

Identificación taxonómica y caracterización microbiológica de estirpes que habitan en hidrotermales de Paipa, Boyacá.

Dana Catherine Rentería Salazar

Trabajo de Grado para Optar el Título de Bióloga

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Doctor en Ciencias Agrícolas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi papá, Gonzalo Rentería, y a mi mamá, Edith Salazar, por ser el pilar fundamental de mi vida y el motor que me impulsó durante toda mi carrera. Gracias por su amor, su apoyo incondicional y por su compañía en cada parte de este proceso; este logro también es de ustedes.

Agradecimientos

Agradezco, en primer lugar, a la vida y a la Universidad Industrial de Santander por brindarme la oportunidad y el espacio para mi formación académica y personal.

De igual manera, expreso mi más sincero agradecimiento a mi director, Jorge Luis Fuentes, por su orientación, enseñanza y acompañamiento a lo largo de este proceso. Asimismo, agradezco a mis compañeros del laboratorio LMMA-UIS, especialmente a Diego, Carina y Silvia, quienes, además de compartir conmigo sus conocimientos y brindarme su apoyo, me ofrecieron su amistad.

Agradezco también a mis familiares, en especial a mi hermano Marlon, mi tío Alfredo, mi tía Laura, mi prima Mayra y mi primo Jonathan, por su cariño, compañía y apoyo en esta etapa. A mi nona Aurora, que me acompaña desde el cielo, por haber sido una de las primeras motivaciones para recorrer este camino. De igual forma, doy gracias a mis amigos especialmente a los más cercanos, Juan Pablo, Wilmer y Juan José, por su apoyo incondicional en cada momento.

Por último, agradezco a cada persona que, en su momento, aportó a mi formación y estuvo presente a lo largo de este camino.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	8
1. Objetivos	12
1.1 Objetivo general.....	12
1.2 Objetivos específicos	12
2. Competencias	13
3. Metodología	14
3.1 Reactivación de las cepas	14
3.2 Identificación taxonómica de las cepas	15
3.2.1 Extracción de ADN	15
3.2.2 Amplificación y secuenciación de los genes ribosomales	16
3.2.3 Análisis de secuencias.....	17
3.3 Caracterización microbiológica	18
3.3.1 Cepas bacterianas	18
3.3.2 Cepa de levadura	19
4. Resultados	21
4.1 Asignación taxonómica basada en el análisis de secuencias del gen ribosomal 16S o 18S	21
4.2 Caracterización de las cepas bacterianas	22
4.3 Caracterización cepa de levadura	25
5. Discusión.....	27
6. Conclusiones	32
7. Recomendaciones.....	33
Referencias bibliográficas	34
Apéndices.....	41

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Cepas microbianas utilizadas en el estudio, sitio de muestreo y código LMMA-UIS asignado.	14
Tabla 2. Resultados de la identificación molecular de las cepas mediante análisis BLAST de los genes ribosomales 16S y 18S.....	22
Tabla 3. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas bacterianas.	24
Tabla 4. Caracterización morfológica, fisiológica y metabólica de la cepa de levadura	26

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Formación de la biopelícula de las cepas bacterianas <i>Bacillus</i> spp.....	23
Figura 2. Micrografía de la levadura cepa UIS1300 en contraste de fase.	25

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Características fisicoquímicas de los sitios hidrotermales de Paipa asociados a las cepas estudiadas.	41
Apéndice B. Registro macroscópico (Colonias y biopelícula) y microscópico (Tinción de Gram y contraste de fase) de las cepas bacterianas aisladas.....	41
Apéndice C. Registro macroscópico (colonias) y microscópico (Tinción con azul de lactofenol) de las cepas de levadura aislada.....	43

Resumen

Título: Identificación taxonómica y caracterización microbiológica de estirpes que habitan en hidrotermales de Paipa, Boyacá *

Autor: Dana Catherine Renteria Salazar**

Palabras Clave: Sistemas hidrotermales, identificación taxonómica, caracterización, 16S ARNr, 18S ARNr, Paipa.

Descripción: Los sistemas hidrotermales continentales constituyen ambientes extremos de alto interés por el potencial biotecnológico de los microorganismos que habitan en ellos. En el área hidrotermal Paipa-Iza (Paipa, Boyacá), es limitado el conocimiento sobre los microorganismos cultivables asociados a estos sistemas. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la identidad taxonómica y caracterizar microbiológicamente estirpes de microorganismos originarios de estos ambientes; los cuales están preservados en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA-UIS). Para ello, se reactivaron diez cepas (nueve aislamientos bacterianos y una levadura) y se realizó su identificación taxonómica usando el análisis de secuencia del gen ribosomal 16S o 18S, respectivamente. Adicionalmente, se desarrolló la caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas estudiadas. Los resultados permitieron asignar las nueve cepas bacterianas al género *Bacillus*, con porcentajes de identidad superiores al 95 %, aunque sin alcanzar el umbral requerido para su identificación a nivel de especie. La cepa de levadura solo pudo afiliarse taxonómicamente a la familia Debaryomycetaceae, lo que evidenció la limitada resolución del marcador 18S. Las bacterias presentaron un perfil homogéneo, caracterizado por bacilos Gram positivos, formación de biopelícula, actividad catalasa y oxidasa positiva, crecimiento a 25, 37 y 50 °C, y comportamiento anaerobio facultativo. Por su parte, la levadura mostró células ovaladas, actividad catalasa positiva, crecimiento entre pH 3 y 7 y ausencia de fermentación de glucosa y maltosa. En conjunto, estos hallazgos aportaron nuevo conocimiento sobre microorganismos cultivables asociados a sistemas hidrotermales en Colombia y resaltan la necesidad de continuar profundizando en la taxonomía y el metabolismo de los microorganismos que habitan estos ambientes.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Doctor en Ciencias Agrícolas.

Abstract

Title: Taxonomic identification and microbiological characterization of strains inhabiting hot springs in Paipa, Boyacá *

Author: Dana Catherine Renteria Salazar**

Key Words: Hot springs, taxonomic identification, characterization, rRNA 16S, rRNA 18S, Paipa.

Description: Continental hot springs are extreme environments of great interest due to the biotechnological potential of the microorganisms that inhabit them. In the Paipa–Iza hydrothermal area (Paipa, Boyacá), knowledge about the cultivable microorganisms associated with these systems is limited. In this context, the present study aimed to determine the taxonomic identity and microbiologically characterize microbial strains originating from these environments, which are preserved in the strain collection of the Laboratory of Microbiology and Environmental Mutagenesis (LMMA-UIS). To achieve this, ten strains (nine bacterial isolates and one yeast) were reactivated, and their taxonomic identification was performed using 16S or 18S ribosomal gene sequence analysis, respectively. Additionally, the morphological, physiological, and biochemical characterization of the studied strains was carried out. The results allowed the assignment of the nine bacterial strains to the genus *Bacillus*, with identity percentages greater than 95%, although without reaching the threshold required for species-level identification. The yeast strain could only be taxonomically assigned to the family Debaryomycetaceae, highlighting the limited resolution of the 18S marker. The bacteria exhibited a homogeneous profile, characterized by Gram-positive bacilli, biofilm formation, positive catalase and oxidase activity, growth at 25, 37, and 50 °C, and facultative anaerobic behavior. The yeast, in turn, showed oval cells, positive catalase activity, growth between pH 3 and 7, and absence of glucose and maltose fermentation. Overall, these findings provided new knowledge about cultivable microorganisms associated with hydrothermal systems in Colombia and underscore the need to continue deepening the understanding of the taxonomy and metabolism of microorganisms inhabiting these environments.

* Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Biology. Adviser: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. PhD in Agricultural Sciences.

Introducción

Los ambientes hidrotermales terrestres son sistemas geotérmicos en los que fluidos calientes emergen hacia la superficie a temperaturas superiores a la ambiental, dando lugar a manifestaciones como aguas termales, géiseres y emisiones de vapor, como resultado de la transferencia de calor y compuestos químicos desde el subsuelo (Renaut & Jones, 2011). Estos ambientes se consideran altamente hostiles para el ser humano e, incluso, algunos pueden resultar demasiado extremos para albergar vida microbiana (Silva et al., 2021).

En consecuencia, los microorganismos capaces de desarrollarse en estas condiciones se clasifican como extremófilos, cuando requieren obligatoriamente dichas condiciones para su crecimiento, o como extremo-tolerantes, cuando, aunque las soportan, también pueden crecer en ambientes considerados normales. A su vez, estos microorganismos pueden clasificarse de acuerdo con sus condiciones óptimas de crecimiento, tales como la fuerza iónica, la presión, la temperatura —que incluye organismos psicrófilos, termófilos e hipertermófilos— y el pH, que permite distinguir a organismos acidófilos y alcalófilos (Rampelotto, 2013).

En los sistemas hidrotermales continentales predominan microorganismos procariotas adaptados a condiciones extremas, comúnmente asociadas a altas temperaturas (termófilos) y a valores extremos de pH (acidófilos o alcalófilos) (Canganella & Wiegel, 2011). Los microorganismos termófilos pueden subdividirse, de acuerdo con su rango óptimo de crecimiento, en termófilos (50–60 °C), termófilos extremos (60–80 °C) e hipertermófilos (80–110 °C) (Kumar et al., 2019). Por su parte, los microorganismos acidófilos se caracterizan por crecer en ambientes con valores de pH inferiores a siete, presentando crecimiento óptimo entre pH 2 y 4, y se

encuentran distribuidos en los tres dominios de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya (Silva et al., 2021).

Los termófilos constituyen un grupo de microorganismos que ha despertado un notable interés científico, debido a que presentan características que los convierten en una fuente prometedora de aplicaciones biotecnológicas e industriales. Entre estas características se encuentra la producción de enzimas termoestables, como amilasas, celulasas, quitinasas y xilanasas, las cuales pueden ser utilizadas en diversos procesos médicos, industriales y agrícolas. (Benammar et al., 2020; Debnath et al., 2019; Kumar et al., 2019). Además, diversos estudios han demostrado que la diversidad de las comunidades microbianas presentes en aguas termales varía según las condiciones fisicoquímicas del sistema y de su ubicación geográfica (Li & Ma, 2019). Por ende, otra de las características de interés es la capacidad de adaptación de estos microorganismos asociada a una elevada flexibilidad genómica y metabólica, lo que les permite desarrollarse bajo condiciones adversas (Badhai et al., 2015).

Investigaciones sobre microorganismos asociados a aguas termales se han desarrollado en diversas regiones del mundo, lo que evidencia la relevancia de estos ecosistemas para el estudio de la microbiología en ambientes extremos (Benammar et al., 2020). Para la identificación taxonómica de estos microorganismos, se recurre ampliamente al análisis de genes ribosomales, particularmente el 16S rRNA para bacterias y marcadores como el 18S rRNA o ITS para hongos y levaduras, debido a su carácter conservado, su utilidad filogenética y la disponibilidad de bases de datos de referencia (Bartoš et al., 2024; Schoch et al., 2012; Tedersoo et al., 2024). No obstante, estos marcadores pueden presentar limitaciones de resolución a nivel de especie, especialmente en

grupos bacterianos estrechamente relacionados, por lo que su interpretación resulta más robusta cuando se integra con métodos clásicos de caracterización microbiológica, tales como la evaluación morfológica, fisiológica y bioquímica de los aislamientos (Hugenholtz et al., 2021). En este sentido, el aislamiento de cepas microbianas y su identificación molecular continúan siendo fundamentales para la caracterización detallada de los microorganismos presentes en sistemas hidrotermales continentales; así como, para garantizar su conservación y disponibilidad en colecciones microbianas que faciliten estudios futuros.

En consecuencia, avanzar en el conocimiento de los microorganismos termófilos presentes en ambientes hidrotermales de Colombia resulta fundamental para contribuir al descubrimiento de nuevos taxones y para comprender sus funciones y metabolismo asociado con ecosistemas. En el país, se han identificado al menos 12 áreas geotérmicas. Entre estas, el área Paipa–Iza presenta un alto interés científico debido a sus características geológicas y fisicoquímicas. Esta área se divide en dos grandes sectores, ITP–Lanceros y La Playa, en los cuales se localizan diversas fuentes termales con pH neutro de relevancia; por ejemplo, Pozo Azul con temperaturas cercanas a los 56°C y La Playa, donde la temperatura puede alcanzar los 76°C. Adicionalmente, la fuente hidrotermal El Hervidero puede presentar valores de pH ácidos hasta 3.1 (Alfaro-Valero et al., 2020).

A pesar de la existencia de estudios de muchos sistemas hidrotermales terrestres, la información microbiológica disponible de estos sigue siendo escasa. En Colombia, los estudios sobre comunidades microbianas de sistemas hidrotermales continentales son limitados y dirigidos a conocer la diversidad microbiana planctónicas de estos ecosistemas usando análisis

metagenómicos (Delgado-Serrano et al., 2014). Un solo reporte (Rubiano-Labrador et al., 2019), fue orientado a aislar, identificar, y caracterizar metabólicamente, microorganismos cultivables de hidrotermales. Si bien, se dispone de información detallada sobre la geoquímica y fisicoquímicas de los hidrotermales del área Paipa–Iza; no existe conocimiento sobre la microbiología asociada con estos ecosistemas. En este contexto, resulta relevante contribuir en el conocimiento de los microorganismos asociados a estos sistemas hidrotermales continentales, a través de estudios orientados a su identificación taxonómica y metabolismo.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como propósito identificar taxonómicamente usando análisis de secuencias del gen ribosomal 16S o 18S, así como, caracterizar microbiológicamente estirpes microbianas provenientes de los sistemas hidrotermales del área Paipa–Iza (Paipa, Boyacá) actualmente preservados en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA-UIS).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la identidad taxonómica y caracterizar microbiológicamente estirpes de hidrotermales del área Paipa–Iza (Paipa, Boyacá).

1.2 Objetivos Específicos

Identificar taxonómicamente las estirpes mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S o 18S, auxiliado con herramientas bioinformáticas.

Caracterizar microbiológicamente los microorganismos usando técnicas de curación adecuadas.

2. Competencias

Adquiere destrezas en el cultivo y caracterización de microorganismos extremófilos, utilizando técnicas microbiológicas adecuadas para su estudio.

Realiza extracción de ADN, su cuantificación y la amplificación de secuencias genéticas mediante técnicas estandarizadas.

Analiza y compara secuencias genéticas mediante herramientas bioinformáticas y bases de datos para determinar la identidad taxonómica de microorganismos.

3. Metodología

3.1 Reactivación de las cepas

Se realizó la reactivación de diez cepas criopreservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA-UIS), las cuales fueron aisladas de diferentes fuentes hidrotermales (Tabla 1).

Tabla 1.

Cepas microbianas utilizadas en el estudio, sitio de muestreo y código LMMA-UIS asignado.

Número de aislamientos por sitio de muestreo					Total	Código LMMA-UIS
PA	PL	L1	L2	HG		
0	0	0	0	1	1	UIS1300 [‡]
3	1				4	UIS1260 [†] , UIS1261 [†] , UIS1262 [†] , UIS1264 [†]
1		3	1		5	UIS1263 [†] , UIS1265 [†] , UIS1266 [†] , UIS1267 [†] , UIS1268 [†]
4	1	3	1	1	10	

Composición de los medios de cultivo (g/L): M9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) – Medio de sales mínimas M9 (33,9 g de fosfato disódico, 15 g de fosfato monopotásico, 2,5 g de cloruro de sodio, 5 g de cloruro de amonio, 0,018 g de rojo de fenol, pH = 7,4 ± 0,2). M9Y – (M9 + 1 g de extracto de levadura, pH = 3,5 ± 0,0). RCM (Oxoid LTD, Basingstoke, Inglaterra) – Medio reforzado para clostridios (10 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5 g de cloruro de sodio, 5 g de dextrosa, 3 g de extracto de levadura, 3 g de acetato de sodio, 1 g de almidón soluble, 0,5 g de L-cisteína HCl, 0,5 g de agar, pH = 6,8 ± 0,2). SCAM (Kuster y Williams, 1964) – Medio de agar almidón-caseína (10 g de almidón soluble, 0,3 g de caseína, 2 g de KNO₃, 0,05 g de MgSO₄·7H₂O, 2 g de K₂HPO₄, 2 g de NaCl, 0,02 g de CaCO₃, 0,01 g de Fe(SO₄)(NH₄)(SO₄)·6H₂O, 18 g de agar, pH = 7,3 ± 0,2 o 9,7 ± 0,2). ‡, Cepa microbiana que creció a pH 3,5. †, Cepa microbiana que creció a temperatura > 50 °C

Nota. Las cepas fueron obtenidas de diferentes sitios de muestreo: PA = Hidrotermal Pozo Azul, PL = Hidrotermal La Playa, L1 = Hidrotermal Lanceros 1, L2 = Hidrotermal Lanceros 2 y HG = Hidrotermal de Gas. A cada cepa microbiana criopreservada se le asignó un código LMMA-UIS.

Las cepas fueron sembradas bajo condiciones controladas de laboratorio y apropiadas para su crecimiento. Las nueve cepas bacterianas fueron cultivadas en los medios de cultivo Caldo Nutritivo y Medio Clostridio Reforzado (RCM) y se incubaron a una temperatura de 37 °C. En el caso de la cepa de levadura, se empleó el medio M9 suplementado con extracto de levadura (M9Y) y se incubó a una temperatura de 28 °C. La pureza de las cepas microbianas se comprobó mediante

tinciones de Gram y Azul de Lactofenol. Posteriormente, se aplicaron las pruebas como catalasa y oxidasa para constatar su estabilidad fisiológica comparando con datos de referencia. A partir de cada cepa reactivada y verificada, se prepararon soluciones de trabajo que se usaron para los ensayos posteriores. Adicionalmente, las cepas fueron nuevamente criopreservadas en glicerol, garantizando su conservación y disponibilidad futura en el cepario del LMMA-UIS.

3.2 Identificación taxonómica de las cepas

3.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cultivos puros utilizando el método descrito por Liu (2009), con las modificaciones propuestas para la fase de lisis celular por Collins et al. (1987). Las células fueron disueltas en buffer de lisis que contenía Tris-HCl 1M pH 8.0, EDTA 0.5M pH 8.0, NaCl 5M, SDS al 10% (p/v) y Triton X-100 al 0.5% (v/v). Adicionalmente se agregaron 10 μ L de lisozima (AMRESCO, Solon, Ohio, USA) preparada a 10 mg/mL y 5 μ L de RNasa (AMRESCO, Solon, Ohio, USA) preparada a 10 mg/mL. La suspensión celular fue incubada a 37 °C durante 30 min en un ultrasonido (Elmasonic E 30 H) Posteriormente, la suspensión celular fue sometida a tres pasos sucesivos con la mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1). El ADN se precipitó de la fase acuosa resultante adicionando Cloruro de sodio (NaCl) en una proporción de 1:10 (v/v), seguida de la adición de alcohol isopropílico frío en similar volumen al volumen total de la muestra. El ADN obtenido se lavó con etanol al 70% y se conservó finalmente en buffer Tris 10 mM–EDTA 1 mM (TE 10:1).

En el caso de la levadura, se realizó una modificación en la etapa de lisis celular descrita para extracción de ADN de hongos (Fuentes Lorenzo et al., 2003). Para la fase de lisis celular, la biomasa celular previamente liofilizada fue macerada y posteriormente se añadió buffer de lisis

suplementado con PVP al 1%, seguido de la adición de 2-mercaptoetanol. La mezcla se incubó a 65 °C durante 30 min. Las etapas posteriores de purificación, precipitación y conservación del ADN se llevaron a cabo de la misma manera que para las cepas bacterianas.

La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v), utilizando buffer TBE 1X y tinción con EZ-Vision® One DNA Dye as Loading Buffer, 6X, verificando la presencia de bandas definidas y la ausencia de degradación. Finalmente, la cuantificación del ADN se realizó por fluorometría utilizando el sistema QuantiFluor™ dsDNA System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.2 Amplificación y secuenciación de los genes ribosomales

Una vez determinada la cantidad de ADN genómico obtenido por cada cepa, se realizó la reacción de amplificación del gen ribosomal 16S o 18S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 50 µL como sigue: 25 µL de OneTaq® 2X Master Mix, 1 µL de cada cebador (100 µM), 1 µL de ADN genómico (100 ng/µL) y 22 µL de agua libre de nucleasas. Para las cepas bacterianas, se usaron los cebadores 530F (5'-GTCCCAGCMGCCGCGG-3') y 1490R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) que flanquean las regiones V4-V8 del gen ribosomal 16S (Wani et al., 2006). Para la cepa de levadura, se usaron los cebadores SSU1F (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') y SSUBR (5'-CCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) que flanquean el gen ribosomal 18S (Medlin et al., 1988).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific). Se inició con 3 min de desnaturalización a 94 °C y luego se realizaron 35 ciclos de

PCR. Cada ciclo consistió en 45 s a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C y, finalizando con una extensión a 72 °C durante 5 min (Fuentes Lorenzo et al., 2023). Posteriormente, los productos de amplificación fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v), utilizando buffer TBE 1X y un voltaje de 65V. Para verificar la calidad de los amplicones se tiñó el gel con el colorante EZ-Vision® One DNA Dye y su tamaño se comparó con un marcador de peso molecular para ADN, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Esto permitió confirmar la presencia de fragmentos amplificados del tamaño esperado. Finalmente, los amplicones obtenidos fueron purificados y secuenciados usando el servicio SSiGMol prestado por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2.3 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas a partir del servicio de secuenciación SSiGMol fueron editadas, eliminando regiones de baja calidad y el ruido asociado al proceso de secuenciación. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el software BioEdit (Hall, 1999). Dado que la secuenciación de los amplicones se realizó en ambas direcciones (forward y reverse), las secuencias correspondientes a cada cepa fueron alineadas y ensambladas para obtener una secuencia consenso. Esta secuencia consenso fue utilizada para la identificación taxonómica de las cepas mediante la comparación con secuencias depositadas en base de datos pública National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990). La asignación de las secuencias a los distintos taxones se llevó a cabo empleando umbrales mínimos de identidad, establecidos de la siguiente manera: género ($\geq 95\%$) y especie ($\geq 98,7\%$) (Stackebrandt & Ebers, 2006).

3.3 Caracterización microbiológica

3.3.1 Cepas bacterianas

La caracterización microbiológica de las cepas bacterianas se realizó mediante la evaluación de su crecimiento a diferentes temperaturas y la aplicación de pruebas bioquímicas con el fin de determinar su perfil metabólico.

Para evaluar el crecimiento a distintas temperaturas, las cepas fueron inoculadas en medio líquido Caldo Nutritivo e incubadas a 25, 37, 50 y 60 °C durante 72 h. La incubación se llevó a cabo mediante la inmersión de los cultivos en un baño María (Thermo Fisher Scientific, USA) en el cual se monitoreó la temperatura continuamente con un termómetro para garantizar la estabilidad térmica durante el ensayo. El crecimiento fue constatado mediante la observación de turbidez o formación de película superficial en el medio. Adicionalmente, se evaluó el crecimiento en condiciones anaerobias mediante la siembra en medio sólido Medio Clostridio Reforzado, incubado a 37 °C durante 72 h en cámaras de anaerobiosis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado e incluyeron controles negativos con el fin de descartar posibles contaminaciones.

Con el propósito de determinar características metabólicas relevantes se realizaron pruebas bioquímicas como la prueba de Voges–Proskauer para la detección de producción de acetoína a partir de la fermentación de glucosa. La prueba de Voges–Proskauer se realizó inoculando 5 mL de caldo MR-VP (Clark and Lubs), los cuales se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se adicionaron 3 mL de solución de α -naftol al 5 % (5 g en 100 mL de alcohol etílico) y 3 mL de hidróxido de potasio al 40 % (40 g en 100 mL de agua destilada), siguiendo el método de Barritt y respetando el orden de adición de los reactivos. La mezcla se agitó suavemente y se dejó reposar

durante 15 min. La reacción positiva se determinó mediante la aparición de una coloración rojiza en la parte superior del medio, indicativa de la producción de acetoina. La selección de estas pruebas se realizó con base en los criterios descritos en el Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (Logan & De Vos, 2015), particularmente para la diferenciación metabólica de especies dentro del género *Bacillus*.

Adicionalmente, se evaluó la capacidad hidrolítica de las cepas midiendo actividad enzimática para almidón, gelatina, ADN y celulosa. Para las pruebas de actividad enzimática, las cepas fueron sembradas en el medio específico correspondiente en cajas Petri divididas e incubadas a 37 °C durante 48 h. La actividad se determinó mediante la formación de halos de hidrólisis alrededor del crecimiento bacteriano. Los medios fueron revelados individualmente de la siguiente manera: para gelatinasa se adicionó sulfato de amonio 6 M; para DNasa se adicionó HCl 1 M; para amilasa se utilizó solución de Lugol; y para celulasa el revelado se realizó con Rojo Congo al 0,1 %, seguido de lavado con NaCl 1 M, de acuerdo con lo descrito por Rawway et al. (2018). En el caso de gelatinasa, DNasa y amilasa, los reactivos se dejaron actuar durante 5 min y posteriormente se retiraron; para la prueba de celulasa, el Rojo Congo se dejó actuar durante 15 min antes del lavado correspondiente.

3.3.2 Cepa de levadura

En el caso de la cepa de levadura, la caracterización microbiológica se realizó mediante la aplicación de pruebas morfológicas y fisiológicas propias de microorganismos eucariotas, excluyendo aquellas específicas para bacterias. Para evaluar el crecimiento a diferentes valores de pH la cepa fue inoculada en medio M9Y, ajustando a pH 3, 4, 5, 6 o 7 con adición de HCl (2 M).

Los cultivos fueron incubados a 28 °C durante 72 h. El ensayo correspondiente a pH 3 se realizó en medio líquido, mientras que los demás valores de pH se evaluaron en medio sólido. El crecimiento fue determinado mediante la presencia o ausencia de colonias en medio sólido y por la formación de turbidez en medio líquido. Todos los ensayos se realizaron por triplicado e incluyeron controles negativos con el fin de descartar posibles contaminaciones.

Adicionalmente, se realizaron pruebas fisiológicas de asimilación y fermentación de azúcares siguiendo los procedimientos descritos en *The Yeasts: A Taxonomic Study* (Kurtzman et al., 2011). Las pruebas de fermentación se realizaron en 5 mL de medio líquido basal (peptona 7,5 g/L, extracto de levadura 4,5 g/L, pH 6,0) para fermentación de levaduras descrito por Wickerham (1951) y siguiendo las indicaciones de Kurtzman et al. (2011). Para cada ensayo se emplearon 4,5 mL del medio basal, a los cuales se adicionaron 0,5 mL de una solución stock estéril del azúcar correspondiente al 20 % (p/v) para una concentración final de 2 % (p/v). Los cultivos fueron incubados a 28 °C sin agitación durante 72 h. Posteriormente, se adicionó rojo de metilo al 0,02 % (p/v) como indicador de pH. La actividad fermentativa se determinó mediante la acidificación del medio, evidenciada por el viraje del indicador hacia rojo, asociada al metabolismo del azúcar correspondiente.

4. Resultados

Se logró la reactivación y el crecimiento exitoso de las diez cepas preservadas en el cepario del LMMA-UIS, de las cuales nueve correspondieron a aislamientos bacterianos y una a cepa de levadura. Todas las cepas presentaron crecimiento en los medios de cultivo empleados, lo que permitió la obtención de biomasa suficiente para la extracción de ADN genómico. El ADN obtenido fue de calidad adecuada para su posterior amplificación y análisis molecular. A partir de estos resultados, fue posible llevar a cabo la identificación taxonómica mediante secuenciación del gen ribosomal, así como, la caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas. A continuación, se presentan de manera ordenada los resultados obtenidos en el proceso de identificación y caracterización microbiológica de las cepas estudiadas.

4.1 Asignación taxonómica basada en el análisis de secuencias del gen 16S o 18S

Los resultados del análisis de secuencias permitieron identificar las nueve cepas bacterianas a nivel de género. Todas presentaron porcentajes de identidad superiores al 95 % con entradas de la base de datos pública NCBI correspondientes al género *Bacillus*. Sin embargo, ninguna de estas secuencias superó el umbral del 98,7 % establecido en la metodología como criterio para la asignación a nivel de especie. Con la excepción de la cepa UIS1260, los alineamientos mostraron altos valores de cobertura entre el 90 y 100 %. Por el contrario, en el caso de la cepa de levadura el análisis de secuencias del gen 18S solo permitió afiliación taxonómica al nivel de familia (Debaryomycetaceae), mostrando porcentaje de identidad del 86,4 % y una cobertura del 96%. Los valores detallados de porcentaje de identidad y cobertura obtenidos para cada cepa se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Resultados de la identificación molecular de las cepas mediante análisis BLAST de los genes ribosomales 16S y 18S.

Cepa	Gen analizado	Filiación taxonómica	% Identidad	% Cobertura
UIS1260	16S	<i>Bacillus</i> sp.	95,7	80
UIS1261	16S	<i>Bacillus</i> sp.	96,2	91
UIS1262	16S	<i>Bacillus</i> sp.	97,2	98
UIS1263	16S	<i>Bacillus</i> sp.	96,9	95
UIS1264	16S	<i>Bacillus</i> sp.	97,9	100
UIS1265	16S	<i>Bacillus</i> sp.	97,7	96
UIS1266	16S	<i>Bacillus</i> sp.	95,1	90
UIS1267	16S	<i>Bacillus</i> sp.	97,2	98
UIS1268	16S	<i>Bacillus</i> sp.	97	99
UIS1300	18S	Debaryomycetaceae	86,4	96

Nota. La asignación taxonómica se realizó mediante comparación de secuencias consenso con la base de datos NCBI usando BLAST. Criterios de identificación: género (≥ 95 %) y especie ($\geq 98,7\%$).

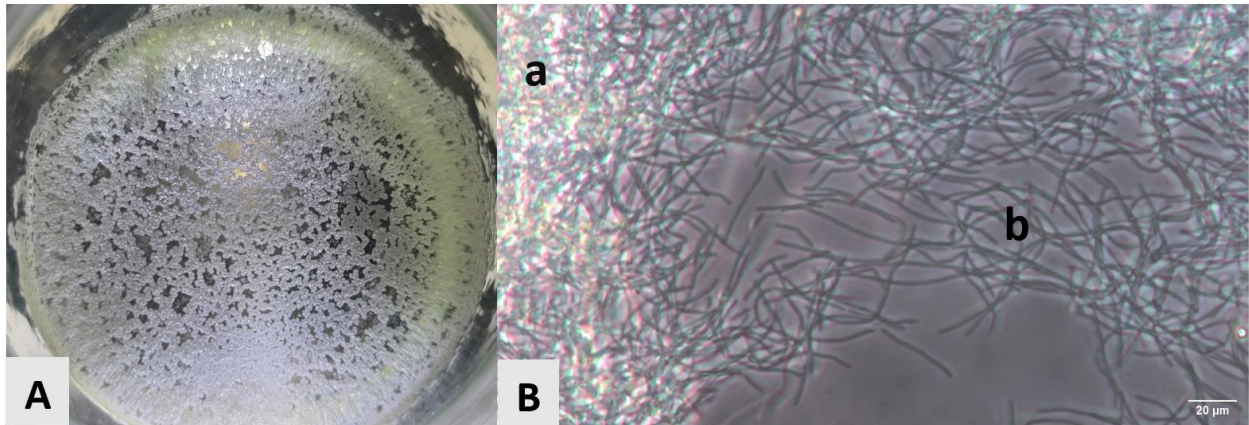
4.2 Caracterización de las cepas bacterianas

Las nueve cepas bacterianas evaluadas presentaron un perfil morfológico uniforme. Todas correspondieron a bacilos Gram positivos, con endosporas observables en baja proporción. Estas características fueron consistentes en todas las cepas bacterianas analizadas, sin variaciones apreciables entre cepas. Durante el crecimiento en medio líquido, las cepas desarrollaron una biopelícula superficial visible en la interfase aire-líquido (Figura 1); pero nunca mostraron un crecimiento con turbidez. No se observaron diferencias en la apariencia macroscópica de la biopelícula entre las distintas cepas. Este crecimiento atípico para cepas del género *Bacillus* fue observado de manera reproducible en todos los cultivos y sugiere un crecimiento preferencial en

la zona con mayor disponibilidad de oxígeno. Este resultado muestra concordancia con las pruebas fisiológicas catalasa y oxidasa; las cuales en todas las cepas resultaron positivas.

Figura 1.

Formación de la biopelícula de las cepas bacterianas Bacillus spp.



Nota. (A) Biopelícula desarrollada en cultivo líquido en la interfase aire-líquido. (B) Micrografía de la biopelícula observada mediante microscopía de contraste de fase (40x), donde se distingue una región más densa de la biopelícula (a) y células bacilares asociadas a la estructura de la biopelícula (b). Barra de escala: 20 μm.

El estudio sobre las propiedades extremófilas de las cepas aisladas constató que todas las cepas forman biopelículas a 25, 37 y 50 °C, pero no a 60 °C. Este comportamiento evidencia la capacidad de las cepas para tolerar altas temperaturas (50 °C), incluyéndolas en la categoría de microorganismos termotolerantes o termófilos moderados. Asimismo, todas las cepas mostraron crecimiento tanto en condiciones aerobias como anaerobias, lo que indica un comportamiento compatible con microorganismos anaerobios facultativos, capaces de adaptarse a la presencia o ausencia de oxígeno según las condiciones del ambiente donde crecen.

Amilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNAsa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celulasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-

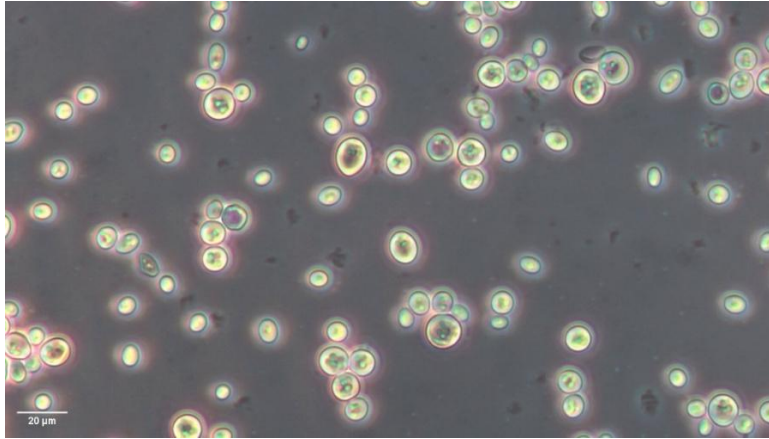
Nota. (+) resultado positivo; (-) resultado negativo; (±) presencia escasa. Las pruebas fueron realizadas siguiendo los procedimientos descritos en el Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (Logan & De Vos, 2015) y el manual interno del LMMA-UIS

4.3 Caracterización cepa de levadura

La cepa UIS1300 presentó células de morfología ovalada en la observación microscópica, evidenciando gemación en microscopia de contraste de fase (Figura 2). En cuanto a su perfil fisiológico, mostró actividad catalasa positiva y presentó crecimiento tanto a 25 °C como a 37 °C. Respecto al rango de pH evaluado, la cepa evidenció crecimiento en todos los valores ensayados (pH 3–7), lo que indica una amplia tolerancia a condiciones ácidas y neutras. Adicionalmente, la cepa mostró crecimiento en condiciones tanto aerobias como anaerobias. En las pruebas metabólicas realizadas no se evidenció fermentación de glucosa ni maltosa bajo las condiciones evaluadas. Los resultados detallados se presentan en la Tabla 4.

Figura 2.

Micrografía de la levadura cepa UIS1300 en contraste de fase.

**Tabla 4.**

Caracterización morfológica, fisiológica y metabólica de la cepa de levadura

Pruebas realizadas	Cepa UIS1300
Morfología	
Forma celular	Ovaladas
Gemación	+
Pruebas fisiológicas	
Catalasa	+
25°C	+
37°C	+
pH 3	+
pH 4	+
pH 5	+
pH 6	+
pH 7	+
Aeróbico	+
Anaeróbico	+
Pruebas metabólicas	
Fermentación	
Glucosa	-
Maltosa	-

Nota. (+) resultado positivo; (-) resultado negativo. Las pruebas realizadas fueron en base a lo descrito en *The Yeasts: A Taxonomic Study* (Kurtzman et al., 2011).

5. Discusión

En el presente estudio, ninguna de las cepas bacterianas alcanzó el porcentaje de identidad requerido para su asignación a nivel de especie mediante el análisis del gen ribosomal 16S o 18S. Este resultado evidencia una limitación ampliamente reconocida para este tipo de marcador dentro del género *Bacillus* (Fuentes Lorenzo et al. 2023). Se ha documentado que las secuencias del ADN ribosomal 16S fallan en diferenciar especies estrechamente relacionadas, por lo que se han empleado enfoques taxonómicos polifásicos que integran múltiples marcadores moleculares (Bartoš et al., 2024; De Vos et al., 2008). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo permiten una asignación confiable al nivel de género, pero evidencian la necesidad de herramientas genómicas para la identificación taxonómica al nivel de especie.

La afiliación de las cepas bacterianas al género *Bacillus* es consistente con estudios previos realizados en ambientes hidrotermales continentales, donde este género ha sido reportado como uno de los grupos dominantes entre los microorganismos cultivables. Por ejemplo, en estudios realizados en sistemas termales similares se ha identificado a *Bacillus* como el género predominante entre las bacterias aisladas de fuentes termales, incluyendo especies como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y otros *Bacillus* spp. (Ortega-Villar et al., 2024; Ulucay et al., 2022). De manera similar, se ha observado que la mayoría de los aislados obtenidos de aguas termales en Etiopía pertenecían a este mismo género, siendo *Bacillus licheniformis* una de las especies más frecuentes (Guta et al., 2024).

Las características morfológicas como células bacilares, Gram positivas y anaerobias facultativas corresponden al género *Bacillus* según lo descrito por Logan & De Vos, (2015).

Aunque en baja proporción, la observación microscópica permitió constatar la formación de endosporas en las cepas estudiadas, lo cual también es consistente con especies de este género. La escasa presencia de estas estructuras podría estar relacionada con condiciones fisiológicas específicas, ya que la formación de endosporas suele presentarse principalmente durante fases avanzadas de crecimiento o bajo condiciones de estrés (Setlow, 2014).

Otras características observadas son consistentes con el género *Bacillus*, por ejemplo, durante el crecimiento en medio líquido se evidenció la formación de biopelícula. Se ha reportado que algunas especies de este género, como *B. licheniformis* y *B. cereus*, tienen la capacidad de formar biopelículas, estructuras que corresponden a comunidades de células bacterianas asociadas a una matriz de polímeros extracelulares que les permite mantenerse unidas y adherirse a diferentes superficies (Zhou et al., 2023). La formación de este tipo de estructuras puede estar influenciada por factores ambientales, entre ellos la temperatura. De acuerdo con lo reportado por Zain et al. (2015), en algunas especies de *Bacillus* la formación de biopelículas es más evidente a 37 °C; sin embargo, algunos aislados también han mostrado la capacidad de formarlas a temperaturas más altas, como 55 °C. Esto sugiere que la formación de biopelículas puede variar entre especies y depender de las condiciones en las que se desarrollan.

Un hallazgo de relevancia biológica y ecológica fue que todas las cepas bacterianas evaluadas presentaron crecimiento a 37 °C y 50 °C, a pesar de haber sido aisladas de fuentes hidrotermales con temperaturas entre 47 °C y 59,5 °C (Apéndice A). Este comportamiento sugiere que las cepas no corresponden a termófilas estrictas, sino a microorganismos termotolerantes, capaces de desarrollarse en un rango térmico amplio sin restringirse exclusivamente a las temperaturas máximas del ambiente de origen (Canganella & Wiegel, 2011). Esta interpretación

es consistente con lo reportado para el género *Bacillus*, cuyas especies pueden tolerar temperaturas elevadas, pero en su mayoría no presentan crecimiento por encima de los 50 °C (Hurtado-Bautista et al., 2021). Además, este patrón de crecimiento podría relacionarse con la heterogeneidad térmica propia de los sistemas hidrotermales. Según lo descrito por Alfaro-Valero et al. (2020), en el área de Paipa–Iza, las aguas termales forman parte de un sistema geotérmico influenciado por la circulación del agua a través de fallas, rocas permeables y procesos de mezcla entre aguas salinas y fluidos geotérmicos, lo que puede generar variaciones fisicoquímicas entre sitios de muestreo y microhábitats. En este sentido, el crecimiento de las cepas tanto a 37 °C como a 50 °C no necesariamente indica dependencia estricta de las temperaturas más altas registradas en el ambiente, sino una posible capacidad para tolerar y aprovechar condiciones térmicas variables dentro del sistema hidrotermal.

Desde una perspectiva ecológica, este crecimiento sugiere cierta amplitud de nicho térmico, es decir, la capacidad de mantenerse activas en más de una condición de temperatura dentro del sistema hidrotermal. Según lo descrito por He et al. (2023), en ambientes termales esta amplitud del nicho se ha relacionado con estrategias más generalistas frente a otras más restringidas, lo que podría representar una ventaja en sistemas donde la temperatura puede variar, como ocurre en las zonas de mezcla de los hidrotermales del área Paipa–Iza. Este comportamiento también podría estar relacionado con la plasticidad fenotípica frente a la temperatura descrita para algunos linajes de *Bacillus*, en los cuales la capacidad de crecer en rangos térmicos amplios favorece la colonización de microhábitats con condiciones variables (Hurtado-Bautista et al., 2021). En conjunto, estos resultados sugieren que las cepas estudiadas presentan características fisiológicas compatibles con la heterogeneidad térmica propia de los sistemas hidrotermales

continentales, más que con una dependencia exclusiva de condiciones de temperatura estables y extremas.

Bajo las condiciones ensayadas, las cepas no degradaron almidón, gelatina, ADN ni celulosa. Factores como el pH y la composición del medio pueden influir en la expresión y detección de enzimas extracelulares en bacterias del género *Bacillus* (Schallmey et al., 2004). Finalmente, la homogeneidad en el perfil fenotípico observada en las cepas estudiadas sugiere que todas ellas pertenecen a especies estrechamente relacionadas dentro del género *Bacillus*, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en la identificación molecular.

Por su parte, la cepa de levadura estudiada solo pudo identificarse al nivel taxonómico de familia. Se ha descrito que el gen ribosomal 18S presenta una tasa de evolución relativamente lenta y ha sido utilizado principalmente en estudios filogenéticos de grupos taxonómicos mayores dentro del reino Fungi (Kurtzman et al., 2011); lo que podría explicar nuestros resultados. Schoch et al. (2012) señalaron que la región ITS del ADN ribosomal puede resultar más resolutivo, dado que presenta una mayor capacidad de discriminación taxonómica. En este trabajo se ensayaron algunos cebadores dirigidos a la región ITS (datos no mostrados), sin embargo, estos no mostraron una amplificación satisfactoria, lo que limitó el uso de este marcador para una identificación taxonómica más precisa, por lo que actualmente se trabaja en probar nuevas secuencias.

El presente estudio evidenció que la cepa de levadura estudiada fue capaz de crecer incluso a pH 3. Este resultado podría estar relacionado con las condiciones del sistema hidrotermal del cual fue aislada, El Hervidero. Este hidrotermal es conocido por un flujo sostenido de CO₂ de

origen magmático (~99%), el cual al unirse con agua forma ácido carbónico acidificando este hidrotermal hasta pH cercanos a 3.1 (Alfaro-Valero et al., 2020). Se ha descrito, que las levaduras acido-tolerantes pueden desarrollarse en diversos ambientes naturalmente ácidos, como aguas volcánicas y algunas aguas termales, donde los valores de pH pueden oscilar entre 1 y 3. A pesar de estas condiciones extremas, estos microorganismos mantienen un pH intracelular estable, generalmente entre 4.5 y 5.5, lo que les permite realizar sus procesos metabólicos. Esta capacidad está relacionada con diversas adaptaciones fisiológicas, entre ellas modificaciones en la membrana celular y mecanismos que regulan la entrada de protones al interior de la célula (Segal-Kischinevzky et al., 2022).

En resumen, la interpretación de los resultados de este estudio debe hacerse considerando algunas limitaciones metodológicas. En primer lugar, la identificación taxonómica de las cepas estudiadas fue condicionada por el marcador usado en cada caso: gen ribosomal 16S en bacterias y el gen ribosomal 18S en levaduras. Se conoce que este marcador, no siempre ofrece suficiente poder discriminante para alcanzar el nivel taxonómico de especie. Asimismo, algunas pruebas fisiológicas y bioquímicas pudieron verse influenciadas por las condiciones experimentales utilizadas. Aun así, este estudio representa una primera aproximación que aporta información relevante sobre los microorganismos cultivables asociados a los sistemas hidrotermales del área Paipa–Iza (Paipa, Boyacá); constituyendo un punto de partida para futuros abordajes sobre la identidad taxonómica y el metabolismo de microorganismos asociados con fuentes hidrotermales.

6. Conclusiones

En conclusión, este trabajo permitió identificar y caracterizar microbiológicamente diez cepas microbianas cultivables provenientes de hidrotermales del área Paipa–Iza (Paipa, Boyacá), de las cuales nueve correspondieron a *Bacillus* spp. y una a una levadura afiliada a la familia Debaryomycetaceae. Las cepas bacterianas mostraron un perfil fenotípico homogéneo, caracterizado por morfología de bacilos Gram positivos, producción de biopelícula y tolerancia a temperaturas de hasta 50 °C, lo que las ubica en la categoría de microorganismos termotolerantes con capacidad de desarrollarse en un rango térmico amplio, consistente con la heterogeneidad térmica propia de los sistemas hidrotermales del área Paipa–Iza. Por su parte, la levadura presentó crecimiento en un amplio rango de pH, incluyendo pH 3, lo que sugiere una cepa acidotolerante. En conjunto, los resultados obtenidos aportan al conocimiento de los microorganismos cultivables asociados a los sistemas hidrotermales de Colombia y resaltan su potencial como organismos extremófilos.

7. Recomendaciones

La resolución taxonómica alcanzada fue limitada, lo que evidencia la necesidad de usar otros marcadores como los ITS o avanzar con estudios genómicos que permitan identificar inequívocamente las especies microbianas. Se requieren estudios más completos sobre el metabolismo y la fisiología de las cepas estudiadas, se recomienda realizar una caracterización cuantitativa del crecimiento a diferentes temperaturas mediante curvas de crecimiento, lo que permitiría profundizar en la relación entre el comportamiento fisiológico de las cepas y las condiciones térmicas de los hidrotermales del área Paipa–Iza.

Referencias Bibliográficas

- Alfaro-Valero, C., Rueda Gutiérrez, J. B., Matiz-Leon, J. C., Beltrán-Luque, M., Rodríguez Rodríguez, G., Rodríguez-Ospina, G., Gonzalez Idarraga, C., & Malo, J. (2020). Paipa geothermal system, Boyacá: Review of exploration studies and conceptual model. En J. Gómez & A. O. Pinilla-Pachon (Eds.), *The geology of Colombia* (Vol. 38, p. 36). Servicio Geológico Colombiano. <https://doi.org/10.32685/pub.esp.38.2019.04>
- 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)
- Badhai, J., Ghosh, T. S., & Das, S. K. (2015). Taxonomic and functional characteristics of microbial communities and their correlation with physicochemical properties of four geothermal springs in Odisha, India. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1166. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01166>
- Bartoš, O., Chmel, M., & Šwierczková, I. (2024). The overlooked evolutionary dynamics of 16S rRNA revises its role as the “gold standard” for bacterial species identification. *Scientific Reports*, 14(1), 9067. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59667-3>
- Benammar, L., Bektaş, K. İ., Menasria, T., Beldüz, A. O., Güler, H. I., Bedaida, I. K., Gonzalez, J. M., & Ayachi, A. (2020). Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 1987–2007. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00376-0>

- Canganella, F., & Wiegel, J. (2011). Extremophiles: From abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, 98(4), 253–279. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0775-2>
- Collins, F. H., Mendez, M. A., Rasmussen, M. O., Mehaffey, P. C., Besansky, N. J., & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 37–41. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.37>
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (Eds.). (2008). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/b92997>
- Debnath, T., Kujur, R. R. A., Mitra, R., & Das, S. K. (2019). Microbial diversity in hot springs and its sustainable utilization. En T. Satyanarayana, B. Johri, & S. Das (Eds.), *Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_6
- Delgado-Serrano, L., López, G., Bohorquez, L. C., Bustos, J. R., Rubiano, C., Osorio-Forero, C., Junca, H., Baena, S., & Zambrano, M. M. (2014). Neotropical Andes hot springs harbor diverse and distinct planktonic microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1), 56–66. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12333>
- Fuentes Lorenzo, J. L., Correa-Victoria, F. J., Escobar, F., Mora, L., Duque, M. C., Deus, J. E., & Cornide, M. T. (2003). Genetic diversity analysis of the rice blast pathogen population at two locations in Cuba. *Biotechnología Aplicada*, 20(1), 14–19.

- Fuentes Lorenzo, J. L., Suescun-Sepulveda, J. A., García González, M., Díaz Buitrago, J. M., & Cárdenas León, K. M. (2023). Characterization of a bacterial culture collection from terrestrial subsurface habitats in Colombia. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B: Biological Sciences*, 93(4), 979–993. <https://doi.org/10.1007/s40011-023-01481-4>
- Guta, M., Abebe, G., Bacha, K., & Cools, P. (2024). Screening and characterization of thermostable enzyme-producing bacteria from selected hot springs of Ethiopia. *Microbiology Spectrum*, 12(3), e03710-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03710-23>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- He, Q., Wang, S., Feng, K., Michaletz, S. T., Hou, W., Zhang, W., Li, F., Zhang, Y., Wang, D., Peng, X., Yang, X., & Deng, Y. (2023). High speciation rate of niche specialists in hot springs. *The ISME Journal*, 17(8), 1303–1314. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01447-4>
- Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A., Parks, D. H., & Soo, R. M. (2021). Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *The ISME Journal*, 15(7), 1879–1892. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x>
- Hurtado-Bautista, E., Pérez Sánchez, L. F., Islas-Robles, A., Santoyo, G., & Olmedo-Alvarez, G. (2021). Phenotypic plasticity and evolution of thermal tolerance in bacteria from temperate and hot spring environments. *PeerJ*, 9, e11734. <https://doi.org/10.7717/peerj.11734>

- Kumar, S., Dangi, A. K., Shukla, P., Baishya, D., & Khare, S. K. (2019). Thermozyms: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 278, 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.088>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The yeasts* (5th ed., pp. 87–110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Li, L., & Ma, Z. (2019). Global microbiome diversity scaling in hot springs with DAR (diversity–area relationship) profiles. *Frontiers in Microbiology*, 10, 118. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00118>
- Liu, D. (2009). Purification of nucleic acids from bacteria. En D. Liu (Ed.), *Handbook of nucleic acid purification* (Chap. 5). CRC Press.
- Logan, N. A., & De Vos, P. (2015). *Bacillus*. En W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., & Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2), 491–499. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90066-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90066-2)
- Ortega-Villar, R., Escalante, A., Astudillo-Melgar, F., Lizárraga-Mendiola, L., Vázquez-Rodríguez, G. A., Hidalgo-Lara, M. E., & Coronel-Olivares, C. (2024). Isolation and

- characterization of thermophilic bacteria from a hot spring in the state of Hidalgo, Mexico, and geochemical analysis of the thermal water. *Microorganisms*, 12(6), 1066. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061066>
- Rampelotto, P. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life*, 3(3), 482–485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Rawway, M., Ali, S. G., & Badawy, A. S. (2018). Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from different sources at Assiut Governorate (Upper Egypt). *Journal of Ecology of Health & Environment*, 6(1), 15–24. <https://doi.org/10.18576/jehe/060103>
- Renaut, R. W., & Jones, B. (2011). Terrestrial hydrothermal environments. En J. Reitner & V. Thiel (Eds.), *Encyclopedia of geobiology*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_114
- Rubiano-Labrador, C., Díaz-Cárdenas, C., López, G., Gómez, J., & Baena, S. (2019). Colombian Andean thermal springs: Reservoir of thermophilic anaerobic bacteria producing hydrolytic enzymes. *Extremophiles*, 23(6), 793–808. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01132-5>
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An,






- K., Bai, F., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Segal-Kischinevzky, C., Romero-Aguilar, L., Alcaraz, L. D., López-Ortiz, G., Martínez-Castillo, B., Torres-Ramírez, N., Sandoval, G., & González, J. (2022). Yeasts inhabiting extreme environments and their biotechnological applications. *Microorganisms*, *10*(4), 794. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040794>
- Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *Journal of Bacteriology*, *196*(7), 1297–1305. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>
- Silva, B., Antunes, C., Andrade, F., da Silva, E. F., Grande, J. A., & Luís, A. T. (2021). Prokaryotic and eukaryotic diversity in hydrothermal continental systems. *Archives of Microbiology*, *203*(7), 3751–3766. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02416-1>
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiology Today*, *33*, 6–9.
- Tedersoo, L., Moghaddam, M. S. H., Mikryukov, V., Hakimzadeh, A., Bahram, M., Nilsson, R. H., Yatsiuk, I., Geisen, S., Schwelm, A., Piwosz, K., Prous, M., Sildever, S., Chmólowska, D., Rueckert, S., Škaloud, P., Laas, P., Tõnnessen, K., Jung, J. H., Choi, J. H., ... Anslan, S. (2024). EUKARYOME: The rRNA gene reference database for identification of all eukaryotes. *Database*, *2024*, baae043. <https://doi.org/10.1093/database/baae043>

- Ulucay, O., Gormez, A., & Ozic, C. (2022). Identification, characterization and hydrolase producing performance of thermophilic bacteria: Geothermal hot springs in the Eastern and Southeastern Anatolia Regions of Turkey. *Antonie van Leeuwenhoek*, *115*(2), 253–270. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01678-5>
- Wani, A. A., Surakasi, V. P., Siddharth, J., Raghavan, R. G., Patole, M. S., Ranade, D. R., & Shouche, Y. S. (2006). Molecular analyses of microbial diversity associated with the Lonar soda lake in India: An impact crater in a basalt area. *Research in Microbiology*, *157*(10), 928–937. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.08.005>
- Wickerham, L. J. (1951). *Taxonomy of yeasts* (Techn. Bull. No. 1029). U.S. Department of Agriculture.
- Zain, S. N. M., Flint, S. H., Bennett, R., & Tay, H. (2015). Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy Science & Technology*, *96*(3), 285–295. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0264-z>
- Zhou, J., Wu, Y., Liu, D., & Lv, R. (2023). The effect of carbon source and temperature on the formation and growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus* biofilms. *LWT*, *186*, 115239. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115239>

Apéndices

Apéndice A.

Características fisicoquímicas de los sitios hidrotermales de Paipa asociados a las cepas estudiadas.

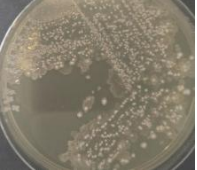

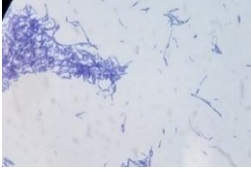
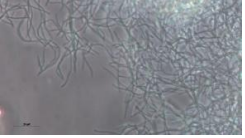
Sitios de muestreo	Ubicación (Departamento)	Coordenadas (Latitud norte/ Longitud oeste)	Altitud (m.s.n.m.)	Temp. (°C)	pH	C (ms/cm)	Número de cepas	Código de colección [‡]
	PA Paipa (Boyacá)	5°45'25.687888"N/ 73°06'33.759816"W	2522	47.2	7.0	42.9	3	UIS1260, UIS1261, UIS1262
	PL Paipa (Boyacá)	5°43'45.924"N/ 73°6'49.81"W	2542	58.5	7.1	39.9	2	UIS1263, UIS1264
	L1 Paipa (Boyacá)	5°45'25.831"N/ 73°6'36.414"W	2480	56.9	7.0	41.4	3	UIS1265, UIS1266, UIS1267
	L2 Paipa (Boyacá)	5°45'22.829423"N/ 73°06'37.209408"W	2499	59.5	7.2	40.7	1	UIS1268
	HG Paipa (Boyacá)	5°42'36.878731"N/ 73°06'48.213252"W	2527	19.3	4.2	190.0	1	UIS1300
Total = 53								

[‡]Código asignado a cada cepa bacteriana en la colección microbiana "Cepario LMMA-UIS" de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

Nota. Información sobre los sitios de muestreo (PA: Hidrotermal Pozo Azul, PL: Hidrotermal La Playa, L1: Hidrotermal Lanceros No. 1, L2: Hidrotermal Lanceros No. 2, HG: Hidrotermal de Gas. Se proporciona un mapa de altitud (metros sobre el nivel del mar, m.s.n.m.) de las localidades de muestreo, su temperatura y pH promedio, conductividad (C) y el número de cepas bacterianas aisladas del sitio muestreado.

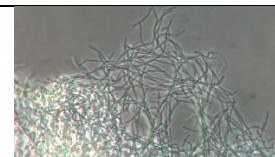
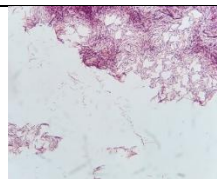
Apéndice B.

Registro macroscópico (Colonias y biopelícula) y microscópico (Tinción de Gram y contraste de fase) de las cepas bacterianas aisladas.

Cepa	Registro macroscópico		Registro microscópico	
	Colonias	Biopelícula	Tinción de Gram	Contraste de fase
<i>Bacillus</i> sp. UIS1260				

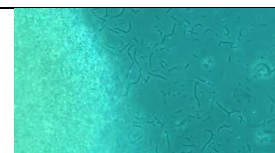
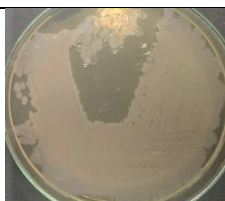
Bacillus sp.

UIS1261



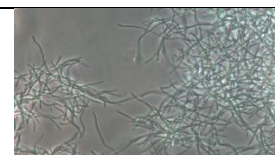
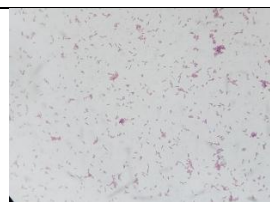
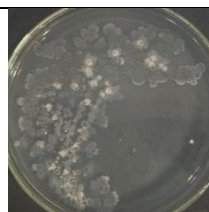
Bacillus sp.

UIS1262



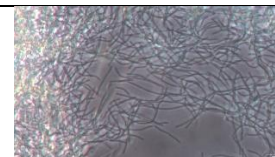
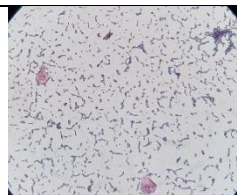
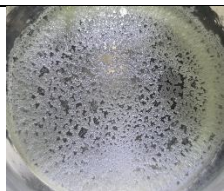
Bacillus sp.

UIS1263



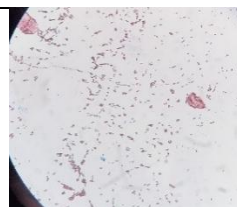
Bacillus sp.

UIS1264



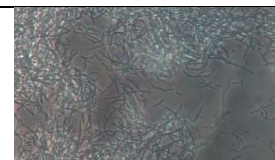
Bacillus sp.



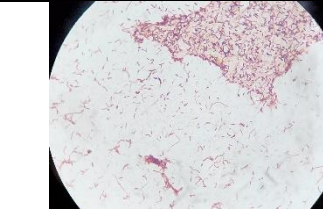
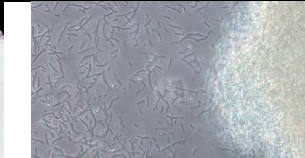
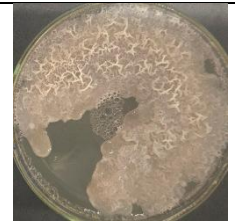

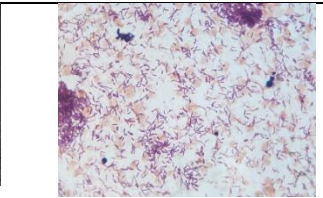
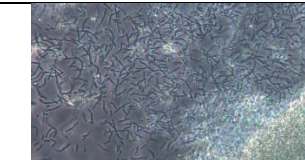
UIS1265



Bacillus sp.

UIS1266



<p><i>Bacillus</i> sp. UIS1267</p>				
<p><i>Bacillus</i> sp. UIS1268</p>				

Apéndice C.

Registro macroscópico (colonias) y microscópico (Tinción con azul de lactofenol) de las cepas de levadura aislada.

Cepa	Registro macroscópico	Registro microscópico
<p>Debaryomycetaceae UIS1300</p>	