



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

**TEMA: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS,
MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE
GEOTERMAL “AGUAS HEDIONDAS”, UBICADA EN LA
PROVINCIA CARCHI, CANTÓN TULCÁN, ECUADOR.**

AUTOR: RIVAS PÁRRAGA ROQUE GUILLERMO

DIRECTOR: IZQUIERDO ANDRÉS, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2017



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

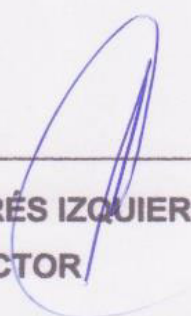
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL "AGUAS HEDIONDAS", UBICADA EN LA PROVINCIA CARCHI, CANTÓN TULCÁN, ECUADOR** realizado por **ROQUE GUILLERMO RIVAS PÁRRAGA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **ROQUE GUILLERMO RIVAS PÁRRAGA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Marzo 2017



ANDRÉS IZQUIERDO, PH.D.
DIRECTOR



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **ROQUE GUILLERMO RIVAS PÁRRAGA**, con cedula de identidad N° 172072166-9 declaro que este trabajo de titulación "AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL "AGUAS HEDIONDAS", UBICADA EN LA PROVINCIA CARCHI, CANTÓN TULCÁN, ECUADOR", ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, Marzo 2017

ROQUE GUILLERMO RIVAS PÁRRAGA
C.C 172072166-9



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **ROQUE GUILLERMO RIVAS PÁRRAGA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, **"AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL "AGUAS HEDIONDAS", UBICADA EN LA PROVINCIA CARCHI, CANTÓN TULCÁN, ECUADOR"** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad. .

Sangolquí, Marzo 2017

ROQUE GUILLERMO RIVAS PÁRRAGA

C.C 172072166-9

A mi madre
Maura Párraga Párraga

Y a mi padre
Roque Rivas Zambrano,

Almas combatientes y perseverantes, por su infinito amor,
dedicación y constancia.

Este logro es más suyo que mío

AGRADECIMIENTOS

He pensado en la escritura de la Tesis como la culminación de un largo trabajo que simboliza y condensa muchas horas de investigación, inquietudes y problemas. Esto requiere de un enorme esfuerzo y un compromiso sólido con lo estudiado. En mi caso no podría haber concluido esta etapa de no haber sido por muchas personas que me han acompañado y escoltado a lo largo de todo este tiempo. Eso es un privilegio que no está al alcance de todos, y por esto me siento muy afortunado y a la vez angustiado cuando tengo que reconocerlo en estos agradecimientos, sabiendo que resulta un poco imposible nombrarlos a todos en estas líneas.

En este esfuerzo, el Doctor Andrés Izquierdo, ha constituido una guía y quiero agradecerle de manera especial por dirigir esta Tesis y por su tiempo. También quiero aprovechar para mencionar a la Máster Alma Koch y agradecerle por sus enseñanzas y por permitirme ser parte del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

A los compañeros Pollo, Mopo, Beto, Yani y Karo quiero agradecerles por acompañarme en el infernal muestreo en las termas Aguas Hediondas y soportar los tremendos olores de las muestras en su procesamiento. ¡Sobrevivimos muchachos!

De la universidad recuerdo con especial gratitud a mis amigos Pablo, Dani O., Danny, Alexis y Santi por tantas carcajadas, serenatas, videojuegos, partidos de fútbol y cervezas compartidas. Esta etapa no hubiera sido la misma sin su apreciable compañía. Me siento muy dichoso por contar con personas tan leales y acolite.

A mis amigos de secundaria Alex, Diego, Oso, Feto, Jenny y Dendé, que a pesar del tiempo transcurrido, cuando nos reunimos revivimos muchos recuerdos en el glorioso MH, quiero agradecerles por su amistad tan duradera.

A Yadi, Mayrita, Guti, Micha y Katy, entrañables amistades con las que empecé este largo viaje en el mundo de la Biotecnología.

A Jessy, que tras entrelazar nuestras manos con tanto amor, con tantas ganas y por tantos días ha desarrollado, a su pesar, la capacidad inigualable de acompañarme en tiempos de zozobra, y más aún, en los mejores momentos. Y eso sí que me resulta insustituible.

Al final de todo, se acaba siempre por el principio, en el núcleo en sí: mi gente, mi familia. Quienes con su amor y cariño me sostienen. A los que quiero abrazar. Mi pequeña hermana mayor Naty y muy grande intelectualmente, mi ñaña Karla siempre tan organizada y enojona, y mi pequeña hermanita menor Sohito. Mi ñaño Gingo que cuando nació me cambió la vida: nunca he jugado tanto con nadie. Deben saber que los admiro.

Roque Eudaldo ha sido y es padre y compañero. Le dedico mi Tesis porque me ha enseñado que la vida sin sueños no tiene sentido y que la única manera de alcanzarlos es dejándote la piel en ello. Maura Elizabeth es mi madre, y eso lo es todo: el sostén de mi familia, cuidados, amor, caricias, consejos, alegría. El orgullo de ambos es mi mejor recompensa. Este largo trabajo habría sido imposible sin ellos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
LISTADO DE FIGURAS	xi
LISTADO DE TABLAS	xii
LISTADO DE ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema	1
1.3. Objetivos de la investigación	2
1.3.1. Objetivo general	2
1.3.2. Objetivos específicos	2
1.4. Marco teórico	2
1.4.1. Microorganismos extremófilos	2
1.4.2. Adaptaciones de microorganismos a condiciones ambientales extremas	3
1.4.2.1. Factor temperatura	3
1.4.2.2. Presión	4
1.4.2.3. pH del ambiente	5
1.4.3. Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo	5
1.4.3.1. Extracción de ADN	5
1.4.3.2. PCR	6
1.4.3.3. Gen ribosomal 16S	7
1.4.3.4. 23S rRNA	9
1.4.3.5. ITS	9
1.4.3.6. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)	10
1.4.3.7. Secuenciación Sanger	11
1.4.3.8. Alineamiento múltiple de secuencias (MSA)	11
1.4.3.9. Árboles filogenéticos	12

1.4.3.10. Aplicaciones	13
1.4.3.11. Terma Aguas Hediondas	13
1.5. Hipótesis de la investigación	14
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Participantes.....	15
2.2. Zona de estudio	15
2.2.1. Fase de campo.....	15
2.2.2. Fase de laboratorio.....	16
2.3. Periodo de investigación.....	16
2.4. Procedimientos de aislamiento	16
2.4.1. Preparación de medios de cultivo	16
2.4.2. Toma de muestras	17
2.4.3. Procesamiento de las muestras.....	19
2.4.4. Obtención de cultivos puros.....	19
2.4.5. Determinación de las características macroscópicas del cultivo	19
2.4.6. Determinación de las características microscópicas del cultivo	20
2.4.7. Preparación del cepario	20
2.5. Extracción de ADN.....	20
2.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
2.7. Análisis de RFLPs	22
2.8. Secuenciación.....	22
2.9. Análisis de secuencias	23
2.9.1. Limpieza y ensamblaje	23
2.9.2. Análisis de similitud y homología	23
2.9.3. Análisis filogenético.....	23
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	24
3.1. Evaluación de cada punto de muestreo.....	24
3.1. Análisis fisicoquímico.....	24
3.1. Cultivos puros obtenidos.....	26
3.2. Características microscópicas de los cultivos	26
3.3. Extracción de ADN.....	30
3.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	30
3.6. RFLPs en gel de agarosa	31
3.7. Análisis de similitud	33
3.8. Análisis filogenético	33

3.9. Construcción de cepario	36
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	37
4.1. Características fisicoquímicas de la fuente geotermal	37
4.2. Aislamiento	38
4.3. Identificación molecular	39
4.4. Cepas identificadas en Aguas Hediondas presentes en otras fuentes geotermales del mundo	41
4.5. Potenciales aplicaciones biotecnológicas de las cepas aisladas	43
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	51
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	52
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	53

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la técnica de PCR.	7
Figura 2: Ribosoma procariota.....	7
Figura 3: Gen 16S rRNA.....	8
Figura 4: Gen 23S rRNA.....	9
Figura 5: Gen ITS.....	9
Figura 6: Esquema de análisis por RFLPs.	10
Figura 7: Secuenciación Sanger.....	12
Figura 8: Árbol filogenético.....	12
Figura 9: Ubicación geográfica Aguas Hediondas.....	15
Figura 10: Distancia entre Aguas Hediondas y el Volcán Chiles.	16
Figura 11: Fuente geotermal Aguas Hediondas.	17
Figura 12: Recolección de muestras.	18
Figura 13: Cultivos puros obtenidos.....	26
Figura 14: Tinción Gram de la cepa #9 (<i>Bacillus licheniformis</i>), 100X.....	27
Figura 15: Tinción Gram, cepa #14 (<i>Bacillus licheniformis</i>), 100X.....	28
Figura 16: Tinción Gram, cepa #36 (<i>Bacillus thermoamylovorans</i>), 100X. ..	28
Figura 17: Microalga #1 (<i>Chroococciopsis sp.</i>), 100X.	29
Figura 18: Microalga #2 (Clorofita), 100X.	29
Figura 19: Cepa fúngica (<i>Talaromyces thermophilus</i>), 100X.....	30
Figura 20: Gen 16S rRNA.....	30
Figura 21: A. Gen 23S rRNA. B. Gen ITS.	31
Figura 22: RFLPs, con la enzima MspI, del gen 16S rRNA de las cepas bacterianas aisladas..	32
Figura 23: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rRNA.....	34
Figura 24: Árboles filogenéticos. A: secuencias del gen 23S rRNA de microalgas. B: secuencias del gen ITS de hongos.....	35
Figura 25: Cepario de la fuente geotermal Aguas Hediondas.....	36

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de las aguas de la fuente geotermal Aguas Hediondas.	14
Tabla 2: Componentes de la PCR.	21
Tabla 3: Cebadores para PCR de Bacterias, microalgas y hongos.	21
Tabla 4: Componentes de la reacción de RFLPs.....	22
Tabla 5: Datos de cada punto de muestreo.	24
Tabla 6: Análisis fisicoquímico de muestras de agua.....	25
Tabla 7: Análisis fisicoquímico de muestras de sedimentos.	25
Tabla 8: Resumen comparativo de fragmentos de restricción.....	32
Tabla 9: Análisis de secuencias de microorganismos aislados con la herramienta BLAST del NCBI.	33
Tabla 10: Número de cepas aisladas de cada microorganismo.	36

LISTADO DE ABREVIATURAS

pH: Potencial de hidrógeno

°C: Grados centígrados

DNA: Ácido desoxirribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

GPS: Global Positioning System

AN: Agar nutrient

PDA: Agar papa dextrosa

CN: Caldo nutriente

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

µm: Micrómetro

mL: Mililitro

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatos

kb: Kilobase

pb: Pares de Bases

V: Voltio

mA: Miliamperio

mM: milimolar

RESUMEN

Ecuador es un país megadiverso, ubicado en el Cinturón de Fuego del Pacífico. Los flujos magmáticos originan cientos de fuentes geotermales. En el país, hay pocos estudios sobre los microorganismos que habitan en ambientes extremos. Esta investigación se enfocó en el aislamiento e identificación de bacterias microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal Aguas Hediondas. Se analizó las características fisicoquímicas de la fuente. Se recogieron muestras de agua y sedimentos de 3 diferentes puntos de la fuente. Se midió la temperatura y el pH de cada punto de muestreo. Las muestras fueron inoculadas en medios de cultivo generales para el crecimiento de bacterias, microalgas y hongos. Se obtuvo un total de 40 cultivos puros: 37 de bacterias, 2 de microalgas y 1 de hongos. Para la identificación molecular se extrajo el ADN genómico de cada cepa, se amplificó y secuenció los genes 16S rRNA, 23S rRNA e ITS. Se realizó un análisis de similitud con las secuencias de la base de datos GenBank del NCBI y se construyó tres árboles filogenéticos. Se identificó tres cepas bacterianas: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus sp.*; dos cepas de microalgas: una a nivel de género *Chroococciopsis*, y otra a nivel de familia Clorofita y una cepa fúngica: *Talaromyces thermophilus*. Los microorganismos aislados tienen varias aplicaciones biotecnológicas potenciales, entre ellas: producción de enzimas termoestables, biocombustibles, biopolímeros, fármacos y nanopartículas.

PALABRAS CLAVE:

- **TERMÓFILOS**
- **SECUENCIACIÓN**
- **GEN 16S rRNA**
- **GEN 23S rRNA**
- **GEN ITS**

ABSTRACT

Ecuador is a megadiverse country, located in the Pacific Ring of Fire. Magmatic flows originate hundreds of thermal springs. In the country, there are few studies about microorganisms which can live in extreme environments. This research focused on the isolation and identification of thermophilic bacteria, microalgae and fungi from the Aguas Hediondas thermal springs. The physicochemical characteristics of the source were analyzed. The temperature and pH of each sampling point were measured. Water and sediment samples were collected from different points in the source. The samples were inoculated in general culture media for the growth of bacteria, microalgae and fungi. A total of 40 pure cultures were obtained: 37 strains of bacteria, 2 of microalgae and 1 fungi. For molecular identification the genomic DNA was extracted from each strain, the 16S rRNA, 23S rRNA and ITS genes were amplified and sequenced. A similarity analysis was performed with the sequences from the NCBI GenBank database and three phylogenetic trees were constructed. Three bacterial strains were identified as: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus sp.*; two strains of microalgae: one at the genus *Chroococcidiopsis sp.*, and another at the Chlorophyta filum and a fungal strain: *Talaromyces thermophilus*. The isolated microorganisms have several potential biotechnological applications: production of thermostable enzymes, biofuels, biopolymers, drugs and nanoparticles.

KEY WORDS:

- THERMOPHILES
- SEQUENCING
- 16S rRNA GENE
- 23S rRNA GENE
- ITS GENE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Ecuador es un país con intensas actividades sísmicas y volcánicas debido a su ubicación geográfica en el Cinturón de Fuego del Pacífico. Los flujos magmáticos originan cientos de fuentes geotermales en varias ciudades del país. Los principales usos de estos manantiales son terapéuticos y recreacionales. Hay pocos estudios sobre las características fisicoquímicas de las aguas termales y sus potenciales usos como fuentes de energía.

En contraste, la información en la literatura científica sobre microorganismos extremófilos en las aguas termales del país es casi inexistente.

La fuente geotermal Aguas Hediondas presenta condiciones adecuadas de pH y temperatura para el crecimiento de bacterias, microalgas y hongos termófilos. En esta investigación se pretende aislar e identificar estos microorganismos.

1.2. Justificación del problema

Los amplios rangos de temperatura, pH y concentraciones de metales pesados en las fuentes geotermales, permite el crecimiento de microorganismos extremófilos.

A nivel mundial el aislamiento y análisis de microorganismos extremófilos ha cobrado gran interés dado que presentan características únicas que los han vuelto organismos de gran valor industrial y ambiental.

Al identificar y aislar los microorganismos que se encuentran en ambientes geotermales se podrá buscar potenciales aplicaciones biotecnológicas e industriales como: producción de extremozimas, descontaminación de agua y suelos contaminados con metales pesados o radioactivos, producción de biosensores, elaboración de nuevas medicinas, estudios de extremolitos, entre otros.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Aislar e identificar bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal Aguas Hediondas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Aplicar técnicas dependientes de cultivo para el aislamiento de cepas de bacterias, microalgas y hongos termófilos.
- Amplificar y secuenciar el gen 16S rRNA, 23S rRNA y el gen ITS para la identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos aislados.
- Construir un cepario con los microorganismos aislados de la fuente geotermal Aguas Hediondas para futuras investigaciones.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Microorganismos extremófilos

Los extremófilos se desarrollan bajo condiciones de temperatura, pH, salinidad y concentraciones de metales pesados que podría matar a la mayoría de los organismos superiores y muchos no pueden sobrevivir en los ambientes considerados globalmente normales (Ramírez, Serrano, & Sandoval, 2006).

En años recientes, los microorganismos que viven bajo condiciones extremas se han vuelto el foco de atención de los investigadores. Existe un gran interés de los científicos por comprender los mecanismos de adaptación bioquímica de dichos organismos, así como también el uso potencial de los extremófilos y extremozimas en la biotecnología (Morozkina, 2010).

1.4.2. Adaptaciones de microorganismos a condiciones ambientales extremas

1.4.2.1. Factor temperatura

La temperatura es uno de las condiciones más importantes para la existencia de vida, su variación influencia diferentes procesos físicos y biológicos. Bajo altas temperaturas, se incrementa la fluidez de membrana, la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos ocurre, y la solubilidad de gases necesaria para las funciones vitales de los microorganismos (O_2 y CO_2) cambian; cuando hay bajas temperaturas, se forman cristales de hielo, que dañan a las membranas citoplasmáticas (Morozkina, 2010).

Considerando el factor temperatura, los microorganismos se dividen en psicrófilos (con temperaturas óptimas de crecimiento = $T_{op} \leq 15^\circ C$), mesófilos ($T_{op} \approx 37^\circ C$), termófilos ($T_{op} \approx 50^\circ C$), e hipertermófilos ($T_{op} > 80^\circ C$). Los termofílicos, que son más comunes que los hipertermófilos, son representados por varios especies bacterianas, incluyendo bacterias fotosintéticas (cianobacteria, bacterias púrpura y bacterias verde), Firmicutes (*Bacillus*, *Clostridium*, y algunos otros), bacterias tiónicas (*Thiobacillus*), y arqueabacteria (*Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Sulfolobus*, metanogénicas) (Vieille & Zeikus, 2001).

Hasta el año 2010, más de 70 especies, 29 géneros, y 10 órdenes de termófilos se conocen, la mayoría de ellos pertenece al dominio Árquea. La temperatura máxima límite de crecimiento ($113^\circ C$) se encontró en un árquea reductora de nitrato quimioautotrófica *Pyrolobus fumarii*. Luego, se encontraron bacterias hipertermófilas que crecen a $121^\circ C$ y no pueden vivir a temperaturas menores de 80 y $90^\circ C$ (Kashefi & Lovley, 2003).

Entre los organismos eucariotas, solo pocas especies de hongos tienen la habilidad de prosperar a temperaturas entre 45 y $55^\circ C$. Los hongos termófilos tienen una temperatura mínima sobre los $20^\circ C$ y crecen a temperaturas máximas sobre $50^\circ C$. Los hongos termófilos no son tan extremos como algunas especies de bacterias o arqueas que pueden sobrevivir sobre los

100°C, sin embargo, existen unas 30 de 50,000 especies de hongos descritas que resisten estas elevadas temperaturas, entre ellas están: *Canariomyces thermophila*, *Chaetomium thermophile*, *Coonemeria crustacea*, *Corynascus thermophilus*, *Dactylomyces thermophilus*, *Melanocarpus albomyces*, *Myceliophthora hinnulea*, *Thizomucor pusillus*, *Talaromyces emersonii*, *Thielavia australiensis*, y otros (Maheshwari, Bharadwaj, & Bhat, 2000).

La capacidad de sobrevivir bajo condiciones extremas de temperatura se debe a cambios de la estructura de la membrana citoplasmática, y también a la síntesis de extremozimas y proteínas de choque térmico (Hickey & Singer, 2004).

1.4.2.2. Presión

Bajo condiciones de presión altas se produce una densificación de lípidos, que lleva al daño de la pared celular y la membrana citoplasmática. Elevadas presiones pueden ser razón de un descenso de la velocidad de crecimiento celular y producción de biomasa debido a la supresión de interacción de proteínas con sustratos, además de la inactivación enzimática (Abe F. , 2007).

Las barófilas pueden crecer a profundidades mayores a 10 km (La fosa de las Marianas a – 10 898 m) bajo presiones de 130 MPa. La presión óptima obligada de las barófilas está entre 70 y 80 MPa y, para algunas de ellas, 100 – 200 MPa, mientras que valores de presión menores que 50 MPa es crítico para su crecimiento (Abe F. &., 2001).

Las aguas profundas en océanos se caracterizan, no solo por altas presiones, sino también por valores de temperatura extremos (desde 1-2 °C hasta 400 °C en fuentes hidrotermales), es por esto que las basófilas pueden ser divididas en psicrófilas, mesófilas y termofílicas de acuerdo con su temperatura de crecimiento (Morozkina, 2010).

La comparación de los microorganismos barofílicos con las bacterias, que viven a presión atmosférica, *E. coli* en particular, muestran la presencia de un sistema conservado regulatorio, responsable de la adaptación a elevadas presiones (Robinson & Sligar, 1995).

1.4.2.3. pH del ambiente

Dependiendo del pH del ambiente, varios microorganismos se conocen como acidófilos (crecimiento óptimo a $\text{pH} < 5$), neutrófilos (crecimiento óptimo a $\text{pH} 6 - 8$) y alcalófilos (activos a $\text{pH} > 9$) (Michaux, y otros, 2010).

Diferentes especies eucariotas y procariotas son organismos acidófilos. El hongo *Acontium cylatium*, *Cephalosporium sp.* y *Trichosporon cerebriae* son capaces de vivir bajo condiciones extremadamente ácidas ($\text{pH} 0$). Las arqueobacterias pueden crecer bajo pH muy bajos. La arqueobacteria heterotrófica aerobia *Picrophilus oshimae* y *Picrophilus torridus* son capaces de crecer a $\text{pH} 0.7$ y 60°C ; fueron aisladas de suelos húmedos con ácido sulfúrico (1.2M), resultado de la oxidación del sulfuro de hidrógeno por bacterias sulfuoxidantes. Estos microorganismos mantienen un pH intracelular de 4.6, mientras otros acidófilos extremos a 6.0 (Schleper, Pühler, Kühlmorgen, & Zillig, 1995).

Los efluentes ácidos de minas son fuente de termófilos acidófilos, capaces de oxidar (*Leptospirillum thermoferrooxidans*) y reducir (*Acidiphilum spp.*) hierro. Las arqueobacterias *Sulfolobus acidocaldaris* crecen a $\text{pH} 3.0$ y 80°C . La bacteria haloalcalotolerante *Anaerobranca spp.* fue aislada de nichos ecológicos con altas concentraciones de sal y valores extremos de pH y temperatura (Engle, Li, Woese, & Wiegel, 1995).

Los microorganismos acidófilos y alcalófilos tienen mecanismos efectivos para mantener la homeostasis iónica intracelular y para mantener valores de pH cercanos al neutral en el interior de la célula (Michaux, y otros, 2010).

1.4.3. Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo

1.4.3.1. Extracción de ADN

En general, la mayoría de protocolos de extracción de ADN inician con un paso de lisis celular donde se rompen las membranas celulares y nucleares. Luego las proteínas celulares son removidas por precipitación con sales o

degradadas por procesos enzimáticos. Un paso adicional de digestión de ARN es opcional con la enzima ARNasa. El ADN genómico remanente en la solución luego es precipitado por adición de alcohol. El ADN precipitado es aislado y rehidratado. Se almacena entre -20 y -80°C para su posterior análisis (Bruns, Ashwood, & Burtis, 2007).

1.4.3.2. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR por sus siglas en inglés, es una poderosa técnica de laboratorio inventada por Kary Mullis en 1983 que permite amplificar una secuencia específica de ADN y aislarla del genoma. A pesar de las numerosas variaciones de PCR, la reacción está compuesta por solo unos pocos componentes, entre ellos: agua, buffer de PCR, MgCl₂, dNTPs, cebador delantero, cebador reverso, ADN molde y la enzima polimerasa (Watson *et al.*, 2012).

En general, consta de 30 a 40 ciclos repetitivos de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión o elongación. El primer paso es para desnaturalizar el ADN molde, es decir, para separarlo en cadenas simples y dejar al descubierto las secuencias complementarias de los cebadores. Esto se logra a 94 ó 95°C por un tiempo igual o mayor a 90 segundos. El segundo paso es para la hibridación de los cebadores a las cadenas moldes complementarias. Se debe escoger una temperatura de *annealing* o de unión del cebador, esta temperatura es específica para los cebadores que se utilicen en la reacción y suele ubicarse en el rango de 35 a 60°C y puede durar más de 30 segundos. Finalmente en la etapa de extensión se logra a 72°C, la temperatura óptima de la Taq polimerasa (figura 1). La duración de este paso final es determinada por la longitud del amplicón. Como regla general se necesitan unos 30 segundos por cada 500pb de producto (Integrated DNA Technologies, 2011).

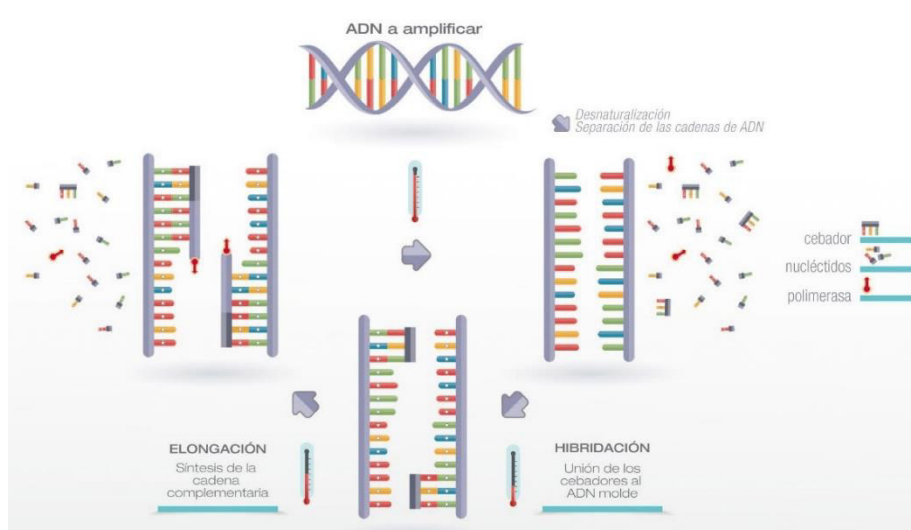


Figura 1 Esquema de la técnica de PCR

Fuente: (ASA, 2017)

1.4.3.3. Gen ribosomal 16S

El ribosoma bacteriano está formado por dos subunidades, una de 50S y la otra de 30S. La subunidad 30S tiene una molécula de rRNA 16S (figura 2) (Janda & Abbott, 2007).

Se conoce bien que genes codificadores de 5S, 16S, 23S rRNA, y los espacios entre ellos son significativos para la identificación de bacterias, microalgas y arqueas. Entre estos fragmentos estables, el gen 16S rRNA es el marcador más frecuentemente usado para propósitos taxonómicos en bacterias (Tortoli, 2003).

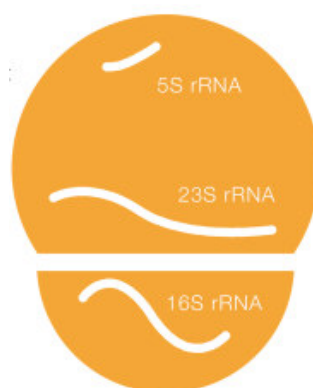


Figura 2 Ribosoma procariota.

Fuente: (ChunLab, 2017).

La secuencia del gen 16S rRNA es de aproximadamente 1.5 kb, y está compuesta de regiones variables y conservadas (figura 3). Tiene mayor grado de conservación que genes que codifican enzimas. El gen 16S rRNA tiene gran importancia en la fisiología de las bacterias y es ampliamente aceptado que una mutación importante en una región “altamente conservada” conduce a una forma de vida no viable, o una forma que es eliminada a través de selección natural (Clarridge, 2004).

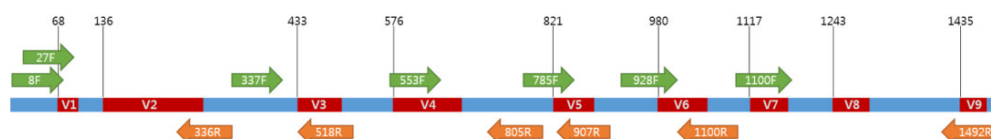


Figura 3 Gen 16S rRNA.

Fuente: (ChunLab, 2017).

Nota: Rojo: regiones variables. Celeste: regiones conservadas. Verde: cebadores delanteros. Anaranjado: cebadores reversos.

La secuencia del gen 16S rRNA permite evaluar la distancia evolutiva y las relaciones entre organismos, y provee de evidencias válidas y estadísticas para la identificación bacteriana, mostrando suficientes polimorfismos entre especies. El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA entre cepas bacterianas es mejor que los métodos fenotípicos, permitiendo una identificación más precisa de cepas raras, poco descritas o aberrantes. Adicionalmente, este marcador puede ser usado para la identificación de bacterias no cultivadas, cianobacterias y arqueas (Kimura, 1980).

Sin embargo, algunos investigadores han encontrado que el gen 16S rRNA no tiene buenos resultados para diferenciar unas pocas especies, que se pueden identificar por el gen 23S rRNA o 16S-23S rDNA ISR (intergenic spacer region) más precisamente (Woese, 1987).

Se plantea que al obtener un 97% de identidad de una secuencia del gen rRNA 16S comparada con las bases de datos se tiene una alta probabilidad de que sean de la misma especie (Vasek, Hebert, De Giori, Rata, & Fusco, 2005).

1.4.3.4. 23S rRNA

El gen 23S rRNA es dos veces más grande que el gen 16S rRNA, mide unas 2,9kb aproximadamente (figuras 2 y 4). Su análisis puede arrojar mucha información sobre la filogenia de ciertas especies de microalgas y bacterias debido a que tiene regiones más variables. Sin embargo su uso se ha visto obstaculizado principalmente debido a su gran tamaño (Sallen, Rajoharison, Desvarenne, Quinn, & Mabilat, 1996).



Figura 4 Gen 23S rRNA.

Fuente: (Ahern, 2017).

Douglas y colaboradores han reportado la utilidad del gen 23S rRNA para la identificación molecular de microalgas (Douglas, 1984).

1.4.3.5. ITS

ITS (siglas en inglés de: Internal Transcribed Spacer Region), son regiones del genoma que se localizan entre los genes ribosomales 18S y 28S, es un marcador genético versátil. Pueden ser amplificadas y el producto de amplificación es digerido con enzimas de restricción para observar polimorfismos genéticos. Es ampliamente utilizado en la construcción de árboles filogenéticos, evaluación de procesos evolutivos y determinación de la identidad taxonómica en diversos organismos eucariotas como hongos, algas, protozoos, vertebrados, entre otros (Powers, y otros, 1997).

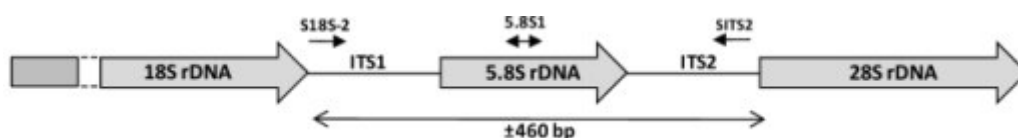


Figura 5 Gen ITS

Fuente: (Quaedvlieg, y otros, 2011).

1.4.3.6. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLPs, o Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, es una técnica en la cual el ADN es tratado con una o más enzimas de restricción que cortan el ADN en cualquier lugar que presente una secuencia específica de bases (cada enzima de restricción cortará en un único sitio de restricción), generando un número de fragmentos de ADN de diferentes longitudes (figura 6) (Narayanan, 1991).

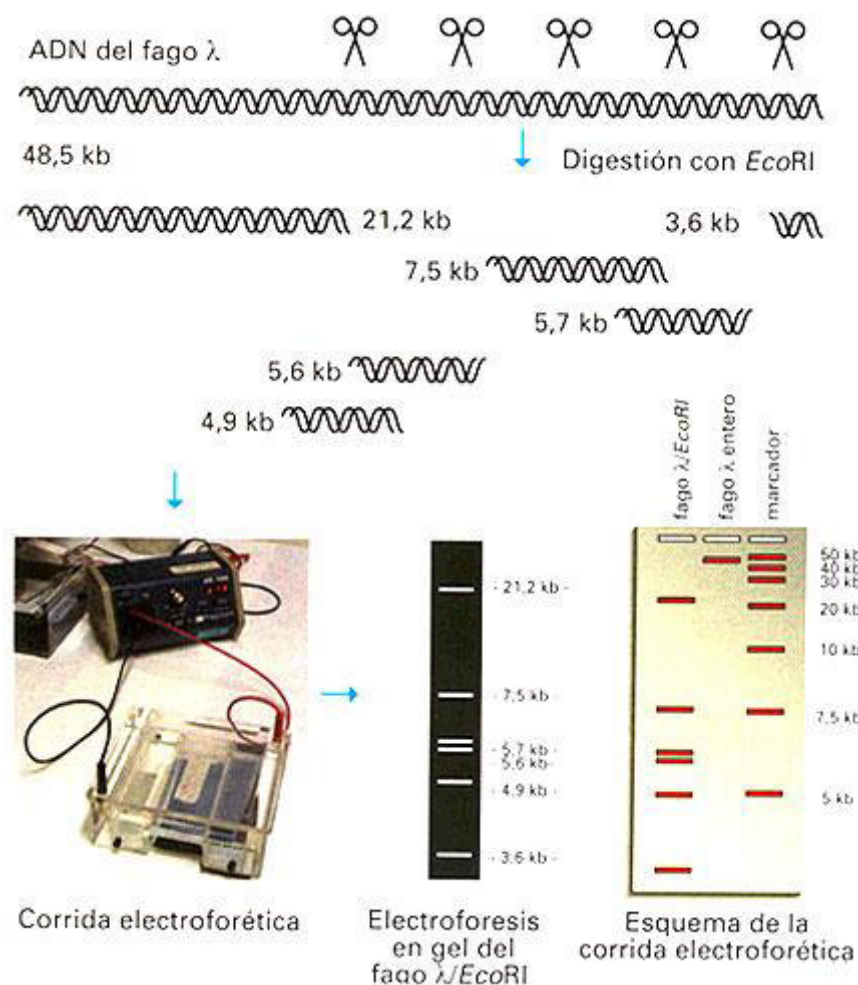


Figura 6 Esquema de análisis por RFLPs.

Fuente: (Posik, Ripoli, Garcia, & Giovambattista, 2007).

En algunos individuos, las mutaciones aleatorias en el ADN causarán la pérdida de uno o más sitios de restricción, es decir, una variación en la longitud de los fragmentos. Si el ADN se coloca en un gel y se le aplica un campo eléctrico, los fragmentos de diferentes longitudes se moverán a lo largo

del gel dependiendo de su peso. El ADN puede visualizarse mediante varios métodos, revelando un patrón de bandas, similar a un código de barras de un supermercado. Es relativamente fácil determinar que dos muestras son diferentes, si una tiene una banda que la otra no posee, pero es un poco más complicado determinar si dos muestras con el mismo patrón de bandas provienen del mismo individuo (Panneerchelvam & Norazmi, 2003).

1.4.3.7. Secuenciación Sanger

Previo a la secuenciación de Sanger, se necesita el fragmento de DNA que se quiere secuenciar. Luego, se añaden los primers, los cuatro nucleótidos y la DNA polimerasa. En el método original de Sanger, se realizan cuatro reacciones separadas. Cada reacción contiene un nucleótido modificado que una vez incorporado resulta en la terminación de la cadena, que permite la identificación de la base final. Estas muestras luego se someten a una corrida electroforética (Let's Talk Science, 2013).

Nuevos avances en este método incorporaron el uso de fluoróforos, que son componentes químicos que emiten luces de color característico. Asignándole diferentes fluoróforos coloreados a cada nucleótido, la secuenciación se puede realizar en una sola reacción y en un solo carril del gel, identificando el color de cada banda, como se observa en la figura 8 (Janitz M. , 2011).

1.4.3.8. Alineamiento múltiple de secuencias (MSA)

Consiste en alinear múltiples secuencias de ADN, ARN o proteínas y es una herramienta esencial que tiene varias aplicaciones, entre ellas: determinar la similitud entre varios organismos, construcción de árboles filogenéticos, determinar la estructura de proteínas, predicción de función de proteínas, búsqueda de regiones conservadas, entre otras. Varios programas bioinformáticos (MEGA, ClustalX, BioEdit, Strap, etc) permiten realizar MSA mediante algoritmos matemáticos (Edgar & Batzoglou, 2006).

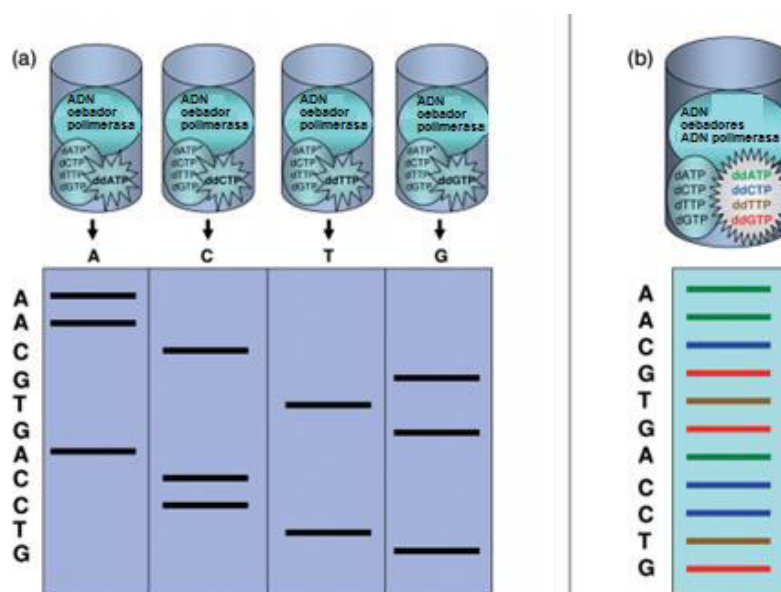


Figura 7 Secuenciación Sanger.

Fuente: (Janitz M. , 2011).

Nota: a.- Método original, b.- Método modificado.

1.4.3.9. Árboles filogenéticos

El árbol filogenético, también conocido como filogenia, es un diagrama que representa las líneas de descendencia evolutiva de diferentes especies, organismos, o genes de a partir de un ancestro común. Los árboles filogenéticos son útiles para organizar el conocimiento de la diversidad biológica, para la estructuración de clasificaciones, y para dar ideas sobre eventos que ocurrieron durante la evolución (figura 9), (Baum, 2008).

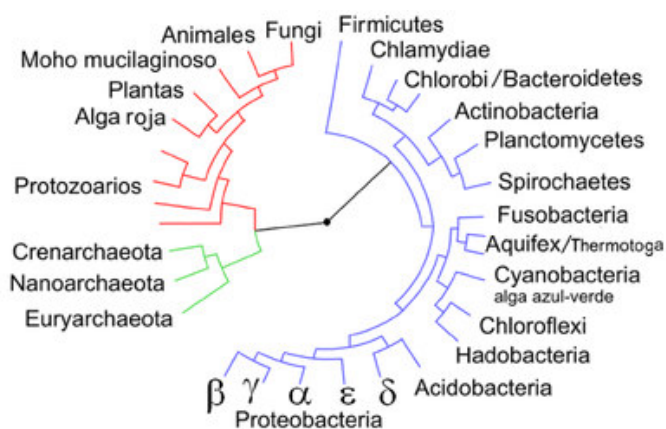


Figura 8 Árbol filogenético.

Fuente: (Ciccarelli, y otros, 2006).

1.4.3.10. Aplicaciones

Los extremófilos poseen muchas aplicaciones biotecnológicas y comerciales debido a su capacidad para sintetizar enzimas, que muestran alta actividad y estabilidad, sustancias biológicas activas y también para la destrucción o eliminación de xenobióticos, incluyendo la acumulación de iones de metales pesados (Podar & Reysenbach, 2006).

Las enzimas termófilas son las más prometedoras para aplicaciones industriales. Durante su cultivo (temperaturas de fermentación mayores a 60°C) el riesgo de contaminación microbial decrece, la solubilidad de los sustratos aumenta, y la viscosidad de los medios de cultivo disminuyen. La mayoría de las enzimas termófilas tienen alta termoestabilidad de 70 hasta 125°C. Los microorganismos termófilos e hipertermófilos sirven como fuente de hidrolasas altamente termoestables: celulasas, xilasas, proteasas, lipasas, glucoisomerasas, alcohol dehidrogenasas, y esterases. Se han aplicado en la biología molecular y la medicina enzimas termoestables como: DNA polimerasas, DNA ligasas, restrictasas y fosfatasas (Margesin & Schinner, 2001).

También se estudia la producción de “extremolitos” que producen los microorganismos extremófilos para protegerse de la influencia de ambientes hostiles. Algunos ejemplos son: clicerina, betaina, ectoina e hidroxiectoina y se están utilizando ampliamente en la industria alimenticia, cosmetológica, farmacéutica y de biología molecular (de Champdoré *et al.*, 2007).

En años recientes, mucha información ha aparecido acerca de microorganismos extremófilos que participan en remediación de agua y suelos contaminados con metales pesados y radionucleidos (Al-Maghrabi, Islam, & Chaalal, 1999).

1.4.3.11. Terma Aguas Hediondas

Las Termas Aguas Hediondas se encuentran ubicadas en la parroquia Tufiño, provincia Carchi, cantón Tulcán, se originan por el contacto de aguas subterráneas con flujos magmáticos del volcán Chiles. La temperatura de las

termas alcanza en promedio 50 - 55°C. Son aguas sulfatadas, sódicas, cálcicas, cloruradas y magnésicas, como se observa en la tabla 1 (Beate & Salgado, 2005).

Tabla 1

Composición química de las aguas de la fuente geotermal Aguas Hediondas.

Fuente	Tufiño 1 (Aguas Hediondas)	Tufiño 2	Tufiño 3
T °C	41	53	40
pH	3.1	5.9	6.2
Na	78	149	134
K	18	34	3.1
Ca	328	100	104
Mg	64	70.6	70.7
HCO3	--	350	670
Cl	320	110	74
SO4	1300	550	2100
SiO2	226	159	157
Altitud	3850	3530	3260

Fuente: Beate *et al.*, 2015

1.5. Hipótesis de la investigación

En el agua y el sedimento de la fuente geotermal Aguas Hediondas existen bacterias, microalgas y hongos termófilos.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El proyecto de tesis fue desarrollado por Roque Guillermo Rivas Párraga, con la colaboración de Andrés Izquierdo, Ph.D., director del proyecto y Alma Koch Kaiser, MSc., asesora científica.

2.2. Zona de estudio

La investigación se realizó en campo y a nivel de laboratorio.

2.2.1. Fase de campo

Se llevó a cabo en la fuente geotermal Aguas Hediondas ubicada en la parroquia Tufiño, cantón Tulcán, provincia del Carchi, Ecuador; con coordenadas geográficas Latitud: 00°48.578'N; Longitud: 077°54.362'W; Altura media: 3428 m.s.n.m. Aguas Hediondas se encuentra a 3,5km de distancia del Volcán Chiles, Colombia (figuras 9 y 10).



Figura 9 Ubicación geográfica de las termas Aguas Hediondas

Fuente: (GoogleMaps, 2017).



Figura 10 Distancia entre Aguas Hediondas y el Volcán Chiles.

Fuente: (GoogleMaps, 2017)

2.2.2. Fase de laboratorio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicado en la Av. El Progreso s/n, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador; con coordenadas geográficas Latitud: $0^{\circ}18'53.5''S$, Longitud: $78^{\circ}26'36.5''O$, Altura Media: 2700 m.s.n.m.

2.3. Periodo de investigación

La investigación se desarrolló desde mayo de 2016 hasta febrero de 2017, con una duración de 10 meses.

2.4. Procedimientos de aislamiento

2.4.1. Preparación de medios de cultivo

Para la toma de muestras de sedimentos se preparó medios líquidos: M9 y caldo nutriente (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

Dependiendo del tipo de microorganismo a aislar se preparó los siguientes medios sólidos:

- Bacterias aerobias: Agar nutriente y Agar M9 (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).
- Hongos: medio PDA (Rinaldi, 1982).
- Microalgas: BG11 (Morales, 2012).

Se ajustó el pH de los medios a 5, correspondiente al de la terma Aguas Hediondas. Los componentes de cada medio se presentan en el Anexo A.

2.4.2. Toma de muestras

La toma de muestras se realizó el 29 de abril de 2016. Se localizaron 3 ojos o vertientes de la fuente geotermal correspondientes a cada punto de muestreo (figura 12).



Figura 11 Fuente geotermal Aguas Hediondas.

Fuente: (Rivas, 2017).

Para evitar la contaminación de las muestras, se mantuvo condiciones estériles y usó implementos de protección personal: guantes, mascarilla y mandil.



Figura 12 Recolección de muestras.

Fuente: (Rivas, 2017).

2.4.2.1. Muestras para aislamiento de bacterias y hongos

Se recolectó 50 mL de agua superficial y profunda en tubos falcon estériles por cada punto y por triplicado. Para la toma de muestras de sedimentos, se realizó un raspado del suelo por cada punto con un hisopo estéril y luego se inoculó en tubos con caldo nutriente y M9. Se mantuvo las muestras a 50°C aproximadamente hasta su procesamiento en el laboratorio.

2.4.2.2. Muestras para aislamiento de microalgas

Se recolectó 50mL de agua con sedimento por cada punto y por triplicado. No se colocó reactivos para preservar la muestra. Se mantuvo a 50°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

2.4.2.3. Muestras para análisis de propiedades fisicoquímicas

Se recolectó dos litros de agua y 1 Kg de sedimentos en recipientes estériles. Se almacenaron a 4°C hasta llegar al laboratorio del Centro de Servicios Ambientales y Químicos (CESAQ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2.4.3. Procesamiento de las muestras

Las muestras se inocularon en medios de cultivo sólidos 6 horas después de su recolección debido a la distancia entre el laboratorio y la fuente geotermal.

De las muestras destinadas al aislamiento de bacterias y hongos, se inoculó 100µL en medios de cultivo sólidos (Agar Nutriente, Agar M9 y PDA) mediante la técnica de extensión. Los cultivos del punto 2 se incubaron a 51°C y los de los puntos 1 y 3 a 56°C por 72 horas, monitoreando el crecimiento cada 12 horas.

Para la obtención de microalgas, se sembró cada muestra en medio sólido BG11. Se agitó la muestra, y posteriormente se inoculó tres gotas en el medio esparciendo el líquido mediante la técnica de extensión. Cada caja se mantuvo a temperatura ambiente con iluminación entre 2000 y 1000 lux y fotoperiodo de 24 horas de luz y 24 horas de oscuridad.

2.4.4. Obtención de cultivos puros

Para la obtención de cepas bacterianas puras se observó los cultivos iniciales y se resembró una sola colonia en un nuevo medio estéril igual al del cultivo inicial, por la técnica de estriado. Se dejó incubar a 51 y 56°C por 12 horas y se observó el crecimiento.

Para obtener microalgas puras, se observó en el microscopio los cultivos iniciales y con la ayuda de un asa, se seleccionó colonias aisladas de microorganismos, que fueron transferidos a otra caja Petri con el mismo medio hasta obtener axenización. Posteriormente, se traspasó las colonias de microalgas ya aisladas en 3mL del medio BG11 líquido. Se mantuvo los tubos a las mismas condiciones de crecimiento. Al observar aumento de biomasa, se procedió a añadir más medio hasta cambiar a matraces de 25mL.

2.4.5. Determinación de las características macroscópicas del cultivo

Se evaluó las cepas de bacterias y microalgas según los siguientes criterios: pigmentación (color), aspecto (brillante, translúcida, opaca, mucosa),

borde (liso o irregular), elevación (plana, convexa, acuminada, plano-convexa) y forma de las colonias (circular, rizoide, filamentosa, irregular, puntiforme). De la cepa fúngica se observó la pigmentación y el aspecto del micelio.

2.4.6. Determinación de las características microscópicas del cultivo

Se realizó una tinción Gram a todas las cepas bacterianas puras para identificar si son Gram positivas o Gram negativas y para determinar su morfología. También se observó al microscopio (Olympus CX21), con un aumento de 100X, las características que presentan los hongos y microalgas.

2.4.7. Preparación del cepario

Las cepas de bacterias y microalgas fueron conservadas por criopreservación en glicerol. Se sembraron en medio líquido hasta obtener abundante biomasa. Se colocó 800µL de caldo con la cepa desarrollada y 200µL de glicerol en tubos ependorf de 2mL, se dejó a -20 °C por una semana y posteriormente se las guardó a -80°C. La cepa fúngica se sembró en medio PDA inclinado y se cubrió completamente con aceite mineral. Se mantuvo a 4°C.

2.5. Extracción de ADN

2.5.1. A partir de cepas aisladas

Se extrajo ADN de las cepas bacterianas con el protocolo “Protocolo CTAB para la extracción de ADN genómico bacteriano” (Moore, Arnscheidt, KrÜger, StrÖmpl, & Mau, 2008), anexo B.

El ADN de las cepas fúngicas se extrajo utilizando el protocolo de “Minipreparación de ADN”, según (Weising, Nybom, Wolff, & Meyer, 1995), descrito en el anexo B.

El aislamiento de ADN de cada microalga se realizó siguiendo el método basado en la ruptura con perlas de vidrio descrito por (Cai & Wolk, 1990). Los pasos se describen en el anexo B.

El ADN extraído se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 8000UV-Vis para determinar su concentración y radios de pureza.

2.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificó los genes 16S rRNA, 23S rRNA y el gen ITS de las cepas aisladas. Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 25µL. Se preparó un master mix con el kit GoTaq® GreenMasterMix de Promega (tabla 2). Los cebadores utilizados se describen en la tabla 3.

Tabla 2

Componentes de la PCR.

Componente	Volumen (µL)	Concentración Final
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12,5	1X
Cebador delantero, 10µM	1,5	0,1-1,0 µM
Cebador reverso, 10µM	1,5	0,1-1,0 µM
Muestra de ADN	2,5	<250ng
Agua ultra pura	7	N.A
Volumen final por muestra	25	

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, Temperatura de annealing (55°C) por 1min, 72°C por 1min y 72 por 7,5min. Finalmente se mantuvo a 4°C por 10min.

Tabla 3

Cebadores para PCR de Bacterias, microalgas y hongos.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Organism	Tamaño*	Referencia
16S rRNA	27F	AGATTTGATYMTGGCTCAG	Bacteria	~1500pb	Cihan <i>et al.</i> , 2012
	1492R	ACGGYTACCTTGTTACGACTT			
23S rRNA	p23SrV_f1	GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA	Microalgas	~410pb	Sherwood & Presting, 2007
	p23SrV_r1	TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG			
ITS	ITS1F-Bt1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Hongos	~650pb	White, 1990
	ITS4Rbt	TCCTCCGCTTATTGATATGC			

**Tamaño del fragmento de amplificado.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con visualizador GelStar™ 10X concentrado en DMSO, en el equipo High Performance UV - transiluminador. La electroforesis se configuró a 100V, 300mA y 40 minutos. Se utilizó un marcador molecular 1kb DNA Ladder (Promega).

2.7. Análisis de RFLPs

Se realizó un análisis de RFLPs de los productos de PCR de las cepas bacterianas. Los amplicones del gen 16S rRNA fueron digeridos por la enzima MspI (BioLabs) que reconoce la secuencia CCGC en la hebra superior y GGCC en la cadena complementaria, (Tabla 4) (Adley, 2006).

Tabla 4

Componentes de la reacción de RFLPs.

Componente	Volumen (µL)
10X NE buffer	2
BSA 100X	0,2
MspI	0,25
Agua ultra pura	7,55
Producto de PCR	10
Volumen final	20

Se incubó las reacciones a 37°C por 2 horas. Los fragmentos de restricción se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se configuró a 100V y 300mA por 50 minutos. Se utilizó un marcador molecular 1kb DNA ladder (Promega). Las cepas se clasificaron en grupos de acuerdo a la similitud en los patrones de corte.

2.8 Secuenciación

Los productos de PCR se enviaron a la compañía Macrogen en Korea, para su posterior purificación y secuenciación. Se envió 20µL de cada producto de PCR no purificado a una concentración aproximada de 100ng/µL y 25µL de cada cebador a una concentración 10nM (tabla 3).

2.9. Análisis de secuencias

2.9.1. Limpieza y ensamblaje

Las secuencias de DNA resultantes, enviadas por MacroGen Korea, se limpiaron en el software Geneious 10.0.8. Se ensamblaron las secuencias forward y reverse para construir los contigs con una alta sensibilidad, utilizando un límite de probabilidad de error de 0.02. Finalmente, se generaron secuencias consenso.

2.9.2. Análisis de similitud y homología

Se corrió un BLASTN de las secuencias consenso para compararlas con secuencias de material tipo de la base de datos NCBI, es decir, organismos autenticados y cultivables. Se analizaron los parámetros de porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura de las secuencias.

2.9.3. Análisis filogenético

En el análisis filogenético se utilizaron las secuencias de especímenes tipo con mayor porcentaje de identidad y de cobertura sugeridas por el NCBI.

Utilizando la herramienta MUSCLE del software MEGA 7, se realizaron los alineamientos de las secuencias. Se purgó las regiones ambiguas mediante el software de acceso online Gblocks. En el programa MEGA 7 se analizó las secuencias para encontrar el modelo de evolución que más se ajusta para la construcción de la filogenia. Finalmente se construyó los árboles filogenéticos usando el método probabilístico de máxima verosimilitud.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Evaluación de cada punto de muestreo

La fuente geotermal se encuentra a la intemperie. Se ubicó tres ojos o vertientes de agua. Se midió la temperatura y el pH de cada ojo de agua, correspondiente a cada punto de muestreo, así como también las coordenadas geográficas y la altura, los datos se detallan en la tabla 5.

Tabla 5

Datos de cada punto de muestreo.

Ojo de agua	T [°C]	pH	Coordenadas	Altura
1	56,2	5,64	N 00°48.578' W 077°54.362'	3428 m.s.n.m
2	51,4	6,5		
3	56,4	5		

3.1. Análisis fisicoquímico

En las tablas siguientes se resumen los resultados de los análisis fisicoquímicos de las muestras de agua y sedimentos de la fuente geotermal Aguas Hediondas.

Tabla 6

Análisis fisicoquímico de muestras de agua.

Parámetro	Método analítico	Unidad	Resultado
Arsénico	SM 3112 B / SM3114 C / CP-PEE-A009	mg/L	0,054
Cloruros	SM 4500 Cl / CP-PEEA013	mg/L	83,1
Cobre	SM 3111 B / CP-PEE-A013	mg/L	<0,05
Conductividad Eléctrica	SM 2510 B / CP-PEE-A033	uS/cm	1725
Hierro	SM 3111 B / CP-PEE-A010	mg/L	0,53
Manganeso	SM 3111 B / CP-PEE-A010	mg/L	2,5
pH	SM 4500-H+ B /CP-PEE-A042	unidad pH	4,8
Sólidos sedimentables	SM2540 F / CP-PEE-A061	mL/L	<,1
Sólidos totales	SM 2540 B / CP-PEE-A063	mg/L	1556
Sólidos volátiles	SM 2540 E / CP-PEE-A015	mg/L	120
Sólidos no volátiles	SM 2540 E / CP-PEE-A015	mg/L	1290
Sodio	SM 3120 B /PEE/ANNCY/74	mg/L	225
Potasio	SM 3120 B /PEE/ANNCY/74	mg/L	45,4
Magnesio	SM 3111 B / MEAG-13	mg/L	168,44
Calcio	SM 3111 B / MEAG-13	mg/L	72
Sulfatos	EPA 375.4 SO2 / PA-17.00	mg/L	744,8
Alcalinidad total	SM 2320 B / MEAG-54	mg/L	16

*Resultados proporcionados por CESAQ.

Tabla 7

Análisis fisicoquímico de muestras de sedimentos.

Parámetro	Método analítico	Unidad	Resultado
Cadmio	EPA 3051/7000A / CP-PEE-S002	mg/kg	1,3
Cloruros	ASTM 1411-09/ SM 4500 Cl D	mg/kg	<250,0
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	CP-PEE-S009 SM 6440 B	mg/kg	<0,50
Materia Orgánica	ASTM D 2974 / CP-PEE-S008	%	60,59
pH	EPA 9045 D / CP-PEE-S012	unidad pH	5,8
Cobre	SM 3120 B /PEE/ANNCY/59	mg/kg	29,3
Conductividad	SM 2510 B /PEE/ANNCY/13	uS/cm	1164
Potasio	SM 3120 B /PEE/ANNCY/59	mg/kg	312
Zinc	SM 3120 B /PEE/ANNCY/59	mg/kg	28,4
Calcio	SM 3050 B / MESS-01	mg/kg	< 8
Nitrógeno Total	AOAC 955.04 / MESS-03	mg/kg	< 2530
Hierro	SM 3120 B, EPA 3050B	mg/kg	12500
Manganeso	SM 3120 B, EPA 3050B	mg/kg	79
Magnesio	SM 3050 B / MESS-01	mg/kg	1860

*Resultados proporcionados por CESAQ.

3.1. Cultivos puros obtenidos

Se obtuvo un total de 43 cultivos puros: 37 cepas de bacterias, 2 de microalgas y una fúngica. En el anexo C se presenta el punto del que provino cada cultivo y el tipo de muestra del que fue aislado (agua o sedimento). Las características macroscópicas de cada aislado se detallan en el anexo D. En la figura 13 se puede observar fotografías de cultivos puros obtenidos.



Figura 13 Cultivos puros obtenidos.

Nota: A: cepa bacteriana 14 (*Bacillus licheniformis*). B: cepa fúngica 1 (*Talaromyces thermophilus*). C: cepa de microalga 2 (Clorofita).

3.2. Características microscópicas de los cultivos

Mediante tinción Gram, se determinó que las 37 cepas bacterianas tienen morfología de bacilos Gram positivos, de entre 1 y 3 μm de longitud; además se pudo evidenciar la formación de esporas. En las siguientes figuras se observan fotografías, capturadas con la cámara MotiCam 10MP, de las tinciones Gram de distintas cepas bacterianas vistas al microscopio.



Figura 14 Tinción Gram de la cepa bacteriana #9 (*Bacillus licheniformis*), 100X.

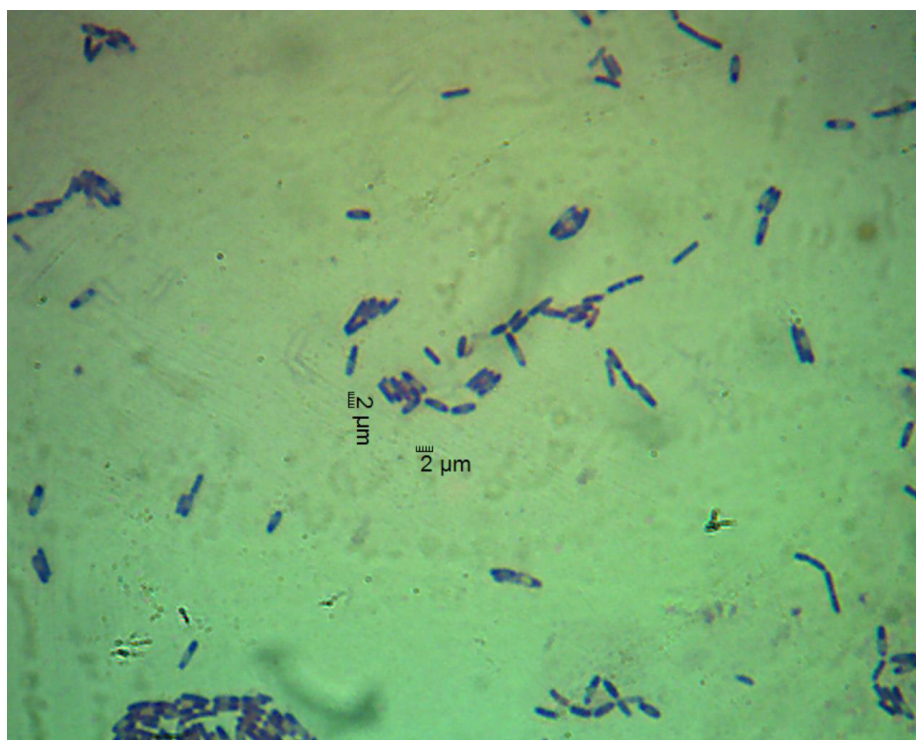


Figura 15 Tinción Gram, cepa bacteriana #14 (*Bacillus licheniformis*), 100X.

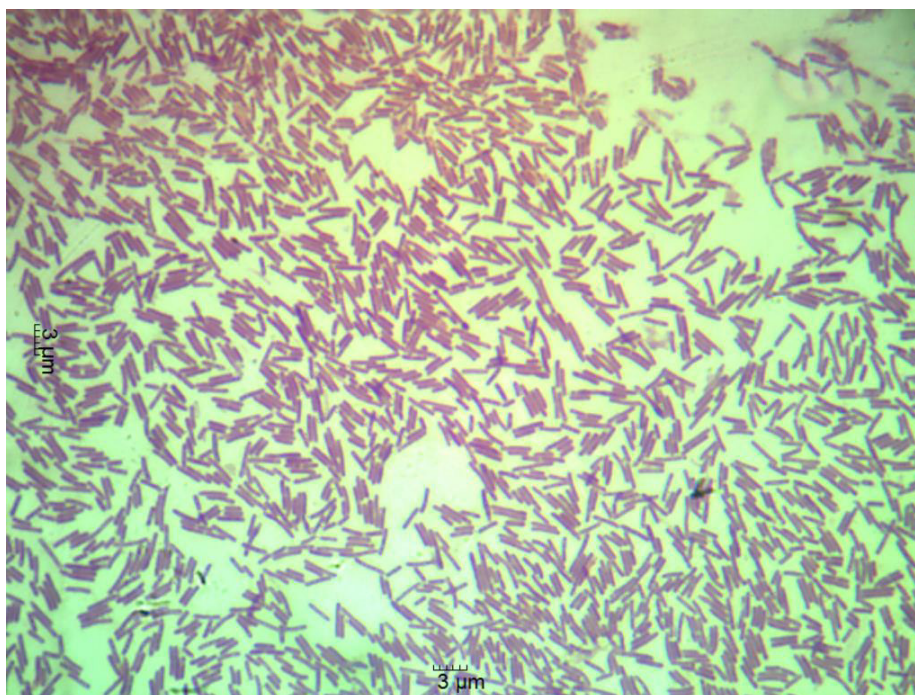


Figura 16 Tinción Gram, cepa bacteriana #36 (*Bacillus thermoamylovorans*), 100X.

También se observó las cepas de microalgas aisladas en el microscopio, las características de cada una se describen en el anexo C. A continuación se presentan capturas fotográficas.

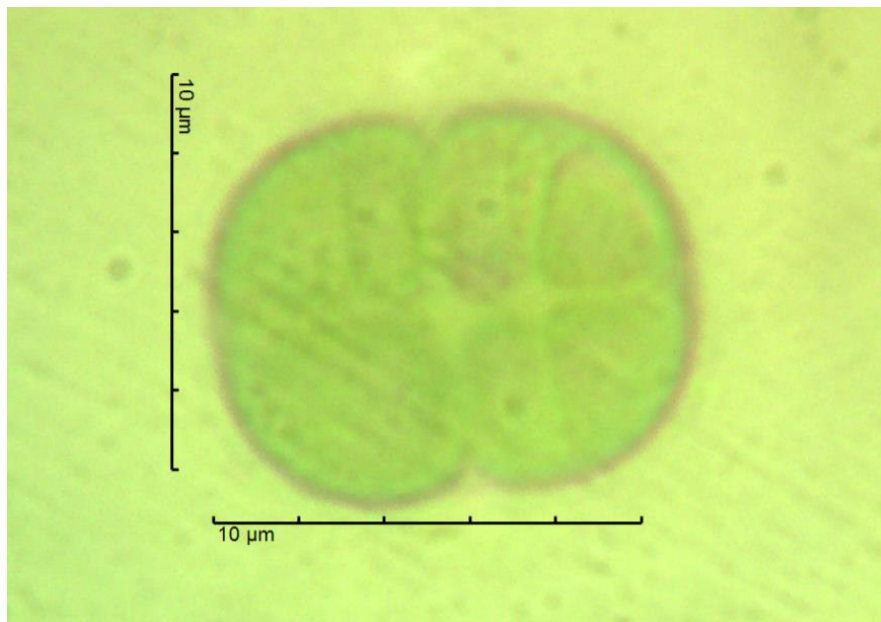


Figura 17 Microalga #1 (*Chroococciopsis sp.*), 100X.

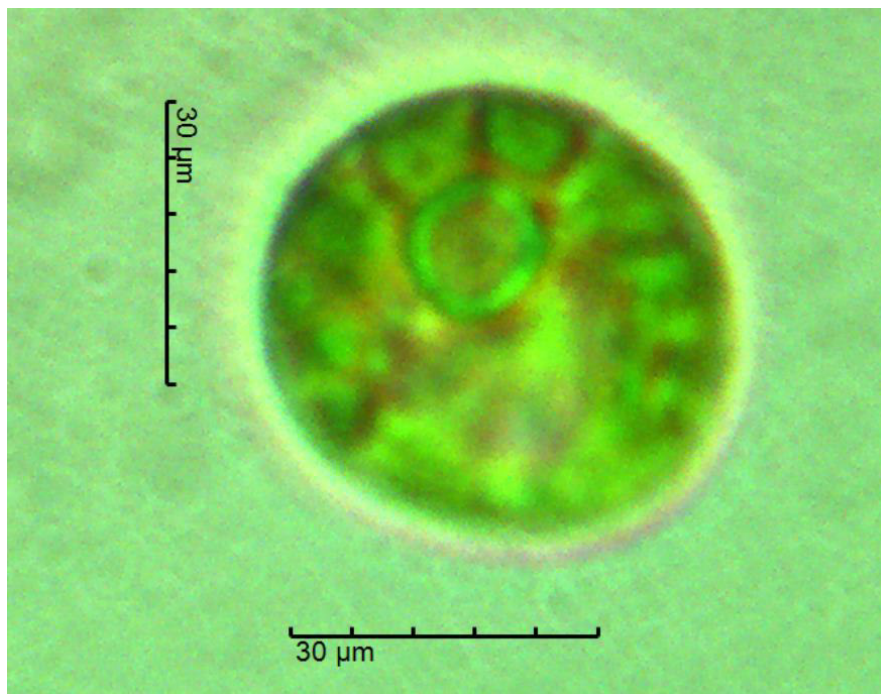


Figura 18 Microalga #2 (Clorofita), 100X.

En la figura 19 se observa una captura fotográfica de la cepa fúngica vista al microscopio con un aumento de 100X.

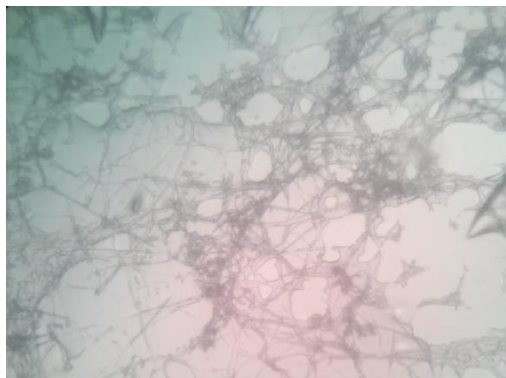


Figura 19 Cepa fúngica (*Talaromyces thermophilus*), 100X.

3.3. Extracción de ADN

Para proceder con la identificación molecular, se obtuvo ADN de alta calidad a partir de los cultivos puros así como también a partir de muestras de sedimentos y agua. La concentración de ADN y sus respectivos radios de pureza se resumen en el anexo E.

3.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de cepas bacterianas se amplificó el gen 16S rRNA de 1500pb aproximadamente (figura 20).

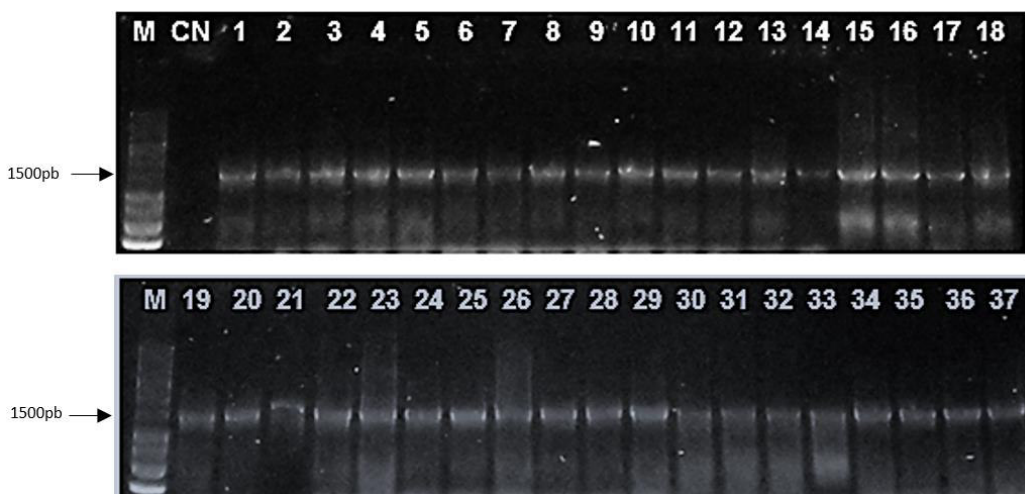


Figura 20 Gen 16S rRNA.

Nota: M: Marcador molecular. 1-37: cepas bacterianas.

Los productos de PCR del gen 23S rRNA de 410pb para microalgas y el gen ITS de 650pb para la cepa fúngica se presentan en la figura 21.

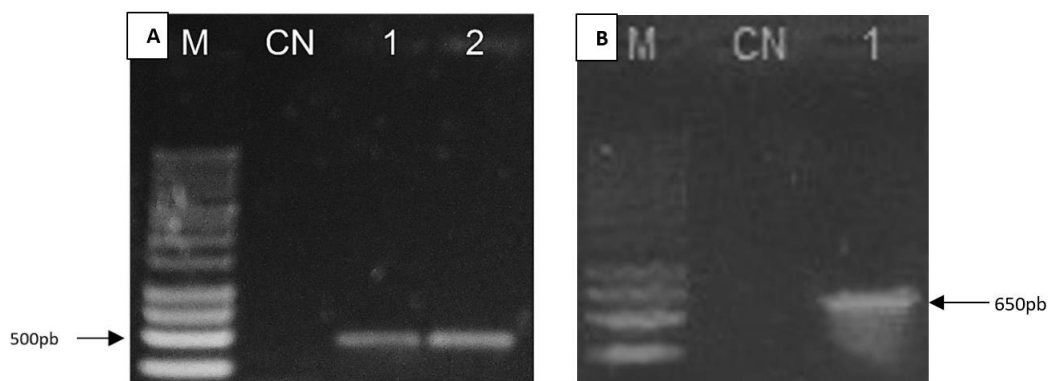


Figura 21 Electroforesis gen 23S rRNA y gen ITS.

Nota: A. Gen 23S rRNA. M: Marcador molecular. CN: control negativo. 1 y 2: cepas de microalgas. B. Gen ITS. M: Marcador molecular. CN: control negativo. 1: cepas fúngica.

3.6. RFLPs en gel de agarosa

Los productos de PCR del gen 16S rRNA de las 37 cepas bacterianas se sometieron a un análisis de RFLPs. Los amplicones fueron digeridos con la enzima MspI. Los fragmentos resultantes se visualizaron en un gel de agarosa (figura 22).

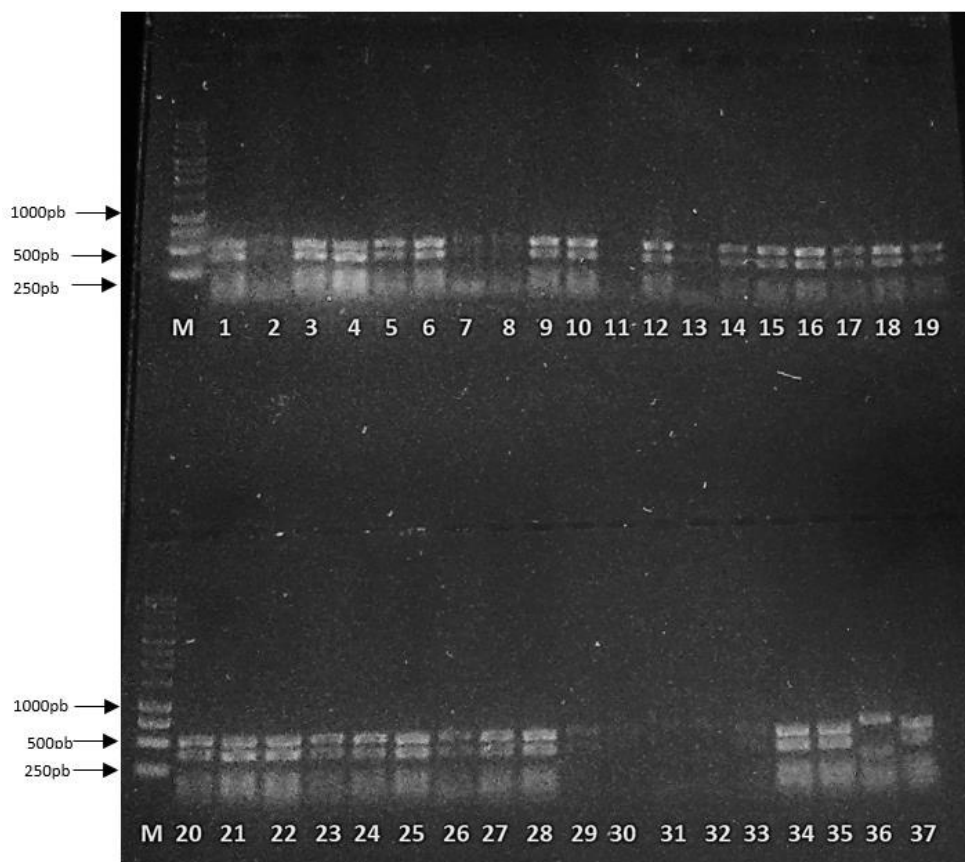


Figura 22 RFLPs, con la enzima *MspI*, del gen 16S rRNA de las cepas bacterianas aisladas.

Nota: M: Marcador molecular. 1-37: cepas bacterianas.

Se identificaron los patrones de corte iguales y se agruparon las cepas bacterianas como se observa en la tabla 8.

Tabla 8

Resumen comparativo de fragmentos de restricción.

Grupo 1	1*, 2*, 3*, 4, 5*, 6*, 7*, 8, 9, 10*, 11, 12, 13*, 14, 15, 16*, 17, 18*, 19*, 20*, 21*, 22, 23, 24*, 25*, 26, 27, 28*, 29, 30*, 31, 33, 34*, 35*, 37*
Grupo 2	32*, 36*

*Cepas enviadas a secuenciar a la empresa Macrogen – Korea.

Se observaron dos patrones de corte distintos. Para confirmar estos resultados se envió a secuenciar los productos de PCR de 20 de las 32 cepas del grupo 1 y también las 2 cepas del grupo 2.

3.7. Análisis de similitud

Los resultados de la secuenciación, enviados por MacroGen-Korea, se procesaron en el software Geneious 10.0.8 para obtener las secuencias consenso; posteriormente, éstas se sometieron a un análisis de similitud con secuencias de la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta Nucleotide BLAST (blastn). Un resumen de los organismos más próximos se presenta en la tabla 9.

Tabla 9

Análisis de secuencias de microorganismos aislados con la herramienta BLAST del NCBI.

Cepa	Cepas iguales	Organismos más próximos. Número de acceso	Query Coverage	Max Ident	Filo
Bacterias					
A	1-31, 33-35, 37	<i>Bacillus licheniformis</i> KY174334.1	100%	99%	Firmicutes
B	32	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> NR_117028.1	98%	87%	Firmicutes
C	36	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> NR_117028.1	100%	98%	Firmicutes
Microalgas					
D	AH1	<i>Chroococciopsis thermalis</i> NR_102537.1	100%	95%	Cyanobacteria
E	AH2	<i>Chlorella mirabilis</i> KM462865.1	99%	94%	Clorofita
Hongos					
F	H1	<i>Talaromyces thermophilus</i> JF412001.1	100%	99%	Ascomycota

3.8. Análisis filogenético

Para construir los árboles filogenéticos se escogieron las secuencias consenso de mejor calidad de cada cepa identificada. Además se descargó de la base de datos del NCBI las secuencias de los organismos más cercanos taxonómicamente a cada cepa. Se seleccionó la bacteria *Arthrobacter enclensis* (JF421614.1) como outgroup.

Se eliminó las regiones ambiguas con el software online Gblocks. Posteriormente alineó las secuencias con la herramienta MUSCLE del

programa MEGA 7. Se construyó la filogenia en el programa MEGA 7 utilizando el método de máxima verosimilitud Neighbor-Joining y el modelo de evolución Kimura 2.

En la figura 23 se muestra el árbol filogenético, construido con secuencias del gen 16S rRNA de bacterias, teorizado utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de evolución de Kimura 2.

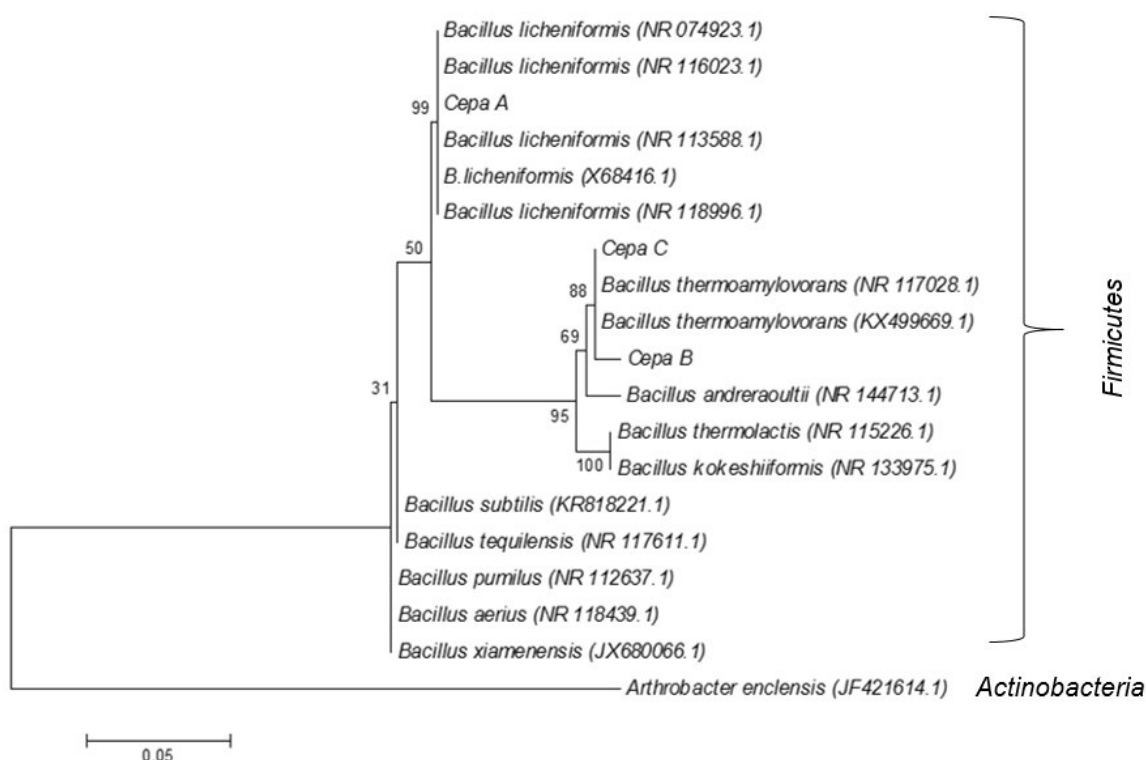


Figura 23 Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias.

En la figura 24 se muestra el árbol filogenético, construido con secuencias del gen 23S rRNA de microalgas y del gen ITS de hongos, teorizados utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de evolución de Kimura 2. En los árboles filogenéticos de microalgas y hongos los outgroups probados dañaron la topología de los árboles filogenéticos por lo que no se seleccionó outgroup.

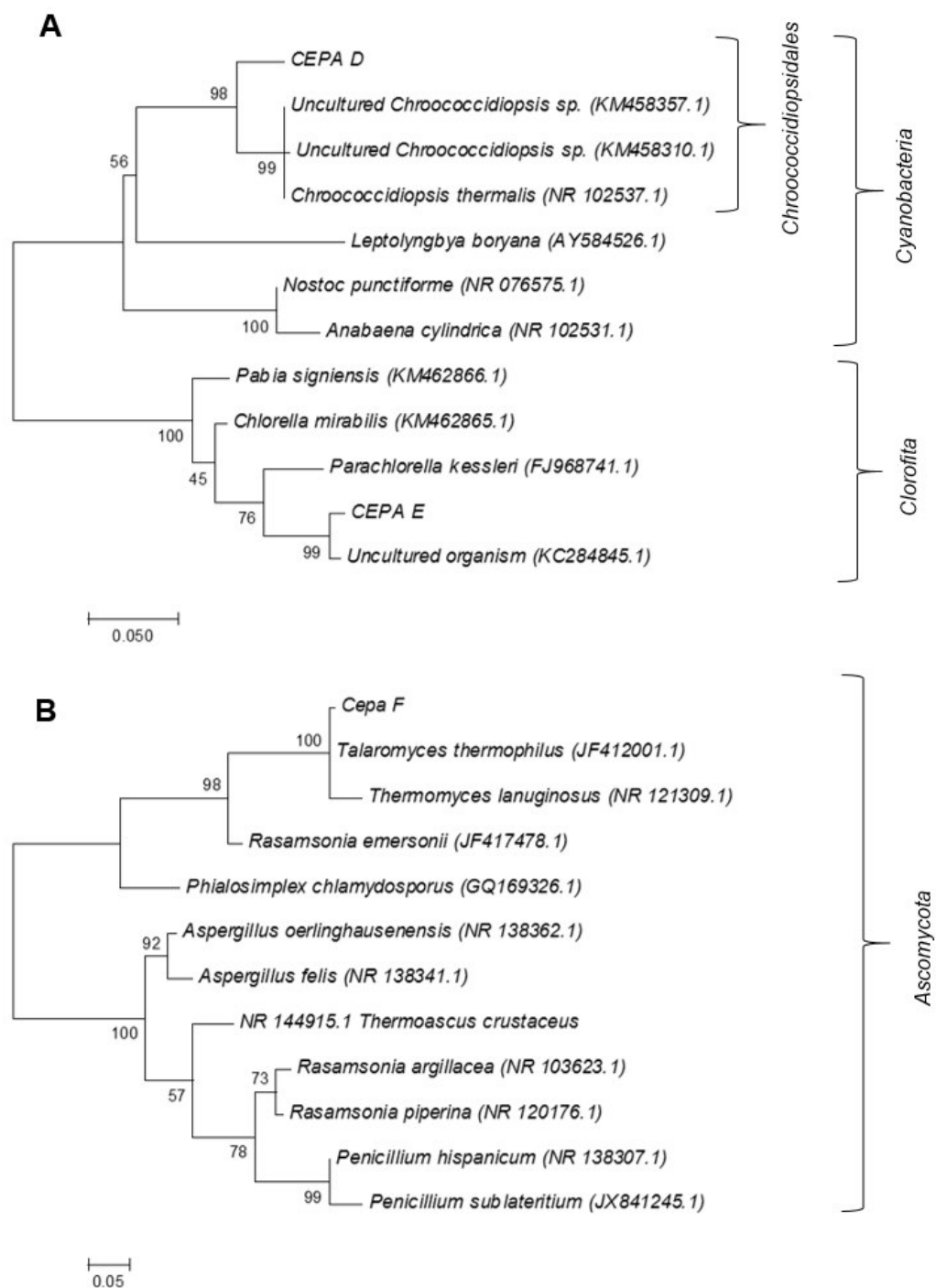


Figura 24 Árboles filogenéticos.

Nota: A: secuencias del gen 23S rRNA de microalgas. B: secuencias del gen ITS de hongos.

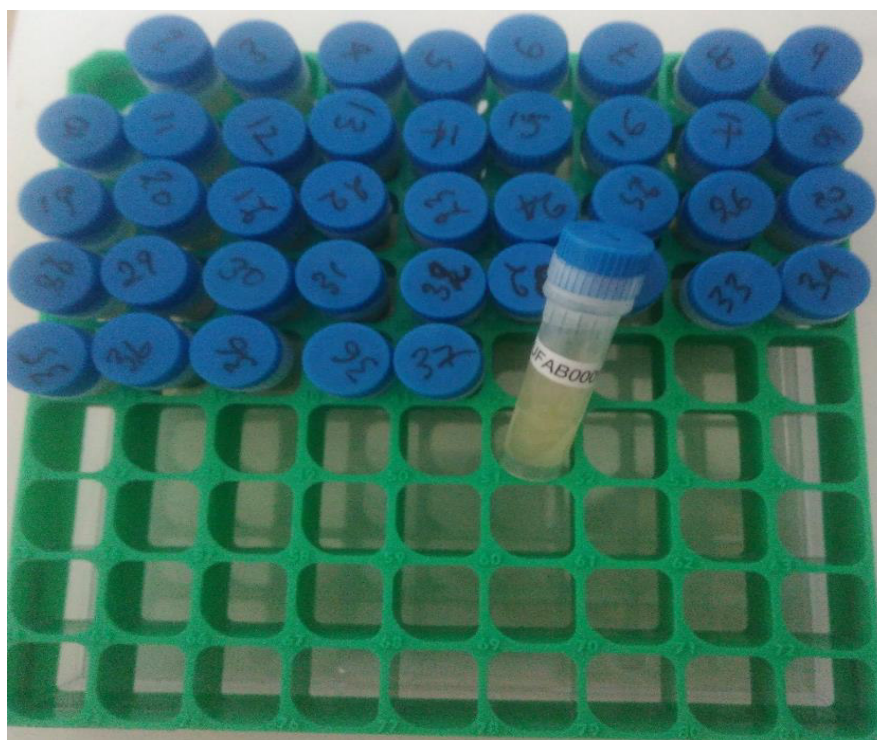
En la tabla 10 se resume el porcentaje de microorganismos aislados en la fuente geotermal Aguas Hediondas.

Tabla 10**Número de cepas aisladas de cada microorganismo.**

Microorganismo	Número de cepas aisladas	%
<i>Bacillus licheniformis</i>	35	87,5
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	1	2,5
<i>Bacillus sp.</i>	1	2,5
<i>Chroococidiopsis sp.</i>	1	2,5
Clorofita	1	2,5
<i>Talaromyces thermophilus</i>	1	2,5
Total	40	100

3.9. Construcción de cepario

Se estableció un cepario con los microorganismos aislados: bacterias (37), microalgas (2) y hongos (1). Se mantienen en criopreservación a -80°C en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE (figura 25).

**Figura 25 Cepario de la fuente geotermal Aguas Hediondas.**

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Características fisicoquímicas de la fuente geotermal

La temperatura del agua se ubicó en el rango de 51,4°C a 56,4°C; con una temperatura promedio de 53,9°C. La temperatura máxima de 56,4°C se observó en el punto 3, seguida de 56,2°C en el punto 1 y 51,4°C en el punto 2. La temperatura de la fuente geotermal Aguas Hediondas se ubica entre las más altas comparada con otras fuentes geotermales del país (INAMHI, 2013).

La conductividad eléctrica (CE) es un indicador de la calidad del agua en relación a constituyentes inorgánicos que aumentan la concentración total de sólidos disueltos (TSD). La CE en el agua es de 1725µS/cm. Mientras que en los sedimentos se observó una CE de 1164µS/cm. El agua actúa como medio conductor mientras tenga sólidos disueltos. Como en el sedimento la cantidad de agua es mucho menor, se ve disminuida la CE. Estos resultados concuerdan con lo reportado por (Orellana, 2015), la CE de las la fuente geotermal Aguas Hediondas (1725µS/cm) es mayor a las del sector: Lagunas Verdes (45µS/cm), Potrerillos (3,918µS/cm) y Artesón (1585,2µS/cm). La elevada CE puede deberse a elevadas concentraciones de sales minerales en las aguas subterráneas que originan este manantial (Lim, 1995).

El pH en el agua fue de 4,8; mientras que en el sedimento se observó un pH de 5,8. La acidez en aguas termales de origen volcánico se asocia con la formación de ácido sulfúrico debido a la oxidación de sulfuros presentes en las aguas subterráneas (Castenholz, 1969). En el análisis fisicoquímico se pudo determinar una elevada concentración de sulfatos 744,8 mg/L. Al realizar el muestreo se pudo percibir emanaciones sulfurosas. En ambientes con altas concentraciones de sulfatos existen microorganismos sulfato reductores (Compeau & Bartha, 1985). Sin embargo, en esta investigación no se logró aislar sulfato reductores, probablemente debido a la falta de azufre en los medios de cultivo utilizados.

La concentración de cloruros fue de 83,1 mg/L. La concentración de iones sodios es de 225 mg/L; el sodio es el elemento alcalino más abundante, y

existe en los minerales. Estas medidas se utilizan como indicadores de la influencia de agua de origen marítimo. Al dividir las concentraciones de Na y Cl se obtiene la relación Na/Cl (2,7) que es mayor a la del agua de mar (0,55), es decir, existe poca influencia de agua de mar. Elevados ratios Na/Cl son típicos de aguas de río, lluvia, subterráneas y aguas halitas (Nordstrom, Ball, Donahoe, & Whittemore, 1989). Valores pequeños en los ratios Na/Cl ocurren cuando otro catión, usualmente el Ca, se encuentra en igual o mayor concentración que los iones de Na. La concentración de iones Ca^{2+} en el agua es de 72mg/L.

La concentración de potasio en el agua es de 45,4 mg/L, mientras que en el sedimento es de 312 mg/L. La presencia del ión K^+ se relaciona con la disolución de potasio proveniente de feldespato o mica, minerales que se encuentran dentro de rocas generalmente duras (Suck, Se-Yeong, Byeong, Byong, & Myong, 1999).

Se detectó 168,44 mg/L de Mg^{2+} en el agua y 1860 mg/L en el sedimento. En general la principal fuente de Mg^{2+} es la disolución de dolomita o minerales que contienen Mg (Suck, Se-Yeong, Byeong, Byong, & Myong, 1999).

La concentración de metales pesados (As, Cu, Fe, Mn) en el agua resultó prácticamente nula (tabla 3.2). Esto se debe a que por su elevada masa tienden a sedimentarse. Por este motivo la concentración de estos elementos en los sedimentos se vio incrementada notablemente (Cd=1,3mg/kg; Cu=29,3mg/kg; Mn=79mg/kg; Zn=28,4mg/kg de Zn y Fe=12500mg/kg).

4.2. Aislamiento

El aislamiento de bacterias, microalgas y hongos se realizó a partir de muestras de agua y sedimentos de la fuente geotermal Aguas Hediondas. La temperatura osciló entre 51,4 y 56,4°C (tabla 5); condiciones idóneas para el crecimiento de microorganismos termófilos. El pH del manantial fue de aproximadamente 5. Los parámetros de crecimiento se ajustaron a estas condiciones para aislar el máximo número de microorganismos.

Se aislaron un total de 37 cepas bacterianas con morfología de bacilos Gram positivos. Se obtuvo mejores resultados con el medio mineral M9 para el crecimiento de bacterias. Esto se debe a que incorpora Cl, Na, Mg, Ca, K, carbonatos y sulfatos en su composición (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). En el análisis fisicoquímico se determinó la presencia de estos elementos. Por lo tanto, el medio mineral M9 supe más efectivamente las necesidades nutricionales de las bacterias de la fuente geotermal Aguas Hediondas en comparación al medio Agar Nutriente.

El medio general BG11 también incorpora N, así como los elementos antes mencionados y permitió el aislamiento de dos cepas de microalgas (Morales, 2012). Mientras que el medio PDA proporcionó los nutrientes necesarios para el crecimiento de una cepa fúngica (Rinaldi, 1982). La incorporación del agua y el sedimento de la fuente en los medios de cultivo pueden ser de ayuda en próximos muestreos para aislar un mayor número de cepas, ya que éstos poseen los minerales necesarios para el desarrollo de los microorganismos.

4.3. Identificación molecular

Las técnicas moleculares son de gran importancia en muchos laboratorios del mundo para la identificación de microorganismos. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite la caracterización de diferentes microorganismos mediante la amplificación de secuencias específicas de ADN. La identificación de bacterias, microalgas y hongos se pueden realizar por análisis de los productos amplificados de PCR mediante varias herramientas como RFLPs, secuenciación, y otras (Gardes & Bruns, 1991).

Para la identificación de bacterias se amplificó el gen 16S rRNA, para microalgas el 23S rRNA y para hongos el ITS. La PCR permite amplificar estos genes a partir del ADN de los microorganismos usando cebadores universales que tienen la peculiaridad de unirse a las regiones conservadas al inicio y al final de cada gen (Liu, Marsh, Cheng, & Forney, 1997). Se puede establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos comparando las regiones conservadas y variables de las secuencias obtenidas. El análisis de estas

secuencias proporciona medidas estadísticas válidas para la identificación de organismos mostrando los polimorfismos entre especies (Kimura, 1980).

Secuenciar los 37 productos de PCR del gen 16S rRNA, resultaría demasiado costoso, por lo que primero se sometieron a un análisis de RFLPs para averiguar qué bacterias son las mismas. Los amplicones fueron digeridos con la enzima de restricción MspI. Se observaron 2 patrones de corte (figura 22; tabla 8). Se envió a Macrogen – Korea 22 productos de PCR del gen 16S rRNA, 2 del gen 23S rRNA y 1 del gen ITS para su secuenciación.

Las secuencias del gen 16S rRNA, 23S rRNA y el ITS se sometieron a un análisis de similitud con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI. Una herramienta bioinformática muy potente y útil para la comparación de secuencias es el BLASTn (Buhler, Lancaster, Jacob, & Chamberlain, 2007). Como resultado de este análisis se identificó las cepas aisladas como: A=*Bacillus licheniformis* con un 99% de identidad, B=*Bacillus thermoamylovorans* (87%), C=*Bacillus thermoamylovorans* (98%), D=*Chroococcidiopsis thermalis* (95%), E=*Chlorella mirabilis* (94%), F=*Talaromyces thermophilus* (99%).

Para corroborar estos resultados se necesita de un análisis filogenético. El método más frecuentemente utilizado es el Neighbor-Joining (Hebert, 2004). Como primer paso se realizó un alineamiento múltiple de secuencias en el software Mega 7. Sin embargo, en los alineamientos se observó regiones divergentes, que no son homólogas o han sido saturadas por múltiples substituciones, también conocidas como regiones ambiguas que dificultan el análisis y que se eliminaron con la herramienta online Gblocks (Castresana, 2000). Una vez purgadas las secuencias se construyó los árboles filogenéticos usando el método Neighbor-joinin de máxima verosimilitud, con un bolstraps de 1000 y modelo de Kimura-2.

Al observar la topología de los árboles filogenéticos y los porcentajes bajos de identidad se concluyó que los aislados B, D y E no corresponden a las secuencias obtenidas de NCBI. Esto puede deberse a la falta de información sobre estos taxones en la base de datos o a que estos aislados sean nuevas

especies. Sería recomendable obtener más información a partir de la secuenciación de otros genes como el 5S rRNA, 16S rRNA, ISR y el gen ITS para corroborar estos resultados (Tortoli, 2003).

Del análisis filogenético se logró identificar hasta especie a las cepas: A=*Bacillus licheniformis*, C=*Bacillus thermoamylovorans*, F=*Talaromyces thermophilus*. A nivel de género las cepas: B=*Bacillus*, D=*Chroococcidiopsis* y a nivel de filum la cepa E= Clorofita.

4.4. Cepas identificadas en Aguas Hediondas presentes en otras fuentes geotermales del mundo

Los microorganismos identificados en la fuente geotermal Aguas Hediondas concuerdan con numerosos estudios alrededor del mundo sobre la diversidad de microorganismos en fuentes geotermales, en los que se ha descrito la capacidad de los géneros *Bacillus*, *Talaromyces*, *Chroococcidiopsis* y el filum Clorofita para soportar condiciones de temperatura extremas.

Darland y colaboradores aislaron bacterias de siete fuentes geotermales del Parque Nacional Yellowstone similares a Aguas Hediondas, con elevadas temperaturas (44-72°C) y bajo pH (2-5). Observaron que predomina el género *Bacillus*, especialmente Gram-positivos o Gram-variables y con pronunciada tendencia a formar endosporas (Darland & Brock, 1971). *Bacillus licheniformis* y *Bacillus thermoamylovorans* presentan estas características que les permite habitar en manantiales ácidos con elevadas temperaturas.

Bacillus licheniformis se aisló de la fuente geotermal Aguas Hediondas a temperaturas de 51-56°C y pH 5. Varios investigadores reportan condiciones de crecimiento similares. Narayan y colaboradores aislaron *B. licheniformis* de la fuente termal Savusavu en Fiji a temperaturas entre 60 y 73°C y pH de 6,5 a 7,5 (Narayan, 2008). Lee y colaboradores observaron la presencia de *B. licheniformis* en la fuente Borax Lake ubicada en Oregon, Estados Unidos, a temperaturas entre 40 y 50°C y pH de 5 – 7 (Lee, Smith, Wagschal, Orts, & Wong, 2008). También se logró aislar, a 60°C aeróbicamente, a partir de

muestras de 18 fuentes termales de Bulgaria (Derekova, Mandeva, & Kambourova, 2008).

Bacillus thermoamylovorans se obtuvo de la fuente Aguas Hediondas a 56°C y pH 5. También se ha identificado en la fuente geotermal Chavasqueira en Galicia, España a temperaturas superiores de 50°C y pH neutro (Deive, Álvarez, Morán, Sanromán, & Longo, 2012). Además se ha logrado aislar de varias fuentes geotermales de Arabia Saudita con un crecimiento óptimo a 60°C, logrando crecer hasta temperaturas de 90°C (Khiyami, Serour, Shehata, & Bahkila, 2012). Se ha observado la presencia de *B. thermoamylovorans* en las fuentes geotermales Tanjung Sakti, Indonesia a temperaturas de 80-91°C y pH=7-8 (Yohandini, 2015).

Talaromyces thermophilus se logró aislar a partir de muestras de sedimentos de fuentes termales, similares a Aguas Hediondas, en el Parque Nacional Tengchong Rehai. Los investigadores establecieron una temperatura óptima de crecimiento de entre 45 y 50°C y rangos de pH tolerables de entre 4 y 12 (Pan, y otros, 2010).

El género *Chroococcidiopsis* se ha aislado principalmente del interior y exterior de las rocas en desiertos calientes y fríos del planeta. Parece ser extremadamente tolerante a la desecación (Caiola, Billi, & Friedmann, 1996). También hay reportes de cepas de *Chroococcidiopsis caldariorum* aisladas de fuentes geotermales en Indonesia (Geitler, 1933; Geitler *et al.*, 1935). En estudios más recientes se ha identificado cepas del género *Chroococcidiopsis* en las fuentes geotermales del norte de Tailandia con una temperatura óptima de crecimiento de 50°C y pH 8 (Hayashi, y otros, 1994).

En una investigación sobre algas verdes en las fuentes geotermales de Bulgaria se establece que el filum Clorofita tiene un rol importante en las comunidades de algas termales. Los datos mostraron que 75 de 200 especies encuestadas corresponden al filum Clorofita y pueden crecer a temperaturas entre 30 y 101°C y pH entre 1-10 (Stoyneva, 2003). Se han aislado Clorofitas de fuentes termales del este de África a temperaturas entre 30 y 40°C (Krienitz, Bock, Kotut, & Luo, 2012).

4.5. Potenciales aplicaciones biotecnológicas de las cepas aisladas

A continuación se resumen varias de las potenciales aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos aislados en este estudio.

Bacillus licheniformis

Es un Gram-positivo formador de endosporas que puede ser aislado de suelos y plantas en todo el mundo. Nunca se ha reportado patogenicidad en animales o plantas y es usado ampliamente para la producción a gran escala de exoenzimas, una de sus cualidades que lo convierten en microorganismo con importantes usos industriales es que puede secretar grandes cantidades de proteínas, entre 20 y 25 g/l (Veith, y otros, 2004).

B. licheniformis posee genes codificadores de: proteasas, pectato liasas, lipasas y varias enzimas degradadoras de polisacáridos; con potenciales usos en la industria biotecnológica (Veith, y otros, 2004).

Un grupo de Investigadores del Departamento de Botánica y Microbiología de la Universidad de Oklahoma, en 1985, reportaron la utilidad de cultivos anaerobios de la cepa JF-2 *Bacillus licheniformis* para la producción de biosurfactantes. El interés científico en los biosurfactantes se ha incrementado en los últimos años debido a sus potenciales aplicaciones para mejorar la recuperación de aceites, especialmente químicos, muchos de los cuales contaminan ecosistemas o son recalcitrantes. Estas sustancias reducen significativamente la tensión superficial entre el agua y el aceite (Javaheri, Jenneman, McInerney, & Knapp, 1985).

Lin, X., y colaboradores; aislaron, purificaron y caracterizaron la enzima keratinasa a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis*. El componente más abundante en las plumas de las aves es la queratina. Debido a uniones muy fuertes entre cisteínas mediante puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas, la queratina es insoluble en agua y, por lo tanto, difícilmente degradable por enzimas proteolíticas como la tripsina, pepsina y papaína. La

biodegradación de plumas por este microorganismo representa un método para la utilización de este tipo de desechos orgánicos con el fin de producir proteínas destinadas a la alimentación animal (Lin, Lee, Casale, & Shih, 1992).

Kloepper y colaboradores en 1993 describió ciertas bacterias del suelo con la capacidad de liberar factores de crecimiento de plantas. En el año 2000, un grupo de investigadores españoles logran producir giberelinas, un factor de crecimiento de plantas, a partir de cultivos de *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis*. La producción a nivel industrial de este tipo de sustancias podría beneficiar al sector agrícola en el país (Gutiérrez-Mañero, y otros, 2001).

Bacillus licheniformis también se ha utilizado en el campo de los nanomateriales. La nanotecnología se enfoca al desarrollo de materiales a un nivel atómico para concederle unas propiedades únicas, que pueden ser manipuladas para las aplicaciones deseadas. En la actualidad, crece cada día la necesidad de desarrollar procesos de síntesis de nanopartículas benevolentes con el medioambiente, que no utilicen químicos tóxicos en sus protocolos. Un grupo de investigadores de la India ha sintetizado nanocristales de plata utilizando la biomasa del microorganismo *Bacillus licheniformis*. La enzima que permite la síntesis de la nanopartícula podría ser la nitrato reductasa (Kalimuthu, Babu, Venkataraman, Bilal, & Gurunathan, 2008).

Científicos de la Universidad Da-Yeh en Taiwan estudiaron la producción de biopolímeros floculantes y sus propiedades a partir del microorganismo *Bacillus licheniformis*. Los floculantes son frecuentemente utilizados en el tratamiento de aguas residuales y en un amplio rango de procesos industriales. Entre los floculantes más utilizados hay polímeros sintéticos orgánicos, generalmente, porque son económicos y altamente efectivos. Sin embargo, su uso aumenta el riesgo de problemas ambientales debido a que son difíciles de degradar y además muchos de sus monómeros, como la acrilamida, resultan neurotóxicos e inclusive carcinogénicos. El uso de microorganismos para la producción de floculantes biodegradables y seguros,

minimizan los riesgos de salud y ambientales (Shih, Van, Yeh, Lin, & Chang, 2001).

Matsui, T. y colaboradores aplicaron una proteasa alcalina aislada de *Bacillus licheniformis* para hidrolizar un preparado de músculo de sardina. Posteriormente, evaluaron cómo este hidrolizado influye en la actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina I¹. El hidrolizado resultó inhibitorio de la ACE, rico en aminoácidos ácidos, pobre en hidrofóbicos y con alto potencial para la producción de material alimenticio rico en proteínas y con efecto reductor de presión arterial (Matsui, y otros, 1993).

Bacillus thermoamylovorans

La bacteria *Bacillus thermoamylovorans* produce esporas que le permiten resistir elevadas temperaturas, es un organismo anaeróbico facultativo y tiene la habilidad de crecer a temperaturas entre 40 y 58°C (Berendsen, y otros, 2015).

El consumo desmesurado de combustibles fósiles ha causado varias crisis económicas, guerras y cambios climáticos graves a nivel mundial. El hidrógeno y el etanol son alternativas energéticas sugeridas para resolver este problema en el futuro. El uso de biomasa como recurso renovable para la producción de sustancias químicas y energía puede al mismo tiempo reducir los desechos orgánicos que ocasionan daños ambientales. Chang, J. y colaboradores demostraron que un cultivo combinado de *B. thermoamylovorans* y *C. beijerinckii* L9 se puede utilizar para la producción de hidrógeno a partir de desechos de levadura de cerveza (Chang, y otros, 2008).

Las lipasas son enzimas clave en la industria biotecnológica. Se conoce que promueven un rango amplio de reacciones: hidrólisis, interestirificación, esterificación, alcoholisis, acidólisis y aminólisis. Por todas estas características, son muy interesantes y representan uno de los tres más importantes grupos de enzimas en el mercado. Un grupo de científicos de la

¹ ACE por sus siglas en inglés. Enzima reguladora de la presión arterial. Convierte la angiotensina I en angiotensina II, esto incrementa la acción vasoconstrictora.

Universidad de Vigo en España han desarrollado un proceso para la producción de lipasa extracelular a partir de *Bacillus thermoamylovorans* (Deive, Álvarez, Morán, Sanromán, & Longo, 2012).

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas. Es un carbohidrato que contiene diferentes azúcares como monómeros (celulosa, hemicelulosa, lignina). Es el material más abundante en el planeta disponible para la producción de biocombustibles, principalmente bioetanol. Un grupo de investigadores de China identificó a *B. thermoamylovorans* como integrante de un consorcio bacteriano con la capacidad de degradar lignocelulosa (Wang, y otros, 2011).

Bacillus thermoamylovorans también es un microorganismo con prometedoras aplicaciones para remediación de contaminación ambiental. El cromo (VI), telurio (IV) y selenio (IV) son más tóxicos que sus formas menos oxidadas y menos solubles. Slobodkina, G. y colaboradores encontraron que la cepa *B. thermoamylovorans* SKC1 es capaz de reducir el cromato utilizando como donador de electrones la L-arabinosa a una temperatura óptima de 50°C y pH neutral. Además este microorganismo tiene la capacidad de reducir seleniatos, teluratos y también formas solubles de Fe(III). La reducción de estos aniones permite la detoxificación de efluentes con este tipo de contaminantes (Slobodkina, Bonch-Osmolovskaya, & Slobodkin, 2007).

Wang, J. y colaboradores utilizaron el microorganismos *B. thermoamylovorans*, con excelentes resultados, para la bioconversión de lodos activados de aguas residuales municipales y desechos alimenticios en fertilizantes orgánicos libres de patógenos y con elevadas cargas de nutrientes (Wang, Stabnikova, Tay, Ivanov, & Tay, 2003).

Talaromyces thermophilus

El xilano es el segundo más abundante biopolímero en la pared celular vegetal y el mayor polisacárido de hemicelulosa. Se conoce una amplia variedad de microorganismos que producen enzimas degradadoras de xilano. Entre estos microorganismos, los hongos termófilos son muy atractivos por su

potencial como fuente de xilanasas termoestables. Maalej, I. y colaboradores en 2008 lograron aislar xilasas altamente termoestables del hongo *T. thermophilus*. En 2009 usando esta enzima inmovilizada produjeron xilo-oligosacáridos (xilobiosa y xilotriosa) a partir de residuos agrícolas a escala industrial (Maalej, Belhaj, Masmoudi, & Belghith, 2009).

En 2012, utilizaron la xilanasas aislada a partir de *T. thermophilus* en el proceso de blanqueado de la industria del papel. Observaron que utilizando 20U de enzima por gramo de pulpa seca se puede disminuir el uso de hipoclorito de sodio en un 57%. Esta cantidad de xilanasas actúa sobre la hemicelulosa, liberando cromóforos y reduciendo azúcares (Maalej-Achouri, Guerfali, Romdhane, Gargouri, & Belghith, 2012).

Nakkharat, P. y colaboradores purificaron y caracterizaron una enzima intracelular con actividad β -glucosidasa y β -galactosidasa a partir del hongo *T. thermophilus*. La enzima podría ser útil para una hidrólisis eficiente de la lactosa en la leche y el suero, así como también en la producción de oligosacáridos derivados de lactosa en la industria alimenticia (Nakkharat & Haltrich, 2006).

Una lipasa termotolerante y alcalina, con su máxima actividad a pH 9.5, se aisló del hongo *T. thermophilus* en África. Las principales aplicaciones de esta enzima pueden ser la adición a detergentes e ingredientes alimenticios, así como también el desarrollo de aromas y sabores en diferentes productos (Romdhane, Fendri, Gargouri, Gargouri, & Belghith, 2010).

Otra potencial aplicación biotecnológica para el hongo *T. thermophilus* es el aislamiento de la enzima fitasa. Un grupo de investigadores de F. Hoffman - La Roche Ltd. clonaron fitasas a partir de *E. nidulans* y del hongo *T. thermophilus* (Pasamontes, Haiker, Henriquez-Huecas, Mitchell, & van Loon, 1997).

Las plantas almacenan la mayor parte del fósforo inorgánico en sus semillas en forma de ácido fítico. El fósforo fítico no es de fácil asimilación para los animales monogástricos, de hecho, es eliminado casi en su totalidad

en sus heces y contribuye a problemas ambientales graves como la eutrofización. En la industria de alimento de animales suele añadir fósforo a los concentrados, lo que resulta muy costoso. Las fitasas son una solución a este problema, ya que tienen la capacidad de liberar eficientemente el fósforo del ácido fítico; se puede añadir esta enzima al alimento de los animales para promover la disponibilidad de este elemento. Nelson, T. y colaboradores utilizaron la enzima fitasa como suplemento alimenticio en gallinas y observaron un incremento significativo en la asimilación de fósforo (Nelson *et al.*, 2011; Golovan *et al.*, 2001).

Chroococcidiopsis sp.

Chroococcidiopsis sp. es una cianobacteria de gran interés en el estudio de la vida en ambientes extremos. Puede hacer uso de pequeños períodos de disponibilidad de agua y detener su metabolismo en respuesta a condiciones ambientales adversas (Caiola, Billi, & Friedmann, 1996).

Un grupo de investigadores estudió la capacidad del género *Chroococcidiopsis* para producir fosfatasa. Esta habilidad le permite a este organismo liberar fósforo para su nutrición a partir de rocas de su entorno (Banerjee & Sharma, 2004).

Las cianobacterias se han utilizado para producir gas hidrógeno. Esta sustancia constituye una fuente de energía alterna a los combustibles fósiles. Serebryakova, L. y colaboradores observaron la capacidad del género *Chroococcidiopsis* para producir hidrógeno molecular (Serebryakova, Sheremetieva, & Lindblad, 2000).

Estos microorganismos son una de las formas de vida más antiguas en el planeta. Este filum es capaz de realizar fotosíntesis y dependen de la radiación solar para sobrevivir. Se ha encontrado que bajo diversas condiciones climáticas los rayos ultravioleta (UV) pueden dañar la maquinaria celular. Para protegerse de la radiación, varias cianobacterias producen compuestos absorbentes de radiación UV (Mishra *et al.*, 2015). El género *Chroococcidiopsis* tiene la capacidad de sintetizar el pigmento scytonemin.

Una vez producido, es estable por largos períodos de tiempo. Este pigmento protege efectivamente al microorganismo de la radiación de longitudes de onda ultravioleta (Dillon, Tatsumi, Tandingan, & Castenholz, 2002). Una de las aplicaciones potenciales de este compuesto, que ha despertado mucho interés en el campo de la dermatología, es la elaboración de protectores solares (Karlsson, 2011). También se está investigando varias aplicaciones biomédicas, entre ellas: componente de medicamentos, acción antiinflamatoria y anti proliferativa (Stevenson, 2002), además de su actividad anticancerígena (McInnes, Mezna, & Fischer, 2005).

Por las características del género *Chroococcidiopsis*, este organismo tiene aplicaciones potenciales en la astrobiología. Un grupo de investigadores sometieron una cianobacteria *Chroococcidiopsis* a condiciones simuladas de vacío espacial, atmósfera de Marte, radiación UV y temperaturas extremas. Observaron que el microorganismo puede sobrevivir a todas estas condiciones (Baqué, de Vera, Rettberg, & Billi, 2013).

Clorofita

El filum Clorofita es rico en proteínas y contiene todos los aminoácidos esenciales. También posee considerable concentración de ácidos grasos, fibra, carotenoides, vitaminas, minerales, y otros compuestos bioactivos que lo hacen atractivo para la nutrición (Lin L. P., 2005). Se ha utilizado como alimento para animales (Gouveia *et al.*, 1996^a; Gouveia *et al.*, 1996b). También es considerado como una materia prima alternativa prometedora para la producción de biodiesel debido a su rápido crecimiento y altos contenidos de aceites (Phukan, Chutia, Konwar, & Kataki, 2011).

Las Clorofitas tienen la capacidad de fijar el dióxido de carbono eficientemente y de remover nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, haciéndolo un gran candidato para la mitigación del efecto invernadero y también para la biorremediación de aguas residuales (Doucha *et al.*, 2005; Meheta *et al.*, 2005).

Además, se está investigando el uso de Clorofitas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes (Chen, Wang, Sun, Zhang, & Li, 2001), entre ellas: hormona de crecimiento humano (Hawkins & Nakamura, 1999), reductasa mercúrica de *Bacillus megaterium* (Huang, y otros, 2006), y otras.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron bacterias, microalgas y hongos termófilos presentes en la fuente geotermal Aguas Hediondas. Las bacterias son los microorganismos más abundantes con un total de 37 aislados, seguido por las microalgas (2) y finalmente los hongos (1).

Mediante técnicas de biología molecular, se identificó hasta nivel de especie a dos cepas bacterianas y una fúngica: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans* y *Talaromyces thermophilus*.

Se identificó a nivel de género una cepa bacteriana y una cepa de microalga procariota: *Bacillus* y *Chroococcidiopsis*.

Se identificó una cepa de microalga eucariota hasta nivel de filum: Clorofita.

Los microorganismos aislados de la fuente geotermal Aguas Hediondas han sido identificados en otras fuentes termales alrededor del mundo.

Entre las potenciales aplicaciones de las cepas aisladas destacan su uso en la astrobiología y la biorremediación, así como también la producción de enzimas termoestables, alimento animal, factores de crecimiento de plantas, biosurfactantes, nanopartículas, biopolímeros y fármacos.

La producción de fuentes de energía renovables (hidrógeno y biocombustibles) a partir de las cepas aisladas, puede contribuir a la reducción del uso de combustibles fósiles.

Se construyó un cepario con los microorganismos termófilos aislados para futuras investigaciones.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Para la elaboración de medios de cultivo en futuras investigaciones se recomienda utilizar el agua y los sedimentos de la fuente geotermal como componentes del medio de cultivo para suplir las demandas de minerales de los microorganismos y obtener un mayor número de cepas aisladas.

La fuente geotermal Aguas Hediondas presenta elevadas concentraciones de sulfatos (744,8ppm) por lo que se debe investigar la presencia de microorganismos sulfato reductores.

Es recomendable amplificar y secuenciar los genes ITS y 16S rRNA para la identificación a nivel de especie de las cepas: D=*Chroococcidiopsis sp.* y E=Clorofita y el gen 23S rRNA para la identificación a nivel de especie de la cepa B= *Bacillus*.

Se recomienda seguir con la investigación de aplicaciones biotecnológicas de las cepas aisladas de la fuente geotermal Aguas Hediondas. Estos microorganismos pueden contribuir al desarrollo de varias industrias, y por lo tanto, al cambio de la matriz productiva del país y se encuentran almacenados en el cepario del laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F. &. (102-108). The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in biotechnology*, 2001.
- Abe, F. (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2347-2357.
- Adley, C. ((2006)). Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols. . *New Jersey. EEUU: Humana Press*.
- Ahern, K. (26 de 02 de 2017). *Transcription Outline*. Obtenido de <http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/lectures/transcriptio noutline.html>
- Ahmadian, A. (2006). Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *SCIENCE DIRECT*.
- Al-Maghrabi, I. M., Islam, M. R., & Chaalal, O. (1999). Use of thermophilic bacteria for bioremediation of petroleum contaminants. *Energy Sources* ., 17-29.
- ASA. (26 de 02 de 2017). *Biotecnología*. Obtenido de Asociación de Semilleros Argentinos: <http://asabiotecnologia.com.ar/>
- Banerjee, M., & Sharma, D. (2004). Regulation of phosphatase activity in Chroococcidiopsis isolates from two diverse habitats: effect of light, pH and temperature. . *Applied Ecology and Environmental Research*, 71-82.
- Baqué, M., de Vera, J., Rettberg, P., & Billi, D. (2013). The BOSS and BIOMEX space experiments on the EXPOSE-R2 mission: Endurance of the desert cyanobacterium Chroococcidiopsis under simulated space vacuum, Martian atmosphere, UVC radiation and temperature extremes. *Acta Astronautica*, 180-186.

- Baum, D. (2008). Reading a phylogenetic tree: the meaning of monophyletic groups. *Nature Education*, 190.
- Beate, B., & Salgado, R. (2005). Geothermal Country Update for Ecuador, 2000 - 2005. *Geothermal Congress 2005*.
- Berendsen, E., Krawczyk, A., Klaus, V., de Jong, A., Boekhorst, J., Eijlander, R., & Wells-Bennik, M. (2015). *Bacillus thermoamylovorans* spores with very-high-level heat resistance germinate poorly in rich medium despite the presence of ger clusters but efficiently upon exposure to calcium-dipicolinic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 7791-7801.
- Blank, C. E., Cady, S. L., & Pace, N. (2002). Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 5123-5135.
- Bruns, D. E., Ashwood, E. R., & Burtis, C. A. (2007). Fundamentals of molecular diagnostics. *Elsevier Health Sciences*.
- Buhler, J. D., Lancaster, J. M., Jacob, A. C., & Chamberlain, R. D. (2007). Mercury BLASTN: Faster DNA sequence comparison using a streaming hardware architecture. *Proc. of Reconfigurable Systems Summer Institute*.
- Cai, Y. P., & Wolk, C. P. (1990). Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *Journal of Bacteriology*, 3138-3145.
- Caiola, M. G., Billi, D., & Friedmann, E. I. (1996). Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp.(Chroococcales). *European journal of phycology*, 97-105.
- Castenholz, R. W. (1969). Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. *Bacteriological Reviews*, 476.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution*, 540-552.

- Chang, J. J., Chou, C. H., Ho, C. Y., Chen, W. E., Lay, J. J., & Huang, C. C. (2008). Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. *international journal of hydrogen energy*, 5137-514.
- Chen, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L., & Li, W. (2001). Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Current genetics*, 365-370.
- ChunLab. (26 de 02 de 2017). *16S rRNA and 16S rRNA Gene*. Obtenido de <https://chunlab.wordpress.com/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., & Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *science*, 1283-1287.
- Cihan, A. C., Tekin, N., Ozcan, B., & Cokmus, C. (2012). The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analyses isolated from geothermal regions of Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 840-862.
- Compeau, G. C., & Bartha, R. (1985). Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and environmental microbiology*, 498-502.
- Darland, G., & Brock, T. D. (1971). *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *Microbiology*, 9-15.
- de Champdoré, M., Staiano, M., Rossi, M., & D'Auria, S. (2007). Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *Journal of The Royal Society Interface*, 183-191.

- Deive, F. J., Álvarez, M. S., Morán, P., Sanromán, M. A., & Longo, M. A. (2012). A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. *Bioprocess and biosystems engineering*, 931-941.
- Derekova, A., Mandeva, R., & Kambourova, M. (2008). Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1697-1702.
- Dillon, J. G., Tatsumi, C. M., Tandingan, P. G., & Castenholz, R. W. (2002). Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis* sp.). *Archives of microbiology*, 322-331.
- Doucha, J., Straka, F., & Lívanský, K. (2005). Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 403-412.
- Douglas, S. E., & Doolittle, W. F. (1984). Complete nucleotide sequence of the 23S rRNA gene of the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. *Nucleic acids research*, 3373-3386.
- Edgar, R. C., & Batzoglou, S. (2006). Multiple sequence alignment. *Current opinion in structural biology*, 368-373.
- Engle, M., Li, Y., Woese, C., & Wiegell, J. (1995). Isolation and Characterization of a Novel Alkalitolerant Thermophile, *Anaerobranca horikoshii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 454-461.
- Fakruddin, M. D., & Chowdhury, A. (2012). Pyrosequencing an alternative to traditional Sanger sequencing. *Am J Biochem Biotechnol*, 8(1), 14-20.
- Friedmann, E. I., & Ocampo-Friedmann, R. (1995). A primitive cyanobacterium as pioneer microorganism for terraforming Mars. *Advances in Space Research*, 243-246.

- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1991). Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP pattern of their PCR amplified-ITS. *Mycological Society Newsletter*, 41, 14.
- Geitler, L. (1933). Diagnosen neuer Blaualgen von den Sunda-Inseln. *Arch. Hydrobiol.*, 622-634.
- Geitler, L., & Ruttner, F. (1935). Die Cyanophyceen der Deutschen Limnologischen Sunda-Expedition. *ihre Morphologie, Systematik und Ökologie*.
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., & Laursen, J. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature biotechnology*, 741-745.
- Gouveia, L., Gomes, E., & Empis, J. (1996a). Potential use of a microalga (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 75-79.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., & Empis, J. (1996). *Chlorella vulgaris* used to colour egg yolk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 167-172.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouachi, J., R Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Phys.*
- Hawkins, R. L., & Nakamura, M. (1999). Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Current microbiology*, 335-341.
- Hayashi, N. R., Peerapornpisal, Y., Nishihara, H., Ishii, M., Igarashi, Y., & Kodama, T. (1994). Isolation and cultivation of thermophilic cyanobacteria from hot springs of northern Thailand. *Journal of fermentation and bioengineering*, 179-181.

- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* .
- Hickey, D. A., & Singer, G. A. (2004). Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome biology*.
- Huang, C. C., Chen, M. W., Hsieh, J. L., Lin, W. H., Chen, P. C., & Chien, L. F. (2006). Expression of mercuric reductase from *Bacillus megaterium* MB1 in eukaryotic microalga *Chlorella* sp. DT: an approach for mercury phytoremediation. *Applied microbiology*.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 2761-2764.
- Janitz, M. (2008). *Next-Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. Weinheim: WILEY-VCH.
- Janitz, M. (2011). Next-generation genome sequencing: towards personalized medicine. *John Wiley & Sons*.
- Javaheri, M., Jenneman, G. E., McInerney, M. J., & Knapp, R. M. (1985). Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 698-700.
- Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150-153.
- Karlsson, I. (2011). Chemical and dermatological aspects of UV-absorbing compounds.
- Kashefi, K., & Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 934-934.

- Khiyami, M. A., Serour, E. A., Shehata, M. M., & Bahklia, A. H. (2012). Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 4053-4062.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 111-120.
- Kloepper, J. W. (1990). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soil borne diseases. In International Seminar" Biological Control of Plant Diseases and Virus Vectors"(1990, Tsukuba, Japan). *The biological control of plant dise.*
- Krienitz, L., Bock, C., Kotut, K., & Luo, W. (2012). Picocystis salinarum (Chlorophyta) in saline lakes and hot springs of East Africa. *Phycologia*, 22-32.
- Kumar, P., Patel, S. K., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2013). Extending the limits of Bacillus for novel biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 1543-1561.
- Lee, C. C.-A., Smith, M. R., Wagschal, K., Orts, W. J., & Wong, D. W. (2008). Cloning of Bacillus licheniformis xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. *Current Microbiology*, 301-305.
- Let's Talk Science. (2013). *Sanger Sequencing*. Obtenido de explorecuriosity: www.explorecuriosity.org
- Lim, J. U. (1995). Geothermal potential in the Republic of Korea. *Terrestrial heat flow and geothermal energy in Asia*, 435-67.
- Lin, L. P. (2005). Chlorella: its ecology, structure, cultivation, bioprocess and application. *Yi Hsien Publishing Company*.
- Lin, X., Lee, C. G., Casale, E. S., & Shih, J. C. (1992). Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading Bacillus licheniformis strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 3271-3275.

- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 4516-4522.
- Liu, W., Li, L., Khan, M. A., & Zhu, F. (2012). Popular molecular markers in bacteria. *Microbiology and Virology*, 103-107.
- Maalej, I., Belhaj, I., Masmoudi, N. F., & Belghith, H. (2009). Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 200-212.
- Maalej-Achouri, I., Guerfali, M., Romdhane, I. B., Gargouri, A., & Belghith, H. (2012). The effect of *Talaromyces thermophilus* cellulase-free xylanase and commercial laccase on lignocellulosic components during the bleaching of kraft pulp. *Internationa*.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology* .
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied microbiology and biotechnology*, 650-663.
- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., & Osajima, Y. (1993). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Bioscience, biotechnology, and bioch.*
- McInnes, C., Mezna, M., & Fischer, P. M. (2005). Progress in the discovery of polo-like kinase inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry*, 181-197.
- Mehta, S. K., & Gaur, J. P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical reviews in biotechnology*, 113-152.

- Michaux, C., Pouyez, J., Mayard, A., Vandurm, P., Housen, I., & Wouters, J. (2010). Structural insights into the acidophilic pH adaptation of a novel endo-1, 4- β -xylanase from *Scytalidium acidophilum*. *Biochimie*, 1407-1415.
- Mishra, A., Tandon, R., Kesarwani, S., Singh, R., & Tiwari, G. L. (2015). Emerging applications of cyanobacterial ultraviolet protecting compound scytonemin. *Journal of Applied Phycology*, 1045-1051.
- Moore, E., Arnscheidt, A., Krüger, A., StrÖmpl, C., & Mau, M. (2008). Section 1 update: simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *In Molecular microbial ecol reviews*, 461-488.
- Morales, A. E. (2012). Manual de Ficología relacionado con la bioprospección, aislamiento, cultivo, bioquímica y biotecnología de microorganismos fotosintéticos. PUCE. Proyecto Prometeo-SENESCYT 2012.ogy manual (pp. 1905-1919). *Springer Netherlands*.
- Morozkina, E. V. (2010). Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*.
- Nakkharat, P., & Haltrich, D. (2006). Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, 304-313.
- Narayan, V. V., Hatha, M. A., Morgan, H. W., & Rao, D. (2008). Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the Savusavu hot springs in Fiji. *Microbes and environments*, 350-352.
- Narayanan, S. (1991). Applications of restriction fragment length polymorphism. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 291-296.
- Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinski, R. J., & Ware, J. H. (1971). Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr*, 1289-1293.

- Nordstrom, D. K., Ball, J. W., Donahoe, R. J., & Whittemore, D. (1989). Groundwater chemistry and water-rock interactions at Stripa. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1727-1740.
- Orellana, J. (2015). Medidas de parámetros Fídicoquímicos de las Fuentes Termales (Volcanes Chiles y Cerro Negro. *Instituto Geofísico de la Escuela Politécnica Nacional*.
- Pan, W. Z., Huang, X. W., Wei, K. B., Zhang, C. M., Yang, D. M., Ding, J. M., & Zhang, K. Q. (2010). Diversity of thermophilic fungi in Tengchong Rehai National Park revealed by ITS nucleotide sequence analyses. *The Journal of Microbiology*, 48(2), 146-152.
- Panneerchelvam, S., & Norazmi, M. N. (2003). Forensic DNA profiling and database. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 10(2), 20.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Henriquez-Huecas, M., Mitchell, D. B., & van Loon, A. P. (1997). Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expr.*
- Phukan, M. M., Chutia, R. S., Konwar, B. K., & Kataki, R. (2011). Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Applied Energy*, 88(10), 3307-3312.
- Podar, M., & Reysenbach, A. L. (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current opinion in biotechnology*, 17(3), 250-255.
- Posik, D. M., Ripoli, M. V., Garcia, P. P., & Giovambattista, G. (2007). El veredicto de la genética. *Ciencia hoy*, 17(98), 51-57.
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A., Murray, P. C., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., & Harris, T. S. (1997). The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4), 441.

- Quaedvlieg, W., Kema, G. H., Groenewald, J. Z., Verkley, G. J., Seifbarghi, S., Razavi, M., & Crous, P. W. (2011). Zymoseptoria gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia-Molecular Phy.*
- Ramírez, N., Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1232-1240.
- Rinaldi, M. G. (1982). Use of potato flakes agar in clinical mycology. *Journal of clinical microbiology*, 15(6), 1159-1160.
- Robinson, C. R., & Sligar, S. G. (1995). Hydrostatic and osmotic pressure as tools to study macromolecular recognition. *Methods in enzymology*, 259, 395-427.
- Romdhane, I. B., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A., & Belghith, H. (2010). A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 112-120.
- Sakai, N., Sakamoto, Y., Kishimoto, N., Chihara, M., & Karube, I. (1995). Chlorella strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energy Conversion and Management*, 36(6), 693-696.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., & Mabilat, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3), 669-674.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold spring harbor laboratory press*.

- Schleper, C., Pühler, G., Kühlmorgen, B., & Zillig, W. (1995). Life at extremely low pH. *Nature*, 375(6534), 741-742.
- Serebryakova, L. T., Sheremetieva, M. E., & Lindblad, P. (2000). H₂-uptake and evolution in the unicellular cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(6), 525-530.
- Sherwood, A. R., & Presting, G. G. (2007). Universal Primers Amplify a 23s Rdna Plastid Marker in Eukaryotic Algae and Cyanobacteria¹. *Journal of phycology*, 43(3), 605-608.
- Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, L. C., Lin, H. G., & Chang, Y. N. (2001). Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresource technology*, 78(3), 267-272.
- Slobodkina, G. B., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2007). Reduction of chromate, selenite, tellurite, and iron (III) by the moderately thermophilic bacterium *Bacillus thermoamylovorans* SKC1. *Microbiology*, 76(5), 530-534.
- Stevenson, C. S. (2002). The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *Journal of*.
- Stoyneva, M. P. (2003). Survey on green algae of Bulgarian thermal springs. *BIOLOGIA-BRATISLAVA*, 58(4), 563-574.
- Suck, J. H., Se-Yeong, H., Byeong, D. L., Byong, W. C., & Myong, H. C. (1999). Geochemical characteristics of geothermal water and groundwater in the Dongrae hot-spring area. *The Journal of Engineering Geology*, 9(3), 207-225.
- Takai, K., & Horikoshi, K. (2000). Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 5066-5072.

- Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 319-354.
- Vasek, O., Hebert, E., De Giori, S., Rata, R., & Fusco, A. (2005). Secuencia parcial del gen 16S rRNA de cepas constituyentes de un fermento para la elaboración de queso artesanal de corrientes.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J. O., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., & Ehrenreich, A. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of molecular microbiology*.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(1), 1-43.
- Wang, J. Y., Stabnikova, O., Tay, S. T., Ivanov, V., & Tay, J. H. (2003). Intensive bioconversion of sewage sludge and food waste by *Bacillus thermoamylovorans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 427-432.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1174-1186.
- Wang, W., Yan, L., Cui, Z., Gao, Y., Wang, Y., & Jing, R. (2011). Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresource technology*, 102(19), 9321-9324.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Meyer, W. (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. USA: CRC Press.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 18(1), 315-322.

- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221.
- Yohandini, H. (. (2015). Isolation and Phylogenetic Analysis of Thermophile Community Within Tanjung Sakti Hot Spring, South Sumatera, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(3), 143-148.