

MICROBIOLOGIA DE AMBIENTES ESPECIALES EN EL  
SISTEMA HIDROTHERMAL DEL VOLCAN NEVADO DEL RUIZ

CARLOS ARTURO GRANADA TORRES

UNIVERSIDAD CATOLICA DE MANIZALES  
FACULTAD DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO  
MANIZALES

1995

MICROBIOLOGIA DE AMBIENTES ESPECIALES EN EL  
SISTEMA HIDROTHERMAL DEL VOLCAN NEVADO DEL RUIZ

CARLOS ARTURO GRANADA TORRES

UNIVERSIDAD CATOLICA DE MANIZALES  
FACULTAD DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO  
MANIZALES

1994



NOTA DE ACEPTACION

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Presidente

\_\_\_\_\_

Jurado

\_\_\_\_\_

Jurado

\_\_\_\_\_

Jurado

MANIZALES, NOVIEMBRE, 1994

## DEDICATORIA

El presente Trabajo de Grado lo dedico y agradezco a Dios por la fortaleza que me brindó a través de mi carrera.

A mis padres por confiar en mí. Sin ellos no hubiese logrado los triunfos que hoy obtengo.

A todos aquellos que existen en mi afecto: familiares y amigos.

Más allá del tiempo, el dolor y la alegría. Por los motivos que ellos conocen.

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Observatorio Vulcanológico Nacional. Ingeominas.  
Manizales.

César Augusto Carvajal. Geólogo Director Observatorio  
Vulcanológico Nacional. Ingeominas.

Ricardo Méndez. Geólogo. Jefe de Vulcanología y  
sismología. Observatorio Vulcanológico Nacional.  
"Ingeominas"

Claudia Alfaro V. Química. Observatorio Vulcanológico.  
Nacional. Ingeominas.

Luis Evelio Aguirre. Técnico. Observatorio  
Vulcanológico Nacional. "Ingeominas"

Universidad Católica de Manizales. Facultad de  
Bacteriología.

Martha Eva Buriticá de Monsalve. Bacterióloga y  
Laboratorista Clínica. Magistra en Desarrollo  
Educativo y Social. Asesora Metodológica. Facultad de  
Bacteriología. Universidad Católica de Manizales.

Jorge Enrique Pérez. Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Especialista en Inmunología. Docente Universidad Católica de Manizales.

Jairo Londoño Arango. Médico y Cirujano. Docente Universidad Católica de Manizales.

Alvaro Mauricio Flórez. Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Docente Universidad Autónoma. Facultad de Odontología. A.

Martha Gallego de García. Bacterióloga y Laboratorista Clínica Magistra en Desarrollo Educativo y Social. Decana de la Facultad de Bacteriología de la Universidad Católica de Manizales.

María Teresa Salgado. Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Especialista en Microbiología de Alimentos. Docente Universidad Católica. Facultad de Nutrición y Dietética.

Hermana Mabel Jaramillo Restrepo. Rectora Universidad Católica de Manizales.

Beatriz Giraldo Ospina. Jefe Central de Materiales Magistra en Microbiología Docente en Inmunología Universidad Católica de Manizales.

Aldemar Giraldo Hoyos. Médico Veterinario Departamento de Idiomas Universidad Católica.

Henry Toro López. Ingeniero Agrónomo Facultad de Agronomía Universidad de Caldas.

Guillermo Arias Ostos. Ingeniero Químico Docente  
Bioestadística Universidad Católica de Manizales.



## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
1. EL PROBLEMA	4
1.1 DESCRIPCION DEL AREA PROBLEMÁTICA	4
1.2 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	6
1.3 ANTECEDENTES	6
2. MARCO CONCEPTUAL	12
2.1 OBJETIVOS	12
2.1.1 Objetivo General	12
2.1.2 Objetivo específico	12
2.2 MARCO TEORICO	12
2.2.1 Sistema Hidrotermal del Ruiz	12
2.2.1.1. Macizo Volcánico del Ruiz.	12
2.2.1.2 Generalidades del Complejo Ruiz Tolima	13
2.2.1.3 Aguas Termales	15
2.2.1.3.1 Clasificación de los diferentes tipos de Agua Termal	16
2.2.1.3.1.1 Aguas alcalino-cloradas.	16



2.2.1.3.1.2	Aguas bicarbonato-sulfatadas.	16
2.2.1.3.1.3	Aguas ácido-sulfato-cloradas	17
2.2.1.3.1.4	Aguas ácido-sulfatadas.	17
2.2.1.3.2	Fuentes de interés para el estudio de microorganismos:	17
2.2.1.3.2.1	Zona Termal Botero Londoño	18
2.2.1.3.2.2	Fuente Termal Hotel Termales.	18
2.2.1.3.2.3	Fuente Termal Aguas calientes	19
2.2.2	Características de ambientes especiales	19
2.2.2.1	Temperatura	20
2.2.2.1.1	Clasificación.	20
2.2.2.1.1.1	Psicrófilos	20
2.2.2.1.1.2	Mesófilos	20
2.2.2.1.1.3	Termófilos	21
2.2.2.2	Acidez y pH	21
2.2.2.3	Actividad del agua.	22
2.2.2.4	Presión	23
2.2.2.5	Oxígeno	24
2.2.6.1	Autótrofos	26
2.2.2.6.2	Heterótrofos	26
2.2.3	Flora microbiana de ambientes especiales	26
2.2.4	Vida microbiana en ambientes de alta temperatura	29
2.2.5	Organización estructural de los microorganismos termófilos	32
2.2.5.1	Proteínas y Acidos Nucleicos	34
2.2.6	Flora microbiana de ambientes especiales	36

2.2.6.1	Generalidades	36
2.2.6.2	Cianobacterias	37
2.2.6.2.1	Características generales	37
2.2.6.2.2	Clasificación de las Cianobacterias	38
2.2.6.2.3	Morfología	38
2.2.6.3	Algas	38
2.2.6.3.1	Características generales	38
2.2.6.3.2	Clasificación de las Algas	39
2.2.6.3.3	Morfología	39
2.2.6.3.4	Motilidad	40
2.2.6.3.5	Estructura de la pared celular	40
2.2.6.3.6	Algas verdes (Clorofita)	41
2.2.6.3.7	Diatomeas	41
2.2.6.4	Arqueobacterias	42
2.2.6.4.1	Arqueobacterias extremadamente Termófilas	45
2.2.6.4.1.1	Temperatura y límites de la existencia microbiana	48
2.2.6.5	Sulfolobus.	49
2.2.6.5.2	Características morfofisiológicas	50
2.2.6.5.3	Distribución	50
2.2.6.5.4	Simbiosis	50
2.2.6.5.5	Estructura bacteriana.	51
2.2.6.5.5.1	Membrana Celular	51
2.2.6.5.6	Versatilidad metabólica	51
2.2.6.5.7	Oxidación Litotrófica del Hierro	53
2.2.6.5.8	Fotomicrografía	53



2.2.6.5.9 Micrografía Electrónica	53
2.2.6.5.10 Conversión Microbiana del Elemento Azufre en el medio	54
2.2.6.6 Microbiología	55
2.2.6.6.1 Aislamiento y cultivo	55
2.2.6.6.2 Rango de temperatura y PH	55
2.2.7 Participación microbiana en el ciclo global del azufre.	56
2.2.8 El microorganismo termófilo y sus aplicaciones industriales	60
2.2.1 Generalidades	60
2.2.8.2 Lixiviación	65
2.3 VARIABLES	66
2.3.1 Temperatura	66
3. METODOLOGIA	68
3.1 POBLACION	68
3.2 MUESTRA	68
3.3 MATERIALES Y EQUIPOS	69
3.3.1 Material de Vidrio	69
3.3.2 Otros materiales	69
3.3.3 Equipos.	70
3.3.4 Reactivos	70
3.4 METODOLOGIA- PROCEDIMIENTO	71
3.4.1 Preparación de los medios de cultivo	71
3.4.1.1 Medio de enriquecimiento	71
3.4.1.2 Medio Selectivo	72
3.4.2 Preparación de la solución reactiva para la técnica de fluorescencia	73

3.4.2.1	Clasificación y precauciones	73
3.4.2.2	Colorante Naranja de Acridina	74
3.4.2.3	Solución Isotónica de Cloruro de Sodio (Na)	75
3.4.3	Descripción de la técnica	75
3.4.4	Procedimiento para la toma de muestras	76
3.4.5	Muestreo	76
3.4.5.1	Zona Termal Botero Londoño	77
3.4.5.2	Fuente Termal Hoteles Termales	77
3.4.5.3	Fuente Termal Aguas Calientes	77
3.4.6	Inoculación	78
3.4.6.1	Fuente Termal Aguas Calientes	79
3.4.6.2	Fuente Termal Hotel Termales	79
3.4.6.3	Zona Termal Botero Londoño	80
3.4.7	Incubación	80
4.	RECURSOS	82
4.1	RECURSOS HUMANOS	82
4.1.1	Investigador	82
4.1.2	Asesores	82
4.1.3	Asesor Metodológico	82
4.2	RECURSOS FISICOS	83
4.1.2	Planta física	83
4.1.2	Transporte	83
4.3	RECURSOS FINANCIEROS	83
5.	RESULTADOS	84
5.1	ANALISIS DE RESULTADOS	84



5.1.1 Fuente Termal Hotel Termales	84
5.1.2 Fuente Termal Aguas calientes	85
4.1.3 Fuente Termal Botero Londoño	86
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	92
CITAS BIBLIOGRAFICAS	95
BIBLIOGRAFIA	99
ANEXOS	

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Análisis químico de aguas termales de interés microbiológico.
- Tabla 2. Temperatura de crecimiento de algunas especies termófilas de microorganismos.
- Tabla 3. Límites inferiores de pH para el crecimiento de diferentes grupos de organismos.
- Tabla 4. Límites de temperaturas superiores para el desarrollo de organismos vivos.
- Tabla 5. Propiedades de arqueobacterias extremadamente termófilas.
- Tabla 6. Generación de energía de las arqueobacterias extremadamente termófilas.
- Tabla 7. Composición química Zona-termal Botero Londoño.
- Tabla 8. Composición química fuente termal Hotel Termales
- Tabla 9. Composición química fuente termal Aguas Calientes



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotografía: Zona Termal Botero Londoño
- Figura 2. Fotografía: Fuente Termal Hotel Termales
- Figura 3. Fotografía: Fuente Termal Aguas Calientes.
- Figura 4. Mapa: La ubicación de las fuentes de muestreo microbiológico.
- Figura 5. Composición entre la estructura de una membrana celular convencional y la de una arqueobacteria.
- Figura 6. Esquema de evolución propuesto por N.C. Moese
- Figura 7. Ciclo del azufre
- Figura 8. Micrografía de fluorescencia Muestra Fuente Termal Hotel Termales.
- Figura 9. Micrografía de fluorescencia Muestra Fuente Termal Aguas Calientes.

## RESUMEN

Se realizó un estudio microbiológico en tres (3) fuentes hidrotermales pertenecientes al sistema hidrotermal del Ruiz. Estas fuentes presentan características diferentes de acuerdo con su composición química, pH y temperatura.

Las fuentes de Botero Londoño, Hotel Termal y Aguas Calientes fueron seleccionadas con el fin de aislar mediante medios de cultivo especiales y técnicas de fluorescencia bacterias termófilas del género *sulfolobus*.

En las dos (2) últimas fuentes mencionadas se determinó la existencia de bacterias del género *sulfolobos* a temperaturas entre 57 y 75°C; en la fuente Termal Botero Londoño se encontraron microorganismos termófilos diferentes del género *sulfolobus*, puesto que no tomaron la coloración de fluorescencia específica para estos, ni se desarrollaron en los medios de cultivo especiales para el aislamiento de este género de bacterias.





## INTRODUCCION

El que la vida tal como la concebimos sea exclusiva del planeta tierra sigue siendo una pregunta sin respuesta.

Entre todos los seres vivos, los microorganismos son los que más facultades adaptativas tienen a los diferentes medios cambiantes, incluyendo aquellos tan adversos que ni los organismos pluricelulares superiores, ni el mismo hombre podría sobrevivir. La mayoría de las funciones que desarrollan estos microorganismos son esenciales para la vida, de manera que sin ellos el mantenimiento de ésta en el planeta sería imposible.(1)

La iniciativa de realizar un estudio sobre microorganismos que por sus características se consideran de ambientes especiales, surge del cuestionamiento por saber qué formas de vida se encuentran en ambientes que aparentemente dan la impresión de ser inhóspitos.

Uno de los temas científicos más apasionantes de los últimos tiempos es, tal vez, el que plantea la existencia de alguna forma de vida en el Planeta Marte.

Investigaciones realizadas en los valles fríos de la Antártida han revelado la existencia de microorganismos en forma de un recubrimiento de algas que viven a unos cinco centímetros por debajo de la superficie de un lago congelado soportando así temperaturas de hasta  $60^{\circ}\text{C}$  bajo cero y vientos de más de 60 Km. por hora allí, en el ambiente más hostil donde la vida no debería existir, esta se adapta a cada roca suelta. (2). Condiciones climáticas como las de la Antártida, en donde se registran las temperaturas más bajas de la tierra, son similares a las del Planeta Marte por lo que es posible encontrar huellas de vida análogas en este planeta a las que se han descubierto recientemente en las condiciones más extremas que se dan en la tierra.

¿De qué múltiples y caprichosas formas podría la vida manifestarse en otros lugares del cosmos? un virus sería suficiente, vibraría la biología del provincialismo, nos mostraría que más es posible. (3)

Microorganismos termófilos aislados de diferentes hábitats naturales, como fosas submarinas y manantiales



calientes han aportado valiosos elementos al desarrollo de ciencias como la Biología Molecular, la Biotecnología e inclusive el esclarecimiento acerca de las primeras formas de vida primitiva que poblaron la tierra. El presente estudio pretende contribuir al desarrollo científico, en un mundo microbiano aún sin descubrir en su totalidad, y, de otra parte, fomentar el espíritu innovador para así alcanzar la total comprensión de nuestro entorno.

## 1. EL PROBLEMA

### 1.1 DESCRIPCION DEL AREA PROBLEMÁTICA

Parque Natural Nacional los Nevados (PNNN): La Ley segunda de 1955 reservó los nevados de Colombia y sus alrededores como Parques Naturales Nacionales; en marzo de 1957 el Inderena fijó los linderos del Parque Nacional Natural los Nevados, por acuerdo número 15, aprobado por resolución ejecutiva número 148 del 30 de Abril de 1979, emanado de la presidencia de la República.

El Parque Nacional Natural los Nevados abarca aproximadamente una superficie de 54000 hectáreas y se encuentra en jurisdicción de los departamentos de Quindío, Tolima, Risaralda y Caldas; en esta región es posible encontrar alturas que van desde los 2600 hasta los 5300 m. sobre el nivel del mar; el territorio de este parque está asentado sobre cenizas volcánicas y en determinadas partes es fácil apreciar claramente suelos

fósiles y capas de lava, vestigios de anteriores y sucesivas erupciones.

El paisaje que enmarca esta zona es nevado y montañoso, con una gran riqueza hidrográfica y reservas de flora y fauna. El Parque Nacional Natural los Nevados (PNNN) abarca un gran macizo de nevados y volcanes. Sobre las faldas de la Cordillera Central, la presencia de fumarolas (escapes de gases volcánicos), al igual que numerosas fuentes termales, han sido la evidencia de la actividad volcánica desarrollada en esta zona.

En el Parque Nacional Natural los Nevados se destacan seis sitios geográficos y geológicos que son: los Nevados del Ruiz, del Cisne, de Santa Isabel, Quindío, Tolima y el Paramillo de Santa Rosa de Cabal, de los cuales el Ruiz, Santa Isabel y Tolima, permanecen con nieve todo el año, lo que los cataloga como glaciares de montaña.(4).

Dentro de esta extensa y característica región se encuentra el sistema hidrotermal del Macizo Volcánico del Ruiz en el cual se han identificado al menos 16 zonas termales.

Estas fuentes presentan diferentes características de acuerdo con su composición química, pH, y temperatura.(5)



## 1.2 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Desde hace varios años el Observatorio Vulcanológico de Colombia (INGEOMINAS) adelanta estudios geoquímicos y fisicoquímicos de las fuentes hidrotermales del Nevado del Ruiz con el fin de relacionarlas con la actividad volcánica.

Actualmente no se conocen estudios que permitan describir y determinar la biología y específicamente la microbiología de estos ambientes especiales.

Por lo tanto, el siguiente estudio se considera como un proyecto innovador que pretendió definir conceptos sobre los microambientes y la simbiosis microbiana, propia de la actividad volcánica del Nevado del Ruiz, relacionadas con las fuentes hidrotermales.

## 1.3 ANTECEDENTES

El estudio de la microbiología de ambientes especiales en el sistema hidrotermal del Ruiz surge a partir del impacto que desató entre la opinión pública y la comunidad científica, la activación y posterior erupción del cráter Arenas del Volcán Nevado del Ruiz.

Esto motivó a los estudiantes Sandra Marín Escobar y Carlos Arturo Granada Torres de la Facultad de Bacteriología (Entre los que se destacó el estudiante Carlos Arturo Granada Torres, gestor de la propuesta de investigación y del patrocinio por parte del Observatorio Vulcanológico de Colombia Ingeominas) a investigar qué tipo de microorganismos podrían encontrarse allí.

Inicialmente el interés de los estudiantes anteriormente mencionados se centró en las diferentes formas de vida que allí se podrían encontrar, así como las transformaciones químicas en que intervienen estos microorganismos, la distribución y los medios que habitan.

Para la realización de este trabajo de investigación inicialmente se buscó el patrocinio del Observatorio Vulcanológico de Colombia (INGEOMINAS), sede Manizales, institución a la cual se presentó la propuesta con el fin de buscar un patrocinio que cubriera los costos de transporte hasta los diferentes sitios escogidos para el muestreo en el Parque Natural Nacional Los Nevados.

Este patrocinio fue aprobado por esta institución.

En un principio la propuesta del estudio abarcaba el

reconocimiento de la flora microbiana en el Parque Natural Nacional los Nevados, bajo el nombre de: Microbiología de ambientes especiales en el Parque Natural Nacional los Nevados. El estudio hacía énfasis en la descripción y el reconocimiento de la microbiología del Parque los Nevados, así como también la posibilidad de usar estos microorganismos a nivel industrial. Es de destacar, que este trabajo fue realizado en ese entonces y los resultados fueron presentados a la par con otros trabajos de investigación el Día del Bacteriólogo. Esta exposición anual se realiza en la Universidad Católica con el fin de conmemorar el día del Bacteriólogo y, a la vez, seleccionar los mejores trabajos de investigación para ser sustentados.

El trabajo "Microbiología de Ambientes Especiales en el Parque Natural Nacional Los Nevados" recibió el primer puesto en la premiación a los mejores trabajos expuestos el Día del Bacteriólogo y recibió una mención de honor al mérito investigativo, al estudiante Carlos Arturo Granada Torres autor del proyecto. Esta distinción motivó a presentar el proyecto como Trabajo de Grado, para lo cual se elaboró un anteproyecto el cual fue presentado al Núcleo de Investigaciones de la Facultad de Bacteriología. El anteproyecto fue aprobado y en el se requirió, por parte del Núcleo de Investigaciones, la



precisión, por parte de los autores, acerca de los objetivos presentados ya que eran muy extensos y no eran lo suficientemente claros.

Tomando como base esta sugerencia se decidió concretar la investigación, tomando solo una parte de la diversa y extensa flora microbiana como objeto de estudio: los termófilos. Fue así como se precisaron objetivos y al proyecto de le denominó Microbiología de Ambientes Especiales en el Sistema Hidrotermal del Volcán Nevado del Ruiz. En esta etapa de trabajo entró a formar parte del Proyecto el estudiante James Rodolfo Quebrada Lozano; es de destacar que antes del ingreso de este estudiante, este proyecto ya había representado a la Universidad en diferentes Congresos y Eventos a nivel Regional y Nacional, tales como:

- Día del Bacteriólogo.

Facultad de Bacteriología. Universidad Católica de Manizales. Abril de 1989

- Día del Bacteriólogo. Facultad de Bacteriología. Universidad Católica de Manizales. Abril de 1990

- Día del Científico. Universidad Católica de Manizales. Septiembre 1992

- Tercer Congreso Nacional de Ciencias Biológicas y afines. Universidad del Magdalena. 23 - 27 de Agosto, 1989.

Además, había sido galardonado con la Mención de Honor al Mérito Investigativo por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica de Manizales el Día del Bacteriólogo, Abril de 1989.

Este trabajo tiene como propósito la investigación microbiana en varias fuentes termales seleccionadas, las cuales pertenecen al sistema hidrotermal del Ruíz. Las fuentes encargadas tienen características de pH y temperatura determinadas, esto hace que se constituyan en ambientes especiales, para la sobrevivencia de los microorganismos que allí se pudieran encontrar.

La realización del estudio se basa en una serie de salidas de campo a las fuentes termales de interés, las cuales fueron determinadas por el Observatorio Vulcanológico de Colombia (INGEOMINAS) que tuvieron por objeto el muestreo y la determinación de la flora microbiana existente en estos ambientes especiales.

Los estudios realizados en diferentes habitats geotermales a nivel mundial han demostrado la existencia de una variedad de géneros microbianos que habitan en estos ambientes.

Estas fuentes hidrotermales tienen composiciones químicas



y características similares a las fuentes hidrotermales del Ruiz, asociadas también con la actividad volcánica; por tanto, es de suponer la existencia de flora microbiana en estas fuentes con características similares a las descritas por otros autores en investigaciones realizadas en ambientes termales.

## 2. MARCO CONCEPTUAL

### 2.1 OBJETIVOS

#### 2.1.1 Objetivo General

Determinar la flora microbiana presente en las fuentes hidrotermales del volcan Nevado del Ruiz.

#### 2.1.2 Objetivo especifico

Aislar mediante medios de cultivo especiales y técnicas de fluorescencia bacterias del género *sulfolobus* en las fuentes seleccionadas.

### 2.2 MARCO TEORICO

#### 2.2.1 Sistema Hidrotermal del Ruiz

2.2.1.1. Macizo Volcánico del Ruiz: este Macizo se encuentra constituido por un eje de aparatos volcánicos que constituyen parte de la Cordillera Central de Colombia. El complejo volcánico incluye los picos: Cerro Bravo (4.000 m s.n.m.); Domos del Alto del Plato, Alto de Santana y Alto de la Laguna (con una altura máxima de

3950 m.s.n.m); Nevado del Ruiz (5.311 m.s.n.m); Morro Negro y Nevado del Cisne (4.700 m.s.n.m); Nevado de Santa Isabel (5.100 m.s.n.m); Cerro España (4.550 m.s.n.m); Nevado del Quindío (5110 m.s.n.m); Nevado del Tolima (5215 m.s.n.m); Volcán Machín (2.700 m.s.n.m).

La ubicación geográfica está definida por un rectángulo de 72 km. de largo en dirección N-S y 27.5 km. de ancho en dirección E-W, con las siguientes Coordenadas: Al Norte 5° 8' de latitud Norte, al Oriente 75° 15' de longitud Oeste, al Sur 4°28' de latitud Norte y al Occidente 75° 30' de longitud Oeste, cubriendo un área total de 1980 Km<sup>2</sup>.

En los alrededores del macizo volcánico brotan manifestaciones termales superficiales en forma de manantiales, fumarolas, suelos calientes, y emanaciones de vapor.

Políticamente el Macizo pertenece a los Departamentos de Quindío, Risaralda, Tolima y Caldas (6)

**2.2.1.2 Generalidades del Complejo Ruiz Tolima:** el Volcán Nevado del Ruiz es un estrato Volcán andecítico que se encuentra localizado a 150 Km al Noreste de Bogotá (Colombia) y ha estado activo desde noviembre de 1984;

forma parte de uno de los siete (7) volcanes que conforman el complejo volcánico Ruiz - Tolima. Los otros Nevados son:

El Cisne, Nevado de Santa Isabel, Nevado del Quindío, El Páramo de Santa Rosa, Nevado del Tolima y Cerro Bravo.

El complejo Ruiz - Tolima es dominado por el Nevado del Ruiz, con una elevación máxima de 5.400 m.s.n.m.

La corteza terrestre en esta parte del mundo ha sufrido un intensivo plegamiento; intrusiones magmáticas y volcanismo, durante varios periodos orogénicos, se han constituido en una muy compleja historia eruptiva.

La cadena volcánica de los Andes es parte de un arco continental causado por la convergencia de las placas de Nasca y Suramérica.

Este volcán tiene un extenso sistema Hidrotermal; los centros superficiales Hidrotermales cubren una área grande y fuentes termales con alto contenido de sulfato y cloruro se encuentran hasta los 12 km, desde la cima del Volcán.

La actividad volcánica del Ruiz es acompañada por grandes emisiones de bióxido de azufre ( $SO_2$ ), las cuales exceden



algunas veces 104 toneladas de  $\text{SO}_2$  por día.

**2.2.1.3 Aguas Termales:** la fuente de agua termal es una manifestación superficial de la interacción de agua (agua meteórica) y tabla de agua con otros materiales a profundidad (placas tectónicas y cuerpos magmáticos).

El estudio y comprensión de los procesos en los sistemas hidrogeológicos es importante, ya que el agua constituye un valioso recurso natural en el caso de los sistemas hidrotermales asociados con Volcanes; su importancia radica en la posibilidad de usar los fluidos en la generación de electricidad o calor.

Estos sistemas Hidrotermales son ambientes geológicos primarios para el transporte y el depósito de muchos tipos de minerales y son muy importantes en el debilitamiento mecánico y químico de las rocas.

Los datos de la química de fluidos naturales en los sistemas hidrotermales pueden aportar información invaluable acerca de las propiedades físicas y químicas del sistema, tales como: vías de flujo, interacciones entre diferentes fluidos e interacción fluido - roca.

**2.2.1.3.1 Clasificación de los diferentes tipos de Agua Termal:** Sturchio et.al.(1988), clasificó las diferentes descargas hidrotermales en 4 grupos de acuerdo con la composición de las aguas.

**2.2.1.3.1.1 Aguas alcalino-cloradas:** estas aguas descargan desde dos grupos de fuentes en ebullición y varias fuentes tibias en el lado Oeste del Volcán a elevaciones inferiores a 3000 m. Estas son: Botero Londoño y La piscina.

**2.2.1.3.1.2 Aguas bicarbonato-sulfatadas:** éstas contienen menor cantidad de cloro y cantidades variables de Sulfato. Las fuentes termales de las Nereidas, el Recodo al Oeste, San Luis y la Caldera al Nornoroeste (NNE) pertenecen a este tipo.

Sturchio et al. (1988), han sugerido que estas aguas son producidas por dilución del vapor de aguas alcalino cloradas en ebullición con agua subterránea cerca a la superficie.

Los gases descargados por el manantial de este tipo son ricos en Dióxido de Carbono ( $\text{CO}_2$ ) y contienen proporciones variables de Sulfuro de Hidrógeno. Sturchio sugiere un flujo subsuperficial controlado por falla de



aguas alcalino cloradas hacia el WNW del volcán.

**2.2.1.3.1.3 Aguas ácido-sulfato-cloradas.** Estas aguas están en el Norte y Este del volcán, están representadas por Termales del Ruiz, Aguas calientes y Aguas blancas y tienen un pH inferior a 3.

De acuerdo con Sturchio et al, el origen de estas aguas es la condensación de gases magmáticos a alta temperatura; este proceso explicaría la alta concentración en Sulfatos, Cloruros y Fluoruros en la mayoría de las aguas ácidas salobres.

**2.2.1.3.1.4 Aguas ácido-sulfatadas:** éstas son formadas por el río Gualí y la Hedionda. Estos manantiales se forman a grandes elevaciones y se encuentran localizados al lado Norte del Volcán Nevado del Ruiz.

Tienen pH bajo, son aguas más diluidas que las ácidas sulfato cloradas y pueden tener un exceso de Sulfato por la oxidación del  $H_2$  cerca de la superficie

**2.2.1.3.2 Fuentes de interés para el estudio de microorganismos:** el sistema Hidrotermal del Ruiz está conformado por unas 42 zonas hidrotermales.



10 de estas fuentes se estudian con el fin de la vigilancia (construcción de la línea de base) e investigación. De estas fuentes, 3 son de interés para el estudio microbiológico propuesto. (8)

**2.2.1.3.2.1 Zona Termal Botero Londoño:** esta zona hidrotermal se encuentra localizada sobre la margen de la quebrada Las Nereidas, en la Hacienda Botero Londoño. Esta fuente se caracteriza por tener un pH neutro y temperaturas que oscilan entre 37 y 92 grados C, lo que la hacen interesante para el estudio de los diferentes biotopos que puedan encontrarse a diferentes temperaturas; esta zona hidrotermal es de tipo Geyser; se pueden apreciar escapes de agua que salen de las rocas a gran presión y altas temperaturas; estas aguas en ebullición se van enfriando a medida que se alejan de su origen. (figura 1).

**2.2.1.3.2.2 Fuente Termal Hotel Termal:** se encuentra ubicada en el Hotel Termal del Ruiz; se caracteriza por tener un pH entre 1 y 1.7 y temperaturas de 62 grados C. Los bajos valores de pH y la temperatura condicionan un habitat difícil para la sobrevivencia de los microorganismos, a excepción de las Arqueobacterias que se han encontrado en fuentes termales con similares características.

(Figura 2).

**2.2.1.3.2.3 Fuente Termal Aguas calientes:** justamente se halla sobre la quebrada de Aguas Calientes. Presenta condiciones de temperatura y bajo pH, similares a la del Hotel Termal. El agua brota a unos 62 grados C, de la roca y se va enfriando a medida que se aleja; el color verde característico de estas fuentes se debe a los depósitos de Azufre acumulados en el fondo. (Figura 3) Algunas características de la composición química del agua de las fuentes anteriormente nombradas son presentados en la tabla 1. (Figura 4).

**2.2.2 Características de ambientes especiales:** la gran versatilidad de los microorganismos ha permitido su desarrollo en diversidad de habitats deficientes y hostiles para los organismos superiores. En el caso de los microorganismos resulta particular el hecho de que una condición ambiental pueda ser perjudicial para un organismo y benéfica para otro.

Factores como la temperatura, pH, acidez, actividad del agua, presión, oxígeno y radiación conforman un medio ambiente determinado en el que viven y se desarrollan los microorganismos.



**2.2.2.1 Temperatura:** cada bacteria tiene una temperatura óptima, que es aquella en la que mejor crece; una temperatura mínima, la más baja a la que se desarrolla y una temperatura máxima, la más alta que permite su crecimiento.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en el desarrollo y sobrevivencia de los organismos. Cuando aumenta la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas de la célula se hacen más rápidas aumentando el metabolismo hasta llegar al punto en donde las reacciones se inactivan. (Tabla 2).

**2.2.2.1.1 Clasificación:** dependiendo de los rangos de temperatura en los cuales los microorganismos viven y se desarrollan, se han propuesto tres grupos.

**2.2.2.1.1.1 Psicrófilos:** estos microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento de 15 °C o menos y una temperatura mínima de crecimiento de 0 °C o menos. Los organismos que se desarrollan a 0 °C, pero tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30 °C se llaman psicrófilos Facultativos.

**2.2.2.1.1.2 Mesófilos:** los microorganismos Mesófilos se desarrollan en rangos de temperatura desde los 15 °C

hasta los 45 °C y un crecimiento óptimo de 37 °C.

**2.2.2.1.1.3 Termófilos:** se consideran Termófilos los microorganismos que crecen a temperaturas por encima de 45 o 50 °C hasta 105 °C.

**2.2.2.2 Acidez y pH:** la acidez o alcalinidad de una solución se expresa por su pH. La expresión pH representa el logaritmo negativo de la concentración del Ion Hidrógeno. La concentración del Ion hidrógeno del agua pura es  $10^{-7}$  M, y, por consecuencia, el agua pura tiene un pH de 7.0; aquellos valores de pH que son inferiores a 7.0 son ácidos y los superiores son alcalinos.

La concentración de hidrogeniones influye decisivamente en el crecimiento y reproducción de los microorganismos. Cada organismo tiene un pH óptimo de crecimiento definido; en el caso de las bacterias, el rango de pH para su desarrollo oscila entre 4 y 9 y muy pocos organismos pueden crecer a pH menores de 2 ó mayores de 10.

La excepción la constituyen algunos géneros acidófilos como: Thiobacillus thiooxidans y ferrooxidans que soportan pH de 1.0. Otro ejemplo lo constituye el género Sulfolobus; estas bacterias viven en fuentes sulfurosas

calientes; el rango de pH en el que se desarrollan estos microorganismos oscila entre 0.9 y 5.8, siendo el pH óptimo de 2 a 3.

Probablemente lo que ocurre en los microorganismos acidófilos obligados, es que al subir el pH a la neutralidad la membrana plasmática se disuelve, esto quiere decir que las concentraciones altas del ion  $H^+$  son necesarias para lograr la estabilidad de la membrana. Aunque los microorganismos crecen en rangos de pH muy amplios, el pH en el interior de la célula debe encontrarse cercano a la neutralidad, ya que existen muchos componentes en el interior de la célula que son lábiles a los ácidos y alcalis. La clorofila, el DNA y muchas proteínas son destruidas a pH alcalino; el pH óptimo para las enzimas intracelulares generalmente está alrededor de la neutralidad. (Tabla 3).

**2.2.2.3 Actividad del agua:** el agua representa entre el 80% y el 90% del peso de un microorganismo. Todas las reacciones químicas que suceden en los organismos vivos requieren un ambiente acuoso. Los requerimientos de agua de los microorganismos se expresan cuantitativamente en forma de actividad del agua (aW) del medio ambiente. El valor del aW del agua es de 1.000; este valor decrece cuando se disuelven solutos en ésta.



Los microorganismos crecen en medios con valores de  $a_w$  entre 0.99 y 0.63. El Halobacterium es un género de bacterias que requiere iones de Sodio para su proliferación; su crecimiento óptimo ocurre en unos valores de  $a_w$  inferiores a 0.80; este valor es aproximadamente la saturación de una solución de NaCl. A estos microorganismos capaces de resistir estas condiciones se les denomina Halófilos.

**2.2.2.4 Presión:** la presión del agua que es ejercida sobre el fondo de una columna, debido al peso del agua se denomina presión hidrostática, a diferencia de la presión de la atmósfera de la tierra denominada presión barométrica.

En la naturaleza, la presión hidrostática alta se encuentra principalmente en las profundidades de los océanos y hay un aumento de aproximadamente 10 atmósferas de presión por cada 100 m. de aumento de profundidad la parte más profunda del Océano es la profundidad desafiante, en la Fosa de las Marianas, un área en el Norte del Océano Pacífico, al Este de las Filipinas, que tiene una profundidad de 10800m, con una correspondiente presión hidrostática de cerca de 1100 atm.

Muchos microorganismos aislados del agua marina toleran bien las presiones hidrotolerantes en diferente grado y son denominadas Barotolerantes; las bacterias que crecen mejor a presiones atmosféricas más altas que las normales son llamadas Barófilas; estas bacterias han sido aisladas de las profundidades de los Océanos.

**2.2.2.5 Oxígeno:** el oxígeno, además de ser una sustancia vital para los organismos respiratorios, es también capaz de formar una variedad de derivados tóxicos, a ún para aquellos organismos que respiran y que lo necesiten.

El aire contiene una concentración de oxígeno del 20% en presión. Los microorganismos aeróbicos obligados se encuentran en entornos aeróbicos y requieren oxígeno debido a que no pueden producir la suficiente energía para crecer mediante fermentación.

El oxígeno puede resultar tóxico para algunos organismos; es así como los anaeróbicos obligados no emplean el oxígeno y son deteriorados por las mínimas concentraciones de éste.

Las bacterias Metanógenas y los Clostridio son ejemplos de microorganismos anaerobios.





Los organismos llamados Microaerófilos requieren oxígeno y crecen mejor a presiones inferiores a la normal; este ejemplo lo constituyen las bacterias productoras de ácido Láctico. (9)

**2.2.2.6 Metabolismo:** los procesos bioquímicos que ocurren en los organismos vivos, así como: capacidad de acumular, convertir nutrientes y energía se denomina metabolismo. Cada microorganismo tiene un metabolismo propio de acuerdo al sustrato que utiliza como fuente de energía. (10)

**2.2.6.1 Autótrofos:** son organismos que se nutren a sí mismos. Del griego auto que significa a uno mismo y trophos que significa nutrición.

Estos organismos fabrican sus propios alimentos a partir de materias primas inorgánicas y, por tanto, no dependen para su nutrición de otros organismos. Algunas bacterias son autótrofas quimiosintéticas, es decir, productoras que fabrican sus propios compuestos orgánicos mediante la oxidación de sustancias inorgánicas simples como el Azufre y el Amoníaco. Estos organismos no requieren luz como fuente de energía para la fabricación de compuestos orgánicos a partir de la oxidación del dióxido de carbono y agua; se denominan autótrofos fotosintéticos. (11)

Ejemplos: bacterias púrpuras sulfurosas, bacterias verdes sulfurosas. Otros autótrofos, denominados litótrofos, obtienen su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos como el azufre elemental ( $S^0$ ), ion Amonio ( $NH_3^+$ ), hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y el hidrógeno ( $H_2$ ).

**2.2.2.6.2 Heterótrofos:** son organismos que obtienen su energía y nutrimentos a partir de moléculas manufacturadas por otros organismos; estos organismos no pueden sintetizar su propio alimento a partir de sustancias inorgánicas, y, por consiguiente, deben vivir a expensas de los autótrofos o de materia en descomposición. Este grupo incluye a todos los animales, hongos, protozoarios y la mayoría de las bacterias.

**2.2.3 Flora microbiana de ambientes especiales:** muchas partes del mundo, tales como las regiones geotérmicas, las polares, las fuentes ácidas, las alcalinas, las fosas submarinas, las salmueras y las profundidades oceánicas de gran presión y bajas temperaturas, son poco adecuadas para la mayoría de las formas de vida; no obstante se encuentran seres que viven adaptados a estos ambientes.

Entre los más sorprendentes hallazgos de microorganismos adaptados a ambientes extremos se consideran los estudios de ZO BELL y MORITA (1959), quienes encontraron bacterias



vivas a más de mil metros de profundidad en el sedimento de la fosa de las Filipinas; se encontraron entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^6$  bacterias por gramo en materia fresca. Algunos de estos microorganismos aislados de las profundidades del mar se desarrollan óptimamente a presiones superiores a 500 atmósferas y no crecen o lo hacen muy mal a la presión atmosférica.

ZO BELL Y JOHNSON proponen designarlos con el nombre de Barófilos; estos microorganismos encuentran las condiciones óptimas para su desarrollo a presiones altas y bajas temperaturas (3 - 5 °C).(12)

En el Valle Wright Valley en la Antártida se registran temperaturas promedio de  $-20^{\circ}\text{C}$ , con precipitaciones prácticamente nulas; estos ambientes son muy parecidos a las condiciones climáticas del planeta Marte. (12)

Investigaciones realizadas en los valles secos de la Antártida demuestran la existencia de colonias de microorganismos que se hallan ocultas a un centímetro aproximadamente de la superficie.

Un segundo tipo de nicho ecológico en condiciones climáticas extremas lo constituye el lago Hoare en el valle Taylor en la Antártida; éste consigue mantener en



una atmósfera de  $-20^{\circ}\text{C}$  bajo una gruesa capa de hielo, un agua líquida a  $0^{\circ}$ , gracias a la energía combinada del sol y de la energía geotérmica en las aguas de estos lagos; en este hábitat los científicos descubrieron microorganismos en forma de un recubrimiento de algas.

Carl Woese ha demostrado, a partir del análisis comparativo de la estructura del ARN de los seres vivos, que la célula primitiva, antepasado de todas las formas de vida en la tierra, era un Termófilo, organismo vivo que utiliza el Azufre como fuente de energía metabólica.

Si se encontraran fósiles en Marte es probable que se pueda determinar el medio de los seres vivos, a partir del análisis geológico de las rocas y de los sedimentos en que vivieron; luego se podrá determinar si la vida original en este planeta era también un Termófilo que utilizaba el Azufre (12).

Otro ambiente especial lo constituyen los lagos salados; la concentración de sal en algunos de ellos llega a la saturación. Los microorganismos encontrados pertenecen a los géneros Halobacterium y Halococcus y están clasificados dentro de las Arqueobacterias.

La concentración óptima para su crecimiento y desarrollo

está entre el 25 y el 30% inclusive permanecen vivas en la sal cristalizada. (13)

En el fondo del mar existen habitats volcánicos submarinos; aunque estos se encuentran a poca profundidad, la presión a unos pocos metros de la superficie puede elevar el punto de ebullición del agua a temperaturas incluso de 350°C.

Estos ambientes calientes en el fondo del mar existen en varias partes alrededor del mundo; muchos de ellos han sido localizados a 2 y 10 metros de profundidad en la Costa de Vulcano Italia; de estas resurgencias son emitidas aguas calientes a 103°C y han sido aislados géneros de bacterias extremadamente termófilas como: Pyrodictium, Thermococcus, Thermodiscus, Pyrococcus y Staphylothermus. (14)

**2.2.4 Vida microbiana en ambientes de alta temperatura:**  
de los medios ambientales extremos, uno de los más interesantes de todos es el de las altas temperaturas. La temperatura es uno de los parámetros más importantes de la actividad celular y la evolución de los organismos.

A pesar de que la temperatura media en la tierra es baja, los ambientes de altas temperaturas se encuentran



distribuidos por toda la superficie de la tierra; los géiseres, las resurgencias marinas en el fondo del mar y los manantiales calientes constituyen habitats térmicos naturales.

Existen, a la vez, ambientes térmicos artificiales relacionados con las operaciones industriales de las centrales eléctricas, las industrias alimentarias y otros tipos de instalaciones. En estos medios extremos, tanto naturales como artificiales, se encuentran microorganismos que se desarrollan en estas condiciones.

Fredinam Cohn fue el primero en comprender el significado biológico de la existencia de microorganismos en los manantiales calientes.

F. Cohn dedujo que a medida que hay variación en la temperatura del agua, existen especies de microorganismos diferentes, lo cual se aprecia mediante las diferencias de color existentes en los materiales.

Posteriormente, estudios realizados en microorganismos que viven en ambientes de altas temperaturas, concluyeron que un incremento de temperatura en un medio ambiente determinado ocasiona la desaparición de grupos

taxanómicos completos. Los Musgos, algunos Insectos y Crustáceos constituyen ejemplos de organismos pluricelulares que no sobreviven a temperaturas superiores a 50°C.

Algunos Eucariotes se desarrollan a temperaturas máximo de hasta 60°C; es el caso de algunos Protozoarios, Hongos y Algas.

Los procariotes pueden adaptarse a sobrevivir a temperaturas un poco más altas. Las bacterias fotosintéticas tienen un rango de temperatura máxima entre 70 y 73°C. Las Eubacterias (bacterias verdaderas) no se encuentran a temperaturas de más de 90°C; superior a este límite solamente se encuentran especies de microorganismos capaces de desarrollarse y reproducirse como las Arqueobacterias, no siendo muchas de ellas estrictamente Termófilas y pueden vivir a temperaturas normales.

La bacteria más Termófila fue aislada en 1982 de un manantial caliente submarino por investigadores de la Universidad de Ratisbona en Alemania; a esta bacteria se le denominó Pyrodictium y es capaz de desarrollarse a unos 110°C.

**2.2.5 Organización estructural de los microorganismos termófilos:** la explicación de la vida a altas temperaturas tiene sus bases en la estructura de la membrana celular. La especial configuración que posee la membrana es la que le permite sobrevivir a los microorganismos en condiciones que la vida para otros seres vivientes es imposible.

Las membranas de las células Eucariotes y de las Eubacterias están constituidas por una doble capa de lípidos en las que se insertan proteínas; los lípidos de estas membranas poseen una parte hidrófoba que tiene poca afinidad por el agua; esta parte está dirigida hacia el centro de la bicapa, mientras que la cabeza hidrófila está orientada hacia el medio exterior acuoso.

Siguiendo este modelo se puede encontrar que las membranas biológicas tienen una consistencia tipo cristal líquido, que en las moléculas lipídicas pueden desplazarse lateralmente.

Cuando la bicapa lipídica se calienta, las regiones hidrófobas se hacen más móviles y empiezan a separarse unas de otras, lo que ocasiona el paso de una estructura altamente ordenada o tipo gel a un estado de mayor movilidad; es decir, las moléculas se separan





completamente y la estructura de membrana se desbarata, ocasionando la salida de todos los componentes celulares y la muerte de la célula. (15)

La calorimetría diferencial de barrido mide cómo varía la absorción de calor en función de la temperatura; durante la transición gel-fluido se absorbe una cantidad relativamente grande de calor.

En general, los lípidos con ácidos grasos de cadenas cortas o insaturadas, sufren la transición de fase a temperaturas más bajas que los lípidos con cadenas largas o saturadas.

Las cadenas cortas tienen menos área superficial con las que formar interacciones de van der waals entre sí. Las cadenas de ácidos grasos insaturados tienen dobleces, lo que hace que adopten una distribución más variable o fluida y que formen interacciones de Van Der Waals menos estables con otros lípidos. (16)

Cuanto más saturado sea el ácido graso de la membrana, tanto más alta será su temperatura de fusión; por esto hay una proporción de ácidos grasos saturados más elevada en las bacterias termófilas; esto explica por qué los microorganismos termófilos obligatorios no pueden crecer

a temperaturas inferiores a los 35-40°C; las funciones membranales a bajas temperaturas son incompatibles con una composición muy rica en ácidos grasos saturados.

Las Arqueobacterias no presentan el modelo de la bicapa lipídica. Su membrana está compuesta por una sola capa lipídica; en los dos extremos se encuentran dos cabezas hidrófilas unidas entre sí de manera covalente por una parte hidrófoba. Por lo tanto, la separación de las colas hidrófobas no puede producirse en las Arqueobacterias porque las dos caras de la membrana están en puente de manera covalente; de esta manera se necesitaría una tensión estructural potente para desestabilizar la organización lipídica de la membrana celular. Por estas propiedades, la organización a nivel membranal tiene una gran rigidez y estabilidad. (Figura 5)

**2.2.5.1 Proteínas y Ácidos Nucleicos:** las proteínas y los ácidos nucleicos de los organismos clásicos son destruidos rápidamente por el calor ya que la estructura tridimensional de estas macromoléculas está controlada por la formación de una red de interacciones de pequeñas energías en el interior de cada molécula; estas uniones débiles son sensibles a los efectos de la temperatura y pueden romperse si no están estabilizados correctamente.



La estabilidad de las proteínas se explica a partir de una red de interacciones de pequeña energía (enlaces hidrógeno, fuerzas de Van der Waals) que estabilizan la estructura del polipéptido. Estos enlaces débiles son sensibles al calor y a un incremento en la temperatura; al romper las interacciones (excepto las hidrófobas), desnaturaliza la proteínas; al perder su conformación la proteína pierde también su actividad.

En los organismos termófilos se producen algunos nuevos enlaces débiles que no modifican la conformación global de la molécula.

En el caso de la ferredoxina, la diferencia entre la del Clostridium tartaricum (que afecta al 50% de su actividad después de dos horas de incubación a 70°C) y la del Clostridium thermosaccharolyticum (que conserva el 90% de su actividad en las mismas condiciones) está en la sustitución de dos aminoácidos: los residuos glutaminas en las posiciones 31 y 44 son sustituidos por residuos de ácido glutámico. Mientras que los residuos Glicina (Gln) tienen enlaces H con los residuos Lisina (Lis) en posición 29 e Histidina (His) en posición 2. Los residuos glutamina (Glu) tienen interacciones electrostáticas con estos mismos residuos. La sustitución de enlaces H por interacciones electrostáticas es, por sí sola, capaz de

explicar el paso a una clara termofilia.

Referente a la termoestabilidad de los ácidos nucleicos, el calentamiento de la doble hélice de ADN produce una separación progresiva de las dos hebras hasta formar 2 moléculas de una sola hebra de ADN. La doble hélice se mantiene en su configuración gracias a la creación de enlaces hidrógenos entre las bases nitrogenadas de cada hebra. La Adenina y la Timinase emparejan intercambiando tres enlaces. La estabilización de las moléculas de ADN de los organismos termófilos se basa en dos estrategias: EL ADN puede contener más bases Guanina y Citocina que el de los organismos convencionales. De este modo se establecen más enlaces H entre las dos hebras de la doble hélice, lo que tiene como consecuencia que la molécula sea más estable al calor. El emparejamiento puede estabilizarse mediante sales de metales bivalentes o bases orgánicas que desempeñan la misma función.

## **2.2.6 Flora microbiana de ambientes especiales.**

**2.2.6.1 Generalidades:** muchas de las zonas geotermales naturales constituyen excelentes medios para el estudio de la ecología de los microorganismos, siendo de mucho interés los que presentan un pH bajo.

En lo que se refiere a la temperatura, ningún organismo

pluricelular puede vivir a más de 50°C, límite alcanzado por los musgos, entre los vegetales, y por los insectos y los pequeños crustáceos, entre los animales. El límite para el desarrollo de los demás eucariotes está alrededor de los 60°C; a esta temperatura algunos pocos Protozoarios, Algas y Hongos pueden vivir. A temperaturas superiores solo algunos procariotes pueden encontrarse, como es el caso de algunas bacterias fotosintéticas que tienen una temperatura máxima de supervivencia de 70 a 73°C. Las Eubacterias y bacterias verdaderas ya no se encuentran a temperaturas de 90°C; superior a esta temperatura sólo las Arqueobacterias son capaces de reproducirse. (Tabla 4) (17).

#### 2.2.6.2 Cianobacterias.

2.2.6.2.1 Características generales: las Cianobacterias o Algas Verdeazules comprenden un grande y heterogéneo grupo de microorganismos fototrofos.

Las Cianobacterias existen en formas unicelulares o coloniales y se han descrito unas 7500 especies; estos microorganismos tienen una sola forma de clorofila, la clorofila a, y todas tienen pigmentos biliproteínicos característicos: las ficobilinas.

Las Cianobacterias son más tolerantes a los extremos

ambientales que las Algas Eucarióticas y son con frecuencia los organismos dominantes o los únicos fotosintéticos en los manantiales calientes, los lagos salinos y otros ambientes extremos. (18)

**2.2.6.2.2 Clasificación de las Cianobacterias:** se hallan clasificadas en el reino mónera, división Cianófitos. (19)

**2.2.6.2.3 Morfología:** son organismos procariotes y su tamaño oscila entre 0.5-1  $\mu$ m hasta 60  $\mu$ m, en el caso de la Occillatoria princeps; carecen de membrana nuclear y de los demás organelos membranosos como mitocondrias y cloroplastos presentes en los Eucariotes. (20)

A diferencia de las bacterias, poseen laminillas fotosintéticas donde tiene lugar la fotosíntesis. Es probable que las Cianobacterias fueran los primeros organismos fotosintéticos productores de Oxígeno y fueran los responsables de la conversión inicial de la atmósfera de la tierra de anaeróbica o aeróbica. (21)

### 2.2.6.3 Algas

**2.2.6.3.1 Características generales.** Son organismos eucarióticos que comprenden Algas unicelulares y



multicelulares. El término Alga se refiere a un gran grupo de organismos con una diversidad morfológica y fisiológica, que contienen clorofila y que llevan a cabo un tipo de fotosíntesis productora de Oxígeno. En el pasado, la palabra Alga se empleó para nombrar tanto los Procariotes como los Eucariotes; a las formas Procariotas se les denominó Algas verdeazules que en la actualidad se llaman Cianobacterias. Algunas algas son móviles por medio de flagelos y parece que están emparentadas con los Protozoarios. (22)

**2.2.6.3.2 Clasificación de las Algas:** clasificadas dentro del Reino Protista, con varias divisiones.

La clasificación en Phyla o divisiones se basa en la composición de pigmentos y de productos de almacenamiento de energía. Otras características utilizadas para la clasificación de las algas incluye la composición de la pared celular, el número y localización de los flagelos y la morfología de los cloroplastos. (23)

**2.2.6.3.3 Morfología:** existe diversidad de estructuras; las formas más simples son unicelulares y se dividen por fisión binaria. En muchos casos las dos células hijas no se separan inmediatamente después de la división sino que permanecen juntas formando cadenas o masas amorfas de

células. Si las células permanecen más o menos unidas unas con otras, el conjunto se llama Cenobium; mientras que si se separan, pero se mantienen juntas por estar incluidas en mucilago, la disposición se conoce como Tetrasporal.

Muchas Algas son filamentosas y se pueden diferenciar diversos tipos:

- Filamentosas simples sin septos
- Filamentosas septadas simples sin ramificaciones.
- Formas filamentosas ramificadas con diferentes grados de complejidad.

**2.2.6.3.4 Motilidad:** algunos tipos de Algas son móviles debido a que poseen flagelos; los cilios no se presentan en las Algas. La Euglena posee un solo flagelo polar; las especies flageladas de clorofitas tienen dos o cuatro flagelos.

**2.2.6.3.5 Estructura de la pared celular:** las algas presentan diversidad en la química y estructura de sus paredes celulares, en muchos casos esta pared está compuesta básicamente de celulosa y presenta otros ácidos alginicos, ácido fuccínico y otros.





**2.2.6.3.6 Algas verdes (Clorofita):** son organismos fotosintéticos con clorofila a y b y carotenoides en los cloroplastos; el almidón es la reserva principal de alimento; casi todas poseen paredes celulares con celulosa.

Las algas verdes comparten muchas características con las plantas; bioquímicamente, su pigmentación, los productos de almacenamiento y la pared celular son idénticos. Por éstas y otras semejanzas fue que las plantas evolucionaron de ancestros semejantes a las Algas.

Uno de los organismos más representativos de este grupo es las Chlamydomona; es la forma más simple de clorofita; posee flagelos y es móvil.

Uno de los géneros más avanzados de algas es la colonia denominada Volvox; el número de células en una colonia varía de aproximadamente 500 en algunas especies, a más de 50.000 en otras. (24)

**2.2.6.3.7 Diatomeas:** las Diatomeas son Algas que pertenecen a la división Chrysophyta, que a su vez están dispuestas en tres clases: la Bacillariophyceae que incluye las diatomeas; estas Algas son vegetales microscópicas que tienen paredes celulares constituidas



por sílice en una estructura en forma de dos labios superpuestos que se encajan el uno al otro como las partes de una caja; esta pared posee pequeñas ranuras, crestas y aberturas que son propias de cada especie. Estas formaciones pueden presentar simetría radial o bilateral. Este sílice es el responsable de la rigidez de la célula; las diatomeas almacenan alimento como el polisacárido leucosina, como aceite y no como almidón.

Las diatomeas contienen un pigmento castaño, la fucoxantina, lo mismo que clorofilas a y c; mediante estos pigmentos las Diatomeas realizan la fotosíntesis. Se ha estimado que las Diatomeas sintetizan más o menos los tres cuartos de todo el material orgánico producido en la tierra. (25)

Estas Algas se encuentran en números realmente extraordinarios en medios marinos y aguas de ríos y suelos; se reproducen sexual o asexualmente.

Debido a la alta resistencia de las frústulas de las diatomeas, al desintegrarse permanecen intactas por largo tiempo y constituyen uno de los mejores fósiles de algas.

Existen otras clases de Chrysophyta, algas verdes amarillas (Xanthophyceae) y pardodoradas (Chrysophyceae);

poseen paredes celulares compuestas de sílice y cloroplastos ricos en carotenos y Xantofilas que les dan su color pardo o amarillo característico. Se han reportado unas 10000 especies vivientes y muchas especies extinguidas. (26)

**2.2.6.4 Archeobacterias:** los biólogos por muchos años han aceptado la teoría evolutiva de la vida a partir de dos planos celulares diferentes: el eucariótico y el Procariótico.

De acuerdo con estudios realizados a nivel del RNAs ribosomal, se ha demostrado que tres grupos de microorganismos celulares pudieron haber evolucionado a partir de una célula ancestral; dos de estos grupos son procarióticos y eucarióticos, los dos primeros han sido denominados Eubacterias que son la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, las Cianobacterias y las Archeobacterias son Procariotes que incluyen bacterias Termoacidófilas, Metanógenas y Halófilas.

Por su parte, W.C.R Woese propuso un árbol de linaje celular de evolución; sugirió que el antepasado universal podría ser denominado progenote, y el antepasado de los presentes núcleos Eucariotes se llamaría Urcariote.

(Figura 6) (27).

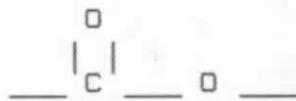
Etimológicamente, el término *Arqueobacteria* sugiere antigüedad; a este grupo pertenecen bacterias capaces de habitar medios considerados extremos que pudieron haber existido en el ambiente primitivo de la tierra.

Las hipótesis que tratan de aclarar el origen de la vida argumentan que la vida surgió en lagos calientes y concentrados en ambientes totalmente anóxicos. Las propiedades de algunas *Arqueobacterias* actuales permitirían entender mejor las características que poseían los microorganismos primitivos.

Las *Arqueobacterias* están agrupadas como organismos procariotes, pero difieren en algunas características con las *Eubacterias*; las *Arqueobacterias* no utilizan el ciclo de Calvin; para reducir el carbono requieren varias coenzimas excepcionales que cumplen la función del NAD + y FAD como aceptores de electrones; las secuencias de nucleóticos de sus ARN de transferencia y ARN ribosómico son muy distintas a las de los otros organismos; el peptidoglicano no está presente en las paredes celulares de las *Arqueobacterias*; éstas constan de proteínas, glucoproteínas o polisacáridos y los lípidos de la membrana son éter (CO-C) ligado, a diferencia de las



Eubacterias y Eucarióticos que están ligados a éster.



Los Metanogénicos (productores de Metano que viven en ambientes totalmente anóxicos), los Halofílicos (dependientes de sal), y los termoacidófilos (que prosperan en habitats térmicos altamente ácidos) son los microorganismos incluidos dentro del grupo de las Arqueobacterias. (28)

Un estudio basado en la comparación de las secuencias RNA 16S sugiere que las Arqueobacterias son las más antiguas de dos grupos de Procariotas y que su curso de evolución ha sido más lento que los grupos Eucariota y Eubacteria. No se conoce por qué las Arqueobacterias han sido las más lentas en evolucionar de los tres grupos, pero esto puede estar relacionado con la hostilidad de los medios ambientes en que habitan. (29)

**2.2.6.4.1 Arqueobacterias extremadamente Termófilas:** la división filogenética de las Arqueobacterias se refiere a un grupo de organismos en común, que por sus requerimientos metabólicos reducen compuestos de Azufre y son de naturaleza extremadamente termófila, (Algunas veces son designados como hipertermófilos). Varios Termófilos extremos son capaces de desarrollarse a

temperaturas sobre el punto normal de ebullición del agua.

Todas las bacterias extremadamente Termófilas han sido aisladas de termales calientes, suelos o aguas que contienen Azufre elemental y muchas especies metabolizan Azufre de acuerdo con su metabolismo.

Los ambientes terrestres, como suelos y manantiales ricos en Azufre, pueden tener temperaturas superiores a los  $100^{\circ}\text{C}$  y son medianamente o extremadamente ácidos, debido a la producción de ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) por la oxidación biológica del ácido Sulfihídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) o Azufre elemental ( $\text{S}^{\circ}$ ).

El término "Solfataras" significa mina de Azufre en Italiano y se ha usado para describir ambientes ricos en Azufre y campos azufrados encontrados por todo el mundo; estos extensos campos han sido hallados en Italia, Islandia, Nueva Zelanda y el Parque Nacional de Yellowstone Wyoming U.S.A.

Dependiendo de su entorno geológico, los ambientes azufrados pueden ser ligeramente alcalinos, medianamente ácidos con Ph de 5-8 o extremadamente ácidos con valores de pH de 1. Los termófilos extremos han sido aislados de

estos tipos de ambientes, pero la mayoría de estos organismos viven en habitats neutros o medianamente ácidos. (Tabla 5)

El azufre elemental existente en estos ambientes es formado a partir del  $H_2S$  termal, bien sea por oxidación espontánea del  $H_2S$  con el oxígeno, o por reacción del  $H_2S$  con el  $SO_2$  (este último es un componente común de los gases volcánicos).

Las Arqueobacterias extremadamente Termófilas tienen un metabolismo Organótrofo o Litótrofo a excepción de dos géneros que son anaerobios. Muchas Arqueobacterias extremadamente Termófilas pueden desarrollarse Litotróficamente con  $H_2$  como fuente de energía. El pyrodictium, por ejemplo, se desarrolla de manera estrictamente anaerobia en un medio de sales minerales complementado con  $H_2$  y  $S^0$  a temperaturas superiores a  $110^{\circ}C$ .

Otros Termófilos extremos, como el Sulfolobus, se desarrollan por la oxidación del Azufre elemental y el Hierro Ferroso (aeróbicamente). El papel que desempeña el Azufre en estos procesos respiratorios es clave, bien sea como donador o aceptor de electrones. (Tabla 6) (30).



**2.2.6.4.1.1 Temperatura y límites de la existencia microbiana:** las proteínas de los Termófilos extremos son estables al calor debido a la secuencia especial de los aminoácidos dentro de la proteína.

Cerca a los 100°C algunas importantes biomoléculas son destruidas, por ejemplo: moléculas como el ATP y el NAD + se hidrolizan rápidamente a gran temperatura. La vida media de estas dos moléculas a 100°C es menor de 30 minutos.

Algunas fumarolas marinas llamadas también "Chimeneas negras" alcanzan temperaturas de 250 - 350°C; a estas enormes temperaturas las macromoléculas y las moléculas orgánicas simples, como aminoácidos y nucleótidos, son rápidamente hidrolizadas. La vida en estos ambientes parece imposible, por ejemplo: la vida media del DNA a 250°C es del orden de un microsegundo y la vida media de las proteínas y el ATP es menor que un segundo.

Aunque todavía la temperatura más alta para la vida no ha sido definida, el descubrimiento de Arqueobacterias extremadamente Termófilas muestra un límite de desarrollo no inferior a los 110°C.

Experimentos de laboratorio sobre la estabilidad de las



biomoléculas al efecto del calor revelan que los procesos vivos pueden ser mantenidos a temperaturas de 150°C, pero a temperaturas más elevadas quizás la estructura de la vida no sea capaz de sobreponerse. Esto plantea la posibilidad de descubrir algún día supertermofilos capaces de crecer a 150°C. (21).

#### 2.2.6.5 Sulfolobus.

**2.2.6.5.1 Generalidades:** las bacterias del género Sulfolobus, fueron los primeros microorganismos encontrados en manantiales calientes ricos en Azufre a temperaturas superiores a 90°C y pH de 1-5. La mayoría de estos ambientes están relacionados con actividad volcánica.

El Sulfolobus es un aerobio obligado y puede crecer autótrofa o Quimiolitótrofamente. Se han descrito dos especies del género Sulfolobus: Sulfolobus acidocaldarius, el cual se desarrolla en rangos de temperatura entre 55 y 85°C, con un crecimiento óptimo de 70 a 75°C, y a un valor de pH entre 1 y 6. óptimo de 2 a 3; han sido aislados de ambientes ácidos calientes. Sulfolobus solfotacticus, con temperaturas de desarrollo entre 50 y 87°C y un crecimiento óptimo de 87°C a un valor de pH de 3 a 5.5 óptimo alrededor de 4.5 aislado de

biotopos azufrados.(31).

**2.2.6.5.2 Características morfofisiológicas:** este género se caracteriza por un diámetro celular de 0.8-1.0 micras; presentan una forma lobulada cocoide. Presenta lóbulos irregulares, no presenta flagelos ni movilidad.

Este microorganismo es Autótrofo facultativo, puede desarrollarse litotróficamente oxidando azufre elemental ( $S^0$ ), o de manera Oranotrófica oxidando compuestos orgánicos: Extracto de Levadura, Azúcares o aminoácidos. El metabolismo Autótrofo del Sulfolobus ocurre por la vía inversa de los ácidos Tricarboxílicos.

**2.2.6.5.3 Distribución:** estas bacterias han sido aisladas de manantiales calientes ricos en Azufre y campos azufrados calientes como los existentes en el Parque Nacional de Yellowstone (Wyoming) E.U. Otros aislamientos se han realizado en Italia, Salvador, República Dominicana, Nuevo México, Nueva Zelanda, Islandia, Japón, Islas Azores y Sumatra.(32)

**2.2.6.5.4 Simbiosis:** el Sulfolobus es un aerobio obligado que oxida el  $H_2S$  a azufre elemental ( $S^0$ ) y luego a  $H_2SO_4$ , fijando  $CO_2$  como fuente del carbono, por lo tanto, este microorganismo es el responsable de la acidez

de los habitas geotérmicos ricos en Azufre.

Además de su metabolismo aerobio el Sulfolobus reduce Fe 3+ a Fe 2+ anaerobicamente; también puede oxidar Fe 2+ a Fe 3+ aerobicamente; esta propiedad ha sido usada con éxito en la lixiviación de Hierro y minerales de Cobre a gran temperatura.

#### 2.2.6.5.5 Estructura bacteriana.

2.2.6.5.5.1 Membrana Celular: la membrana celular del Sulfolobus como la del resto de las Arqueobacterias, es diferente a la de la mayoría de los microorganismos; ésta consta de una sola capa de fosfolípidos formada por cadenas de hidrocarbonados conectada a ambos extremos por enlaces éter y no por enlaces comunes éster a residuos de glicerol.

#### 2.2.6.5.6 Versatilidad metabólica

Muchos de los compuestos de azufre reducidos pueden emplearse como donadores de electrones por una variedad de bacterias sulfurosas. Los compuestos sulfurosos más frecuentes empleados como donadores de electrones son el H<sub>2</sub>S, el azufre elemental (S) y el tiosulfato, que son donadores de electrones para la fosforilación pro



transporte de electrones. El primer producto de la oxidación del  $H_2S$  es el azufre, sustancia muy insoluble. Algunas bacterias depositan el azufre en el interior de la célula, mientras que otras lo hacen extracelularmente. El azufre depositado a consecuencia de la oxidación inicial es una reserva energética y cuando ha disminuido el aporte de  $H_2S$ , puede obtenerse energía adicional de la oxidación del azufre. La producción del  $SO_2$  puede dar lugar a condiciones extremadamente ácidas, algunas veces con  $ph$  inferior a dos.

La capacidad de las bacterias oxidantes del azufre para producir ácido sulfúrico se emplea prácticamente en la agricultura para tratar suelos alcalinos; se esparce azufre en polvo en el suelo y las bacterias sulfurosas presentes naturalmente en éste, lo oxidan y reducen el  $ph$  a valores más adecuados para cultivos agrícolas.

Cuando el azufre elemental es empleado como donador de electrones por un microorganismo, éste debe crecer unido a una partícula; de azufre elemental, adhiriéndose a dicha partícula, el organismo puede tener eficientemente los pocos átomos de azufre que se disuelven espontáneamente y conforme esto ocurre, aumenta la disolución del azufre, con lo que gradualmente se consume la partícula.

#### 2.2.6.5.7 Oxidación Litotrófica del Hierro.

Sulfolobus también oxida el hierro. La oxidación del hierro del estado ferroso al férrico es una reacción que produce energía en unas cuantas bacterias. Solo una pequeña cantidad de energía se produce de esta oxidación, y por esta razón las bacterias como Sulfolobus deben oxidar grandes cantidades de hierro para poder crecer. El hierro férrico forma un hidróxido muy insoluble en el agua el cual se precipita conforme va teniendo lugar la oxidación.

#### 2.2.6.5.8 Fotomicrografía.

Las bacterias del género Sulfolobus acidocaldarios se visualizan por microscopía de fluorescencia después de su tinción con el colorante anaranjado de acridina. El cristal de azufre no florece, la fotomicrografía se obtiene con una cámara de fluorescencia y después de haber seleccionado el campo más representativo sobre la preparación.

#### 2.2.6.5.9 Micrografía Electrónica.

Para estudiar la estructura interna del Sulfolobus es esencial el microscopio electrónico. Con él se emplean

electrones en lugar de rayos luminosos y los electromagnetos actúan como lentes, funcionando todo el sistema a alto vacío. Son además necesarias técnicas especiales para cortes delgados y así poder obtener muestras para el microscopio electrónico. Para su corte, las células deben primero fijarse, lo que se lleva a cabo sumergiendo las células en un solvente orgánico. Después de la deshidratación la muestra se mete en plástico; a partir de este plástico se obtienen los cortes delgados o cortes finos, con la ayuda de un ultramicrotomo especial, usualmente equipado con una navaja de diamante. Por ejemplo una sola célula bacteriana de *Sulfolobus* puede ser cortada en cinco o más rebanadas muy delgadas, las cuales pueden entonces examinarse individualmente con el microscopio electrónico; así se obtienen las micrografías sobre los pequeños cortes y a una amplificación óptima de 48.970 X.

#### **2.2.6.5.10 Conversión Microbiana del Elemento Azufre en el medio**

Existen elementos minerales, como fósforo, calcio y potasio que realizan funciones importantes en el crecimiento y metabolismo de todos los organismos. Los microorganismos los contienen y por lo tanto los inmovilizan, y los liberan como consecuencia de la



descomposición de la materia orgánica. Los productos del metabolismo microbiano al alterar el pH, por ejemplo, pueden afectar la disponibilidad de un ión al alterar su solubilidad o su estado de oxidación, aunque dicha especie iónica no sea metabolizada. Estos son efectos indirectos en la disponibilidad de muchos nutrientes de vegetales, en los cuales los microorganismos son quizás importantes; aunque existe poca información detallada, por el contrario, el azufre tiene grupos de bacterias que lo utilizan específicamente como sustrato. Es el caso de las bacterias del género *sulfolobus*.

#### 2.2.6.6 Microbiología.

2.2.6.6.1 Aislamiento y cultivo. D. Brock refiere un enriquecimiento Autótrofo con Azufre elemental, Heterótrofo adicionando Extracto de Levadura al 0.1% (p-v) según el procedimiento simple para el enriquecimiento del medio para aislar Sulfolobus. Cuando las células de Sulfolobus se observan en muestras naturales y en medio de cultivo en el laboratorio, presenta la característica de atacar los cristales de Azufre; esto puede ser observado con microscopio de fluorescencia usando el colorante Anaranjado de Acridina.

2.2.6.6.2 Rango de temperatura y PH: a continuación se presentan los distintos rangos de temperatura y pH en los

que el Sufulobus se desarrolla.

TEMPERATURA		PH	
Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
55	80	1	5,9
55	80	1	5,9
55	75	1	4,5
55	80	1	5,9
55	80	1	5,9
55	75	1	4,5

Tomado de: Sulfubolus a New Genus of sulfur Oxidizing Bacteria living ata Low PH and High temperature. Thomas D. Brock , departament of Bacteriolgy University of Wisconsing 1972.(33).

2.2.7 Participación microbiana en el ciclo global del azufre: la mayor cantidad de azufre en la tierra se encuentra concentrada en las rocas y sedimentos, formando minerales de sulfato como el Yeso y de Sulfuro como la pirita, teniendo muy én cuenta que son los océanos los reservorios más importantes de Azufre en forma de Sulfato inorgánico contribuyendo así de esta manera al desarrollo de la vida en general.



Cuando las bacterias reducen el sulfato se forma el ácido Sulfhídrico, el principal gas volátil del azufre.

El Sulfuro se encuentra presente en diversos ambientes, dependiendo del pH, el cual selecciona químicamente la forma en la que éste se ha de encontrar; es así como a pH básicos la forma más encontrada es el Sulfuro ( $S_2$ ); a pH ácido es el ácido Sulfhídrico ( $H_2S$ ) y a pH neutros la forma más abundante es el  $HS^-$ .

Una gran cantidad de bacterias pueden utilizar el Sulfato como fuente de Azufre y en la última instancia formar  $HS^-$  a participar de la descomposición del Azufre orgánico mediante la putrefacción y la desulfuración.

Estos microorganismos se han denominado bacterias reductoras del Sulfato y son todas las de carácter anaeróbico obligado.

El Azufre elemental ( $S^0$ ) es químicamente estable en la mayoría de los entornos en presencia de oxígeno, pero es fácilmente oxidado por las bacterias oxidantes del Azufre como las del género Thiobacillus. El Azufre elemental es muy insoluble y las bacterias que lo oxidan están adheridas fuertemente a los cristales del Azufre.



La oxidación del Azufre elemental da por resultado la formación de Iones Sulfato de Hidrógeno, lo que característicamente produce una disminución de pH.

Este metabolismo incluye procesos de oxidorreducción, dando lugar al ciclo del Azufre. (Figura 7).

Los compuestos Azufrados más conspicuos en la biomasa son algunos aminoácidos como Metionina, Cisteína, y Cistina, los cuales poseen grupos tiol con valencia -2, también los Ester-sulfatos como los Polisacáridos o los Aromáticos que son fácilmente hidrolizados por ciertos microorganismos procariotas y Eucariotas liberando  $\text{SO}_4^{2-}$  al ambiente.

El metabolismo microbiano del Azufre tiene un impacto considerable en la biosfera transformando el  $\text{S}^0$  a estados apropiados para el crecimiento de las células, produciendo cantidades significativas de un aceptor de electrones  $\text{SO}_4^{2-}$  que puede actuar como un depósito importante de condiciones anóxicas, y contribuyendo a determinados procesos geoquímicos oxidativos como reductivos.

En los ambientes marinos, por ejemplo, los  $\text{SO}_4^{2-}$  a concentraciones de 28 mm. constituyen una gigantesca

reserva de S- alrededor de  $3,6 \times 10^{15}$  toneladas y las aguas oceánicas contienen más de 500 veces más equivalentes de oxidación en forma de  $\text{SO}_4^{2-}$  que de  $\text{O}_2$  ya que éste tiene una solubilidad relativamente baja. (34).

Actualmente se han descrito tres géneros de bacterias reductoras de  $\text{SO}_4^{2-}$ : desulfovibrio, una forma vibroide móvil, las Desulfomonas que son inmóviles y los Desulfotomaculum esporulados y termófilos; la distribución de estas bacterias es muy amplia, por tanto, sus representantes se encuentran en un amplio rango de pH, temperatura y salinidades en sedimentos y suelos.

Tradicionalmente se considera que ciertos Procariotes juegan un papel primordial en la oxidación del Azufre; éstos son: los oxidantes del Azufre quimiotróficos aerobios y Microaerofílicos, también denominados bacterias incoloras del azufre.

Otro grupo lo constituyen los oxidantes fototróficos anaeróbicos, bacterias violetas o bacterias verdes. Entre las primeras tenemos Quimiolitotróficos ejemplarizados por el género Thiobacillus y algunas bacterias deslizantes tales como Beggiatoa y Achromatium.

Los gérmenes Quimiotrofos oxidantes del Azufre también

abarcaban la Arqueobacteria termófila, *Sulfolobus acidocaldarius* que ocupa un nicho geotérmico característico.

Las bacterias fototróficas comprenden los Chromatiaceae (violetas), Las Chlorobiaceae (verdes), y las Flexibacterias Filamentosas y termófilas. (36)

## 2.2.8 El microorganismo termófilo y sus aplicaciones industriales.

2.2.1 Generalidades: el uso del microorganismo en la industria es de amplia aplicación. Algunos de los usos más interesantes lo constituyen el empleo de termófilos para la producción de combustibles y químicos. (37)

La temperatura óptima para el funcionamiento de los termófilos en la industria es de 50°C, ya que son incapaces de crecer y desarrollarse a temperaturas menores de 30°C, por lo que son microorganismos Termófilos obligados.

Los termófilos facultativos se aplican en procesos de fermentación industrial; éstos crecen y se desarrollan entre los 30 y 55°C, con una temperatura óptima de 45-50°C. (Rango Industrial).



La producción de combustibles y químicos por fermentación termofilica tiene fundamentada una relación existente entre los Carbohidratos y las Biomosas, lo que implica un proceso importante, ya que se puede hacer con dos (2) fines: Biodescontaminación ambiental y producción industrial.

El sustrato utilizado por estos microorganismos son Carbohidratos que se pueden obtener en cantidades industriales en los desechos orgánicos procedentes de: residuos de bosques, agricultura, basuras municipales y desechos animales. Se debe tener en cuenta que las biomosas Termófilas necesitan una fracción de Carbohidrato adecuado para funcionar al tope; esto ayuda a disminuir los costos en los procesos químicos; esto equivale a trabajar con la cantidad de sustrato óptima necesaria para que la biomasa funcione en óptimas condiciones.(38).

Para los procesos biotecnológicos el comportamiento de estos organismos a temperaturas altas presenta muchas ventajas: una de ellas es que al aumentar la temperatura disminuye la viscosidad y la tensión superficial del agua, con los consiguientes efectos sobre las fermentaciones microbianas. Además, las contaminaciones por fagos o bacterias parásitas de los medios de cultivo

se observan con menor frecuencia en las fermentaciones realizadas a temperaturas elevadas, ya que los microorganismos que soportan estas temperaturas son muy pocos.

Un aumento de la temperatura disminuye la solubilidad de los compuestos gaseosos (Oxígeno, Hidrógeno, y Metano); así, el índice de Oxígeno disuelto en el agua a 70°C es igual al 5% del índice a 20°C.

A escala industrial, los procesos que se desarrollan sin Oxígeno (anaerobiosis) quedarán por tanto favorecidos a altas temperaturas, además, en las fermentaciones realizadas a escala industrial, el empleo de los organismos termófilos mejora también ciertos procesos.

Al altas temperaturas la recuperación de los productos de catálisis o fermentación es más fácil a causa de la disminución de la viscosidad del medio de cultivo y del aumento de solubilidad de los compuestos no gaseosos; por otra parte, si la temperatura es bastante elevada es posible mejorar la destilación de los productos volátiles que podrían inhibir el crecimiento de las células o que son en sí mismos interesantes, como es el caso de la producción de Etanol.

Además, la actividad metabólica provoca una producción de calor que ha de ser eliminado cuando se utilizan microorganismos sensibles a altas temperaturas.

Ahora bien, la transferencia de las fermentaciones termófilas no tienen necesidad de refrigeración, lo cual constituye un ahorro de energía y, por lo tanto, reduce el costo del proceso, incluso, cuando se realiza a alta temperatura, la operación resulta más sensible, ya que un proceso enzimático industrial se desarrolla más rápidamente si están generando enzimas termófilas.

A raíz de las diferentes crisis petroleras se han desarrollado nuevos programas destinados a abandonar progresivamente la utilización de energía fósiles y valorar más la biomasa, ya que ésta es una buena fuente de energía renovable y almacenable.

En la formación de biogas de metanización, las bacterias etanógenas termófilas son muy utilizadas en las instalaciones depuradoras para la digestión anaerobia de los afluentes industriales: basuras domésticas y residuos agrícolas. Esta fermentación mecánica realizada entre 50 y 60 °C desencadena la formación de biogas, compuestos esencialmente de Metano 60 ó 79% y de gas carbónico, a partir de Metano producido por otros microorganismos

eventualmente Termófilos.

Este proceso se emplea con la finalidad de descontaminar y producir energía; la producción de energía contribuye a la rentabilidad del mismo.

Algunos microorganismos Termófilos se emplean también para producir etano a partir de almidón; también hay otras reacciones industriales que se realizan a altas temperaturas.

Las proteasas constituyen el grupo más importante de enzimas industriales (con el 50-60% del mercado); la utilización de proteasas termoestables (termosilina de *Bacillus thermoproteolyctus*) es especialmente interesante en los detergentes y en la industria quesera.

A diferencia de las enzimas mesófilas, estas proteasas pueden utilizarse también en síntesis orgánica. La producción industrial de aspartame se hace mediante una termilisina en disolventes orgánicos.

También se menciona la explotación industrial de la amilasa (*Bacillus stearothermophilus*) que convierte el almidón en glucosa; su utilización a altas temperaturas favorece la disociación de almidones; ésta es una enzima





termoestable a 120°C.; otra enzima termoestable a 75°C., es la glucosa isomerasa (Bacillus coagulans) que se emplea en la industria de bebidas no alcohólicas, para convertir la glucosa en fructuosa (el poder edulcorante de la fructuosa es dos veces más alto que el de la glucosa).

Otras aplicaciones de la termofilia es la del empleo de enzimas termoestables como modelos para la producción de otras nuevas enzimas que podrían obtenerse mediante procesos de ingeniería genética. (39).

**2.2.8.2 Lixiviación:** la lixiviación es un proceso hidrometalúrgico en el cual los metales son separados por solubilización de los compuestos minerales; una vez solubilizados los metales, son concretados por procesos no biológicos. La lixiviación microbiana ha sido aplicada a escala industrial en lixiviación de cobre de los desechos a enorme escala. Los principales beneficios de este proceso son: Bajos costos en las operaciones, disminución en los índices de contaminación ambiental.

Los microorganismos que participan en procesos de lixiviación son: Thiobacillus ferroxidans y Leptospirillum Ferroxidans.

Existen dos (2) grupos de microorganismos termófilos utilizados para la canalización en la extracción de metales de los minerales; son las especies de Sulfolobus y Thiobacillus, ambos grupos son termófilos, acidófilos, y quimiolitotrofos.

El Sulfolobus no solo oxida Azufre, sino que también oxida Hierro Ferroso. El aislamiento de Sulfolobus de ambientes de lixiviación metálica fue reportado en 1983 por Maesch y Norris, quienes lo encontraron en los canales de drenaje de las minas (40).

## 2.3 VARIABLES

**2.3.1 Temperatura:** la Temperatura es un factor determinante en el desarrollo y sobrevivencia de los microorganismos. En el caso de las bacterias Termófilas, éstas presentan una composición estructural definida, la cual no le permite la supervivencia a temperaturas inferiores a su límite de crecimiento Termófilo, comprendido entre unos 55°C hasta 110°C (límites de Temperatura superior hasta hoy encontradas) (41).

En el desarrollo de esta investigación, la temperatura fue un factor que siempre estuvo presente en el muestreo y es necesario considerar las posibles variaciones de la

temperatura entre la toma de la muestra, el transporte y el momento de la incubación.



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 POBLACION

Para la realización del muestreo se seleccionaron tres (3) fuentes termales, las cuales forman parte del Sistema Hidrotermal del Ruiz y éstas fueron:

- Zona Termal de Botero Londoño. (Figura 1.)
- Fuente Termal Hotel Termales (Figura 2.)
- Fuente Termal Aguas Calientes (Figura 3.)

Clasificadas de acuerdo con su composición química en Clorada Neutra la primera, y ácido Sulfatadas las dos últimas.

#### 3.2 MUESTRA

Se tomó un total de 500 muestras, distribuidas de la siguiente manera:

- 100 muestras en la zona termal de Botero Londoño.

- 200 muestras en la fuente termal Hotel Termales
- 200 muestras en la fuente Termal Aguas Calientes

### 3.3 MATERIALES Y EQUIPOS

#### 3.3.1 Material de Vidrio.

- 350 tubos taparosca de 12 ml (estériles)
- 1 Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad.
- 1 Probeta de 500 ml de capacidad.
- 1 Cubeta de vidrio de 15 lts de capacidad.
- 3 Beaker de 500 ml de capacidad (estériles).
- 20 frascos de boca ancha estériles
- 10 pipetas 10 ml.
- 5 pipetas de 5ml.
- 20 Pipetas de Pasteur.
- 200 laminillas cuarzo cubreobjetos.
- 100 laminillas de vidrio portaobjetos.

#### 3.2.2 Otros materiales

- 10 pinzas (estériles)
- 5 Espátulas (estériles)
- 12 Jeringas (estériles)
- 2 Termos.

- 5 Gradillas

### 3.3.3 Equipos.

- Microscopio marca Olympus CH2
- Microscopio con adaptación para cámara fotográfica marca Nikon. fx-35A. Labophot.
- pHmetro marca SCHITT MAINZ C6710
- Incubadora
- Balanza analítica
- Termómetro digital (°C)

### 3.3.4 Reactivos

- Extracto de Levadura (Merck)
- SLn de Acido Sulfúrico.  $H_2SO_4$ . 10N.
- Sulfato de Amonio.  $(NH_4)_2SO_4$ .
- Fosfato diácido de potasio.  $KH_2PO_4$ .
- Sulfato de Magnesio.  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- Cloruro de calcio.  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$
- Sulfato de Zinc.  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- Cloruro de cobre.  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$

- Naranja de acridina
- Suero fisiológico

### 3.4 METODOLOGIA- PROCEDIMIENTO

#### 3.4.1 Preparación de los medios de cultivo.

**3.4.1.1 Medio de enriquecimiento:** este medio se preparó a partir de una solución de Extracto de levadura al 0.1% (p/v). Se midieron 250 ml de Agua destilada en un erlenmeyer de 550 ml de capacidad; luego se pesó un gr. de extracto de levadura (Merck) y se disolvió en los 250 ml. de agua Destilada. Posteriormente se ajustó a un volumen de 1000 ml., adicionando otros 759ml de agua destilada.

Luego se procedió a acidificar la solución preparada con un la solución de ácido sulfídrico ( $H_2SO_4$ ) 10 N, previamente preparada. Esta solución de ácido sulfídrico, 10 N, se fue agregando, gota a gota, a la solución de extracto de levadura y se hicieron mediciones periódicas con el pH metro, hasta llegar a un pH deseado de 2.

Al final se obtuvo una solución de extracto de Levadura al 0,5%, (p/v), con un pH final de 2, la cual se envasó en tubos, los cuales se llevaron al autoclave para una

esterilización por 15' a 120 libras de presión para ser usados posteriormente.

**3.4.1.2 Medio Selectivo:** consiste en un medio de sales minerales, complementado con extracto de Levadura y acidificado a un pH de 2 con una solución de ácido Sulfúrico, 10 N.

Para la preparación de este medio se midieron en un Beaker 200 ml. de agua destilada y se agregaron las siguientes cantidades de reactivos, previamente pesados en la balanza analítica: Sulfato de Amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,3 gr., Fosfato Diácido de Potasio  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ , 0,28gr; Sulfato de Magnesio  $(\text{MgSO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 gr; Cloruro de Calcio  $(\text{CaCl}_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,07 gr; Cloruro Férrico  $(\text{FeCl}_3) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 gr; Cloruro de Manganeso  $(\text{MnCl}_2) \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,0018 gr Pentaborato de Sodio  $(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 0,0045 gr Sulfato de Zinc  $(\text{ZnSO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,00022 gr Cloruro de Cobre  $(\text{CuCl}_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,00005 gr Molibdato de Sodio  $(\text{NaMoO}_4) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,00003 gr Vanadil Sulfato  $(\text{VO}_2\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,00003 grms Sulfato de Cobalto  $(\text{CoSO}_4)$ , 0,00001 gr.

**Nota:** los compuestos Sulfato de Cobalto, Cloruro de Manganeso y Vanadil Sulfato no fueron utilizados, ya que no hubo existencia de éstos en la central de materiales y su gestión en otras instituciones no fue posible.





Una vez disueltos estos reactivos en los 200 ml de agua destilada. Se pesó un gramo (1 gr.) de Extracto de Levadura, el cual se le añadió a la solución de sales minerales y se procedió a ajustar a 1 litro el volumen con agua destilada. Luego se procedió a acidificar la solución preparada añadiendo gota a gota una solución de ácido sulfúrico, 10 N, previamente preparada y se hicieron mediciones periódicas con el pH metro para obtener un pH deseado de dos (2).

Al final fue obtenida una solución de sales minerales complementada con extracto de levadura al 0.1% de concentración y pH de dos(2), con un volumen total de un litro, la cual se envasó en tubos tapa rosca y se llevó al autoclave a 120°C, 15'. Para ser usadas posteriormente.

### 3.4.2 Preparación de la solución reactiva para la técnica de fluorescencia

#### 3.4.2.1 Clasificación y precauciones

El reactivo naranja de acridina, es extremadamente nocivo. Por su toxicidad aguda oral, dermal, inhalativa, así como por indicios considerables de posibles daños para la salud, posiblemente irreversibles, por absorción

única repetida o de larga duración, por tanto se tomaron las precauciones correspondientes para la manipulación correcta de reactivos, tales como el uso de doble guante, gorro y gafas protectores, al igual que máscara antigases, con el fin de evitar el contacto con el cuerpo y la inhalación de vapores, ya que se pueden ocasionar posibles daños para la salud en caso de empleo inadecuado y es posible descartar totalmente una acción cancerígena, alteración genética o teratogena, al contacto con la piel o mucosa (manual de productos químicos para la investigación y la producción industrial) Merck.(42)

**3.4.2.2 Colorante Naranja de Acridina.** Se midieron 500 ml de solución isotónica de Cloruro de Sodio (Na) en una probeta y se agregaron 0.3 g. del Reactivo Naranja de Acridina, previamente pesado en la balanza analítica, obteniendo así una solución al 0.06% (Peso Volumen).

Los reactivos anteriormente mencionados, tienen las siguientes características químicas:

Naranja de Acridina:

C.L N°4600, (pág. 902)

Sinónimos Basic Orange 3 RN,

$C_{17}H_{20}N_3Cl$ ; M= 301.82 g/M

Berl. E 3/4 XXII, 5490, CAS 65-61-2

Máx: 498 nm

- Margen de fusión 239 - 241°C

Soluble en agua etanol

Presentación envases de 25 g. (43)

### 3.4.2.3 Solución Isotónica de Cloruro de Sodio (Na)

Solución estéril libre de pirógenos

Sinónimos: Suero fisiológico

Cada 100 ml contienen Cloruro de Sodio =  
= 900 mg.

Contenido aproximado en MEQ por litro:

Sodio (Na) = 155

Cloro (Cl) = 155

### 3.4.3 Descripción de la técnica

Se tomaron 200 laminillas de cuarzo y se sumergieron en la solución una vez preparado, por espacio de 10 minutos al cabo de los cuales se sacaron y se colocaron delicadamente sobre un paño que no soltara lanas, para secarlas al aire en un cuarto oscuro.

Una vez completamente secas las laminillas se utilizaron para cubrir las muestras sometidas a estudio, que se habían colocado con anterioridad sobre las laminas portaobjetos.

Terminado este procedimiento se procedió a realizar el respectivo análisis bajo el objetivo del microscopio para lo cual se utilizó un equipo de epifluorescencia marca Nikon FX- 35A. Labophot. Que consta de un microscopio automático de fluorescencia con adaptación para cámara fotográfica, filtro de interferencia de 515 nanómetros, espejo dicroico de 515 y objetivos de 60X para la técnica de fluorescencia y, lámpara de vapor de mercurio de 50 waticos, objetivo de 60X y una apertura numérica de 0.65 para contraste de fase.

**3.4.4 Procedimiento para la toma de muestras.** Se utilizaron tubos tapa rosca, frascos de boca ancha, jeringas, pinzas y espátulas debidamente esterilizadas. Para el aislamiento de bacterias del género Sulfolobus fueron preparados dos medios de cultivo; un medio de enriquecimiento y otro medio selectivo descrito y utilizado por T.D. Brock en el aislamiento de bacterias del género Sulfolobus.

**3.4.5 Muestreo.** Los muestreos fueron realizados en el segundo semestre de 1992, el año 1993, y segundo semestre de 1994 con una periodicidad aproximadamente de un mes de acuerdo con la programación determinada para el

observatorio Vulcanológico Nacional (INGEOMINAS): sede



Manizales. Esta programación es asignada al equipo Técnico Científico de investigación geoquímica y es realizada en la última semana de cada mes.

Algunas de las salidas de campo fueron canceladas por contratiempos de última hora no previstos por el observatorio vulcanológico.

Una vez confirmada la salida de campo se prepararon los diferentes medios, equipos e instrumentos para ser usados en el sitio de muestreos.

**3.4.5.1 Zona Termal Botero Londoño.** Se tomaron un total de 100 muestras a diferentes temperaturas con el fin de tenerlas incubadas y monitorearlas como grupo control. Para esto 50 muestras fueron incubadas en medio de cultivo ( 25 en medio selectivo, y 25 en medio enriquecido). Y cincuenta sin inocular en ningún medio (figura 1).

**3.4.5.2 Fuente Termal Hoteles Termales.** Se recogieron un total de 200 muestras con el fin de aislar bacterias del género Sulfolobus. (Figura 2.); para lo cual fueron inculados 140 muestras en medio de cultivo y 60 fueron observadas al microscopio en fresco.

**3.4.5.3 Fuente Termal Aguas Calientes.** Se tomaron un total de 200 muestras con el propósito de aislar bacterias del género Sulfolobus (Figura 3).

Para este propósito 140 muestras fueron inoculadas en medios de cultivo y 60 muestras fueron observadas al microscopio.

El empleo de medios de cultivo en el aislamiento de bacterias del género Sulfolobus en las fuentes del Hotel Termal y Aguas Calientes se debe a que estas aguas presentan un pH, temperatura y concentraciones de Azufre favorables para el crecimiento y desarrollo de esta bacteria. Según estudios realizados en otros ambiente termal.

La fuente hidrotermal Botero Londoño, posee la Temperatura favorable, pero no presenta ni el pH ni las concentraciones de Azufre favorables para la sobrevivencia de las bacterias pertenecientes a este género.

La composición química, pH y temperatura de las fuentes Botero Londoño, Hotel Termal y Aguas Calientes; muestreadas en el segundo semestre del año 1992 y 1993 son presentadas en la tabla 7,8, y 9 respectivamente.

**3.4.6 Inoculación.** Los medios de cultivo anteriormente descritos fueron utilizados en las Aguas de las Fuentes Termal de Aguas Calientes y el Hotel Termal con el fin de obtener el aislamiento de bacterias del género Sulfolobus y fueron distribuidos de la siguiente manera:

**3.4.6.1 Fuente Termal Aguas Calientes:** de las 140 muestras tomadas en medios de cultivo en esta fuente, 80 muestras fueron inoculadas en medio de enriquecimiento y 60 muestras se inocularon en el medio selectivo para el aislamiento de bacterias termófilas género Sulfolobus.

**3.4.6.2 Fuente Termal Hotel Termales:** en esta fuente se tomaron 140 muestras para inocular en medios de cultivo, de los cuales 80 fueron inoculadas en medio de enriquecimiento y las otras 60 fueron inoculadas en medios selectivo con el mismo fin.

Las muestras se tomaron agregando aproximadamente 10 ml. de agua Termal a los tubos que contenían los medios de cultivo mencionados. La muestra de agua fue recogida usando tubos y jeringas estériles y se tomaron las muestras de diferentes partes de la fuente (Del fondo, medio y de la superficie).

Se depositaron pequeños fragmentos de roca del fondo de la fuente y pequeñas piedras recubiertas de Azufre en el fondo de los tubos.

De acuerdo con estudios realizados se ha podido



establecer que el Sulfolobus tiene la particularidad de adherirse fuertemente a los cristales del Azufre.

**3.4.6.3 Zona Termal Botero Londoño:** para la recolección de las muestras en esta fuente no se utilizaron medios de cultivo en las cantidades iguales a las fuentes anteriores debido a que las condiciones de, pH, acidez y concentración de Azufre no favorecen el crecimiento de la bacteria Sulfolobus, por lo tanto, se hizo una recolección de la muestra usando tubos estériles con el fin de tenerlos como grupo control; una vez en el laboratorio se distribuyeron de la manera que se indica en el aparte (3.4.5.1) al igual que en las otras fuentes las muestras fueron tomadas en diferentes puntos y a diferentes temperaturas en la zona hidrotermal. Las temperaturas para la toma de la muestra oscilaron entre 55 y 92°C.

**3.4.7 Incubación:** las muestras obtenidas en las Fuentes del Hotel Termal y Aguas Calientes y Botero Londoño fueron depositadas en el interior de un recipiente térmico con el fin de conservar la temperatura a la cual se encontraba en la fuente; este procedimiento se realizó desde el momento en que fue tomada la muestra en la zona Termal hasta el momento de la incubación en el laboratorio; para este propósito se agregó agua termal al



termo y se depositaron los tubos en su interior; una vez transportada la muestra hasta el laboratorio se incubaron a 65°C por 7 días consecutivos.

El agua termal agregada al recipiente térmico se encontró a una temperatura de 62°C.

Nuevamente fue medida en el momento de sacar los tubos en el laboratorio para llevarlos a la incubadora y la temperatura fue de 50°C.

De esta manera se concluyó el trabajo de campo que tuvo como objetivos hacer aislamiento de bacterias del genero sulfolobus en medios de cultivo y las correspondientes técnicas de fluorescencia con naranjado de acridina para su identificación.

## 4. RECURSOS

### 4.1 RECURSOS HUMANOS

4.1.1 Investigador: Carlos Arturo Granada Torres.

#### 4.1.2 Asesores.

- Jorge Enrique Pérez. Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Especialista en Inmunología. Docente Universidad Católica de Manizales.

- Claudia Alfaro V. Química. Observatorio Vulcanológico Nacional. Ingeominas. Manizales.

- Fernando Delgado Blandón. Licenciado en Biología y Química. Magister en Microbiología Médica, Docente. Universidad Católica de Manizales.

#### 4.1.3 Asesor Metodológico.

Martha Eva Buritica de Monsalve. Bacterióloga y

Laboratorista Clínica. Magistra en Desarrollo Educativo y Social. Universidad Católica de Manizales.

#### 4.2 RECURSOS FISICOS

4.1.2 Planta física. Laboratorios Facultad de Bacteriología. Universidad Católica de Manizales.

4.1.2 Transporte. Observatorio Vulcanológico Nacional. Ingeominas, Manizales.

#### 4.3 RECURSOS FINANCIEROS

El presente trabajo de grado fue financiado en su totalidad por el investigador y la Facultad de Bacteriología de la Universidad Católica de Manizales con un costo aproximado de \$1.000.000.



## RESULTADOS

### 5.1 ANALISIS DE RESULTADOS

5.1.1 Fuente Termal Hotel Termal: de los 80 medios de cultivo enriquecidos que fueron inoculados con muestra del Hotel Termal, para el aislamiento de sulfobus, 3 (3.75%) de ellos presentaron una película sobrenadante en la superficie, de la cual se tomó una muestra que fue observada al microscopio.

En un muy bajo porcentaje (3 a 4 por campo en cien campos observados) se observaron estructuras bacterianas en pares y en cadenas. En el resto de los medios de cultivo de enriquecimiento (96.25%), y selectivos (100%), no se presentó ningún grado de turbidez que indicara desarrollo bacteriano. Estas cifras demuestran la dificultad de estos microorganismos para crecer y desarrollarse en medios artificiales una vez han sido retirados de su medio ambiente natural.

Según T.D. Brock este medio de enriquecimiento (extracto de levadura), después de inocularlo con una muestra de agua termal e incubarlo por un período de siete días,

presentaba una turbidez general en todo el tubo y una película sobrenadante, la cual, al ser observada al microscopio revelaría la presencia de bacterias del género *sulfolobus* en forma de pares o cadenas.

En los medios enriquecidos no se observó turbidez ni formación de película sobrenadante, razón por la cual se dejaron incubando 15 días más durante los cuales no se hizo ninguna observación. Pasado este tiempo se tomaron muestras de los tubos, en los cuales no se presentó película sobrenadante, pero sí enturbiamiento del medio, por lo que se procedió a hacer observaciones directas al microscopio, que mostraron la presencia de estructuras bacterianas. Para la identificación de estas estructuras se realizó la técnica de microscopía de fluorescencia con Naranja de Acridina mediante la cual fue posible evidenciar la presencia de estructuras bacterianas fluorescentes en forma cocoide, agrupadas en pares, tetradas y cadenas cortas adheridas a pequeños cristales de azufre elemental; (el cristal de azufre no fluoresce), lo que confirmó la existencia de bacterias del género *sulfolobus*. (Ver fig.8)

**5.1.2 Fuente termal aguas calientes:** las muestras inoculadas en medios de cultivo después de una incubación de 22 días a 65°C presentaron los siguientes resultados.

De los 80 medios enriquecidos usados para el aislamiento del sulfulobus, 20 (25%) presentaron una película sobrenadante en la superficie; de ésta se tomó una muestra para observación microscópica; en 5 de estos sobrenadantes (25%) se observaron estructuras bacterianas en forma cocoide en pares y en cadenas de a 3 y 4 células; en los restantes medios de enriquecimiento (70%), no se encontró formación de película sobrenadante, pero sí turbidez que indicaba el crecimiento bacteriano, lo que fue corroborado por fluorescencia. (Ver figura 9).

En los medios selectivos no se presentó formación de película sobrenadante ni turbidez del medio; tampoco se observaron estructuras bacterianas al examen directo. Lo que demuestra la exigencia por parte de estos microorganismos para desarrollarse en un medio selectivo no apropiado sin la cantidad de elementos y nutrientes adecuados para este fin.

**5.1.3 Fuente termal Botero Londoño:** las cien muestras obtenidas de esta fuente fueron observadas al



microscopio; la totalidad de estas muestras se caracterizó durante las observaciones microscópicas por la presencia de una gran cantidad de algas verde azules del género diatomea. También se observó la presencia de pocas estructuras bacterianas que no tomaron la coloración de fluorescencia con Naranja de Acridina, ni presentaron ninguna característica que indicara desarrollo bacteriano en ninguno de los medios de cultivo empleados, lo que demostró la existencia en estas aguas de microorganismos termófilos, diferentes al género *sulfolobus*. Esto se debe a que los índices de acidez de esta fuente son cercanos a la neutralidad, y las sulfobacterias como *sulfolobus* son acidófilas obligadas. Esto demuestra la enorme diversidad de microorganismos que se pueden encontrar en estas zonas. ¿Cómo se originó esta diversidad? está claro que las características morfológicas, fisiológicas y ecológicas de los diversos grupos de microorganismos se controlan, en el último término, por la constitución genética de los organismos, interactuando con los ambientes de los que hacen parte. Por tanto, la diversidad microbiana se origina de los procesos de recombinación genética y mutación, los cuales se realizan en un ambiente que selecciona constantemente.

La diversidad microbiana refleja la diversidad de habitats en esta zona aptos para la vida.

## CONCLUSIONES

- El desarrollo de bacterias en los medios de cultivo enriquecidos, después de 22 días de incubación a 65°C, permitió demostrar la presencia de bacterias termófilas del género *sulfolobus* en estas fuentes.
- El período de incubación planteado por T.D Brock es de siete (7) días y el período de incubación que tuvieron las bacterias objeto de este estudio es de 22 días en promedio, lo que permitió apreciar una gran diferencia (15 días en promedio), lo cual puede ser debido a diferentes factores biogeoquímicos propios de cada fuente.
- De acuerdo al protocolo de aislamiento en medios de cultivo enriquecidos, y a las técnicas de fluorescencia realizadas, se puede concluir que las bacterias allí encontradas pertenecen al género *sulfolobus*.



- Las micrografías tomadas presentan características que demuestran la presencia de bacterias sulfodependientes.

- El objetivo de realizar las técnicas de fluorescencia se cumplió en un 100%, gracias a la consecución oportuna del reactivo Naranja de Acridina, y a la toma correcta de micrografías que demuestran, finalmente, los logros alcanzados por la misma.

- Las bacterias del género *sulfolobus* son extremadamente versátiles, en vista de que no sólo oxidan el azufre elemental, sino también el hierro ferroso, el  $H_2S$  y otro tipo de compuestos orgánicos.

- Las condiciones de pH y temperatura seleccionan las especies microbianas que logran sobrevivir y adaptarse a cada biotopo.

- El pH es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de bacterias del género *sulfolobus*. El pH ácido favorece el crecimiento de microorganismos de este género mientras que el pH neutro no lo permite.

- Conforme aumenta nuestro conocimiento se hace cada vez más necesario para el científico especializarse y estudiar únicamente una pequeña parte de una ciencia.

- En la totalidad de las muestras analizadas procedentes de la fuente termal Botero Londoño (Grupo control) con pH cercano a la neutralidad, no se observaron bacterias que tomaran la coloración de fluorescencia lo que reafirma el hecho de que el *sulfolobus* es un acidófilo obligado.

- El presente trabajo demuestra el potencial de estudio e investigación microbiológica que representa las fuentes termales en cuestión.

- Sin la valiosa asesoría del personal técnico y científico de la Facultad de Bacteriología de la Universidad Católica de Manizales y del Observatorio Vulcanológico Nacional "Ingeominas" Sede Manizales, el cumplimiento de los objetivos del presente estudio no hubiese sido posible.

- Nadie puede saberlo todo, la especialización ha dado lugar al desarrollo de subdisciplinas de la microbiología, tales como virología, microbiología acuática, microbiología marina, microbiología agrícola, microbiología industrial, inmunología, biotecnología, microbiología espacial, biología molecular y microbiología médica entre otras. Lo que crea la necesidad de proyectar el perfil profesional de la Bacteriología hacia otros campos de acción.



- En lo que a la vida se refiere, el concepto que tenemos de medio ambiente es muy restringido. Si es demasiado caluroso, demasiado frío, demasiado húmedo, demasiado seco, demasiado salado, en fin, el hombre desaparece. Y, sin embargo, bajo todas estas condiciones, existen organismos que pueden vivir y desarrollarse.

- Sulfolobus tiene una forma generalmente esférica y produce distintos lóbulos. Las células se adhieren con fuerza a los cristales de azufre donde pueden visualizarse por microscopia con el empleo de tinciones fluorescentes.

- Sulfolobus vive en forma primaria en los habitats geotérmicos ricos en azufre como los manantiales calientes.

- El sulfuro de hidrógeno emitido de las fuentes se oxida por sulfolobus a azufre elemental y además se oxida a ácido sulfúrico y por tanto este organismo es responsable de la acidez de los habitats geotérmicos ricos en azufre.

## RECOMENDACIONES

- El Parque Nacional Natural los Nevados ofrece otros ambientes que por sus características se consideran también especiales para el habitat de microorganismos, lo que hace de este lugar todo un santuario de flora microbiana aún sin explorar; los estudios dirigidos hacia la vida microbiológica en este lugar podrían enfocarse en un comienzo a la caracterización taxonómica en cada uno de estos medios ambientes extremos.

- Las técnicas de aislamiento en cultivos enriquecidos y de microscopía de fluorescencia realizadas en el presente estudio han demostrado la existencia de bacterias termófilas del género *sulfolobus* en estas fuentes, sería de sumo interés para nuestra Facultad continuar con los estudios de microscopía electrónica que permitirían conocer más detalles de su estructura interna, su fisiología y bioquímica, ya que es este un género de bacterias con un promisorio futuro, tanto en el campo

biotecnológico como biomédico e industrial.

- En la totalidad de los medios de cultivo selectivos utilizados en este estudio no se presentó ninguna de las características que hicieran manifiesto el desarrollo bacteriano; esto se debió a la falta de algunos reactivos que hacen parte de la composición del medio. La consecución de los mismos sería muy importante para un próximo estudio y de esta manera lograr un aislamiento más eficaz.

- La creación de un equipo interdisciplinario dentro de la Facultad de Bacteriología para cubrir todas las áreas de estudio que ofrece esta zona, sería de sumo interés, ya que representaría un gran avance en el conocimiento de la geomicrobiología y la ecología microbiana de nuestro entorno.

- Las bacterias termófilas encontradas en estas fuentes poseen enzimas también termófilas que tienen múltiples aplicaciones a nivel industrial y biomédico. La búsqueda de una forma de explotación organizada de estos microorganismo a nivel biotecnológico traería muchos beneficios.



- Las bacterias del género *sulfolobus* utilizan al azufre elemental como substrato y principal fuente de energía. El producto final de este metabolismo es el ácido sulfúrico responsable de la acidez presente en algunas aguas termales. Esta característica podría ser explotada a nivel biotecnológico en la producción de ácido sulfúrico a escala industrial, ya que éste es un proceso biológico que no conlleva a ninguna contaminación de tipo ambiental, además de ser sumamente rentable.

- En la Fuente Termal Botero Londoño, se observaron al microscopio estructuras bacterianas que no tomaron la coloración con naranja de acridina ni se desarrollaron en los medios de cultivo empleados, lo que demuestra la existencia en estas fuentes de microorganismos termófilos diferentes al género *sulfolobus*. Sería de sumo interés hacer el aislamiento y la respectiva identificación de estos microorganismos en esta fuente al igual que un estudio sobre sus posibles aplicaciones bio-tecnológicas y el papel que desempeñan en la geomicrobiología de este lugar.

## CITAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) BROCK, T D. Microbiología 4ed. México: Hispanoamericana, 1984. p. 79, 85.
- (2) SAGAN, Carl. Cosmos. 1ed. Buenos Aires: Planeta, 1992. p. 123, 124.
- (3) PLANETA Tierra I.B.M. Serie de televisión educativa y cultural.
- (4) RINCON MENDEZ, Hermes. Primer ensayo geográfico ecogeodinámico regional del Parque Nacional Natural de los Nevados. División de Humanidades. Departamento de Ciencias Sociales. Sección geográfica. Armenia: Universidad del Quindío, 1982. p. 42.
- (5) INGEOMINAS. Geoquímica del Volcán Nevado del Ruiz. Manizales. Informe interno sin publicar. 1994.
- (6) EVALUACION GEOTERMICA DEL MACIZO VOLCANICO DEL RUIZ, COLOMBIA. Informe Final. Sept 1992. Geoconsul. S.A de CV (Estudios y consultoría en ciencias de la tierra).
- (7) LARIOS LOPEZ. Dina A. The hidroterminal system of Nevado del Ruiz Volcano, Colombia, 1992. pág.12, 36-39 : il + Mapas. Tesis. (Geóloga) Doctoral Examination and Dissertation Report B.S.C. Universidad del Salvador.
- (8) INGEOMINAS. Geoquímica del Volcan Nevado del Ruiz. Manizales. Informe interno sin publicar. 1994.
- (9) BROCK, T.D. Microbiología. 4ed. México : Hispanoamericana. 1984. p. 86/
- (10) VILLE A, Claude. Biología. 2ed. México : Interamericana. 1992. p. 505.

- (11) VILLE A, Claude. 1ed. Bogotá : Interamericana, 1981. p. 128- 139
- (12) RHEINHEIMER, Gerhard. Microabiología de las aguas. 1ed. Barcelona: Acribia, 1982. p. 13, 19, 21-27, 64-100, 114, 116, 119, 200, 206, 260, 261.
- (13) MCKAY. P, Chirtopher. La vida en Marte. En : Mundo científico. Vol 10, Nº 108 (1990); p. 1218-1226.
- (14) W.D. Grant y P.E Long. Microbiología Ambiental. Barcelona : Acribia, 1980. p. 37-49, 53-65.
- (15) CURTIS, Helena. Biología. 4 ed. Buenos Aires : Panamericana, 1985. p. 431-448.
- (16) BROCK, T. D. La vida a alta temperatura. En : Mundo científico. Vol 8, Nº 81 (1988); p. 664, 665.
- (17) BALTIMORE, Lodish y DARNELL, James. Biología celular y molecular. 2ed. Barcelona : Labor, 1988. p. 135-136.
- (18) BROCK, T D. La vida a alta temperatura. En: Mundo científico. Vol 8, Nº 81 (1988); p. 666-670.
- (19) BROCK TD. Microbiología. 4 ed. México : Hispanoamericana, 1984. p. 259-292.
- (20) VILLE A., Claude. Biología. 2ed. México : Interamericana, 1992. p. 506.
- (21) ROBERTIS Y ROBERTIS. Biología celular y molecular. 10ed. Barcelona : Ateneo, 1981. p. 12, 126.
- (22) DANCHIN, Antoine. El origen de la vida. En : Mundo científico. Vol 8, Nº 84 (1988); p. 935.
- (23) CURTIS, Helena. Biología. 4ed. Buenos Aires : Panamericana, 1985. p. 448-497.
- (24) VILLE A., Claudè. Biología. 1ed. Bogotá : Interamericana, 1981. p. 148-149.
- (25) BROCK TD. Microbiología. 4 ed. México : Hispanoamericana, 1984. p. 466-472.
- (26) BAKER. J. W., Jeffrey. Biología e Investigación científica. 4ed. México : Fondo educativo interamericano, 1970. p. 555-560.



- (27) VILLE A., Claude. Biología. 2ed. México : Interamericana, 1992. p. 507-510.
- (28) BALTIMORE, Lodish y DARNELL, James. Biología celular y molecular. 2ed. Barcelona : Labor, 1988. p. 573-575.
- (29) BROCK TD. Microbiología. 4 ed. México : Hispanoamericana, 1984. p. 698-700.
- (30) CABELL, R. Ecología microbiana. 2ed. Barcelona : Limusa, 1987. p. 10, 93-95.
- (31) W.D. Grant y P.E. Long. Microbiología ambiental. Barcelona : Acribia, 1980. p. 158-162, 178-180.
- (32) DINNIS, W. Grogan. Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus Sulfolobus: comparison of five wild type strains. Journal of Bacteriolog. Vol 17, Nº 12 (1989); p. 6710-6719.
- (33) BERGEY'S MANUAL. Of systematic Bacteriology. 8ed. 1989.
- (34) BROCK, T.D. Sulfolobus: A New Genus of sulfur oxidizing Bacteria living at low pH and high Temperature. Arch Microbiol. Nº 84 (1972); p. 54-68.
- (35) BROCK TD. Microbiología. 4 ed. México : Hispanoamericana, 1984. p. 700-707.
- (36) CABELL, R. Ecología microbiana. 2ed. Barcelona : Limusa, 1987. p. 105-187.
- (37) BROCK TD. Microbiología. 4 ed. México : Hispanoamericana, 1984. p. 708.
- (38) WIEGEL, Juergen. Industrial applications of thermostable enzymes : Use of thermophiles for the productio of fuels and chemical. Departmente of microbiology and center for biological resource recovery University of Georgya Athens. p. 219-228.
- (39) WIEGEL, Juergen. Methods for insolation and study of thermofiles. Department of microbiology and center for biological resource recovery University of Georgya Athens. p. 17-34.
- (40) BROCK, T.D. La vida a alta temperatura. En : Mundo científico. Vol 8, Nº 81 (1988); p. 670, 671.

(41) BRIERLEY. A, James y BRIERLEY. L, Corale. Microbial Mining usng thermophilic Microorganisms. Advanced Mineral Technologicis. p. 279-294.

(42) BROCK, T.D. La vida a alta temperatura. En : Mundo científico. Vol 8, Nº 81 (1988); p. 672-673.

(43) MANUAL DE PRODUCTOS QUIMICOS PARA LA INVESTIGACION Y LA PRODUCCION INDUSTRIAL (MERCK).

(44) MANUAL DE PRODUCTOS QUIMICOS PARA MICROSCOPIA. Riedel - de Haen.

## BIBLIOGRAFIA

BAKER. J. W., Jeffrey. Biología e Investigación Científica. 4ed. México : Fondo educativo interamericano, 1970. p. 555-560.

BALTIMORE, Lodish y DARNELL, James. Biología celular y molecular. 2ed. Barcelona : Labor, 1988. p. 135-136, 573-575.

BERGEY'S MANUAL. Of systematic Bacteriology. 8ed. 1989.

BRIERLEY. A, James y BRIERLEY. L, Corale. Microbial Mining usng thermophilic Microorganisms. Advanced Mineral Technologicis. p. 279-294.

BROCK, T.D. Microbiología. 4ed. México Hispanoamericana, 1984. p. 79, 85, 259-292, 466-472, 698-707.

\_\_\_\_\_. La vida a alta temperatura. En : Mundo Científico. Vol 8, Nº 81 (1988); p. 664-673.

\_\_\_\_\_. Sulfolobus: A New Genus of sulfur oxidizing Bacteria living at low pH and high Temperature. Arch Microbiol. Nº 84. (1972); p. 54-68.

BROCK, T. D. y MADRIGAN. T, Michael. Biology of Microorganism. 6ed. p. 809-813.

CAMBELL, R. Ecología microbiana. 2ed. Barcelona : Limusa, 1987. p. 10, 93-95, 105-187.

CENTRAL HIDROELECTRICA DE CALDAS S.A (CHEC). Investigación geotérmica Macizo Volcánico del Ruiz. Vol IV (1983); p. 161, 167.



- CURTIS, Helena. Biología. 4ed. Buenos Aires : Panamericana, 1985. p. 431-497.
- DANCHIN, Antoine. El origen de la vida. En : Mundo Científico. Vol 8, Nº 84 (1988); p. 935.
- DINNIS, W, Grogan. Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus Sulfolobus: comparison of five wild type strains. Journal of Bacteriology. Vol 17, Nº 12 (1989); p. 6710-6719.
- EVALUACION GEOTERMICA DEL MACIZO VOLCANICO DEL RUIZ, COLOMBIA. Informe Final. Sept 1992. Geoconsul S.A de CV (Estudios y consultoria en ciencias de la tierra).
- INGEOMINAS. Geoquímica del Volcán Nevado del Ruiz. Manizales. Informe interno sin publicar. 1994.
- LARIOS LOPEZ. Dina A. The hidrothermal system of Nevado del Ruis Volcano, Colombia, 1992. p. 12, 36-39: il + Mapas. Tesis. (Geóloga) Doctoral Examination and Dissertatation Report B.S.C, Universidad del Salvador.
- MCKAY, P, Christopher. La vida en Marte. En : Mundo Científico. Vol 10, Nº108 (1990); p. 1218-1226.
- NEEDHAM, P.R y NEEDHAM, J.G. Guía para el estudio de los seres vivos de las aguas dulces. 1ed. Barcelona : Reverté. 1978. p. 4, 6, 10.
- RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las Aguas. 1ed. Barcelona : Acribia, 1982. p. 13, 19, 21-27, 64-100, 114, 116, 119, 200, 206, 260, 261.
- RINCON MENDEZ, Hermes. Primer ensayo geográfico ecogeodinámico regional del Parque Nacional Natural de los Nevados. División de Humanidades. Departamento de Ciencias Sociales. Sección geográfica. Armenia : Universidad del Quindío, 1982. p. 42.
- ROBERTIS Y ROBERTIS. Biología celular y molecular. 10ed. Barcelona : Ateneo, 1981. p. 12, 126.
- ROSE, H, Anthony. Microbiología química. 2ed. Madrid : Alhambra, 1969. 73-77.
- SAGAN, Carl. Cosmos. 1ed. Buenos Aires : Planeta, 1992. p.123, 124.
- VILLE. A, Claude. Biología. 1ed. Bogotá : Interamericana, 1981. p. 128, 139, 148, 149.

VILLE. A, Claude. Biología. 2ed. México : Interamericana, 1992. p. 506-510.

W.D. Grant y P.E Long. Microbiología Ambiental Barcelona : Acribia, 1980. p. 37-49, 53-65, 158-162, 178-180.

WIEGEL, Juergen. Industrial applications of thermostable enzymes : Use of thermophiles for the productio of fuels and chemical. Departmente of microbiology and center for biological resource recovery University of Georgya Athens. p. 219-228.

\_\_\_\_\_. Methods for isolation and study of thermofiles. Department of microbiolgy and center for biological resource recovery University of Georgya Athens. P. 17-34.

TABLA 1. Análisis químico de aguas termales de interés biológico.

Localidad	Temp	pH	Ce	Ca	Mg	K	HCO <sub>3</sub>	SO <sub>4</sub>	CL	SiO <sub>2</sub>
Termales del Ruiz	61	1,79	>20000	166	291	138	>0.1	5306	1005	207
Aguas calientes	62	1,38	>20000	214	230	258	>0.1	8316	1752	150
Botero Londoño	92	7,75	2300	47	13	94	192	57	1128	155

Concentraciones en partes por millón (ppm) y conductividad eléctrica (C.E) en microhoms/cm. Fecha: 15 y 28 de Agosto de 1992

TABLA 2. Temperatura de crecimiento de algunas especies termófilas de microorganismos

Temperatura de Crecimiento °C		
Número de especies		
Género		
<b>Bacteria fotótrofas</b>		
Cianobacterias	16	55 - 70
Bacterias púrpura	1	55 - 60
Bacterias Verdes	1	70 - 73
<b>Bacterias Gram-positivas</b>		
Bacilos	15	50 - 70
Clostridio	11	50 - 75
Bacterias lácticas	5	50 - 65
Actinomicetos	23	55 - 75
<b>Otras Eubacterias</b>		
Tiobacilos	3	50 - 60
Espiroquetas	1	54
Desulfotomaculum	7	37 - 55
Aerobias Gram-negativas	7	55 - 75
Anaerobias Gram-negativas	4	50 - 75
<b>Arqueobacterias</b>		
Metanógenas	4	55 - 95
Sulfodependientes	18	55 - 110
Termoplasmas	1	37 - 55

Brook, T.D. La vida a alta temperatura. En: Mundo científico. Vol. 8. Nº 81 (1988); Pág. 665



TABLA 3. Límites inferiores de pH para diferentes grupos de organismos.

GRUPO	LIMITE DE pH INFERIOR APROXIMADO	ESPECIES DENTRO DEL LIMITE INFERIOR
<b>Animales:</b>		
Peces	4	Carpa
Insectos	2	Moscas
Protozoarios	2	Amebas. Heliozoarios
<b>Plantas:</b>		
Plantas vasculares	2.5 - 3	Eleocharis sellowiana Eleocharis acicularis Carex spp Plantas ericáceas (moras, zarzamoras, moras azules etc.)
Musgos	3	Sphagnum
<b>Protistas:</b>		
Algas eucariónticas	1 - 2	Euglena mutabilis Chlamydomonas acidophila Chorella spp
	0	Thiobacillus thiooxidans
	0	Acontium velatum
<b>Bacterias:</b>		
	0 - 8	Thiobacillus thiooxidans Sulfolobus acidocaldarius
	2 - 3	Bacillus, streptomyces
<b>Cianobacterias</b>		
	4	Mastigocladus Synechococcus



**TABLA 4. Límite de temperaturas superiores para el desarrollo de organismos vivos.**

Temperatura límite superior aproximada (°C)		
Grupo		
<b>Animales</b>		
Peces Vertebrados acuáticos	38	<b>EUCARIONTES</b>
Insectos	45 - 50	
Estras codos (crustáceos)	49 - 50	
<b>Plantas</b>		
Plantas vasculares	45	<b>LIMITE = 62 °C</b>
Musgos	50	
<b>Microorganismos</b>		
Protozoarios	56	
Algas	55 - 60	
Hongos	60 - 62	
<b>Microorganismos</b>		
Eubacterias fotosintéticas	70 - 73	<b>EUBACTERIAS</b>
Eubacterias quimiolitótrofas	85 - 90	
Eubacterias heterótrofas	85 - 90	
Arqueobacterias	> 100	
		<b>LIMITE = 90 °C</b>

Broock. T.D. La vida a alta temperatura. En : Mundo científico. Vol.8 N° 81 (1988): Pág. 665

TABLA 5. Propiedades de las arqueobacterias  
extremadamente termófilas

Género	Morfología	Número de Especies	2 -DNA G - C	Temperatura °C			pH Optimo
				MINIMO	OPTIMO	MAXIMO	
Aislamientos Volcánicos Terrestres							
Sulfolobus	Lobulada Esférica	2	37	55	75 - 87	87	2 - 3
Acidianus	Esférica	2	31	60	85 - 90	95	2
Thermoproteus	Bacilar	2	56	60	88	96	6
Thermofilum	Bacilar	1	57	60	88	96	5.5
Desulfurococcus	Esférica	2	51	60	85	93	6
Pyrobaculum	Bacilar	1	45	74	100	102	6
Aislamientos volcánicos submarinos							
Pyrodictium	Forma discoide con filamentos fijos anexos	2	62	82	105	100	6
Pyrococcus	Esférica	2	38	70	100	103	6 - 8
Thermodiscus	Forma discoide	1	49	75	90	98	5.5
Staphylothermus	Esferas con agregados interiores en grupo	1	35	65	92	98	6 - 7
Thermococcus	Esférica	1	56	70	88	95	5.8
Methanopyrus	Bacilar	1	60	85	100	110	6.5
Archaeoglobus	Cocoides	1	46	64	83	92	7

rock. T.D. y Madriagan. T, MichaeL. Biology of microorganism



TABLA 6. Generación de energía de las  
arqueobacterias extremadamente termófilas

Base nutricional	Reacción energética	Ejemplo
Iganófica	Compuesto orgánico + S <sup>0</sup> - H <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub>	Thermoproteus; Thermococcus; Desulfurococcus; Thermofilium; Pyrococcus
	Compuesto orgánico + O <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> O + CO <sub>2</sub>	Sulfolobus
	Compuesto orgánico - CO <sub>2</sub> + Ácidos grasos	Staphylothermus
	Compuesto orgánico - CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>	Pyrococcus
Itófica	H <sub>2</sub> + S <sup>0</sup> - H <sub>2</sub> OS	Acidianatus; Pyrodictium; Thermoproteus
	2S + 3O <sub>2</sub> + 5H <sub>2</sub> O - 2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfolobus; Acidianus
	4FeS <sub>2</sub> + 15O <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O - 2Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> + 2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfolobus
	4H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> - CH <sub>4</sub> + 2H <sub>2</sub> O	Methanopyrus

Broock, T.D., y Madrigant. T, Michael. Biology of  
microorganim.

TABLA 7. Composición química de la fuente Botero  
Londoño Nevado del Ruiz.

CONCENTRACION (ppm)																
FECHA	pH	T	Si	Al	Fe	Ca	Mg	Na	K	Mn	Li	Rb	Cu	Zn	HCl	HCO
Febrero - 91	8.14	90	60	N.D.	N.D.	48	4.6	554	76	0.40	0.87	0.03				
Mayo - 91	8.09	91	80	22	2.8	90	18.0	1166	74	0.40	3.48	<0.01				
Junio - 91	7.62	93	80	N.D.	1.0	40	5.0	438	76	0.34	3.42	<0.01				
Julio - 91	7.89	92	82	N.D.	0.1	40	5.0	436	76	0.30	3.52	<0.01				
Agosto - 91	7.05	91	80	N.D.	N.D.	44	36.0	620	84	0.20	3.20	0.04	N.D.	N.D.		
Novie. - 91			38		1.0	19	1.0	370	45	0.26	1.59	<0.04	<0.01	0.01	1011	
Marzo - 92			40	<1	1.0	17	1.0	340	43	0.24	1.58	0.04	<0.01	0.01	1011	
Abril - 92			40	<1	4.0	17	<1	340	40	0.40	1.63	<0.01	<0.01	0.01	1000	
Octub. - 92	7.52	93	80	<1	<1	46	5.0	620	84	0.10	3.72	0.01	0.06	0.06		
Nov. - 92	7.34	92	78	<1	212.0	44	4.0	600	84	0.10	3.60	0.01	0.01	0.06	1064	
Marzo - 93	7.48	93	68	0.1	0.1	44	4.0	614	90	<0.1	3.50	0.09		0.01	1069	
Abril - 93	7.49	93	76	<0.1	<0.1	44	2.4	680	84	0.34	3.80	0.62		0.01	1060	156
Junio - 93	7.31	91	78	<0.1	<0.1	43	3.2	598	79	0.46	3.60	1.60		0.06	1020	171
Julio - 93	7.37	90	74	<1	<1	42	3.2	596	78	0.28	3.60	<0.01		0.04	955	
Agosto - 93	7.35	94	70	<1	<0.01	46	3.6	540	66	<0.1	3.40	0.56		0.01	957	199
Septi. - 93	7.56	93	76	<1	<0.01	50	3.58	560	60	<0.1	3.40	0.60		0.01	1002	

Ingeominas. Geoquímica del Volcán Nevado del Ruiz. Manizales

**TABLA 8. Composición química de la fuente Hotel**  
**Termales Nevado del Ruiz.**

CONCENTRACION (ppm)															
FECHA	pH	T	Si	Al	Fe	Ca	Mg	Na	K	Mn	Li	Rb	Cu	Zn	HCl
Febrero - 91	1.49	63	96	576	126	254	218	466	104			0.56	0.04		
Junio - 91	1.53	63	104	672	92	224	238	384	116			0.58	0.01		
Julio - 91	1.40	63	98	692	90	232	246	504	116			0.60	0.01		
Agosto - 91	1.44	63	100	720	124	300	260	280	560	6.2	0.52	0.04	0.01	1.40	
Ocubre - 91			50	340	59	127	117	286	59	3.3	0.25	0.01	0.01	0.73	1.083
Novie. - 91			50	320	61	128	114	270	59	3.3	0.25	0.03	0.01	0.70	1.088
Dinies. - 91			50	330	60	127	114	270	60	3.3	0.23	0.02	0.01	0.71	1.078
Marzo - 92			52	340	60	128	112	270	60	3.3	0.23	0.04	0.01	0.72	1.083
Abril - 92			53	350	59	129	110	570	58	3.4	0.23	0.04	0.01	1.70	1.092
Junio. - 92	1.70	61	98	600	118	204	248	520	124	4.8	0.60	0.01	0.06	1.40	1.081
Julio - 92	1.68	61	102	600	120	204	242	540	122	4.8	0.60	0.01	0.08	1.42	1.078
Agosto - 92	1.60	62	104	600	120	204	234	500	122	4.8	0.60	0.01	0.04	1.40	1.083
Sep. - 92	1.41	63	98	580	116	202	236	480	114	4.6	0.62	0.01	0.06	1.40	1.092
Octu. - 92	1.85	62	100	600	116	202	240	500	120	4.8	0.58	0.01	0.08	1.40	1.092
Novie. - 92		63	96	414		184	204	460	106	4.4	0.52	0.01	0.08	1.28	964
Marzo - 93		64	94	580	90	206	236	476	120	5.0	0.56	0.01		0.96	1.029
Abril - 93		64	100	580	87	290	229	520	102	3.7	0.57	0.46		0.91	968
Junio - 93	1.63	62	100	590	122	300	236	516	116	6.6	0.40	1.60		0.96	1.078
Julio - 93	1.57	63	98	616	122	308	242	536	116	6.6	0.60	0.01		1.90	1.081
Agosto - 93	1.64	63	92	720	120	290	244	440	116	5.8	0.54	0.48		1.44	1.026
Septi. - 93	1.33	63	88	760	110	280	238	420	118	5.6	0.46	0.48		1.40	1.022
Octubre - 93	1.78	60	112	860	130	320	260	480	128	6.2	0.56	0.40		1.60	1.011
Dic. - 93	1.84		100	600	118	290	248	480	112	4.3	0.52	0.30		0.96	1.011



Figura 1. Fotografía: Zona Termal Botero Londoño

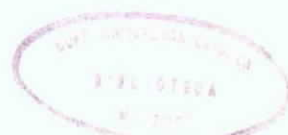




Figura 2. Fotografía: Fuente Termal Hotel Termales

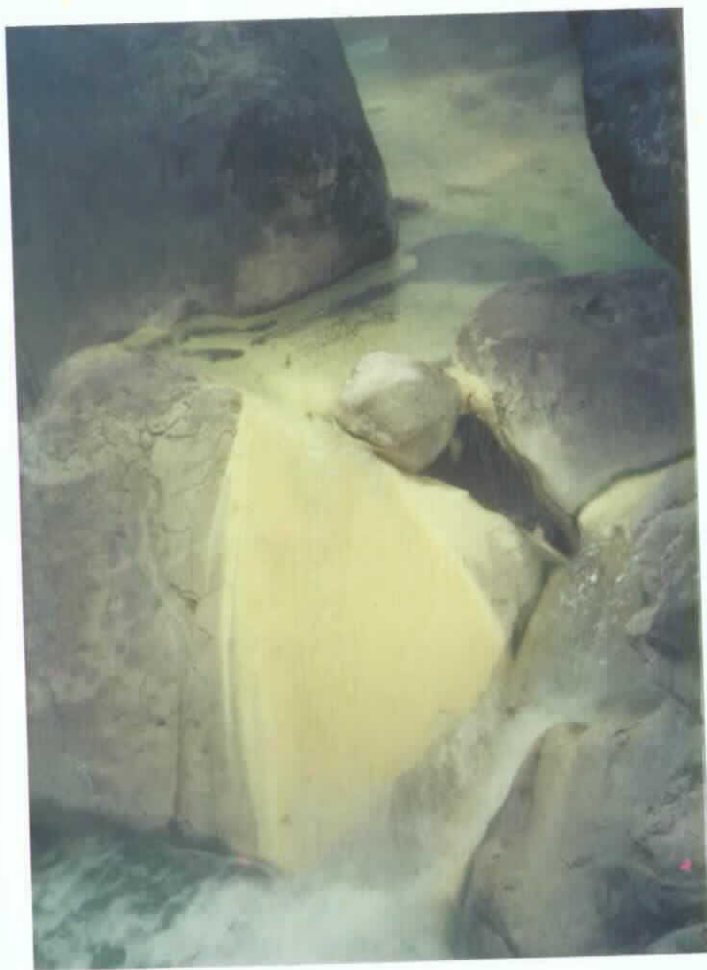


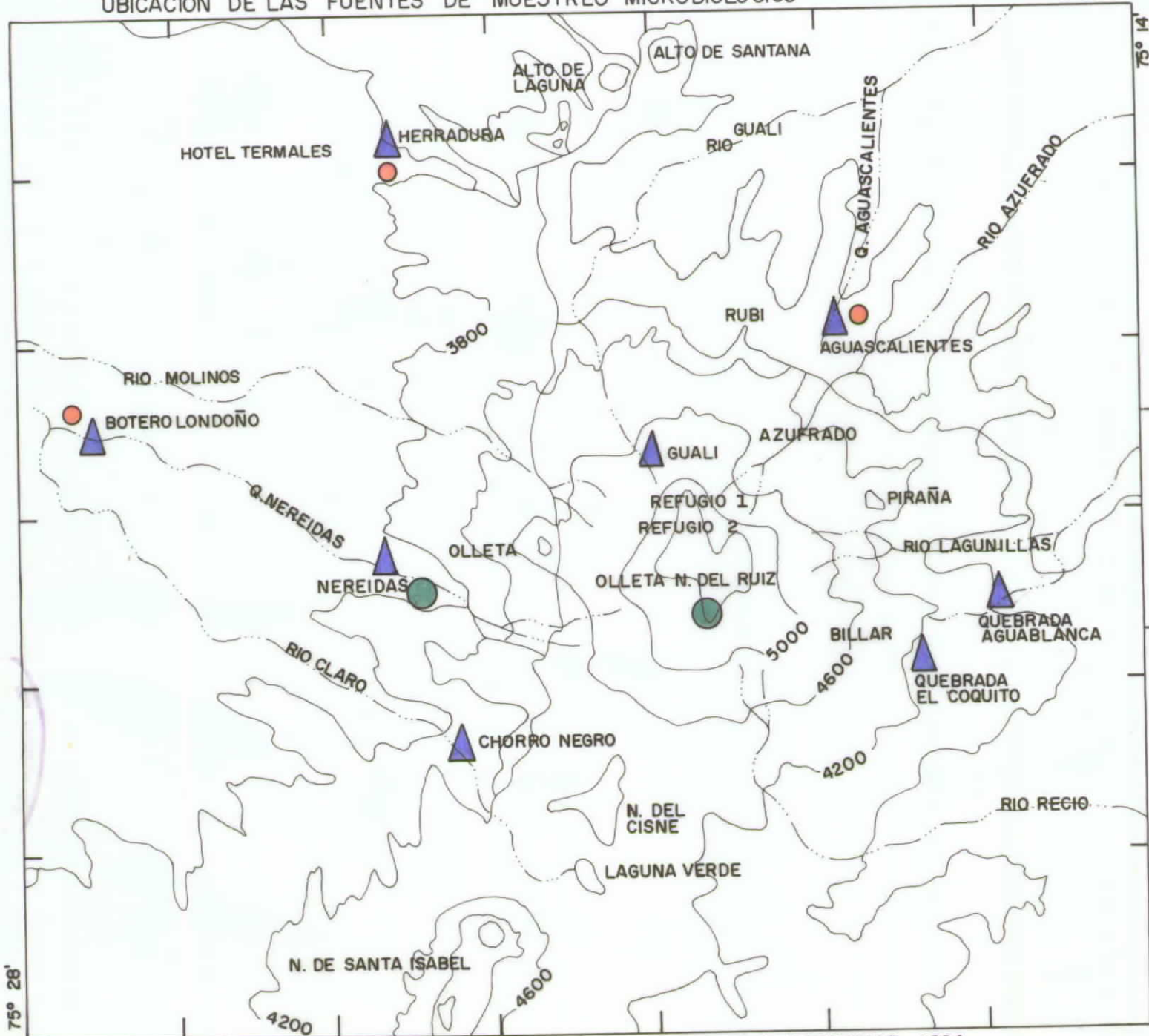
Figura 3. Fotografía: Fuente Termal Aguas Calientes.





UBICACION DE LAS FUENTES DE MUESTREO MICROBIOLÓGICO

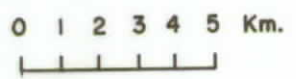
5° 00'



- FUENTES TERMALES DE INTERES MICROBIOLÓGICO
- ▲ FUENTES TERMALES
- FUMAROLAS

COORD. GEOGRÁFICAS DE FUENTES TERMALES :

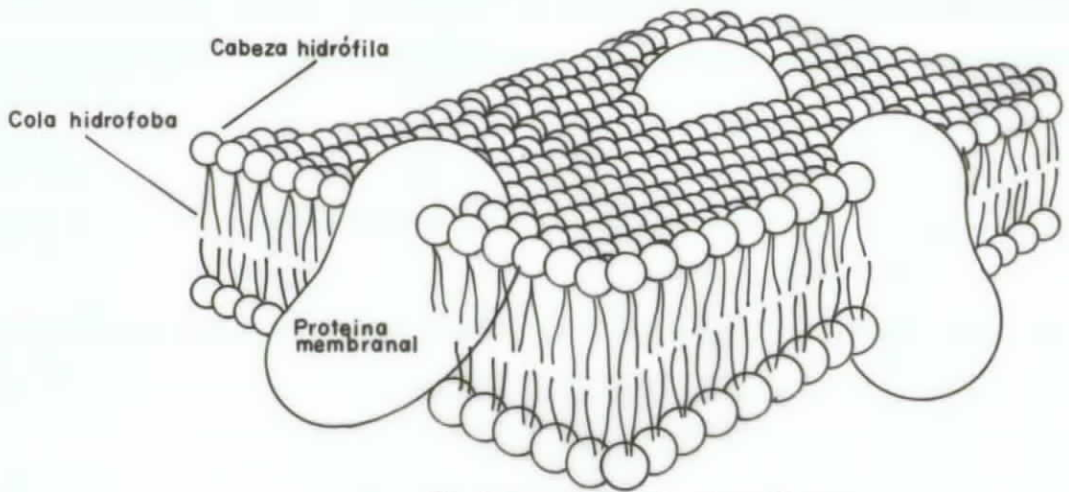
1. BOTERO LONDOÑO	4° 32' 33" LAT.	75° 16' 16" LONG.
2. AGUAS CALIENTES	4° 33' 55" LAT.	75° 10' 24" LONG.
3. HOTEL TERMALES	4° 34' 59" LAT.	75° 13' 51" LONG.



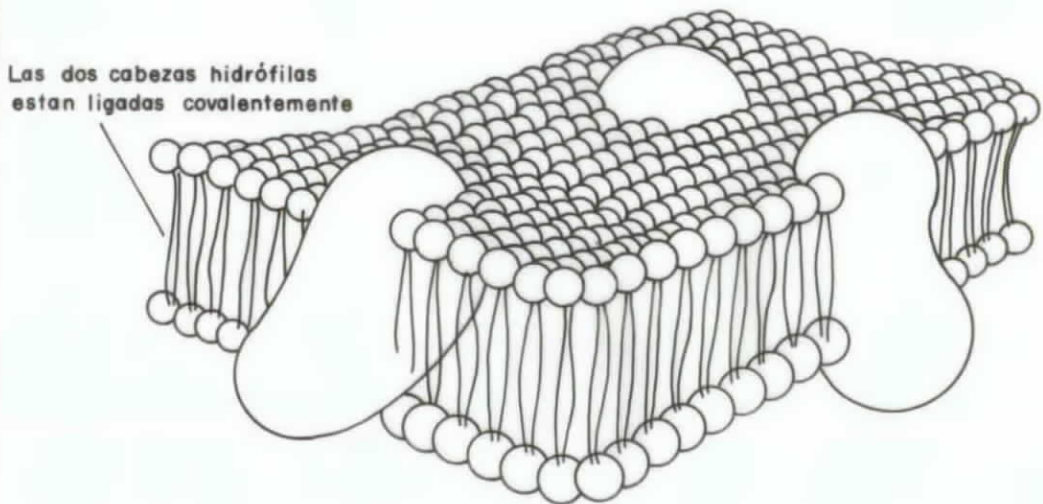
Tomado de INGEOMINAS , 1.994

75° 28'  
4° 48'

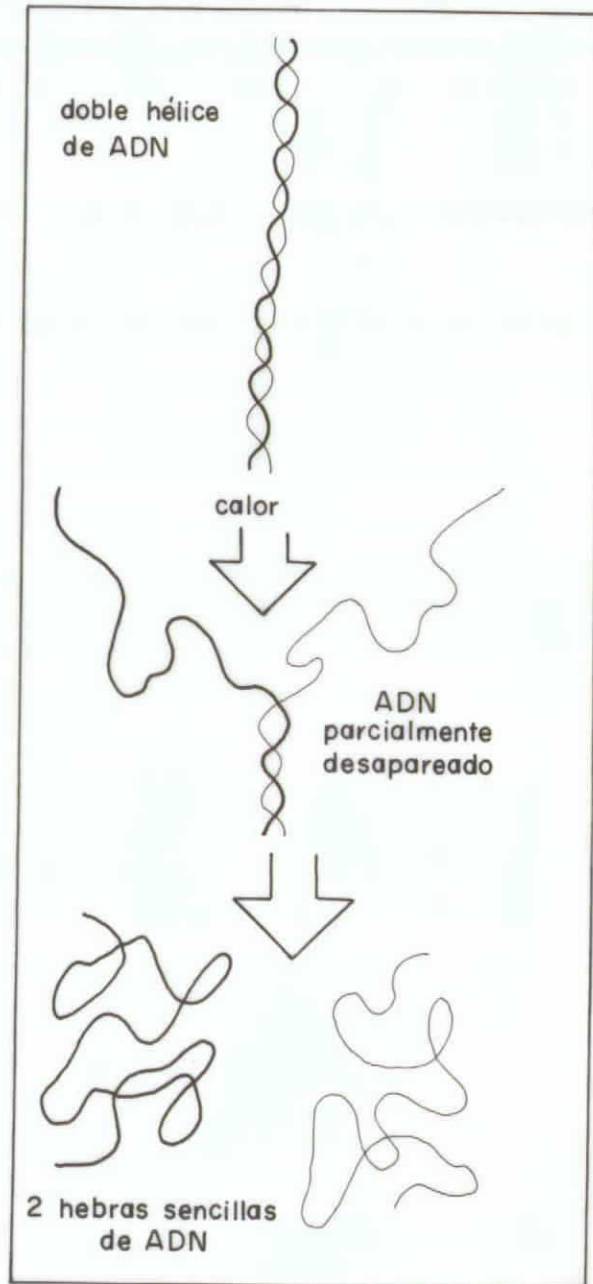
COMPARACION ENTRE LA ESTRUCTURA DE UNA MEMBRANA  
CELULAR CONVENCIONAL Y LA DE UNA ARQUEOBACTERIA

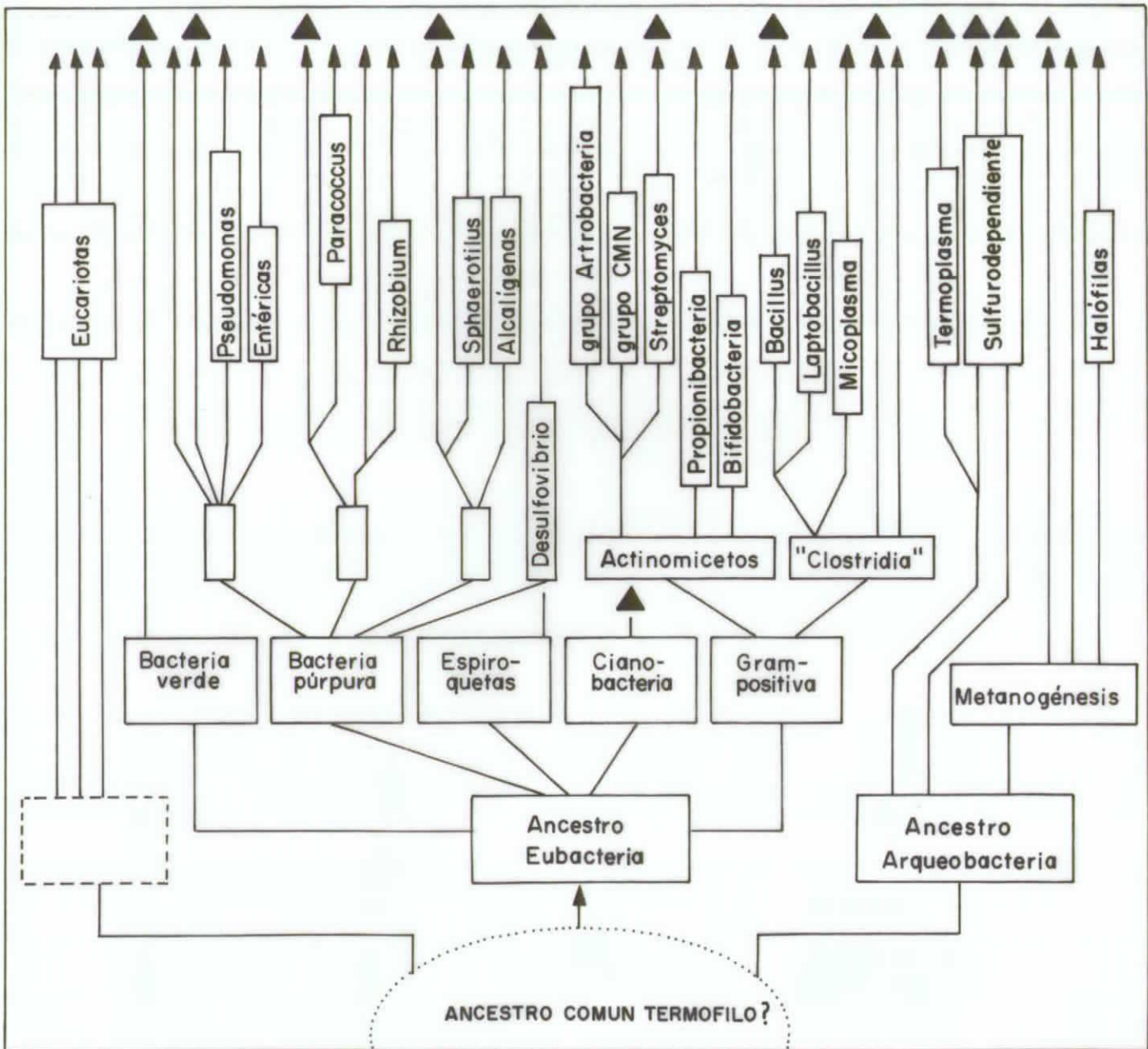


Membrana convencional en bicapa



Membrana de arqueobacteria en monocapa.





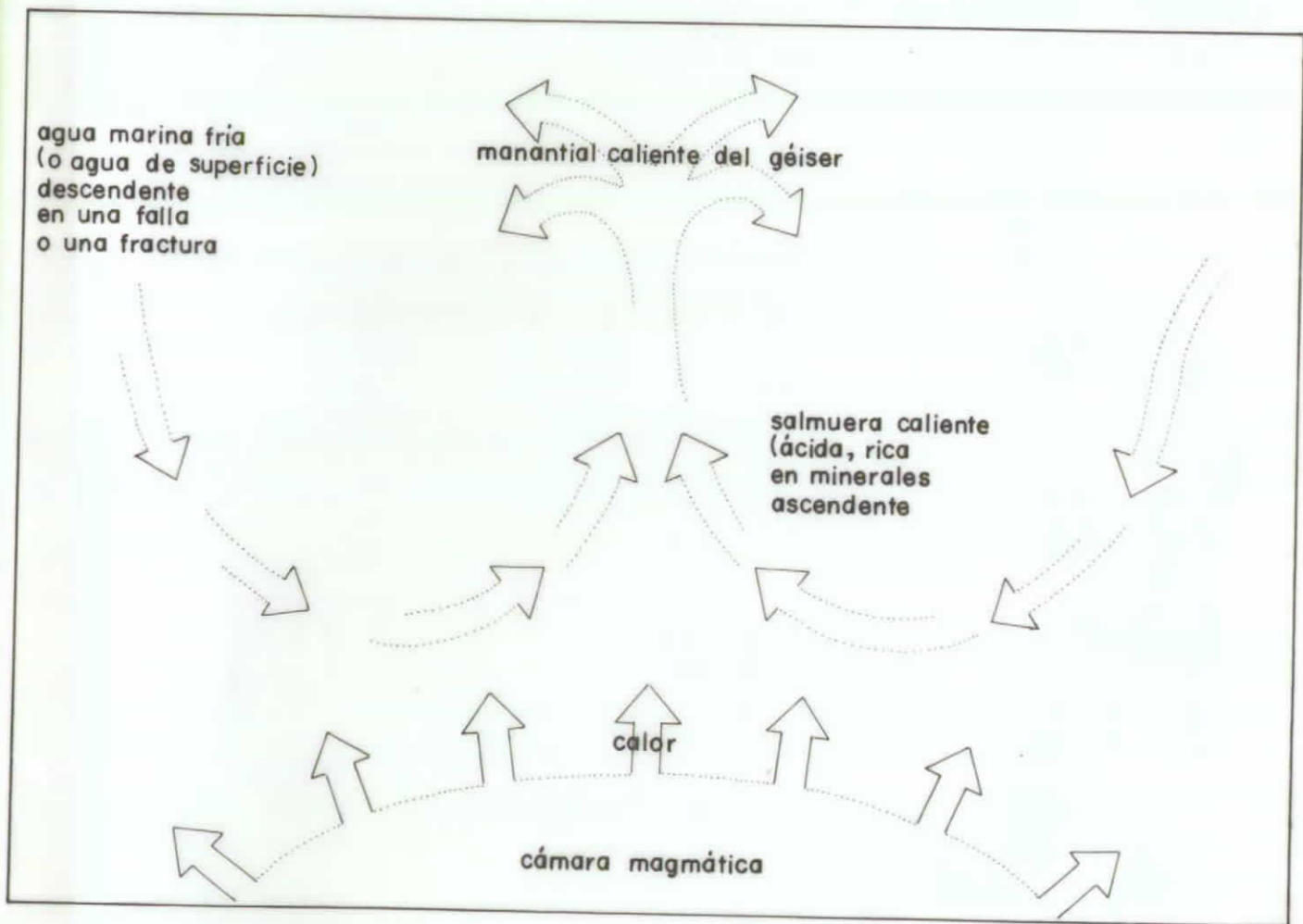


Fig. 102

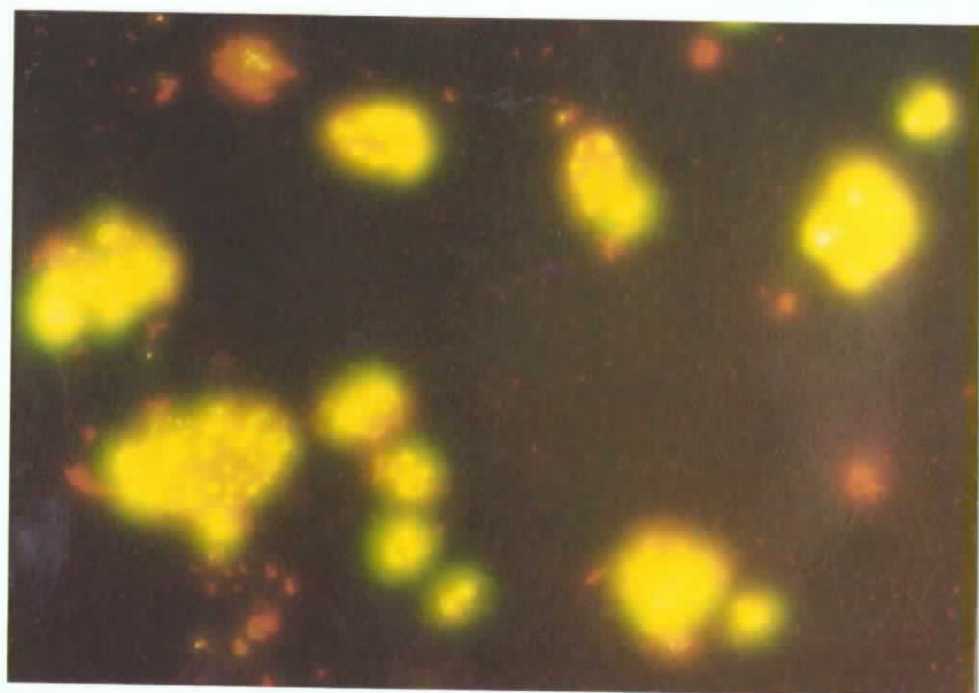
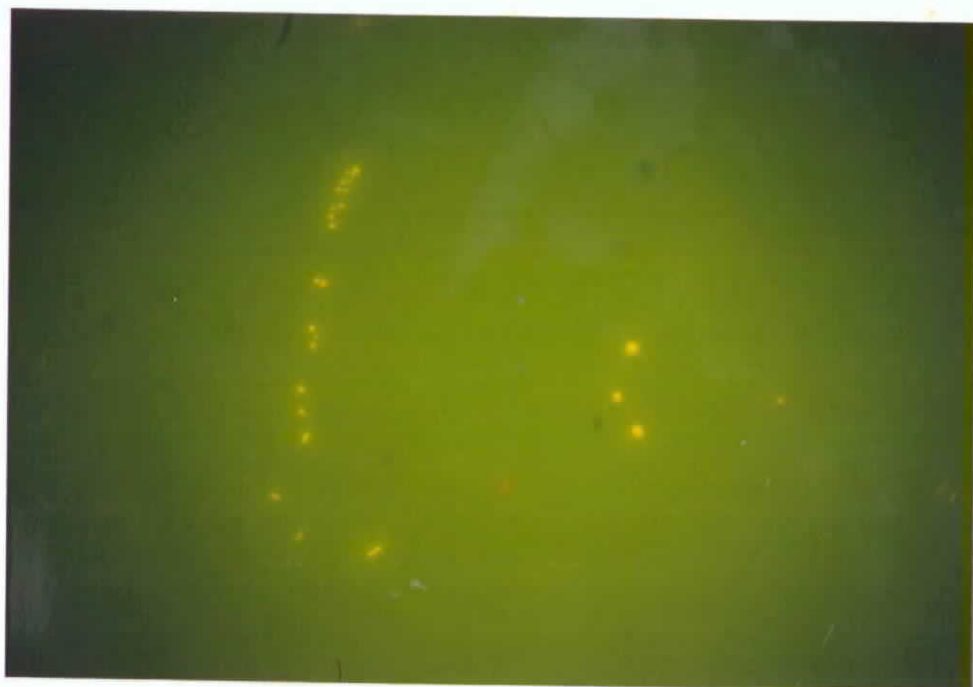


Figura 8. Micrografia de fluorescencia Muestra Fuente Termal Hotel Termales.

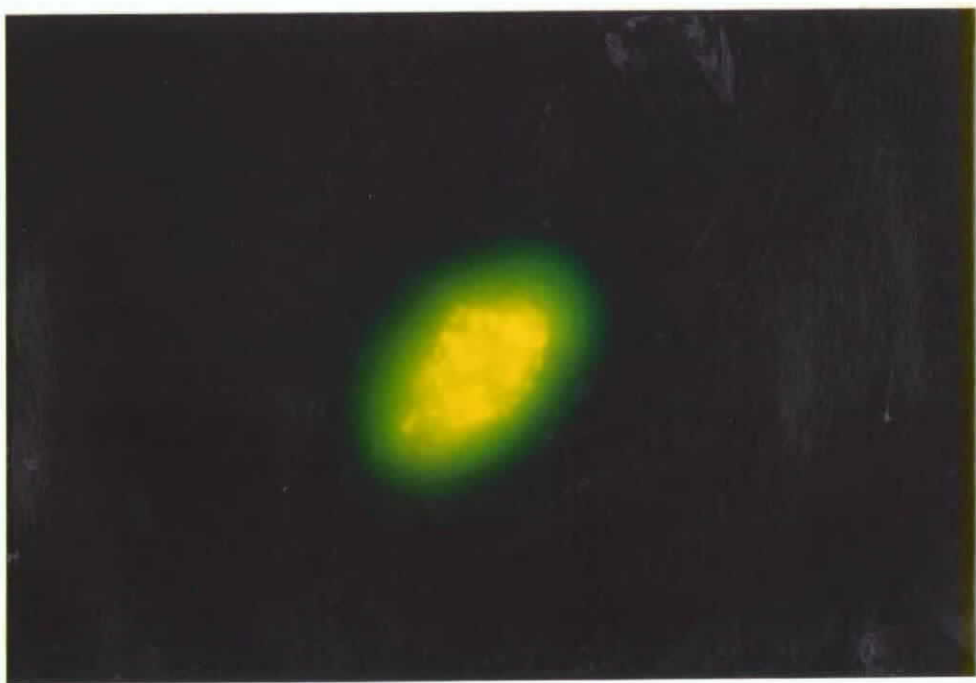
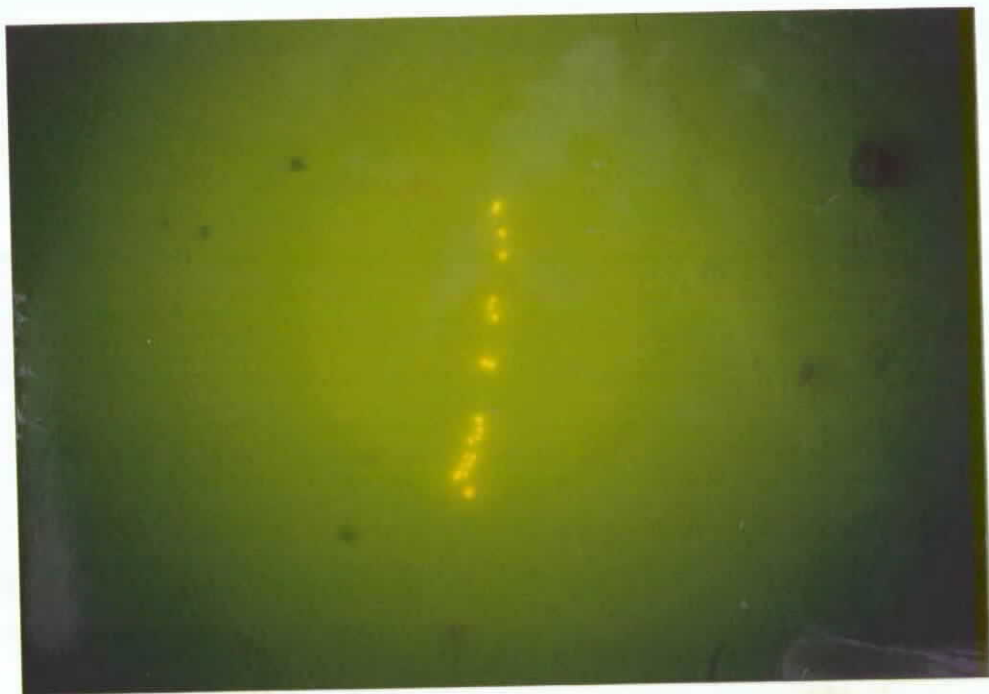


Figura 9. Micrografía de fluorescencia Muestra Fuente Termal Aguas Calientes.

