



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**AISLAMIENTO DE EXTREMÓFILOS CON
APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS, A PARTIR DE
PRODUCTOS MARINOS CONGELADOS**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

AUTORAS: MARÍA JOSÉ GAIBOR VÁSQUEZ

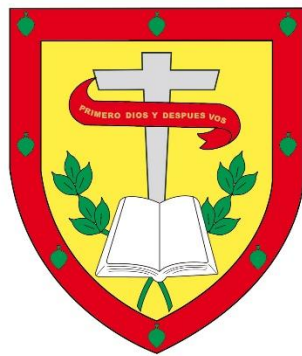
KELLY SALOME PACHECO CAMPOVERDE

DIRECTOR: LIC. LUIS ANDRÉS YARZÁBAL RODRÍGUEZ, PhD

CUENCA - ECUADOR

2025

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

AISLAMIENTO DE EXTREMÓFILOS CON APLICACIONES
BIOTECNOLÓGICAS, A PARTIR DE PRODUCTOS MARINOS
CONGELADOS

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

AUTORAS: MARÍA JOSÉ GAIBOR VÁSQUEZ

KELLY SALOME PACHECO CAMPOVERDE

DIRECTOR: LIC. LUIS ANDRÉS YARZÁBAL RODRÍGUEZ, PhD

CUENCA - ECUADOR

2025

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Aislamiento de bacterias psicrotolerantes con aplicaciones biotecnológicas, a partir de productos marinos congelados

Isolation of Psychrotolerant Bacteria with Biotechnological Applications from Frozen Marine Products

Gaibor Vásquez María José*; Pacheco Campoverde Kelly Salome**; Yarzábal Rodríguez Luis Andrés***; Buela Salazar Lenys Margarita****

RESUMEN

Introducción: Los psicrófilos y los psicrotolerantes son microorganismos capaces de multiplicarse por debajo de los 20°C, con aplicaciones múltiples en la industria biotecnológica. La bioprospección de este tipo de extremófilos enfrenta serios retos logísticos, financieros, tecnológicos y legales, lo que limita y entorpece su estudio y aprovechamiento.

Objetivo: En el presente estudio nos planteamos aislar, caracterizar e identificar bacterias psicrotolerantes y halotolerantes a partir de productos marinos, expendidos congelados en mercados y supermercados de la ciudad de Cuenca (Azuay, Ecuador).

Metodología: El estudio fue de tipo observacional y descriptivo. Las bacterias se aislaron a partir de muestras de Albacora (*Thunnus alalunga*), Bagre (*Bagre pinnimaculatus*), Corvina (*Argyrosomus regius*) y Pez espada (*Xiphias gladius*). Para ello, suspensiones de los tejidos se inocularon en Agar Nutritivo y Agar nutritivo suplementado con NaCl al 2,5% (p/v) y glicerina al 2% (v/v) y se incubaron a 10°C.

Resultados: De los 15 aislados seleccionados, cuatro sintetizaron exoproteasas y dos hemolisinas. La identificación molecular nos permitió identificar cepas relacionadas con especies pertenecientes a los géneros *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Brochothrix*, y *Bacillus*, algunas de las cuales son características de ambientes marinos fríos.

Conclusión: Comprobamos así la pertinencia de la estrategia empleada para el aislamiento de tales microorganismos.

Palabras clave: extremófilos, extremoenzimas, psicrófilos, halotolerantes, bioprospección.

ABSTRACT

Introduction: Psychrophiles and psychrotolerants are microorganisms capable of multiplying at temperatures below 20°C, with multiple applications in the biotechnology industry. Bioprospecting for this type of extremophile faces serious logistical, financial, technological, and legal challenges, which limit and hinder their study and exploitation.

Objective: This study aimed to isolate, characterize, and identify psychrotolerant and halotolerant bacteria from marine products sold frozen in markets and supermarkets in the city of Cuenca (Azuay, Ecuador).

Methodology: This was an observational and descriptive study. Bacteria were isolated from samples of albacore tuna (*Thunnus alalunga*), catfish (*Bagre pinnimaculatus*), corvina (*Argyrosomus regius*), and swordfish (*Xiphias gladius*). To do this, tissue suspensions were inoculated into nutrient agar and nutrient agar supplemented with 2.5% NaCl (w/v) and 2% glycerol (v/v) and incubated at 10°C.

Results: Of the 15 isolates selected, four synthesized exoproteases and two hemolysins. Molecular identification revealed strains related to species belonging to the genera *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Brochothrix*, and *Bacillus*, some of which are characteristic of cold marine environments.

Conclusion: Therefore, the relevance of the strategy used for isolating such microorganisms was verified

Keywords: extremophiles, extremozymes, psychrophile, halotolerant, bioprospecting.

* Carrera de Bioquímica y Farmacia. Universidad Católica de Cuenca. 010207.
maria.gaibor@est.ucacue.edu.ec ORCID <https://orcid.org/0009-0002-1144-7337>

**Carrera de Bioquímica y Farmacia. Universidad Católica de Cuenca. 010207.
kelly.pacheco.28@est.ucacue.edu.ec ORCID <https://orcid.org/0009-0002-6990-3016>

*** Carrera de Bioquímica y Farmacia. Universidad Católica de Cuenca.
0102207. lyarzabalr@ucacue.edu.ec ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1243-7704>

****Carrera de Bioquímica y Farmacia. Universidad Católica de Cuenca. 010207.
lbuelas@ucacue.edu.ec ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4635-8588>

INTRODUCCIÓN

El término “extremófilo” define aquellos organismos capaces de colonizar ambientes considerados inhabitables para los seres humanos (Krasimirova Milova, 2020). Aunque se trata de una definición excesivamente antropocéntrica, se acepta que estos organismos han evolucionado adaptaciones que les permiten multiplicarse activamente bajo estas condiciones “extremas”. (De León Rodríguez & Balderas Hernández, 2023) Es en gran medida debido a dichas adaptaciones que los extremófilos son potencialmente útiles en el campo de la Biotecnología, pues muchos de sus metabolitos y enzimas presentan características especiales, que las hacen muy atractivas para la industria. (Sepe et al., 2025) En efecto, muchas de las biomoléculas sintetizadas por los microorganismos extremófilos poseen múltiples aplicaciones en diversas áreas de la industria, como por ejemplo ciertas enzimas, exopolisacáridos, pigmentos, biosurfactantes, antimicrobianos y bioestimulantes del crecimiento de plantas, entre otras. (Trujillo Tapia et al., 2023)

Un grupo de extremófilos particularmente atractivos desde el punto de vista biotecnológico son los psicrófilos. Se trata de organismos que presentan una temperatura de crecimiento óptima por debajo de los 15 °C, llegando en ocasiones a multiplicarse a 0°C. (Hamid et al., 2022) Esto es posible gracias adaptaciones biológicas, como la modificación de la composición de su membrana, la producción de proteínas anticongelantes o la síntesis de enzimas

activas a bajas temperaturas. (Bezus, 2023) Se encuentran, principalmente, colonizando glaciares, regiones polares, sedimentos marinos, y suelos alpinos, entre otros (Buitrago Tovar, 2022).

Pese al potencial biotecnológico que presentan los extremófilos, uno de los principales retos en su bioprospección es el desarrollo de métodos eficaces para su aislamiento, cultivo, caracterización, identificación, conservación, extracción de ADN, entre otros. (Trujillo Tapia et al., 2023). De hecho, la propia bioprospección de extremófilos representa un gran desafío tecnológico, logístico y financiero (De León Rodríguez & Balderas Hernández, 2023)

A esto se suman las limitaciones en el acceso a estos recursos biológicos y genéticos, debido a las estrictas normas establecidas en acuerdos internacionales que protegen o se dedican a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica. (Naciones Unidas, 2011). Tal es el caso del Protocolo de Nagoya, que busca la conservación de la diversidad biológica y al uso sostenible de sus componentes, pero que impone severas restricciones al acceso a recursos biológicos y genéticos, exigiendo el cumplimiento de una serie de requisitos, en ciertos casos, muy rigurosos. (Fernández 2011; Páez 2013; Rojas Blanco, 2013; Alves et al., 2018; Bockmann et al., 2018; Prathapan et al., 2018; Kumar, 2018)

Para evitar este tipo de inconvenientes, se ha evaluado la posibilidad de aislar microorganismos extremófilos a partir de productos comerciales. Por ejemplo, en 2021, Satari et al. (2021) estudiaron la diversidad de microorganismos halotolerantes y halófilos presentes en muestras de sal doméstica comercial, proveniente de distintas regiones del mundo. (Satari et al., 2021). En forma similar, Mageswari et al. (2015) aislaron bacterias psicrotolerantes a partir de productos alimenticios refrigerados (zanahoria y cilantro) o instalaciones de almacenamiento en frío. De esta forma, lograron recuperar 10 aislados capaces de multiplicarse a 5°C, y pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Psychrobacter*, *Leuconostoc*, *Rhodococcus* y *Arthrobacter*. Entre ellos se destacó *Sphingomonas faeni*, capaz de producir un pigmento amarillo que contenía astaxantina, un carotenoide que tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria. (Mageswari et al., 2015)

Siguiendo este tipo de estrategia, en el presente estudio se propone aislar, a partir de productos marinos congelados, disponibles en mercados y

supermercados en la ciudad de Cuenca, microorganismos psicrófilos o psicrotolerantes, identificarlos mediante métodos moleculares y caracterizarlos de manera preliminar (Azuay, Ecuador).

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue de tipo observacional y descriptiva.

Obtención de las muestras. El aislamiento de bacterias psicrotolerantes y/o halotolerantes se realizó a partir de los siguientes productos marinos: Albacora (*Thunnus alalunga*), Bagre (*Bagre pinnimaculatus*), Corvina (*Argyrosomus regius*) y Espada (*Xiphias gladius*). Los productos, adquiridos en mercados y supermercados de la ciudad de Cuenca (Ecuador), fueron transportados al laboratorio en un contenedor refrigerado, manteniendo la cadena de frío. Una vez allí fueron descongelados lentamente, a 4°C, durante 24 horas.

Aislamiento de bacterias psicrotolerantes y/o halófilas. A partir de 1 g de tejido de cada una de las muestras se preparó una suspensión, disgregándolo en 1 ml de soluciones salina. A partir de esta suspensión inicial se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} y 10^{-2} . Las suspensiones así obtenidas fueron inoculadas por rastrillado, a razón de 100µl, en dos tipos de medio de cultivo: agar nutritivo (AN) y agar nutritivo suplementado con NaCl 2,5% (p/v) y glicerina al 2% (v/v) (ANS). Los cultivos se incubaron a 10°C durante varios días, hasta la aparición de colonias. Finalmente, los aislados seleccionados se purificaron mediante siembra por agotamiento en sus respectivos medios de cultivo hasta obtener colonias aisladas.

Selección fenotípica de los aislados puros. Los aislados susceptibles de ser caracterizados e identificados se seleccionaron en base a criterios morfológicos (=morfortipos) tales como forma, color, textura, tamaño, transparencia, brillo, borde, elevación y consistencia de las colonias. Asimismo, se visualizó la morfología de las células bajo un microscopio, mediante tinción de Gram. (López Pino Evelyn Gisela, 2021)

Valoración de la producción de enzimas hidrolíticas. La producción de exoenzimas hidrolíticas se valoró con medios de cultivo propios para estos ensayos. Se utilizó agar sangre (para verificar actividad hemolítica) (American

Society for Microbiology, 2016), medio YDP con yema de huevo (para verificar actividad fosfolítica) (Britania, 2022), y agar leche (para verificar actividad proteolítica) (Yang et al., 2021). Los cultivos se incubaron a 10°C hasta la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias.

Extracción de ADN genómico. La extracción del ADN genómico de las cepas seleccionadas se realizó mediante una lisis alcalina. Para ello, células provenientes de cultivos frescos fueron resuspendidas en 150µl de solución de lisis (0.025% de agar nutritivo y 0.025 N de hidróxido de sodio), incubándose seguidamente durante 20 minutos a 95°C. Los tubos se centrifugaron a 12.000 × g por minuto, recuperando el sobrenadante, el cual se conservó a -20°C hasta su utilización. (Erin E Hahn et al., 2024)

Amplificación por PCR- Región 16S ADNr. A partir del extracto celular conteniendo el ADN genómico, se amplificó la región 16S ADNr empleando los primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg et al., 1991). El volumen final de cada reacción fue de 25 µl, constituida por: 12,5 µl de GoTaqGreen MasterMix (Promega), 5 µl del primer 27F, 5 µl del Primer 1492R, 14 µl de agua destilada, y 1 µl del extracto celular. El perfil térmico empleado fue el siguiente: 1) Desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos; seguido de 2) 30 ciclos de: desnaturalización 95°C por 30 seg, hibridación a 55°C por 30 seg, elongación a 72°C por 1 minuto con 30 segundos. Al cabo de estos 30 ciclos se incluyó una etapa de extensión final a 72°C por 5 minutos. (Buela et al., 2024; Silva et al., 2012) Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% (p/v) en un transiluminador de luz ultravioleta, previa tinción con SYBR Safe. (Lee et al., 2012)

Secuenciación y análisis de secuencias en BLASTN. Los amplicones obtenidos fueron enviados a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación mediante la técnica automatizada de Sanger. Las secuencias nucleotídicas obtenidas, disponibles en formato FASTA, se depuraron mediante el software BioEdit V7.2 para evitar secuencias ambiguas y/o baja fiabilidad. Finalmente, las secuencias depuradas se analizaron con el programa Blast-N, y se cotejaron con aquellas registradas en la base de datos GenBank. El criterio de asignación a una determinada especie fue un porcentaje de identidad igual o

mayor al 97%, con una cobertura mínima del 90% en la secuencia cotejada. (Altschul et al., 1990)

RESULTADOS

Aislamiento y purificación de bacterias psicrotolerantes y/o halotolerantes.

Al cabo de varios días de incubación de los medios de cultivo inoculados con las suspensiones, se observó la aparición de un gran número de colonias que presentaban una marcada diversidad morfológica, indicativo de una diversidad taxonómica importante. Claramente, esto refleja la diversidad bacteriana presente en los productos marinos congelados. (Figura 1)

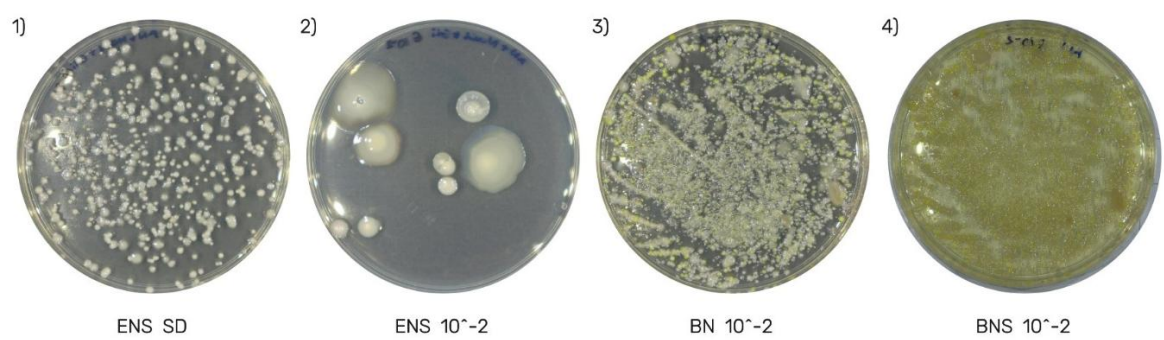


Figura 1. Aislamientos primarios de bacterias a partir de los productos marinos seleccionados. A) Pez espada (E) en agar nutritivo salado sin dilución; B) Pez espada (E) en agar nutritivo salado a una dilución de 10⁻¹; C) Bagre (B) en agar nutritivo a una dilución de 10⁻² ; D) Bagre (B) en agar nutritivo salado a una dilución de 10⁻²

A partir de estos aislamientos primarios, se seleccionaron 15 aislados en base a diferencias morfológicas evidentes (=morfotipos). El estudio microscópico de las células de dichos aislados evidenció una mayoría de bacilos Gram negativos, como se reporta en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de los aislados seleccionados.

Fenotipificación de colonias		
	Macroscópico	Microscópico

	Forma	Color	Brillo	Textura	Borde	Tamaño	Elevación	Transparencia	Consistencia	Morfología	Gram
AN1	C	B	L	E	P	G	O	O	D	Cocos	-
AN2	I	B	L	L	M	P	O	O	S	Bacilos	-
BN2	I	R	B	L	O	M	P	O	D	Cocos	-
BN4	C	V	B	L	E	P	Cv	O	S	Cocos	+
BN7	C	G	G	L	E	M	Cv	O	S	Bacilo	-
BNS1	I	C	B	L	O	G	P	O	D	Cocos	+
BNS4	R	V	B	L	E	P	Cv	O	S	Cocos	+
BNS5	R	A	B	L	E	P	Cv	O	S	Cocos	+
CN1	C	C	B	L	E	P	Cv	O	D	Cocos	-
CN3	C	R	B	L	E	M	P	T	S	Cocos	-
CN4	I	Cr	B	L	L	P	P	T	S	Cocos	+
CN5	I	B	B	R	O	M	P	T	S	Cocos	-
EN1	C	Cr	B	R	E	G	P	O	S	Bacilos	-
EN2	C	Cr	O	L	E	G	P	O	D	Bacilos	+
EN3	F	Cr	O	L	E	G	P	O	S	Bacilos	+

Leyenda. **Forma:** circular (C), rizoide (Rz) filamentosa (F), irregular (I); **Color:** amarillo (A), crema (Cr), rojo (R), naranja (N), blanco (B); **Textura:** lisa (L) o rugosa (R); **Tamaño:** grande (G), mediano (M), pequeño (P); **Transparencia:** opaca (O) o transparente (T) ; **Brillo:** brillante (B) o sin brillo (S); **Borde:** entero (E), rizoide (R), filamentoso (F), ondulado (O), lobulado (L), rizado (R); **Elevación:** convexa (Cv), plana (P), elevada (E), umbilicada (U); **Consistencia:** dura (D), suave (S), mucoide (M).

Producción de enzimas hidrolíticas activas a bajas temperaturas. Seis de los quince aislados evaluados presentaron diferentes actividades enzimáticas a 10°C. Los aislados BN2 y CN3 presentaron actividad hemolítica (Figura 2A), mientras que los aislados AN2, BN2, BNS1 y BNS4 mostraron la presencia de proteasas (Figura 2B). El aislado BN7 produce un pigmento de color amarillo cuya identidad no fue determinada.

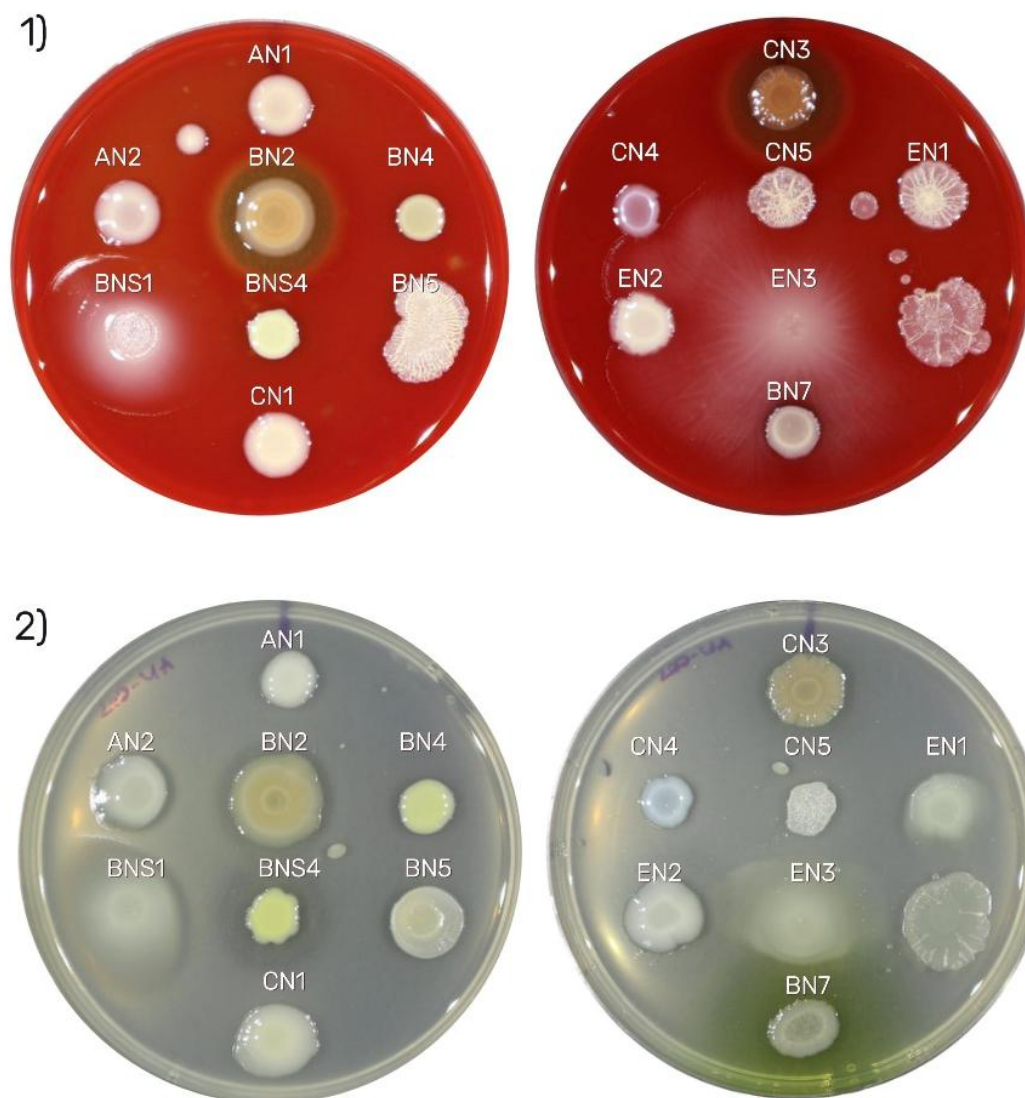


Figura 2 Ensayos de actividad enzimática de los distintos morfotipos aislados. Leyenda. A) Prueba enzimática de las colonias aisladas en el medio de cultivo agar sangre al 3%, en donde se observa una actividad hemolítica debido a la formación de un halo (actividad hemolisinas) en las colonias BN2 y CN3 B) Prueba enzimática de las colonias aisladas en agar nutritivo suplementado con leche, en donde se observa la formación de un halo en las colonias AN2, BN2, BNS1 y BNS4; y un pigmento verde en la colonia BN7, demostrando la actividad proteolítica presente en estas especies.

Identificación molecular de aislados. Las secuencias de tres de los amplicones obtenidos, correspondientes a la región 16S ADN_r, presentaron 100% de similitud con los de secuencias disponibles en el GenBank; las demás

presentaron porcentajes de similitud mayores o iguales al 98,3%. Cinco de los aislados pertenecen a especies dentro del género *Psychrobacter*; dos fueron identificados como relacionados con la especie *Shewanella baltica*; otros dos se identificaron como *Bacillus sonorensis*; dos más se relacionan con especies del género *Pseudomonas*, y dos más con especies del género *Arthrobacter*. Los dos últimos aislados están emparentados con las especies *Staphylococcus vitulinus* y *Brochothrix thermosphacta* (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del análisis por BlastN de las secuencias del gen 16S ADNr.

Código de Identificación	Código de acceso GenBank	Vecino filogenéticamente más cercano	Porcentaje de identidad %	Longitud de secuencia (pb)
AN1	PQ182313.1	<i>Psychrobacter fozii</i>	100%	823
AN2	KC462991.1	<i>Psychrobacter cibarius</i> .	99.88%	806
BN2	MT516250.1	<i>Shewanella baltica</i>	98.03%	811
BN4	KR085932.1	<i>Arthrobacter alpinus</i>	99.89%	948
BN7	MG977684.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.84%	611
BNS1	PQ182313.1	<i>Psychrobacter fozii</i>	99.51%	817
BNS4	AJ609631.1	<i>Arthrobacter bergeri</i>	99.89%	934
BN5	MN229564.1	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	99.75%	785
CN1	MF806171.1	<i>Psychrobacter glacincola</i>	99.48%	779
CN3	MF289341.1	<i>Shewanella baltica</i>	99.64%	830
CN4	JF756118.1	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	99.88%	857
CN5	PQ182313.1	<i>Psychrobacter fozii</i>	99.88%	863
EN1	KP236346.1	<i>Bacillus sonorensis</i>	100%	824
EN2	OR593824.1	<i>Pseudomonas bubulae</i>	99.88%	843

EN3	KP236346.1	<i>Bacillus sonorensis</i>	100%	879
-----	------------	----------------------------	------	-----

DISCUSIÓN

El presente estudio se propuso con el fin de aislar bacterias psicrotolerantes y halotolerantes, con potencial biotecnológico, a partir de muestras de productos marinos congelados, disponibles en supermercados y mercados de Cuenca (Ecuador). Los resultados obtenidos confirman la presencia de dichas bacterias, así como de su capacidad para sintetizar exoenzimas hidrolíticas activas a bajas temperaturas. Además, la mayoría de los aislados bacterianos seleccionados para una caracterización preliminar están filogenéticamente relacionados con especies usualmente presentes en nichos antárticos y/o marinos. Es evidente, por lo tanto, que la estrategia empleada permite tener acceso a este tipo de microorganismos extremófilos o extremotolerantes de manera rápida y eficaz.

Nueve de las quince cepas identificadas están relacionadas con especies pertenecientes a géneros que son frecuentes colonizadores de la región Antártida Marítima. Ejemplo de ello son los géneros *Arthrobacter*, *Psychrobacter* y *Pseudomonas*, frecuentemente aislados a partir de sedimentos glaciares localizados en esta región (Bendia et al 2018).

Una de estas cepas, la BN7, está emparentada con *Pseudomonas fluorescens*, especie que se ha logrado aislar a partir de sedimentos marinos, pertenece al grupo de bacterias Gram negativas y actúa como agente de biocontrol en el campo de la agricultura, debido a la capacidad de generar compuestos antibacterianos como pyoluteorina, pirrolnitrina, ácido 1-fenacina carboxílico y 2,4 diadetilfloroglucinol. (Álvarez-García et al., 2020; Poirier et al., 2016)

Por su parte, las cepas BN2 y CN3 están relacionadas con la especie *Shewanella baltica*, una bacteria Gram negativa previamente aislada a partir de sedimentos del mar Báltico en el archipiélago de Estocolmo. (Lemaire et al., 2020; Martín-Rodríguez et al., 2024) Desde la perspectiva biotecnológica, esta especie es muy atractiva dado que produce un exopolisacárido con actividad antimicrobiana frente a patógenos alimentarios como *Enterococcus faecalis*, útil en la industria alimentaria como un bioconservador. (Condò et al., 2022)

De igual forma, la cepa BN5 está estrechamente relacionada con la especie *Staphylococcus vitulinus*, misma que se aisló por primera vez a partir de soja

fermentada. (Gaillac et al., 2022; Nam et al., 2012). Su presencia en muestras de origen marino representa una incógnita que vale la pena estudiar y, al mismo tiempo, pone de manifiesto la posibilidad de aislar microorganismos extremófilos en productos que presentan condiciones únicas.

Finalmente, las cepas pertenecientes al género *Psychrobacter* pueden ser potencialmente valiosas desde el punto de vista biotecnológico, pues son capaces de producir agentes emulsificantes. (Riccardi et al., 2022)

Las pruebas enzimáticas realizadas en este estudio corroboran la síntesis de enzimas hidrolíticas activas a bajas temperaturas (hemolisinas y proteasas). Dichas extremoenzimas son activas a bajas temperaturas y moderadas concentraciones de sal, abriendo la puerta a la posibilidad de ser evaluadas con el fin de ser incorporadas en procesos productivos sostenibles e innovadores. (Dumorné et al., 2017).

En definitiva, la presencia de cepas que están relacionadas con especies presentes en zonas antárticas y/o marinas, en productos marinos congelados comercializados en supermercados y mercados, muestra que es posible emplear este tipo de fuentes biológicas para el aislamiento de microorganismos extremófilos o extremotolerantes.

A pesar de que los hallazgos obtenidos son significativos, el presente trabajo no está exento de limitaciones que deben tenerse en cuenta al momento de interpretar los resultados. En primer lugar, las muestras utilizadas se restringen a cuatro especies marinas, descartando otras variedades de productos marinos que podrían presentar una diversidad microbiana distinta; asimismo, el aislamiento se ha limitado únicamente a bacterias, excluyendo la posibilidad de aislar otros microorganismos como los hongos. A su vez, las condiciones de cultivo seleccionadas (como la temperatura de incubación de 10°C), favorecen el crecimiento de cierto tipo microorganismos, excluyendo aquellos que crecen a otros rangos de temperatura. De la misma forma, las condiciones aeróbicas mantenidas durante el aislamiento primario también deben ser consideradas en este sentido. Finalmente, las pruebas enzimáticas que se llevaron a cabo se limitaron a evaluar la actividad de ciertas enzimas que presentan actividad hemolítica, proteolítica y fosfolítica, excluyendo otras enzimas hidrolíticas de gran valor como las quitinasas, las celulasas, las amilasas y las peptidasas, que también podrían ser sintetizadas por estas cepas.

Pese a las limitaciones mencionadas, los resultados obtenidos refuerzan la relevancia de los hallazgos, y resaltan su posible trascendencia y aplicación en contextos biotecnológicos. Como se ha evidenciado, el aislamiento de bacterias psicotolerantes y/o halotolerantes fue posible sin la necesidad de desplazarnos a zonas remotas, potencialmente peligrosas, y eventualmente protegidas. Por lo tanto, se trata de una alternativa viable para abordar la bioprospección de microorganismos extremotolerantes o extremófilos, evitando las diferentes trabas que, lamentablemente, suelen limitar el progreso de la investigación sobre este tipo de microorganismos con potenciales aplicaciones biotecnológicas. En otras palabras: nuestro estudio representa una estrategia útil para quienes deseen explorar microorganismos productores de enzimas extremófilas, únicas, con posibles aplicaciones en agricultura, medio ambiente e industria.

CONCLUSIÓN

Los resultados del aislamiento de bacterias extremófilas o extremotolerantes a partir de productos marinos comercializados en supermercados y mercados, muestran que es posible hacer uso de esta estrategia con tales fines. Las cepas bacterianas aisladas fueron capaces de sintetizar exoenzimas activas bajo condiciones relativamente extremas, que podrían ser útiles en el campo de la industria biotecnológica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Laboratorio de Biología Molecular y Genética del Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) de la Universidad Católica de Cuenca. LB y LAYR pertenecen al Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología (GM2yB).

BIBLIOGRAFÍA

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Álvarez-García, J.-A., Santoyo, G., & Rocha-Granados, M. del C. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 01-10.

Alves RJ, Weksler M, Oliveira JA, et al. (2018) Brazilian legislation genetic heritage harms Biodiversity Convention goals and threatens basic biology research and education. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(2), 1279–1284.

American Society for Microbiology. (2016, enero 1). *Blood Agar Plates and Hemolysis* | ASM.org. <https://asm.org/protocols/blood-agar-plates-and-hemolysis-protocols>

Bezus, B. (2023). *Bioprospección de enzimas de interés biotecnológico producidas por levaduras antárticas: Producción, caracterización y aplicaciones industriales* [Tesis, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/148017>

Bockmann FA, Rodrigues MT, Kohlsdorf T, et al. (2018) Brazil's government attacks biodiversity. *Science*, 360 (6391), 865.

Britania. (2022). *Emulsión Yema de Huevo*. https://www.britanialab.com/productos/producto/3/suplementos_para_medios_de_cultivo/-/710/emulsi_n_yema_de_huevo

Buela, L., Barrezueta, J., Torres, S., Guamán, M., & Martínez, M. (2024). Detección de *Rhodotorula* sp., un potencial patógeno oportunista, en la mucosa nasal de cuyes (*Cavia porcellus*). *FACSALUD-UNEMI*, 8(14), 40-48. <https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol8iss14.2024pp40-48p>

Buitrago Tovar, N. A. (2022). *Evaluación de la actividad de tres microorganismos psicrófilos frente al crecimiento y desarrollo vegetal de plántulas de Albahaca (*Ocimum basilicum*) y Menta (*Mentha piperita*) susceptibles a bajas temperaturas*. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/5682>

Condò, C., Gómez, I., Farfán, M., & Rius, N. (2022). Assessing the inhibitory activity of culture supernatants against foodborne pathogens of two psychrotrophic bacteria isolated from river trout. *Archives of Microbiology*, 204(6), 294. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02919-5>

De León Rodríguez, A., & Balderas Hernández, V. E. (2023). *Extremófilos: Biotecnología al extremo*. 69, 65-69.

Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., & Renganathan, P. (2017). *Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications*. 27(4), 649-659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>

Erin E Hahn, Marina Alexander, Alicia Grealy, & Clare Holleley. (2024, enero 2). *Hot alkaline lysis gDNA extraction from formalin-fixed archival tissues*. <https://www.protocols.io/view/hot-alkaline-lysis-gdna-extraction-from-formalin-f-yxmvm32p6l3p/v1>

Fernández F. (2011) The impediment for the study of the biodiversity in Colombia. *Caldasia*, 33,3–5.

Gaillac, A., Briandet, R., Delahaye, E., Deschamps, J., Vigneau, E., Courcoux, P., Jaffrès, E., & Prévost, H. (2022). Exploring the Diversity of Biofilm Formation by the Food Spoiler *Brochothrix thermosphacta*. *Microorganisms*, 10(12), 2474. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122474>

Hamid, B., Bashir, Z., Yattoo, A. M., Mohiddin, F., Majeed, N., Bansal, M., Pocza, P., Almalki, W. H., Sayyed, R. Z., Shati, A. A., & Alfaifi, M. Y. (2022). Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—A Review. *Molecules*, 27(18), 5885. <https://doi.org/10.3390/molecules27185885>

Krasimirova Milova, L. (2020). *Los microorganismos extremófilos y sus aplicaciones biotecnológicas*. <https://digital.csic.es/handle/10261/230752>

Kumar, D. M. (2018). The Nagoya Protocol: Legal Protections for Genetic Resources and Ramifications for Aquatic Science. *Limnology and Oceanography Bulletin*, 27(2), 31-35. <https://doi.org/10.1002/lob.10235>

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 62, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>

Lemaire, O. N., Méjean, V., & Iobbi-Nivol, C. (2020). The *Shewanella* genus: Ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(2), 155-170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz031>

López Pino Evelyn Gisela. (2021). *Caracterización de bacterias aisladas de la laguna negra en la Provincia de Chimborazo* [Escuela Superior Politécnica De Chimborazo]. <https://dspace.esPOCH.edu.ec/items/3041e94d-40b0-4e5b-8de4-1b0745da9039>

- Mageswari, A., Subramanian, P., Srinivasan, R., Karthikeyan, S., & Gothandam, K. M. (2015). La astaxantina de la bacteria psicrotrófica *Sphingomonas faeni* muestra antagonismo contra las bacterias que deterioran los alimentos a bajas temperaturas. *Microbiological Research*, 179, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.010>
- Martín-Rodríguez, A. J., Fernández-Juárez, V., Valeriano, V. D., Mihindukulasooriya, I., Ceresnova, L., Joffré, E., Jensie-Markopoulos, S., Moore, E. R. B., & Sjöling, Å. (2024). A hotspot of diversity: Novel *Shewanella* species isolated from Baltic Sea sediments delineate a sympatric species complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(8), 006480. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006480>
- Naciones Unidas. (2011). *Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad biológica* (p. 16).
- Nam, Y.-D., Chung, W.-H., Seo, M.-J., & Lim, S.-I. (2012). Draft Genome Sequence of *Staphylococcus vitulinus* F1028, a Strain Isolated from a Block of Fermented Soybean. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5961-5962. <https://doi.org/10.1128/jb.01332-12>
- Páez VP. (2016) Colombia's tax on wildlife studies. *Science*, 354(6309),191.
- Poirier, I., Kuhn, L., Demortière, A., Mirvaux, B., Hammann, P., Chicher, J., Caplat, C., Pallud, M., & Bertrand, M. (2016). Ability of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to counteract the toxicity of CdSe nanoparticles. *Journal of Proteomics*, 148, 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.021>
- Prathapan KD, Pethiyagoda R, Bawa KS, et al. (2018) When the cure kills—CBD limits biodiversity research. *Science*, 360(6396),1405–1406.
- Riccardi, C., D'Angelo, C., Calvanese, M., Ricciardelli, A., Tutino, M. L., Parrilli, E., & Fondi, M. (2022). Genome analysis of a new biosurfactants source: The Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. TAE2020. *Marine Genomics*, 61, 100922. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2021.100922>
- Rojas Blanco, DL. (2013) Vicisitudes del Protocolo de Nagoya en Colombia. *Gestión y Ambiente*, 16,17–23.

- Satari, L., Guillén, A., Latorre-Pérez, A., & Porcar, M. (2021). Beyond Archaea: The Table Salt Bacteriome. *Frontiers in Microbiology*, 12, 714110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.714110>
- Sepe, F., Costanzo, E., Ionata, E., & Marcolongo, L. (2025). Biotechnological Potential of Extremophiles: Environmental Solutions, Challenges, and Advancements. *Biology*, 14(7), 847. <https://doi.org/10.3390/biology14070847>
- Silva, G. A. da, Bernardi, T. L., Schaker, P. D. C., Menegotto, M., & Valente, P. (2012). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 319-327. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000200020>
- Trujillo Tapia, Ma. N., Hidalgo Lara, M. E., Batista García, R. A., & Camacho Ruiz, R. M. (2023). *Manual de métodos para el estudio de extremófilos*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. <https://doi.org/10.30973/2023/manual-extremofilos>
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, & D. J. Lane. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173,697-703
- Yang, X., Wang, Z., Zhang, C., Wang, L., Pang, L., Zhang, D., Man, C., & Jiang, Y. (2021). Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6577-6587. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19818>