreme Environment. S. Das and H. R. Dash, eds. En: Microbial Diversity in the Genomic Era. London. Academic Press. 323-332.
- Smith, A. C. y Hussey, M. A. (2005). Gram stain protocols. American Society for Microbiology
- Smith, J. M. (2002). 47-Cultural Characteristics. Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology, 8th Ed., Sims Fornago, J., Ed., MacGraw HillHigher Education: New York, USA, pp. 157-160.
- Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G. y Suvarnalatha Devi, P. (2017). Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum*. *3 Biotech*. 7, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0898-z>

- Stewart, L. C., Llewellyn, J. G., Butterfield, D. A., Lilley, M. D. y Holden, J. F. (2016). Hydrogen and thiosulfate limits for growth of a thermophilic, autotrophic *Desulfurobacterium* species from a deep-sea hydrothermal vent. *Environmental Microbiology Reports*. 8, 2, pp.196–200. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12368>
- Subtavewung P, Raksaskulwong M y Tulyatid J (2005). The characteristics of hot springs in Thailand. *Proceedings World Geothermal Congress*. (1-7 pp). Antalya, Turkey, 24-29 April 2005.
- Suleiman, A. D., Abdul Rahman, N., Mohd Yusof, H., Mohd Shariff, F. y Yasid, N. A. (2020). Effect of cultural conditions on protease production by a Thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* SKF4 isolated from Sungai Klah hot spring, Malaysia. *Molecules*. 25, 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules25112609>
- Tabassum, A. (2024). Effects of temperature, pH, and salinity on *Pseudomonas* species from household water supplies and their multidrug resistance profiles. *Journal of Bacteriology and Virology*. 54 (4), 343-354. <https://doi.org/10.4167/jbv.2024.54.4.343>
- Tamura, K., Stecher, G., y Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38, 3022-3027.
- Tankeshwar, A. (Enero 7, 2024). Colony Morphology of Bacteria. Tomado de Microbe Online. Recuperado el 7 de marzo de 2024 de <https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/>
- Thakur, V., Kumar, V., Kumar, V. y Singh, D. (2022). Xylooligosaccharides production using multi-substrate specific xylanases secreted by a psychrotolerant *Paenibacillus* sp. PCH8. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 3 , 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100215>
- Thankappan, S., Kandasamy, S., Joshi, B., Sorokina, N. K., Taran, O. P. y Uthandi, S. (2018). Bioprospecting thermophilic glycosyl hydrolases, from hot springs of Himachal Pradesh, for biomass valorization. *AMB Express*. 8, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0690-4>
- Truesdell, A. H. y Jones, B. F. (1974). Wateq, a computer program for calculating chemical equilibria of natural waters. *Journal of Research of the U.S. Geological Survey*. 2 (2), 233-248.

- Turner, P., Mamo, G. y Nordberg Karlsson, E. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*. 6, 1-23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-9>
- Ulucay, O., Gomez, A. y Ozic, C. (2022). For biotechnological applications: Purification and characterization of recombinant and nanoconjugated xylanase enzyme from thermophilic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 44, 102478. <https://doi.org/10.1016/j.biab.2022.102478>
- Urbieta, S. M., Donati, R. E., Chan, K. G., Shahar, S., Sin, L. L. y Goh, M. K. (2015). Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*. 33 (6), 633-647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.007>
- Valenzuela, b., Solís-Cornejo, F., Araya, R., Zamorano, P. (2024). Isolation of thermophilic bacteria from extreme environments in nothern Chile. *Microorganisms*. 12 (473), 1-15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030473>
- Vazquez-Suñe, E. y Serrano-Juan, A. (2012). Easy Quim.4. Grupo de Hidrogeología Subterránea. Recuperado de <https://h2ogeo.upc.edu>
- Veeresh, J. y Chuan Wu, J. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30, 6, 1219-1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>
- Verma, D. y Satyanarayana, T. (2012). Cloning, expression and applicability of thermos-alkali-stable xylanase of *Geobacillus thermoleovorans* in generating xylooligosaccharides from agro-residues. *Bioresource Technology*. 107, 333-338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.055>
- Verma, D., Kawarabayasi, Y., Miyazaki, K. y Satyanarayana, T. (2013). Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable ans thermostable xylanase encoding gene (Mxyl) retrived from compost-soil metagenome. *Plos ONE*. 8 (1), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052459>
- Verma, J. P., Jaiswal, D. K., Krishna, R., Prakash, S., Yadav, Y. y Singh, V. (2018). Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh Region of India. *Frontiers in Microbiology*. 9, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01293>

- Větrovský, T. y Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA Gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLOS One*. 8 (2): e57923.
- Vieille, C. y Zeikus, G. J. (1996). Thermozymes: Identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends in Biotechnology*. 14 (6), 183-190. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10026-3](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10026-3)
- Villalba, S. Z., Mikán, J. F. y Sánchez, J. (2004). Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del archivo general de Colombia.
- Von Hegner, I. (2019). Extremophiles: a special or general case in the search for extra-terrestrial life? *Extremophiles*. 24, 167-175. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01144-1>
- Walaa A., Shireen A.A., Eman A., Nahla M. y Mona A. (2018). Possible correlation among osmophilic bacteria, levan yield, and the probiotic activity of three bacterial honey isolates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14, 368-394. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.04.006>
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., y Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*. 7 (11), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0584-6>
- Wang, Q., Cen, Z. y Zhao, J. (2015). The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: an angle of omics. *Physiology*. 30, 97-106. <https://doi.org/10.1152/physiol.00066.2013>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. D. y Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173 (2), 697-703.
- Wilson, H. K., Blitchington, B. R. y Greene, C. R. (1990). Amplification of bacterial 16S Ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 28 (9), 1942-1946.
- Ya-Shan, C., Chun-Chi, C., Chun-Hsiang, H., Tzu-Ping, K., Wenhua, L., Jian-Wen, H., Je-Ruei, L. y Rey-Ting, L. (2014). Structural analysis of a glycosidase hydrolase family 11 Xylanase from *Neocallimastix patriciarum* insights into the molecular basis of a thermophilic enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 289 (16), 11020-11028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550905>
- Yadav, P., Maharjan, J., Korpole, S., Prasad, G. S., Sahni, G., Bhattarai, T. y Sreerama, L. (2018). Production, purification, and characterization of thermostable alkaline xylanases from *Anoxybacillus kamchatkensis*

- NASTP13. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 6 (65), 2-13.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00065>
- Yang, J., Ma, T., Shang-guan, F. y Han, Z. (2020). Improving the catalytic activity of thermostable xylanase from *Thermotoga maritima* via mutagenesis of non-catalytic residues at glycone subsites. *Enzyme and Microbial Technology*. 139, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmotec.2020.109579>
- Yang, X., Wu, L., Xu, Y., Ke, C., Hu, F., Xiao, X. y Huang J. (2018). Identification and characterization of a novel alkalistable and salt-tolerant esterase from the deep-sea hydrothermal vent of the East Pacific Rise. *MicrobiologyOpen*. 7 (5), 1-10. <https://doi.org/10.1002/mbo3.601>
- Yayanos, A. A. (2009). High-Pressure Habitats. Encyclopedia of Microbiology. 3rd Ed., 228-239. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00283-2>
- Young, K. D. (2007). Bacterial morphology. Why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology*. 10 (6), 596-600.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.009>
- Zeldes, B. M., Keller, M. W., Loder, A. J., Straub, C. T., Adams, M. W. W. y Kelly, R. M. (2015). Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Frontiers in Microbiology*. 6, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01209>
- Zhang, G., Mao, L., Zhao, Y., Xue, Y. y Ma, Y. (2010). Characterization of a thermostable xylanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*. 32, 1915-1920. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0372-z>
- Zhang, J., Cui, T. y Li, X. (2018). Screening and identification of an *Enterobacter ludwigii* strain expressing an active β-xylosidase. *Annals of Microbiology*. 68, 261-271. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1334-2>

ANEXOS

A continuación, se detalla las técnicas de preparación y reactivos utilizados para las diferentes metodologías experimentales.

ANEXO 1

Solución Salina estéril al 0.85%

Formulación	Marca	Concentración
NaCl	Meyer	0.85 g
Agua destilada	---	100 mL

Método de preparación

Adicionar 0.85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada y agitar hasta disolver completamente. Esterilizar a 121 °C (15 lb), durante 15 minutos. Dejar enfriar para su posterior uso.

Agar nutritivo suplementado con agar bacteriológico

Formulación	Marca	Gramos por litro
Agar		15.0
Extracto de carne	DIBICO	3.0
Peptona de gelatina		5.0
Agar bacteriológico	Becton Dickinson	15.0

Método de preparación

Rehidratar 23 g de agar nutritivo y 15 g de agar bacteriológico en un litro de agua destilada. Reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición para disolver por completo. Esterilizar a 121 °C (15 lb), durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45 °C. Vaciar en placas de Petri estériles y dejar solidificar o distribuir de acuerdo con las técnicas de análisis.

Tinción de Gram

Kit Gram Colorantes HYCEL de México, S.A. de C.V. No de catálogo 541. Se siguieron las indicaciones del fabricante.

Contenido del Kit

Violeta de genciana
Yodo de Gram
Safranina
Alcohol-cetona

Procedimiento

1. Fijar la muestra con calor en un portaobjetos limpio.
2. Cubrir el frotis con colorante violeta de genciana por 1 minuto.
3. Escurrir el colorante de violeta de genciana sin enjuagar, cubrir la muestra con solución de yodo Gram por 1 minuto.
4. Lavar con solución de alcohol-cetona para decolorar, dejar actuar de 5-15 segundos (frotis delgados) y 15-60 segundos (frotis gruesos).
5. Enjuagar con agua destilada para remover los restos del colorante.
6. Cubrir el frotis con colorante de safranina durante 1 minuto.
7. Lavar con agua destilada hasta aclarar.
8. Secar al aire y observar al microscopio con el objetivo 100X.

Interpretación de resultados

Bacterias Gram positivas: Células de color morado azul

Bacterias Gram negativas: Células de color rojo a rosa

Tinción de endosporas

La tinción de endosporas se realizó siguiendo el método de Schaeffer-Fulton, descrito en el “Endospore Stain Protocol” de la American Society for Microbiology de los autores Marise A. Hussey y Anne Zayaitz.

Reactivos

Solución de verde de malaquita

0.5 g de verde de malaquita
100 mL de agua destilada

Agente decolorante

Aqua

Safranina colorante

Solución stock (2.5% (p/vol) solución de alcohol

2.5 g de safranina O

100 mL de etanol al 95%

Solución de trabajo

10 mL de solución stock

90 mL de agua destilada

Procedimiento

1. Fijar la muestra con calor en un portaobjetos y cubrirla con un recuadro de papel filtro.
2. Colocar el portaobjetos con la muestra y el papel filtro sobre un recipiente con agua en ebullición.
3. Humedecer el papel filtro con verde de malaquita por 5 minutos sin dejar que el papel se seque en ningún momento.
4. Transcurrido los 5 minutos, retirar el papel filtro lavar con agua destilada.
5. Cubrir la muestra con safranina por 30 segundos y lavar con agua.
6. Observar la presencia de endosporas en un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

Interpretación de resultados.

Las endosporas se observan en microscopio óptico en objetivo 100X de color azul o azul turquesa y las células de color rojo.

Caldo Nutritivo

Formulación	Marca	Gramos por litro
Peptona de gelatina		5.0
Extracto de carne	BD Bioxon	3.0

Método de preparación

Suspender 8 g del polvo en un litro de agua purificada. Si es necesario calentar ligeramente hasta disolución. Distribuir y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Hidróxido de sodio 1M (NaOH)

Formulación	Marca	Concentración
Agua destilada	---	50 mL
NaOH	Meyer	2 g

Método de preparación

Pesar 2 g de NaOH, disolver en 30-40 mL de agua en un vaso de precipitados, una vez disuelto, transferir a un matraz aforado de 50 mL, enjuagar el vaso y completar el volumen del matraz aforado. Tapar y agitar suavemente hasta homogenizar.

Ácido clorhídrico 1 M (HCl)

Formulación	Marca	Volumen (mL)
Agua destilada	---	---
HCl	JT Baker	8.29

Método de preparación

Medir el volumen indicado de HCl y aforar con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL.

Caldo nutritivo con concentraciones de NaCl 2, 5 y 7%

Formulación	Marca	Gramos por litro
Caldo nutritivo	BD Bioxon	8.0
NaCl 2%		20
NaCl 5%	Meyer	50
NaCl 7%		70

Método de preparación

Suspender 8g de polvo en 1000 mL de agua destilada y mezclar hasta su completa disolución.

Adicionar la cantidad de NaCl indicada para concentración y mezclar hasta su completa disolución.

Agar de hierro y triple azúcar

Formulación	Marca	Gramos por litro
Agar - agar		13.0
Cloruro de sodio		5.0
Dextrosa		1.0
Lactosa		10.0
Peptona especial	DIBICO	20.0
Rojo fenol		0.025
Sacarosa		10.0
Sulfato de hierro y amonio		0.2
Tiosulfato de sodio		0.2

Método de preparación

Rehidratar 59.4 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada. Calentar agitando con frecuencia hasta punto de ebullición y completa disolución del medio. Distribuir en tubos (1/3 del volumen del tubo) y esterilizar a 121 °C (15 lb de presión), durante 15 minutos. Los tubos deben enfriarse en posición inclinada.

Interpretación de resultados

Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa: base y tubo inclinado color amarillo.

Ácido sulfídrico: precipitado negro en la base del tubo.

Fermentación de glucosa y producción de ácido sulfídrico: base negra, agar amarillo y agar inclinado rojo.

Fermentación de tres azúcares y producción de ácido sulfídrico: base negra y demás agar amarillo.

Producción de gas: Agar craquelado.

Medio SIM

Formulación	Marca	Gramos por litro
Tripteína		20.0
Peptona		6.1
Sulfato de hierro y amonio	Becton Dickinson	0.2
Tiosulfato de sodio		0.2
Agar		3.5

Método de preparación

Suspender 30 gramos del polvo en 1000 mL de agua destilada. Reposar 5 minutos, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Interpretación de resultados

Motilidad

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

Resultado negativo: crecimiento solo en la línea de siembra.

Producción de ácido sulfídrico

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

Resultado negativo: el medio permanece sin cambio de color.

Prueba de indol (agregar 3 ó 4 gotas de indol)

Resultado positivo: el reactivo se torna de color rojo

Resultado negativo: el color del reactivo permanece incoloro

Peróxido de hidrógeno al 30%

Formulación	Volumen de 100 mL
Agua destilada	70 mL
Peróxido de hidrógeno	30 mL

Método de preparación

Medir un volumen de 70 mL de agua destilada y 30 mL de peróxido de hidrógeno y mezclar.

Medio Skim Milk

Formulación	Marca	Concentración
Agua		< 5.0%
Ceniza		< 10%
Nitrógeno total	Fluka Analytical	~ 5.3%
Contenido de lípidos		< 1.5%
Azúcares reductores		~ 55%

(como lactosa
monohidratada)

Método de preparación

Pesar 100 g en 1000 mL. Mezclar el polvo hasta obtener una pasta homogénea con una pequeña cantidad de agua destilada y, a continuación, añadir gradualmente más agua destilada hasta obtener una mezcla al 10% p/v. Esto equivale a leche fresca, y puede esterilizar en autoclave durante 5 minutos a 121 °C. Hay que tener cuidado de no sobrecalentar durante la esterilización, ya que de lo contrario se produciría caramelización.

Interpretación de resultados

Formación de grumos en el medio

Agar almidón

Formulación	Marca	Gramos por litro
Extracto de carne	Becton Dickinson	3
Almidón soluble		10
Agar	Hycel	12

Método de preparación

El pH final del medio debe ser de 7.5 ± 0.2 a una temperatura de 25 °C.

Suspender los reactivos en un litro de agua destilada y mezclar en calentamiento evitando que llegue a ebullición (el almidón se puede hidrolizar). Esterilizar en autoclave a 121 °C o 15 psi durante 15 minutos.

Interpretación de resultados

Inundar la superficie del agar con solución de yodo Gram (Merck DGaA). La aparición de una zona clara alrededor del crecimiento bacteriana indica hidrólisis del almidón (+), siendo amarilla al principio y progresivamente se volverá transparente. La ausencia de una zona clara alrededor del crecimiento indica que el almidón no ha sido hidrolizado.

Hidrólisis de gelatina

Formulación	Marca	Gramos por litro
Peptona	Becton Dickinson	5
Extracto de carne	Becton Dickinson	3
Gelatina	Fermont	120

Método de preparación

El pH final del medio debe ser de 6.8 ± 0.2 , ajustando con HCl o NaOH 1M.

Calentar hasta disolver, repartir en tubos y esterilizar a 121 °C o 15 minutos, dejar enfriar y colocar en hielo por 15-30 minutos. Inocular los tubos por punción profunda e incubar a 25 °C por 7 días.

Interpretación de resultados

El resultado será positivo si se observa licuefacción de gelatina a los 3 días.

Si no hay licuefacción de gelatina, el resultado será negativo.

Además, antes de confirmar el resultado, los tubos se conservaron a una temperatura de 2-8 °C por 30 minutos para asegurarse de que la licuefacción fuera por acción de la gelatinasa

Buffer de fosfatos 100 mM, pH 7

Formulación	Marca	Concentración mM
Fosfato de sodio monobásico	J. T. Baker	100
Fosfato de sodio dibásico anhidro	Sigma-Aldrich	100
Agua destilada	---	---

Método de preparación

Preparar ambas soluciones por separado, pesar el fosfato de sodio monobásico y agitar hasta disolver en agua destilada, realizar el mismo procedimiento con el fosfato de sodio dibásico anhidro. El pH final debe ser de 7, se ajusta con las mismas sales.

Medio mineral

Formulación	Marca	Gramos por litro
Cloruro de sodio	Sigma-Aldrich	5.5
Sulfato de amonio	J. T. Baker	2.5
Cloruro de calcio	Química Meyer	0.1
Sulfato de magnesio	Sigma-Aldrich	0.1
Extracto de levadura	Sigma-Aldrich	0.2 %

Método de preparación

Mezclar todos los reactivos en Buffer de fosfatos 100 mM pH7 y calentar ligeramente (evitar ebullición), para disolver los componentes al máximo. Esterilizar en autoclave a 121 °C o 15 psi por 15 minutos.

Medio para hidrólisis de celulosa

Formulación	Marca	Concentración
Medio mineral	---	---
Buffer de fosfatos	---	100 mM
Agar	Sigma-Aldrich	2%
Carboximetil celulosa (CMC)	Sigma-Aldrich	1%
Rojo Congo	Sigma-Aldrich	1%
Cloruro de sodio	Sigma-Aldrich	1M

Método de preparación

Adicionar CMC (Sigma-Aldrich) y agar al medio mineral disuelto en Buffer de fosfatos 100 mM pH7, calentar ligeramente para disolver los componentes al máximo (evitar que llegue a ebullición). Esterilizar a 121 °C o 15 psi por 15 minutos, una vez estéril el medio, vaciar en cajas Petri estériles y dejar solidificar para su posterior inoculación.

Interpretación de resultados

Inundar las cajas inoculadas con Rojo Congo al 1% por 5 minutos, posteriormente enjuagar con NaCl al 1M.

La hidrólisis de celulosa positiva será visible por la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

Medio para hidrólisis de pectina

Formulación	Marca	Concentración
Medio mineral	---	---
Buffer de fosfatos	---	100 mM
Agar	Sigma-Aldrich	2%
Pectina sal potásica esterificada de cítricos	Sigma-Aldrich	1 %
Buffer Tris-HCl	BIO RAD	10 mM
Buffer de acetatos	---	50 mM
Rojo de rutenio	Sigma-Aldrich	0.05%

Método de preparación

Adicionar pectina sal potásica esterificada de cítricos y agar al medio mineral disuelto en Buffer de fosfatos 100 mM pH 7, calentar ligeramente para disolver al máximo los componentes (evitar que llegue a ebullición). Esterilizar a 121 °C o 15 psi por 15 minutos, una vez estéril el medio, vaciar en cajas Petri estériles, esperar a que solidifique para su posterior uso.

Interpretación de resultados

Realizar lavados a las cajas Petri previamente inoculadas con Buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.6, posteriormente con Buffer de Acetatos 50 mM pH 5.5 y con Rojo de Rutenio 0.05%. Debido a la complejidad del medio, el crecimiento bacteriano en las placas de agar se puede interpretar como microorganismos que posiblemente degraden pectina, también se puede formar un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

Buffer Tris-HCl, 10 mM pH 7.6

Formulación	Marca	Concentración
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	BIO-RAD	10 mM
Ácido clorhídrico	J. T. Baker	---

Método de preparación

Pesar el reactivo Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), adicionar a un recipiente con agua destilada y agitar hasta disolver. El pH final se ajusta con ácido clorhídrico.

Buffer de acetatos 50 mM, pH 5.5

Formulación	Marca	Concentración
Acetato de sodio	BIO-RAD	100 mM
Ácido acético	J. T. Baker	---

Método de preparación

Pesar el reactivo acetato de sodio, adicionar a un recipiente con agua destilada y agitar hasta disolver. El pH final se ajusta con ácido acético.

Medio para hidrólisis de xilano

Formulación	Marca	Concentración
Medio mineral	---	---
Buffer de fosfatos	---	100 mM
Agar	Sigma-Aldrich	2%
Xilano	BpH BIOHORETICS	1%
4-O-Metil-D-glucurono-D-xilano teñido con Azul	Sigma-Aldrich	1%
Brillante de Remazol R (RBB)		

Método de preparación

Disolver el medio mineral en Buffer de fosfatos 100 mM pH 7, además de adicionar agar, xilano y el colorante RBB, calentar ligeramente para asegurar la máxima disolución de los componentes. Esterilizar en autoclave a 121 °C o 15 psi por 15 minutos. Vaciar el medio en cajas Petri estériles y dejar solidificar para su posterior uso.

Interpretación de resultados

Transcurridas 24 horas, las cajas se pueden observar bajo una fuente de luz. Las bacterias con la capacidad de hidrolizar xilano se observará un halo transparente o blanquecino alrededor del crecimiento bacteriano.

ANEXO 2

A continuación, se muestran las secuencias parciales del gen 16S rRNA de cada cepa.

Cepa Z1-1

CTATACATGCAGTCGAGCGGACGATTCAAAAGCTTGGATCGTTAGCGGCCGA
CGGGTGAGTAACACGTGGCACACCTGCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCG
GTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGCCGATGGCTTGTAAAGGCCGCAAG
CTGTCGCTACAGGATGGGCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGCGAAGAAGGCCTCGGGTGTAAAGCTCTGTTG
TTAGGGAAAGAACAAAGTACCGCAGTCAGTGGCGGTACCTGACGGTACCTAACGAGGA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCGAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACCCTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAACAGGAGA
GCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTCTGGTGTAACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGAGGAAACACA
GGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGTA
TCCACCCCTTAGTGCTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGC
AAGAGTGAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTT
TAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGA
GATCGGGCGTCCCCCTCGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCGCAACGAGCGAACCCCTGACCTTAGT
TGCCAGCATTCAAGTGGCACTCTAACGGTACTGCCGCTAAAGTCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATG
GGCGGTACAAAGGGTGCAGAACCCCGCAGGGGGAGCCAATCCCCAAAAGCCGCTCT
CAGTTGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCCGGGTAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCC
ACGAGAGTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTACGGAGGCCAGCCG

Cepa Z1-2

TGCAGTCGAGCGGACCGACGGAGCTTGCTCCCTAGGTAGCGGGCGGACG
GGTAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCCGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTCAATCATAAAAGGTG
GCTTCAGCTACCACTGCAGATGGACCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAA
GGTTTCGGATCGTAAAACCTGTTAGGGAAAGAACAGTACCGTTCGAATA
GGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTCCGGAATTATTGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGCGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTAACCG
GGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGAGTCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTDTA
GAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG
GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTCTT
GACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGGGGCAGAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCACTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTGGGCACTCTAA
GGTGAUTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCCCTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGAACAAAGGGCA
GCGAAGCCGCGAGGCTAACCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCCGGGTGAATACGTTCCGGCCTGTACACACCCGGTCACACACCACG
AGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Cepa Z1-3

TATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTAGGTCAAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATA
AAAGGGGGGTTTAGCTACCCCTTACCGATGGACCCGCGCGCATTAACTAAT
TGGTGAGGGAACGGTCACCAAGGGGACCATGGTAACCCACCTGAGAGGG
TGGTCGGGCACCCTGGACTGGAACACGGGCCAAACTCCTACGGGAGGGAG
CAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTG
AGTGATGAAGGGTTGGATCGTAAAACCTGGTGGTAGGGAAAAACAAGTAC
CGTTCTAATAGGGCGGGACCTTGACGGTACCTAACCAAAAAGCCACGGCTAAC
TACCTGGCAGCAGCCCGGTAATACCTAACGGGCAAGCGGTGGCCCGAATTA
TTGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGGTTCTTAAGTCTGATGGAAAGCCCC
GGCTCAACCAGGGAGGGTATTGAAACTGGGAACCTGAGTGCAGAACAGGG
AAAGTGGAATCCCCTGTTAGCGGTTAGTGGCGTAGAGATGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAACGCG
GGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAGCAACCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGGGG
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCACAGAGCGCAACCGCAACCCCTGATCTTAGTGCAGCATTGAGTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGAAC
AAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCCGCGGTGAATACGTTCCGGCCTGTACACACCGCCCCGTC
ACACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGA

Cepa Z1-4

TGCAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTAGGTAGCAGCGGCGGACG
GGTAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTCAATTATAAAAGGGG
GCTTTAACTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAACTAATTGGTGAGG
GAACGGCTCACCAAGGGGACGATGGTAACCCACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAAACCCGGGCCAAACTCCTACGGGAGGGAGAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAA
GGGTTCCGGATCGTAAACTCTGGTGGTAGGGAAAAACAAGTACCGGTCGAAT
AGGGCGGGACCTTGACGGGACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACCTGGC
AGCAGCCGCGGTAACTAACCTAACGGGCAAGCGGTGGCCGGAATTATTGGCGT
AAAGCGCGCGCAGGGGTTCTTAAGTCTGATGGAAAAGCCCCGGCTAAC
CGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGGAGAAGAGGAGAGTGG
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGGGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGCGACTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCG
AACAGGATTAGATAACCTGGTAGTGCTGCAGCAAACGATGAGTGCTAAGTGT
AGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCTTAAGCACTCCGCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTATTGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAGGTCT
TGACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGGGCAGAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTGGGACTCTAA
GGTGAAGGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCCCTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGAACAAAGGGCA
GCGAAGCCCGAGGCTAACCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCTGTACACACCCGCCCCGTACACACCACG
AGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTA

Cepa Z1-5

CTATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTGCTCCCTAGGTCAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTC
CGGGAAACCAGGGGCTAATACCGGATGCTGATTGAACCGCATGGTCAATCAT
AAAAGGGGGCTTTAGCTACCACTACCGATGGACCCGCGCATTAACTAA
TTGGTGAGGGAACGGTCACCAAGGGGACCATGGTAACCCACCTGAAAGGG
TGATCGGGCACCCCTGGGACTGAAACACGGGCCAAACTCCTACGGGAGGGAG
CAGTAAGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTG
AGTGATGAAGGGTTGGATCGTAAAACCTGGTGGTAAGGAAAAACAAGTAC
CGGTCGAATAGGGCGGGACCTTGACGGTACCTAACCAAAAGCCACGGGTAA
CTACCTGGCAGCAGCCGCGTAATACGTAAGGGCAAGCGGTGGCCCGAATT
ATTGGCGGAAAGCGCGCGCAGGGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
CGGCTCCACCAGGGAGGGCATTGAAACTGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGA
GAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGTGCGACGAAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAGCAACCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGGGG
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCACGAGCGCAACCGCAACCCCTGATCTTAGTGTGCCAGCATTGAGTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGAAC
AAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCCGCGGTGAATACGTTCCGGCCTGTACACACCGCCCCGTC
ACACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTGGAGCCA

Cepa Z1-6

CTATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTGCTCCCTAGGTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTC
CGGGAAACCAGGGGCTAATACCGGATGCTGATTGAACCGCATGGTCCATCAT
AAAAGGGGGGTTTAGCTACCACTACCGATGGACCCGCGCATTAACTAA
TTGGTGAGGGAACGGTCACCAAGGGGACCATGGTAACCCACCTGAAAGGG
TGATCGGCCACCCCTGGACTGGAACACGGGCCAAACTCCTACGGGAGGGAG
CAGTAAGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTG
AGTGATGAAGGGTTGGATCGTAAAACCTGGTGGTAAGGAAAAACAAGTAC
CGGTCGAATAAGGCAGGACCTTGACAGTACCTAACCAAAAGCCACCGCTAAC
TACCTGGCAACAGCCCGGTAATACGTAAGTGGCAAGCGGTGGCCCGAATTAT
TGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCAGGGAGGGTCATTGAAACTGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGGAAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG
TGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGAAACGATGAGTGCT
AAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGGTTAACGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTGACATCCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGGGCA
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGAACGAGCGAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTTGGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGAAC
AAGGGCAGCGAACGCCCGAGGCTAACCCAATCTGTTCTCAGTTC
GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTGAGGCCAGCCG
C

Cepa Z1-7

TGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTAGGTAGCAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCGTAAAGACTGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATGCTGATTGAACCGCATGGTCAATCATAAAAGGT
GGCTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAACGGCTACCAAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGAT
GAAGGTTTCGGATCGTAAAACCTGTTAGGGAGAACAAAGTACCGTTCGA
ATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGCCGAATTATTGGCGT
AAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTAAC
GGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGGAGAGTGGAA
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCG
AACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
AGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCTTAAGCACTCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTCT
TGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGGGGCAGAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTGGGACTCTAA
GGTGAUTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCCCTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGAACAAAGGGCA
GCGAAGCCCGAGGCTAACCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCTGTACACACCCGCCGTACACACCACG
AGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT
AGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGCG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGTTGAGTGCTAGGTGTTGGGACTCCAATCCTCAGTGCCAGCTAACGCA
ATAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACCTCTTAGAGAGATAGAACGCTCT

CTTCGGAGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGTA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGAACCCCTGTCCTAGTTGCCAGCA
TTTAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTGACAAGACGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGATGGAACAACGGGCAGCCAACTCGCGAGAGTGCGCGAATCCCTAAAACC
ATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGTCTTGTACACA
CCGCCCCGTACACCGAGAGTTGCAACACCCGAAGTCGGTGA

Cepa Z2-1

TGCAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTTCCGGCGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAG
ACCTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTA
ACGGCCTACCAAGGCAGCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAACGATGAAGG
TTTCGGATCGAAAGTCTGTTAGGGAAAGAACCGCCGGATGACCTCCCG
GTCTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGCCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGGCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTAACCGTGGAGGG
CCACTTGAAACTGGGAAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGTGGCGAAGGCGGCT
CTCTGCCCTGTAAC TGACGCTGAGGCCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAGTGCTAGGTGTTGGGACT
CCAATCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCCTGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTAACCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATC
CCGCTGACCTCTTAGAGATAGAAGCTCTTCCGGAGCAGCGGTGACAGGTGG
TGCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCCTGCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGGGAGACT
GCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT
TATGTCTGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAACGGGCAGCCAAGT
CGCGAGAGTGCAGCTAACCGGAAATCCCTAAACCATTCTCAGTTGGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
GGTGAATACGTTCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTACACACCACGAGAGTTT
GCAACACCCGAAGTCGGTGA

Cepa Z2-2

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGAACCGCATGGTCAAACATAA
AAGGTGGCTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAGAACAGTACCGTT
CGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGCCGGATTATTGG
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC
AACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCTTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCG
CACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTCGGGGCAG
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTGGCA
CTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTAAA
TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAA
GGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCGG
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACA
CCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Cepa Z2-3

GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTGTGAACCGCATGGTCAAACATAAAAGGTGG
CTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGGCATTAGCTAGTTGGGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGGGATCGGCC
ACAATGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAG
GTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAAAACAAGTACCGTTGAATAG
GGGGTACCTTGACGGTACCTAACCAAAAAGCCACGGTTAACTACGTGCCAGC
AGCCCGGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTGCCGAATTATTGGCGTAA
GGGCTCGCAGGGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTAACCGG
GGAGGGTATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAAAAAAGGGAGAGGGGAAT
TCCCCCGGTAAACGGGGAAATGGTAAAAAATGGGAGGAACACCCAGGG
GGAAGGGGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTTACGCCGAAACGATGAGTGCTAAG
TGTTAGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAG
GTCTTGACATCCTTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTCGGGGGCAGA
GTGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGAACCCCTGATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCC
TTAAGGTGACTGCCGGTACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACCCGTGCTACAATGGACAGAACAA
GGCAGCGAAACCGCGAGGTTAACCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCGG
ATCGCAGTTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACCCGCCGTACCC
CCCCGAGAGTTGTAACCCCCGAAGTCGGTGAGGT

Cepa Z2-4

CTATACATGCAGTCGAGCGGACCTCTCGGAGGTTAGCGGCCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCGGGAAACCGAACGC
TAATACCGGATATGTTTGAAACCGCATGGTCAAAATGGAAAGATGGTTCGGC
TATCACTTACAGATGGACCCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GAUTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCGG
CAATGGCGAAAGCCTGACCGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGGCTTCG
GGTCGTAACACTCTGTTGTCAGGGAAAGAACAAAGTACGAGAGTAACGCTCGTA
CCTTGACGGTACCTGATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCG
CAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTAACCGTGGAGGGTC
ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGCGGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTT
TGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCC
GCCCTTAGTGTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTAATCGAACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCT
GACAACCCTAGAGATAAGGCTTCCCTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTGTCAGCTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGC
GCAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTGGGACTCTAAGGTGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGTTGCGAGACCGC
GAGGTGGAGCGAATCCCATAAAATTGTTCTCAGTTGGATTGCAGGCTGCAACT
CGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCCGTACACACCACGAGAGTTGAA
CACCCGAAGTCGG

Cepa Z2-5

ATACATGCAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTAGGTAGCAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAA
GGTGGCTTCAGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTG
ATGAAGGTTTCGGATCGTAAAACCTGTGTTAGGGAAAGAACAGTACCGTT
GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGGGCAAGGGGTTGTCCCGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCT
CAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAACAGAGGAGA
GGGGAATTCCCCGGGTAGCGGGGGAAATCGTAAAGATGGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCAC
TCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAACACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAAGGGCTCCCTCGGGG
GCAGAGTGACAGGTGGTCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGG
GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGAA
CAAAGGGCAGCGAACGCCCGAGGCTAACGCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGT
TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCCGT
CACACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTGGA

Cepa Z2-6

GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGAACCGCATGGTCAAACATAAAAGGTGG
CTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAATGATGAAGG
TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAAGAACAAAGTACCGTTCGAATAGG
GCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAAG
GGCTCGCAGGCAGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGG
GAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGGAGAGTGGAAATT
CACGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
CGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAG
GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAACTCCGCCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTAACCGAACGCGAACCTTACCAAGGTCTT
ACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTCGGGGGCAGAGTGACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTGGGGACTCTAAG
GTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCA
GCGAAACCGCGAGGTTAACCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCCGGGTGAATACGTTCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACACCACG
AGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Cepa Z2-7

CTAATACATGCAAGTCGAGCGGAGTTGATGGAGTGCTGCACTCCTGATGCTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAATACGTAGGTAACCTGCCCTAACGACCGGGATAA
CTCACGGAAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTCCCTCGCATGAGGGAAT
CGGGAAAGGCGGAGCAATCTGCCGCTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAAGAACGCT
ATGGAGAGTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTGCCGGAAAT
TATTGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTATGTAAGTCTGGTGTAAACCCG
GGGCTCAACTCCGGGTCGCATCGGAAACTGTGTGACTTGAGTGCAGAAGAGG
AAAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATG
CTAGGTGTTAGGGGTTCGATACCCTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAAGCATT
CCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGAC
CCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAACCGAAGCAACCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTACATCCCTCTGACCGTCCTAGAGATAAGGGCTCCCTCGGGC
AGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCACGAGCGCAACCCCTAACCTAGTTAGTGCAGCATTGAGTTGGG
CACTCTAGAGTGAUTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACCGTACTACAATGGCTGGTACA
ACGGGAAGCGAAGCCCGAGGGCGGAGCGAATCCTAAAAAGCCAGTCTCAGTT
CGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCCGGGTAATACGTTCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCACGAGAGTTACAACACCCGAAGTC

Cepa Z2-8

CATGCAAGTCGAGCGGAGTTGATGGAGTGCTGCACTCCTGATGCTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATACGTAGGTAACCTGCCCTAACGACCGGGATAACTCACG
GAAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTCCCTCGCATGAGGGATCGGGAA
AGGTGGAGCAATCTGCCGCTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAAGAACGCTATGGAGA
GTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGCCATTATTGGG
CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTATGTAAGTCTGGTGTAAACCCGGGCTC
AACTCCGGGTCGCATCGGAAACTGTGTGACTTGAGTGCAGAACAGAGGAAAGTG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACTCTGGGCTGTAAGTGACGCTGAGGCGCGAACAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCCCGTAAACGATGAATGTTAGG
TGTAGGGGGTTCGATACCCTGGTAGTCCCCCGTAAACGATGAATGTTAGG
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGC
ACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAACACCTTACCAAG
GTCTTGACATCCCTCTGACCGCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGGCAGAG
GTGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCCGCAACGAGCGAACCCCTAACCTTAACTTAGTGCACCATTGAGTTGGGCAC
TCTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACACGTACTACAATGGCTGGTACAAC
GGGAAGCGAAGCCCGAGGCGGAGCGAACCTAAAAAGCCAGTCTCAGTCAGTC
GATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGATTGCTAGTAATCGCGGA
TCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTACA
CCACGAGAGTTACAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCGCAAGAGGCCAGCC
GCC

Cepa Z2-9

TACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTAGGTAGCAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTCAATTATAAAA
GGTGGCTTCAGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTG
ATGAAGGTTTCGGATCGTAAAACCTGTGTTAGGGAGAACAGTACCGTTC
GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGCCGGATTATTGGG
CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA
ACCAGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCCGTGGG
GAAGCGAACCAAGGAGGATTAGGATACCCTGGTAGTCCACGCCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCAC
TCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
CCCGCACAAGCGGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAAC
TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTCCCTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTTG
GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGA
ACAAAGGGCAGCGAAGCCCGAGGCTAACCCAATCCCACAAATCTGTTCTCA
GTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCACCC
GTCACACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTGGAA

Cepa Z2-10

TATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGTAAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGAACCGCATGGTCAAACATAAAA
GGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAGAACAAAGTACCGTTCG
AATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCCGGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA
CCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGGAGAGTGG
AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAGG
TCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTCGGGGGCAGA
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGAACCCCTGATCTTAGTGCCAGCATTGAGTGGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAA
GGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCGG
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACA
CCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT

Cepa Z2-11

TGCAAGTCAACGGTCCCTTCGGAGGGCAGTGGCGCACGGGTGAGTAACGC
GTAACTGACCTGCCCAAGTCCTGAATAACGCCCGAAAGGGGCGCTAATGT
GGGATGTGCAGTGCCGCTGGCGGCAGTGCAAAGGCGAGAGCTGCTTGGG
GATGGGGTTGCGTTCCATCAGCTGGTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCG
ACGACGGATAGCCGGCCTGAGAGGGTGGCCGGCACAGGGGCACTGAGACA
CGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCCCAATGGCGC
AAGCCTGAGGGAGCGACGCCCGTGAGGGATGAAGGTCTCGGATTGTAAC
CTCTGAATCAGGGACGAAAGACGCAGAAGCGGGATGACGGTACCTGAGTAAC
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGGAGGGTGCAAGC
GTTACCCGGAATCACTGGCGTAAAGGGCGTAGGGCTAGGACTGGATCTG
GTTTAAAGCCCAGGGCTCAACCCGGATGTGGACTGGATACTGGCATGCTAG
ACCTCTGGAGAGGGAACGGATTCTGGTAGCGGTGGAAATGCGTAGATAC
CAGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTTCTGGACAGAAAGGTGACGCTG
AGGCGCGAAAAGTGGCAAGCGAACCGGATTAGATAACCGGGTAGTCCAC
ACCCTAAACGATGCACGTTGGCTGATCGCAGGATGCTGTGGTCGGCGAACCG
AACGCGAGAAACGTGCCGCCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAAGGTCTGACATCCAAGACCCCCGGAAAAGCG
GGGGGTGCCCTCGGGGAGCTGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCACGAGCGAACCGCTGCCT
AGTTGCCAGCAGTCGGCTGGCACTCTGGAGGGACTGCCGGTAAAGCCGG
AGGAAGGCGGGGATGACGTCTAGTCAGCATGGCCTTACGACCTGGCGACA
CACGTGCTACAATGACCAGAACACGCGCTGCAAGCTCGAGAGCAAGCCA
ATCGCTGAAAAGTGGCTCCAGTCAGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGGTCAGCATAACCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTAGATGGCAGCT

ANEXO 3

Técnica de azúcares reductores (Método Miller, 1959)

Procedimiento

1. Se adicionaron 980 µL de buffer de fosfatos con 0.2% de xilano y 20 µL de extracto enzimático en tubos de ensaye.
2. Los tubos se incubaron en baño María por 10 minutos a 50 °C.
3. Posteriormente, se adicionó 1 mL de reactivo DNS.
4. Inmediatamente los tubos se trasladaron a un baño María en ebullición por 5 minutos.
5. Transcurrido este tiempo, los tubos se retiraron del baño María en ebullición y se les adicionó 1 mL de agua desionizada y se agitaron manualmente.
6. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Multiskan Sky High, Singapur) a 540 nm.
7. Se elaboró una curva estándar con diferentes rangos de concentración de 5-30 µmol/mL con D-Xilosa (BD Difco).

Preparación del reactivo DNS

Los reactivos se adicionan en el orden de aparición y se disuelven en agua desionizada.

Formulación	Marca	Concentración (g/L)
Hidróxido de sodio	J.T. Baker	10
Fenol		2
Sulfito de sodio		0.500
Tartrato de sodio	J.T. Baker	200
Ácido 3,5-dinitro-salicílico	Sigma-Aldrich	10