



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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
TERMÓFILAS DE LA FUENTE GEOTERMAL PAPALLACTA**

AUTOR: ARIAS FACTOS JANINA ESTEFANÍA

DIRECTOR: Ph.D. IZQUIERDO ANDRÉS

SANGOLQUÍ

2016



**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 TERMÓFILAS DE LA FUENTE GEOTERMAL PAPALLACTA.**” realizado por **JANINA ESTEFANÍA ARIAS FACTOS**, 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 a la señorita **JANINA ESTEFANÍA ARIAS FACTOS** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí ,10 de mayo 2016

.....
PhD. ANDRÉS IZQUIERDO
DIRECTOR



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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **JANINA ESTEFANÍA ARIAS FACTOS**, con cedula de identidad N° 172248750-9, declaro que este trabajo de titulación “ **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TERMÓFILAS DE LA FUENTE GEOTERMAL PAPALLACTA.**”, 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 ,10 de mayo 2016



JANINA ESTEFANÍA ARIAS FACTOS
C.C 172248750-9



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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **JANINA ESTEFANÍA ARIAS FACTOS**, 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 TERMÓFILAS DE LA FUENTE GEOTERMAL PAPALLACTA.**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad. .

Sangolquí ,10 de mayo 2016



JANINA ESTEFANÍA ARIAS FACTOS
C.C 172248750-9

DEDICATORIA

A mi abuela Esther Luje, a mis padres Marco Arias y Soledad Factos, por su constancia y dedicación y sobre todo por su confianza, por darme las herramientas necesarias que permitieron forjar mi vida y alcanzar mis metas con responsabilidad.

A mis hermanos Nicole Arias y Marco Arias, quienes son incondicionales y son el motor que mueve mi vida.

Este éxito es dedicado a ustedes.

Janina Estefanía Arias Factos

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios por permitirme alcanzar mis metas y por poner en mi camino a la gente que me rodea, por darme la fortaleza y el entusiasmo para hacer las cosas bien.

A mis padres Marco Arias y Soledad Factos, por su amor y sobre todo por su apoyo incondicional lo que me ayudó a alcanzar mis metas, a mis hermanos Nicole y Marco, sin ellos este logro no podría haber sido posible.

A mi abuela Esther Lujé quién ha formado una parte muy importante en mi vida por su paciencia y consejos.

A mi tía Esther Factos por siempre estar pendiente, por su atención, cariño y apoyo.

A Alma Koch, quien formó parte muy sustancial en mi formación profesional y a quien considero más que una profesora, una maestra; gracias por las oportunidades brindadas y por su confianza.

A Andrés Izquierdo por ser guía y orientador en este proyecto.

A Diego F., por su comprensión y amor, por ser mi apoyo y aliento en esta etapa.

A Christian, que formó parte importante de mi vida y mi carrera por su colaboración y ayuda tanto personal como en lo académico.

A mis amigos, quiénes formaron parte de esta ardua carrera y a quienes siempre los llevaré en mi corazón: Nenis P., Shir B., Dany O., Mily O., David B., Fredy Ñ, David R., Wilson C., con quienes hemos reído, llorado, y pasado aquellas amanecidas por el estudio pero siempre con ese apoyo mutuo que nos hizo sobresalir. A Luis T., Pao R., Vini R., Andrés S., que la distancia no separa nuestra amistad al contrario la llena de momentos únicos gracias totales por ser incondicionales.

Al equipo del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE., por su asesoramiento y colaboración.

JANINA ESTEFANÍA ARIAS FACTOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Carátula.....	i
Certificación.....	ii
Autoría de responsabilidad.....	iii
Autorización.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice de contenidos.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas.....	xii
Listado de abreviaturas.....	xiii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
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.....	3
1.4.1 Microorganismos extremófilos	3
1.4.2 Características	3
1.4.3 Clasificación	4
1.4.3.1 Temperatura	4
1.4.3.2 pH.....	4
1.4.3.3 Salinidad	5
1.4.3.4 Presión.....	6
1.4.3.5 Toxicidad.....	6
1.4.3.6 Radioactividad	6

1.4.4	Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo ...	7
1.4.4.1	Extracción de ADN.....	7
1.4.4.2	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	8
1.4.4.3	Gen Ribosomal 16S.....	8
1.4.4.4	RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	9
1.4.4.5	Secuenciación Sanger.....	11
1.4.4.6	Alineamiento múltiple de secuencias.....	11
1.4.4.7	Árboles filogenéticos.....	11
1.4.5	Aplicaciones	12
1.4.6	Termas Papallacta	12
1.5	Hipótesis de la investigación.....	13
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		14
2.1	Participantes	14
2.2	Zona de estudio	14
2.2.1	Fase de campo.....	14
2.2.2	Fase de laboratorio.....	14
2.3	Periodo de investigación	14
2.4	Procedimiento de aislamiento.....	15
2.4.1	Preparación de medios de cultivo	15
2.4.2	Toma de muestras	15
2.4.3	Procesamiento de la muestra.....	16
2.4.4	Obtención de cultivos puros.....	17
2.4.5	Determinación de las características macroscópicas del cultivo	17
2.4.6	Determinación de las características microscópicas del cultivo	18
2.4.7	Preparación del cepario.....	18
2.5	Extracción de ADN	18
2.6	Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR	18
2.7	Análisis de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	19
2.8	Purificación de los productos de PCR.....	20

CAPÍTULO 3: RESULTADOS	21
3.1 Cultivos Puros obtenidos.....	21
3.2 Características microscópicas de los cultivos.....	22
3.3 Extracción de ADN	24
3.4 Amplificación del gen 16S rRNA	24
3.5 RFLPs en gel de agarosa	25
3.6 Secuencias de las bacterias aisladas	30
3.7 BLAST	29
3.8 Construcción del árbol filogenético	32
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	34
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	42
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	43
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ejemplo de digestión con la enzima de restrcción Bam HI.	10
Figura 2: Ojo de la fuente geotermal Papallacta.....	16
Figura 3. Recolección de agua en el ojo de la fuente geotermal Papallacta.	16
Figura 4. Cepa 1, actino bacteria en medio M9.	21
Figura 5. Cepa 17 en agar R2A.....	21
Figura 6. Tinción Gram de la cepa 1, bacilos Gram positivos (<i>Thermoactinomyces intermedius</i>), 100X.....	22
Figura 7. Tinción Gram de la cepa 5, bacilos Gram positivos (<i>Bacillus subtilis</i>), 100X.	22
Figura 8. Tinción Gram de la cepa 34, bacilos Gram positivos (<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>), 100X.	23
Figura 9. Tinción Gram de la cepa 22, bacilos Gram positivos (<i>Anoxybacillus flavithermus</i>), 100X.....	23
Figura 10. Amplificación del gen 16S rRNA de las muestras P1 a P32.....	24
Figura 11. Amplificación del gen 16S rRNA de las muestras P33 a P40, se observa los controles positivo y negativo respectivamente.....	24
Figura 12. Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P1, P2, P3, P4, P5.	25
Figura 13. Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P6, P7, P8, P32, P33, P10.	26
Figura 14. Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortando con la enzima MspI, muestras P11, P34, P35, P37, P13.	26
Figura 15. Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P17, P18, P19, P20, P21.	27
Figura 16. Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P22, P23, P24, P25, P26, P27, P30.....	27
Figura 17. Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P38, P39, P14, P15, P16, P40.	28

- Figura 18.** Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P30, P28, P31..... 28
- Figura 19.** Captura de pantalla de la presentación de los resultados digitales..... 30
- Figura 20.** Árbol filogenético basado en las secuencias 16S rRNA, de las bacterias de la fuente geotermal Papallacta en comparación con organismos tipo. Los números entre paréntesis muestran la cantidad de cepas obtenidas de esa especie en este estudio, se encuentra el número de acceso en el NCBI y el filo al que pertenecen las bacterias (Firmicutes y Proteobacteria)..... 33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios a evaluarse de las colonias aisladas.....	17
Tabla 2. Cantidades de los componentes de la PCR, kit GoTaq® Green Master Mix. .	19
Tabla 3. Componentes del protocolo de análisis con enzimas de restricción para un volumen final de 20 µL por muestra (Adley, 2006).	19
Tabla 4. Fragmentos de restricción por grupos.....	29
Tabla 5. Microorganismos termófilos identificados en la fuente geotermal Papallacta.	31
Tabla 6. Número de cepas aisladas de cada bacteria termófila identificada.	32

LISTADO DE ABREVIATURAS

ANS: Agar Nutriente Salado

LB: Luria-Bertani

pH: Potencial Hidrógeno

°C: Grados Centígrados

spp: species pluralis (latinismo para la pluralización de especies)

µm: Micrómetro o micra

ARN: Ácido Ribonucleico

ADN: Acido Desoxirribonucleico

m.s.n.m: Metros Sobre el Nivel del Mar

NCBI: National Center for Biotechnology Information

Atm: atmósferas

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

%: porcentaje

BLAST: Basic Local alignment Search Tool

µL: microlitros

µM: micromolar

mM: milimolar

ng: nanogramos

SB: Stadtman-Barker

BT: Barker-Taha

pb: pares de bases

T: temperatura m

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

h: horas

mL: mililitros

RESUMEN

El Ecuador es un país que posee varias fuentes geotermales, la mayoría provienen de volcanes y han sido utilizadas principalmente para usos terapéuticos debido a sus propiedades fisicoquímicas las cuales han sido extensamente estudiadas, sin embargo existe poca información acerca de la biodiversidad microbiana. El objetivo de este estudio fue identificar bacterias mediante técnicas microbiológicas y moleculares en la fuente geotermal Papallacta localizada en la provincia de Napo en Ecuador. Se tomaron muestras de agua y sedimento en la fuente así como datos de pH y temperatura. Las muestras fueron procesadas, inoculadas y purificadas en medios semiespecíficos. Para su identificación se extrajo ADN, se realizó una amplificación del gen 16S rRNA, posteriormente se realizó la técnica de RFLP, y se realizó la secuenciación. El promedio de la temperatura del agua termal fue 54°C y del pH fue 8,2. Se obtuvieron un total de cuarenta cepas bacterianas, de los cuales nueve son especies diferentes. Predominan *Anoxybacillus amylolyticus* (12), *Aeribacillus pallidus* (7), and *Anoxybacillus gonensis* (7). También se encontró *Bacillus licheniformis* (5), *Geobacillus stearothermophilus* (4), *Thermoactinomyces intermedius* (2), *Tepidimonas taiwanensis* (1), *Bacillus subtilis* (1) y *Anoxybacillus flavithermus* (1). Los microorganismos identificados están relacionados con la biodiversidad de fuentes geotermales de otras partes de mundo.

Palabras clave:

- FUENTE GEOTERMAL
- MICROBIOLOGÍA
- GEN 16S rRNA
- TERMÓFILO.

ABSTRACT

Ecuador is a country with abundant geothermal springs, most of them originate close to volcanoes. The water from these springs is mainly used for therapeutic purposes due to their physicochemical characteristics which have been widely investigated. Nevertheless information about the microbial biodiversity of these water sources is lacking. The objective of this research was to identify the microbial communities in the Papallacta spring located in the Napo province of Ecuador, using microbiological and molecular techniques. Water and sludge samples were collected, and temperature and pH were measured. Water and sludge samples were inoculated on semi-specific media and bacterial isolates were obtained. For the identification of these isolates, DNA extraction, 16S rRNA gen amplification, RFLPs, and sequencing were performed. Average temperature from the water samples was 54°C and average pH was 8,2. Forty isolates belonging to nine different thermophilic species were obtained. Predominant species were *Anoxybacillus amylolyticus* (12), *Aeribacillus pallidus* (7), and *Anoxybacillus gonensis* (7). *Bacillus licheniformis* (5), *Geobacillus stearothermophilus* (4), *Thermoactinomyces intermedius* (2), *Tepidimonas taiwanensis* (1), *Bacillus subtilis* (1), and *Anoxybacillus flavithermus* (1) were also found. These microorganisms have been identified as part of the microbial community of geothermal springs from other parts of the world.

Keywords:

- **HOT SPRING**
- **MICROBIOLOGY**
- **16S rRNA**
- **THERMOPHILIC BACTERIA.**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El Ecuador tiene varias fuentes geotermales, la gran mayoría provienen de los volcanes y se usan principalmente con fines terapéuticos debido a las propiedades que poseen. Se han realizado estudios fisicoquímicos de las aguas, sin embargo no se ha hecho un análisis bacteriológico, por lo que en esta es la primera investigación que presenta dicho análisis.

La fuente geotermal Papallacta tiene condiciones físicas de pH y temperatura que permiten el crecimiento de microorganismos extremófilos por lo que se quiere determinar los microorganismos presentes en ella.

1.2 Justificación del problema

En varias partes del mundo se han realizado estudios en fuentes geotermales. Las condiciones que presentan permiten el crecimiento de microorganismos extremófilos, una de las primeras investigaciones en este campo fue hecha en el Parque Nacional Yellowstone realizado por Johnson en 1995, pero también se han registrado estudios en la India, China, Argentina, etc., (Song *et al.*, 2010; Sen *et al.*, 2013; Urbieto *et al.*, 2015).

La biodiversidad en nuestro país es muy amplia debido principalmente al clima y las regiones que tiene, sin embargo la investigación en el área es escasa (Flores, 2008). En el ámbito microbiológico se han registrado estudios en su mayoría en suelos siendo la fijación biológica de nitrógeno el tema más tratado, también en aguas pero más enfocado a aguas residuales, potables y control de calidad, aun así la información obtenida es pobre por lo que se requiere mayor profundidad en el campo investigativo (Bernal, 2015).

El Ecuador tiene varias fuentes geotermales, en las cuales se han hecho gran cantidad de estudios fisicoquímicos debido a que son ricas en minerales y por esta razón se conoce que poseen propiedades curativas o relajantes, pero no se ha hecho énfasis en el ámbito microbiológico. Se ha encontrado una tesis realizada en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, el cual hace referencia al análisis microbiológico de aguas termales de Guapante llevada a cabo durante el año 2015, sin embargo en esta investigación se hace la búsqueda de bacterias patógenas para implementar el tratamiento de aguas con el propósito de garantizar la calidad de las piscinas y para no afectar la salud de los turistas (Cruz, 2015).

Los hábitats naturales de nuestras regiones presentan amplios rangos de temperatura, pH y concentraciones de metales, lo que permite el crecimiento de microorganismos extremófilos (Castillo, 2005). El presente estudio es uno de los primeros en el país. Aislar e identificar los microorganismos termófilos que se encuentran en ambientes geotermales como son las aguas de Papallacta la cual posee un temperatura de 54 °C, para utilizarlos en aplicaciones biotecnológicas como por ejemplo producción de enzimas de uso industrial, descontaminación de efluentes que tienen compuestos tóxicos, entre otros, lo que permitirá un nuevo enfoque del uso y la utilidad de los microorganismos.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Aislar e identificar bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta.

1.3.2 Objetivos específicos

- Preparar medios de cultivo semi-específicos para el crecimiento y desarrollo de bacterias termófilas.

- Tomar muestras de agua y sedimentos de la fuente geotermal Papallacta.
- Realizar el procesamiento de las muestras y su inoculación.
- Identificar bacterias termófilas mediante técnicas independientes de cultivo.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos son aquellos que viven en condiciones extremas de temperatura, presión, salinidad, niveles de radiación, compuestos tóxicos y pH. No crecen en hábitats normales, pueden vivir en ambientes que tienen dos factores extremos, temperaturas elevadas y condiciones ácidas o básicas de pH (Castillo *et al.*, 2005).

El aislamiento de bacterias extremófilas se realiza a partir de muestras de suelo y agua para su procesamiento e incubación en las condiciones ambientales adecuadas, sin embargo hay que tomar en cuenta que no todos los microorganismos ambientales son cultivables, se aproxima que del 0,001-0,1% de bacterias en el agua marina, 0,25 en agua fresca, 0,3% en el suelo y 0,25% en sedimentos lo son (Amann *et al.*, 1995). Lo que se debe principalmente a que algunos microorganismos son parásitos de otros, al desconocimiento de requerimientos nutritivos específicos, algunos casos de simbiosis que es la dependencia de alimentación de dos especies es decir que mutuamente dos organismos se ayudan para metabolizar sustancias que de forma individual no podrían. (Madigan *et al.*, 2009).

1.4.2 Características

Los extremófilos principalmente pertenecen a las Eubacterias y Archeobacterias, que son microorganismos unicelulares procariotas (Urbieta *et al.*, 2014). Su hábitat en ambientes extremos se debe a varias características como por ejemplo (Castillo *et al.*, 2005):

- Enzimas estables: conocidas como extroenzimas, las cuales no se desnaturalizan a altas temperaturas o condiciones de pH, su función principal es proteger el ADN.
- Monocapa lipídica que les permite mayor estabilidad.
- Halófilos, acumulan sales en el interior para mantener un equilibrio osmótico lo cual impide la deshidratación.
- Enzimas específicas para metabolizar metales pesados.

1.4.3 Clasificación

1.4.3.1 Temperatura

Los microorganismos que resisten temperaturas altas se denominan termófilos y pertenecen a los dominios Bacteria, Archaea y Eukaria. Se puede clasificarlos dependiendo del rango de temperatura al cual crecen: termófilos 45-47°C, termófilos extremos 50-85°C e hipertermófilos 85-120°C (Baker *et al.*, 2001).

En el dominio Eukaria la tolerancia a altas temperaturas es menor que en los procariotas, se han observado que resisten hasta los 61°C. Entre los eucariotas se han encontrado hongos termófilos que crecen a una temperatura máxima de 62°C y mínima de 20°C (Meheshwari *et al.*, 2000). Aunque se pueden encontrar hongos que crecen a temperaturas superiores o inferiores a este rango, ciertos científicos describen que la temperatura óptima es de 45°C, algunos ejemplos como: *Myceliophthora fergusii*, *Myceliophthora guttulata*, *Myceliophthora heterothallica*, *Thermomyces dupontii*, *Rasamsonia emersonii* y *Rasamsonia byssochlamydoides* (de Oliveira *et al.*, 2014).

1.4.3.2 pH

Se pueden encontrar microorganismos que crecen a diferentes condiciones de pH, sin embargo independientemente del pH del entorno (extracelular), el pH del interior de los microorganismos es siempre cercano a la neutralidad para evitar que se destruyan macromoléculas lábiles (Castillo *et al.*, 2005).

Cada microorganismo crece a un pH específico, por lo que dependiendo del rango en que se encuentran se distinguen:

- Acidófilos: crecen a pH entre 1-5, una característica importante es la estabilidad de la membrana citoplasmática a este pH ya que se lisa a pH neutro, además que se debe mantener un potencial de protones a través de la membrana para estabilizar el pH interno ya que el externo puede llegar a ser muy bajo. Un factor interesante es que a las extremoenzimas aisladas de la pared o membrana celular se las puede dar aplicaciones a pH por debajo de 1.
- Neutrófilos: crecen a pH entre 6-8.
- Alcalófilos: crecen a pH entre 9-11, se pueden distinguir los microorganismos alcalófilos y haloalcalófilos los cuales requieren una concentración de sales mayor al 33%, se encuentran principalmente en ambientes con altas concentraciones de carbonato sódico y en lagos sódicos. Entre los microorganismos que se han encontrado son principalmente bacterias aerobias no marinas (*Bacillus*), en su mayoría son arqueas, las arqueobacterias de los géneros *Natronobacterium* y *Natromonas*, así como también metanógenos y cianobacterias. Del mismo modo que los acidófilos, su pH interior es cercano a la neutralidad pero el celular varía, el pH intracelular se puede mantener debido a la presencia de polímeros ácidos como ácidos galacturónico, glucónico, glutámico y aspártico, que tienen cargas negativas que funcionan como una matriz que reduce el pH en la superficie celular. En la membrana celular se debe bombear protones al interior celular para mantener el pH bajo en comparación al pH extracelular, por lo que utilizan un sistema antitransportador de Na/H para mantener el pH interior (de Oliveira *et al.*, 2014).

1.4.3.3 Salinidad

Estos microorganismos crecen en altas concentraciones de sales, se pueden distinguir;

- Halófilos discretos: requieren 1-6% NaCl
- Halófilos moderados: requieren 6-15% NaCl
- Halófilos extremos: requieren 15-30% NaCl

Habitan en aguas salinas, se puede destacar algas marinas, cianobacterias marinas y de agua dulce, bacterias fotótrofas anoxigénicas y arqueobacterias halófilas extremas. Los halófilos deben evitar la deshidratación, para lo cual incrementan la concentración interna de solutos mediante bombeo de iones inorgánicos hacia el exterior o sintetizando o concentrando algún soluto orgánico (Islas *et al.*, 2007).

1.4.3.4 Presión

Se encuentran en las profundidades de las aguas, como 3000 m (300 atm), generalmente cumplen tres condiciones: bajas temperaturas, altas presiones y bajas cantidades de nutrientes, se distinguen dos grupos (Castillo *et al.*, 2005):

- Barotolerantes: solo toleran altas presiones.
- Barófilos: su entorno debe tener altas presiones para vivir.

1.4.3.5 Toxicidad

Este tipo de microorganismos que toleran altas concentraciones de agentes tóxicos se los denomina toxitolerantes. Pueden ser metales pesados, disolventes orgánicos o antibióticos (Castillo *et al.*, 2005).

1.4.3.6 Radioactividad

A los microorganismos que pueden tolerar altas dosis de radioactividad, se los denomina radiófilos. Tienen proteínas que reparan los daños en el ADN (Castillo *et al.*, 2005).

1.4.4 Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo

Son técnicas moleculares que permiten la identificación de microorganismos que no se pueden detectar por métodos convencionales. Hace algunos años atrás no se podía conocer con certeza la diversidad microbiana debido a la falta de medios, no se tenían las condiciones adecuadas para el cultivo, por el desconocimiento de los factores de crecimiento, porque se encontraban en estado fisiológico no cultivable, entre otros. Al no ser cultivables aproximadamente el 99% de los microorganismos presentes en ambientes naturales, se desarrollaron técnicas independientes de cultivo que son eficaces para su identificación (Jan y Le Borgne, 2001).

Las herramientas de biología molecular analizan los ácidos nucleicos de las muestras o de cultivos, para lo cual se aplican una serie de procesos que permiten identificar los microorganismos con precisión y su posterior análisis filogenético. Entre las principales ventajas que presentan estos métodos se encuentran la identificación de microorganismos no cultivables, obtención de datos confiables sobre la diversidad microbiana en una muestra determinada, se pueden observar relaciones evolutivas, información de la distribución global de los microorganismos, etc., (Díaz y Wachter, 2003).

La combinación de técnicas convencionales y las independientes de cultivo dan excelentes resultados debido a que las primeras permiten la caracterización fenotípica y los segundos proporcionan la identidad, por lo que en conjunto se pueden identificar varios tipos microbianos además de obtener información sobre la función de moléculas del microorganismo (Mayo y Flórez, 2005).

1.4.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN consta de cinco etapas principalmente. La primera es la de lisis celular en la cual se rompen las paredes celulares para que los ácidos nucleicos puedan ser liberados. La segunda es la degradación proteica en la cual mediante la adición de enzimas, en este caso de proteasas, ayuda a la digestión de proteínas. La

tercera es la eliminación de ARN lo que se logra aplicando RNAsa. La cuarta es la extracción de proteínas, en la que se utilizan solventes orgánicos como el fenol que permite su precipitación. La quinta y última es la precipitación del ADN, al ser insoluble en alcohol se utiliza isopropanol, posteriormente el ADN se lo resuspende en un amortiguador apropiado (Zavala, 2005).

1.4.4.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Se realiza la amplificación de un fragmento de ADN, a partir de la extracción de ADN se obtiene la cadena molde. La primera etapa es la desnaturalización en la que las cadenas de la cadena molde se separan, generalmente esto sucede a temperaturas altas es decir pasado los 90°C, en el siguiente paso se baja la temperatura en un rango de 35-60°C siendo específica para los cebadores que se estén utilizando, en esta etapa los mismos se unen a las cadenas molde, sigue la fase de elongación o extensión, aquí actúa la polimerasa que tiene como función ir añadiendo nucleótidos complementarios desde el extremo 3' libre de la región a la que se unieron los cebadores, la adición termina al momento que la polimerasa no es capaz de unir más nucleótidos por lo que se obtienen fragmentos de diferente tamaño, se la realiza a temperaturas entre 70-72°C. Estos ciclos se repiten según lo programado y al final se obtiene millones de copias del fragmento de interés (Pérez de Castro, 2000).

1.4.4.3 Gen ribosomal 16S

El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S, lo que representa una medida de la velocidad a la cual una partícula sedimenta por unidad de fuerza centrífuga y se mide en unidades S que significa Svedberg (10^{-13} segundos) (Voet *et al.*, 2006). Está formado por dos subunidades más pequeñas, la una de 50S y la otra de 30S. La subunidad 30S tiene una molécula de rARN 16S la cual tiene 1542 pb (Janda y Abbot, 2007). Las secuencias que codifican para el rRNA son altamente conservadas aunque también posee zonas específicas, y se toman como referencia para estudios filogenéticos y de evolución. Al realizar una comparación de las secuencias de rRNA 16S, se pueden determinar las relaciones taxonómicas entre las especies además que

permite una fácil identificación de las bacterias. Se ha planteado que en una comparación de secuencias en las que el gen rRNA 16S tenga un 97% de secuencias idénticas existe una alta probabilidad de que sean de la misma especie (Vasek *et al.*, 2000).

1.4.4.4 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

También denominado Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción. Son secuencias específicas de nucleótidos que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción (Suárez, 2007).

Dichas enzimas son proteínas que reconocen una secuencia de cuatro a ocho pares de bases en fragmentos de ADN o en el genoma entero, son obtenidas de procariontas donde actúan como un mecanismo de defensa para degradar material genético extraño que puede entrar en la célula; las bacterias tienen la capacidad de metilar su propio ADN lo que le permite diferenciar el mismo de uno intruso. La nomenclatura corresponde primero a tres letras que representan el nombre científico del microorganismo del cual fue extraída, seguida de la cepa y finalmente en números romanos el número para distinguir si hay una o más endonucleasas aisladas de la misma bacteria, como por ejemplo EcoRI, representa la proteína aislada de *Escherichia coli*, de la cepa RY13 y es la primera endonucleasa que se aisló (Fonseca *et al.*, 2010).

Las enzimas reconocen sitios específicos y cortan los enlaces fosfodiéster en la hebra superior y en su complementaria. Un ejemplo se puede ver en la figura 1, se observan las secuencias de pares de bases específicas que reconoce la enzima Bam HI, la enzima se une y corta los enlaces obteniéndose los fragmentos de la parte inferior (Fonseca *et al.*, 2010). Se utiliza para diferenciar microorganismos analizando los fragmentos obtenidos del corte, ya que se obtendrán patrones diferentes debido a que los sitios de restricción no son iguales (Campbell *et al.*, 2001).

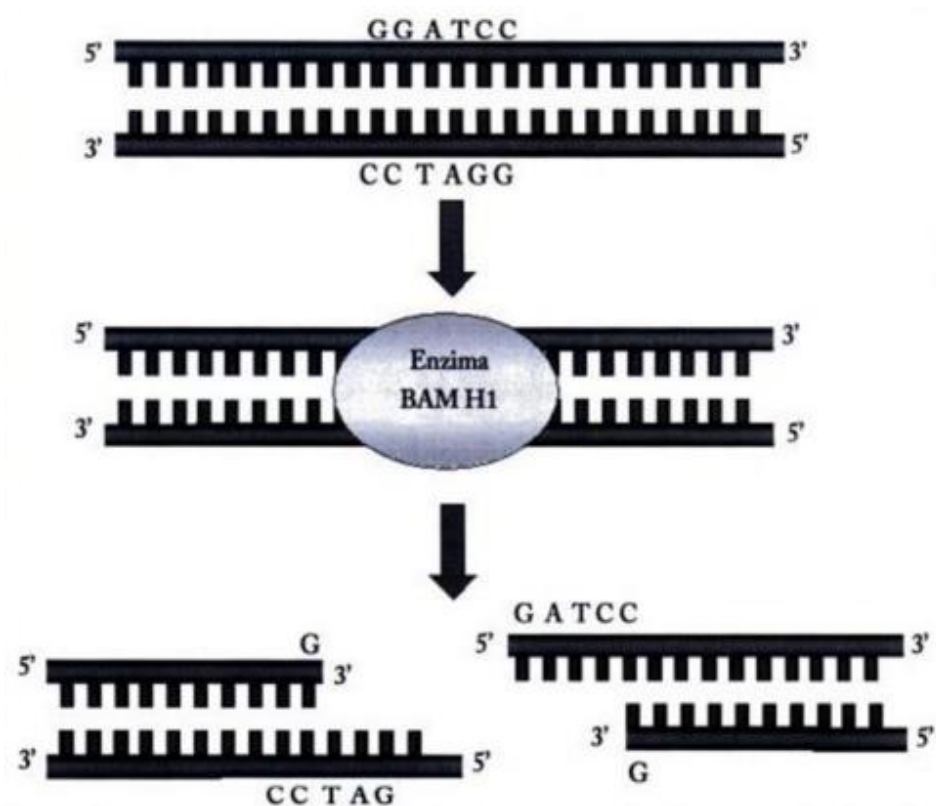


Figura 1: Ejemplo de digestión con la enzima de restricción Bam HI.
Fuente: Fonseca *et al*, 2010.

Hay tres tipos de endonucleasas (Voet y Voet, 2004):

Tipo I: reconocen una secuencia específica de ADN la metilan y restringen. La restricción no ocurre en el sitio de reconocimiento si no en sitios distantes al azar por lo menos a 1000 pb.

Tipo II: reconocen la secuencia de ADN y restringen en el sitio de reconocimiento, son bastante utilizadas ya que cortan en ADN en sitios específicos y se obtienen secuencias conocidas. Al momento se conocen más de 3000 especies de enzimas con más de 200 secuencias específicas que reconocen.

Tipo III: actúan de forma similar a las endonucleasas tipo I, pero la restricción ocurre a 25-27pb del sitio de reconocimiento.

Otro ejemplo de endonucleasa es la MspI, es de tipo II, se aisló de una especie de *Moraxella* y reconoce la secuencia CCGC en la hebra superior y GGCC en su complementaria, ésta enzima se utilizó en el este estudio (Tobler y Benning, 2011).

Los fragmentos de restricción obtenidos se los visualiza en un gel de agarosa o poliacrilamida, en el cual se separan de acuerdo a su tamaño (NCBI, 2014).

1.4.4.5 Secuenciación Sanger

El método Sanger se considera como una tecnología de primera generación, comprende en general los siguientes pasos: la purificación de DNA, la síntesis de DNA el marcaje utilizando ddNTPs (dye-labeled dideoxynucleotides), electroforesis y la detección por fluorescencia (Siqueira *et al.*, 2012).

La secuenciación se basa en añadir dideoxinucleótidos que no tienen el grupo hidroxilo en el terminal 3', por lo que se bloquea la adición de nucleótido y por lo tanto su elongación. El proceso empieza cuando se clona el DNA, se desnaturaliza para obtener hebras simples. En cuatro tubos diferentes se coloca el cebador marcado radioactivamente, los nucleótidos trifosfato, la hebra de cadena simple y la DNA polimerasa en cada tubo, se coloca los dideoxinucleótidos trifosfato (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), así se forman fragmentos de distintas longitudes, las cuales terminan en el dideoxinucleótido trifosfato que se añadió, luego se carga a una electroforesis para observar los fragmentos (Brujin, 2011).

1.4.4.6 Alineamiento múltiple de secuencias

Consiste en alinear más de tres secuencias de ADN, ARN o proteínas, lo que se busca es ordenar las partes homólogas mediante algoritmos bioinformáticos y para lo cual se pueden utilizar programas como el MEGA, BioEdit, Strap, ClustalX, etc. (Rodríguez, 2013).

Entre las aplicaciones más comunes están la reconstrucción filogenética, análisis de proteínas, búsqueda de regiones conservadas, etc. (Rodríguez, 2013).

1.4.4.7 Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos son diagramas que describen la historia evolutiva entre los organismos, las divisiones en el árbol representan especiación lo que significa que un linaje se divide en dos, por lo que se puede utilizar para ver las relaciones evolutivas entre la especie común más antigua incluyendo las especiaciones y las poblaciones presentes de los organismos (Heller *et al.*, 2009).

La aplicación que interesa en este caso se basa en la reconstrucción de árboles genéticos basados en la distancia de los caracteres observados, es decir no representan relaciones evolutivas si no la relaciones de similitud entre los grupos o individuos clasificados (Heller *et al.*, 2009).

1.4.5 Aplicaciones

Las aplicaciones de los microorganismos extremófilos se basan principalmente en saber el mecanismo de funcionamiento de sus biomoléculas específicamente la resistencia al entorno en el que se desarrollan. En el campo biotecnológico, se ha realizado la producción de enzimas termoestables que pueden ser utilizadas en la medicina o como biocatalizadores en varios procesos, por ejemplo como aditivos en los detergentes que al trabajar a bajas temperaturas permite la reducción de costos, en la producción de químicos, biopolímeros, materiales y biocombustibles (Guerrero *et al.*, 2013; Yasawang *et al.*, 2011). Otra aplicación es la obtención de DNA polimerasa termoestable que se utiliza en PCR (Javed *et al.*, 2012).

1.4.6 Termas Papallacta

Las Termas Papallacta se encuentran ubicadas en la parroquia Papallacta, cantón Quijos en la provincia de Napo, a las faldas de los volcanes Cayambe y Antisana. Son un atrayente turístico para gente tanto nacional como extranjera, principalmente por la composición química del agua lo que ayuda a la relajación del cuerpo, terapias contra el estrés, son antialérgicas, desinflamatorias, diuréticas, mejoran la motilidad intestinal, etc.

La temperatura de las termas oscila entre 30 y 70°C, y en las piscinas de 36 a 40°C (Pérez, 2014).

En función de la temperatura que poseen las aguas se encuentra disueltos diferentes minerales, por lo que se clasifican en (Morales, 2008):

- Aguas mesotermales: con un rango de temperatura de 35-45°C.
- Aguas hipertermales: con más de 45°C.

Se han encontrado análisis de las propiedades físico químicas llevados a cabo por la Escuela Politécnica Nacional en lo que dan como resultado que los minerales que se encuentran presentes en mayor cantidad son: cloro, sulfatos, calcio, sodio y en menor proporción magnesio y nitratos. Una característica de estas aguas es que son inodoras, incoloras y de sabor ligeramente salubre (Morales, 2008; Pérez, 2014).

1.5 Hipótesis de la investigación

Existe la presencia de bacterias termófilas en el agua y sedimentos de la fuente geotermal Papallacta.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El proyecto de tesis fue desarrollado por Janina Estefanía Arias Factos, con la colaboración de Andrés Izquierdo Ph.D. Director del Proyecto y Alma Koch M.Sc, Asesora Científica.

2.2 Zona de Estudio

Los estudios se realizaron en campo y laboratorio:

2.2.1 Fase de campo

Se llevó a cabo en la “Hostería Pampallacta”, parroquia de Papallacta, Cantón Quijos, Provincia de Napo, con coordenadas Latitud: 0°32'0,37,93" S; Longitud: 78° 8'26,75" O, Altura Media: 3050 m.s.n.m.

2.2.2 Fase de laboratorio

El trabajo de 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, de coordenadas Latitud: 0°18'53.5"S, Longitud: 78°26'36.5"O, Altura Media: 2700 m.s.n.m.

2.3 Periodo de investigación

El proyecto contempló los meses desde agosto del 2015 hasta abril del 2016, con una duración de ocho meses.

2.4 Procedimientos de aislamiento

2.4.1 Preparación de medios de cultivo

Se preparó medios líquidos M9 y caldo nutriente para la toma de muestras de sedimentos (Javed, 2012).

Se realizó la preparación de medios de cultivo sólidos:

Para bacterias aerobias: ANS, R2A, LB y M9 (Javed *et al.*, 2012; Llarch *et al.*, 1996; Yasawong *et al.*, 2011).

Para bacterias anaerobias: *Methanococcus* (Stadtman-Barker) y *Methanobacterium* (Barker-Taha) (Acuña *et al.*, 2008).

El pH de cada medio se ajustó a un pH de 8.2 el cual es el del agua termal. Los componentes de cada medio de cultivo se presentan en el Anexo D.

2.4.2 Toma de muestras

Se realizaron dos muestreos, el primero el 24 de septiembre del 2015 y el segundo el 03 de diciembre de 2015.

Se localizó el ojo de la fuente geotermal el cual se encontraba delimitado por una estructura de cemento y protegido con tejas grandes de eternit como se puede ver en la figura 2. Se procedió a la toma de muestras manteniendo condiciones de estériles con el uso de guantes y mascarilla. Para bacterias aerobias, en tubos falcón estériles se recogió 50 mL de agua. Para anaerobias, con una jeringa de 10mL se colectó el agua y se dispensó en tubos de polipropileno para mantener condiciones anaerobias (Acuña *et al.*, 2008).

La recolección de sedimentos se hizo con la ayuda de hisopos estériles para lo cual se realizó un raspado en los sedimentos de la terma y se colocó en medio de cultivo líquido (Llarch *et al.*, 1996). Para el procesamiento de las muestras se las llevó al laboratorio en un termo portátil que mantiene la temperatura.



Figura 2: Ojo de la fuente geotermal Papallacta



Figura 3: Recolección de agua en el ojo de la fuente geotermal Papallacta.

2.4.3 Procesamiento de la muestra

Las muestras tomadas se procesaron en el laboratorio una hora y media después de su recolección debido al viaje. Se realizó la inoculación en los medios de cultivo sólidos mediante la técnica de estriado. Para las bacterias anaerobias se utilizó una cámara casera de anaerobiosis construida a partir de un botellón grande en el que se hizo una abertura de 10x5cm y se la selló con cinta adhesiva para evitar que entre oxígeno, al

momento de incubar se colocó una vela encendida en el interior para eliminar el oxígeno y de esta forma crear el ambiente de anaerobiosis. Las muestras se incubaron a 54°C por 48h, observando el crecimiento cada 12 horas.

2.4.4 Obtención de cultivos puros

Para obtener cepas puras se observó el crecimiento en las placas iniciales y se procedió a realizar la resiembra de una sola colonia en un nuevo medio estéril igual al que provino la misma, se dejó incubar a 54°C por 12h y se observó el crecimiento.

2.4.5 Determinación de las características macroscópicas del cultivo

Los criterios a evaluarse son: pigmentación, aspecto, borde, elevación y forma de las colonias como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1:

Criterios a evaluarse de las colonias aisladas. Fuente: Granados y Villaverde, 2003.

Criterio	Observación
Pigmentación	Color
Aspecto	Brillante
	Translúcida
	Opaca
Borde	Mucosa
	Liso
	Irregular
Elevación	Plana
	Convexa
	Acuminada
Forma	Plano-convexa
	Circular
	Rizoide
	Filamentosa
	Irregular
	Puntiforme

Fuente: Granados y Villaverde, 2003.

2.4.6 Determinación de las características microscópicas del cultivo

Se realizó a todas las cepas una tinción Gram para diferenciar entre Gram positivas y Gram negativas, y verificar que los cultivos estén puros. Se hizo la observación al microscopio con un aumento de 100x para observar el color y la forma de las bacterias.

2.4.7 Preparación del cepario

Para tener cepas de reserva se utilizaron dos métodos: el primero fue sembrarlas en agar inclinado y el segundo en glicerol. Para el último las cepas que crecieron en medio M9 se sembraron en caldo M9 y el resto en caldo nutriente. Se dejó incubar a 54°C por 48h. En tubos ependorf de 2mL se colocó 800µL de caldo con la cepa desarrollada y 200µL de glicerol, se dejó a -20 °C por una semana y se las guardó a -80°C, previamente identificadas.

2.5 Extracción de ADN

Se realizó el crecimiento de las cepas en cajas Petri un día antes para obtener crecimiento masivo y cultivo fresco. Se utilizó el protocolo de “Minipreparación de ADN” Anexo E (Weising *et al.*, 1995). Se midió la concentración de DNA obtenida en el NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer. Se determinó la calidad de ADN obtenida observando el valor del radio 260/280 el cual se usa para ver la pureza del ADN, debe estar entre 1,5-2 siendo el mejor valor 1,8 (Scientific, 2010). Se ajustaron las concentraciones a una concentración final de 30 ng/µL (Weising *et al.*, 1995).

2.6 Amplificación de gen 16S rRNA mediante PCR

Se llevó a cabo la amplificación de los genes 16S rRNA de las muestras, utilizando los cebadores 27F y 1492R (Cihan *et al.*, 2012). Las reacciones de PCR se realizaron con el kit GoTaq® Green Master Mix, con un volumen final de 50 µL de cada muestra, Tabla 2. Las condiciones de la PCR en el termociclador fueron las siguientes: 94°C por 5min para la fase de desnaturalización, 94°C por 30s, 55°C por 1min y 72°C por 1min

para la fase de hibridación y 72°C por 5min para la fase de polimerización, por 35 ciclos. Finalmente se mantiene a 4°C por 10 min.

Tabla 2:

Cantidades de los componentes de la PCR, kit GoTaq® Green Master Mix.

Componente	Volumen (μL)	Concentración Final
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25	1X
Cebador reverso, 10μM	2	0,1-1,0 μM
Cebador directo, 10μM	2	0,1-1,0 μM
Muestra de ADN	4	<250ng
Agua ultra pura	17	N.A
Volumen final por muestra	50	

Para observar los productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen 16S rRNA, se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se utilizó un marcador molecular Labnet de 100-3000 bp.

2.7 Análisis de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A los productos obtenidos de la PCR se les realizó un análisis de RFLPs, utilizando la enzima MspI (BioLabs) que reconoce la secuencia CCGC en la hebra superior y GGCC en su complementaria, (Tabla 3) (Tobler y Benning, 2011).

Tabla 3:

Componentes del protocolo de análisis con enzimas de restricción para un volumen final de 20 μL por muestra (Adley, 2006).

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 dejó incubar a 37 °C, por 2 h. Posteriormente, para observar el corte de los fragmentos por la enzima MspI, para lo cual se efectuó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a 100V por 50 min. Los fragmentos de restricción obtenidos se seleccionaron y se agruparon según los patrones observados (Tobler y Benning, 2011).

2.8 Purificación de los productos de PCR

Se midió la concentración de los productos de PCR en ng/μL, al ser altas las mediciones, se purificó solo cierta cantidad del producto de PCR para realizar las respectivas diluciones para llegar a un volumen final de 40μL con concentración final de 80ng/μL aproximadamente. Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit ilustra ExoProStar, Anexo F (Tobler y Benning, 2011).

Al terminar este procedimiento las muestras de DNA fueron enviadas a Korea, para que se realice la secuenciación en la empresa Macrogen en Korea.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Cultivos puros obtenidos

Se obtuvieron un total de 40 cepas termófilas en los dos muestreos, de las cuales 7 provinieron de muestras de agua y 33 de sedimento, en el Anexo B se muestra de dónde provino cada bacteria. El tiempo de incubación fue de 18h a 54 °C y un pH de 8,2. Se hicieron controles negativos para descartar cualquier tipo de contaminación. Las características macroscópicas de las cepas se presentan en el Anexo A. Dos ejemplos de los cultivos obtenidos se pueden ver en las siguientes figuras:



Figura 4: Cepa 1, actino bacteria en medio M9.

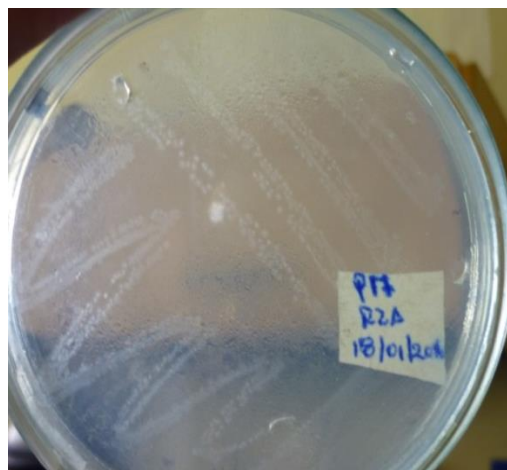


Figura 5: Cepa 17 en agar R2A.

3.2 Características microscópicas de los cultivos

La descripción de las características microscópicas se llevó a cabo según los parámetros detallados en la tabla 1.

En las siguientes figuras se muestran las tinciones Gram de algunas cepas, vistas al microscopio.

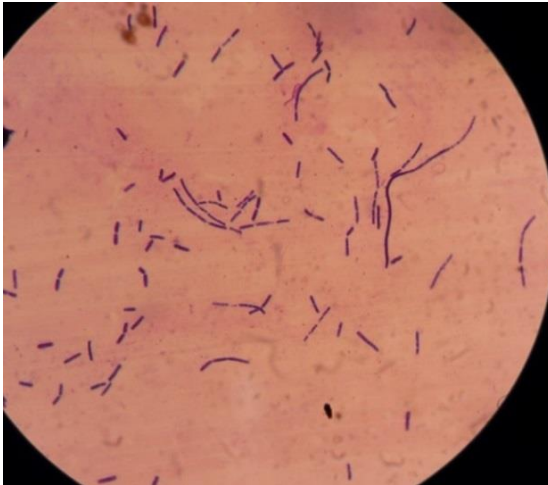


Figura 6: Tinción Gram de la cepa 1, bacilos Gram positivos (*Thermoactinomyces intermedius*), 100X.

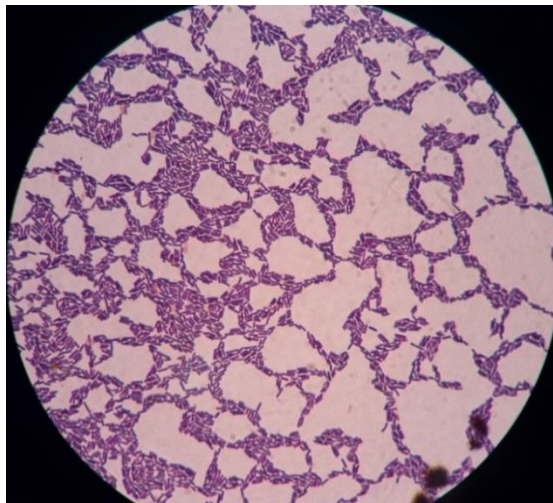


Figura 7: Tinción Gram de la cepa 5, bacilos Gram positivos (*Bacillus subtilis*), 100X.

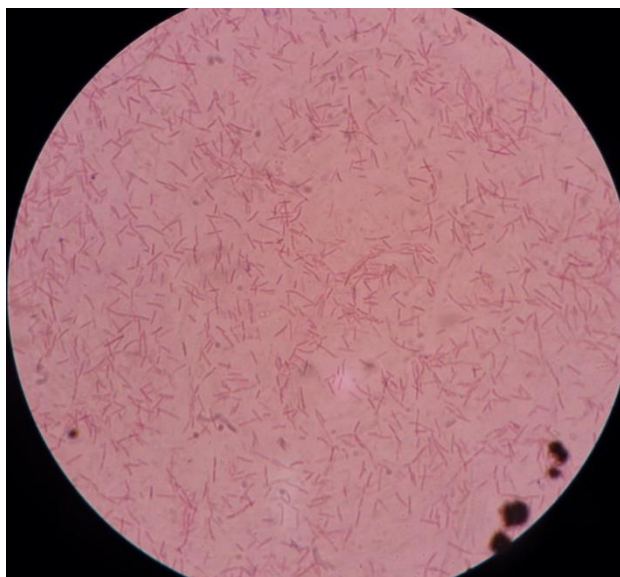


Figura 8: Tinción Gram de la cepa 34, bacilos Gram positivos (*Anoxybacillus amylolyticus*), 100X.

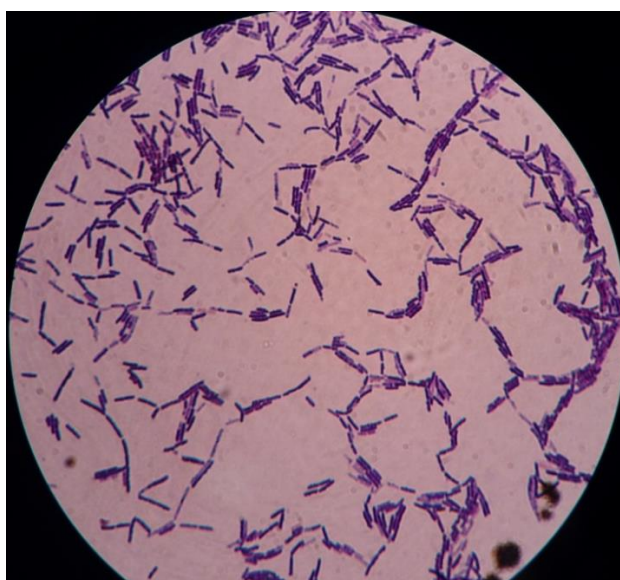


Figura 9: Tinción Gram de la cepa 22, bacilos Gram positivos (*Anoxybacillus flavithermus*), 100X.

La descripción microscópica, de que muestra (suelo o agua) provinieron y medio de cultivo en el que crecieron las cepas aisladas, se detallan en el Anexo B.

3.3 Extracción de ADN

El ADN extraído de todas las cepas aisladas fue de alta calidad, los valores de pureza se encuentran dentro de los valores mencionados previamente. Los datos obtenidos de la concentración de ADN y del radio 260/280 se pueden ver en el Anexo C.

3.4 Amplificación del Gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA de las 40 muestras amplificaron con los cebadores 27F y 1492R, para su observación se corrió una electroforesis en gel de agarosa, se utilizó el marcador de 3000pb, las bandas obtenidas muestran un peso aproximado de 1500 pares de bases, como se ve en las figuras 10 y 11.

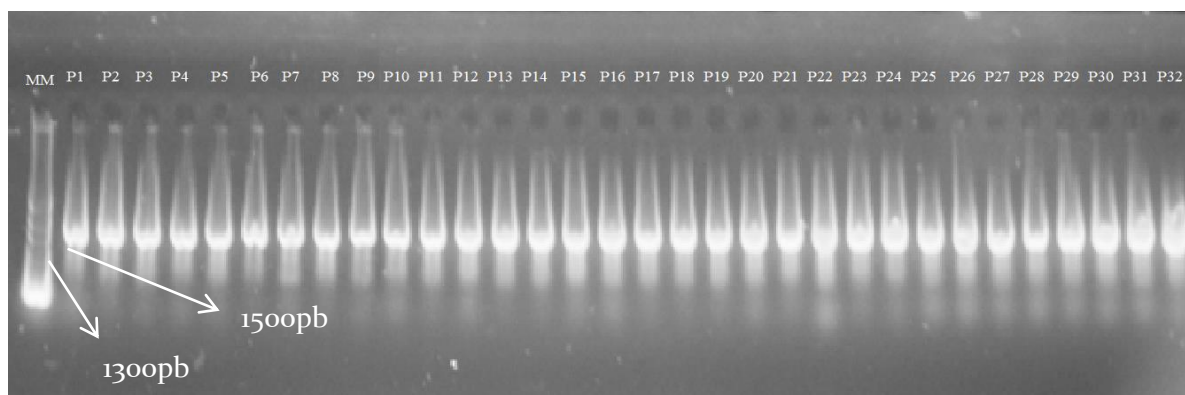


Figura 10: Amplificación del gen 16S rRNA de las muestras P1 a P32.

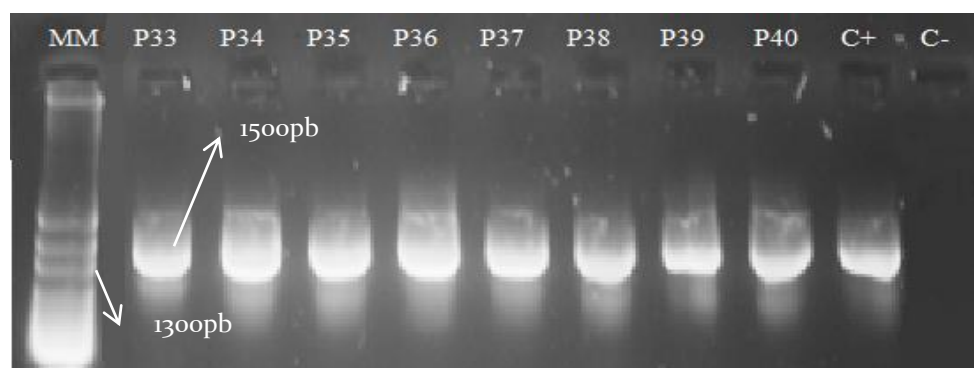


Figura 11: Amplificación del gen 16S rRNA de las muestras P33 a P40, se observa los controles positivo y negativo respectivamente.

3.5 RFLPs en gel de agarosa

Después de amplificar el gen 16S rRNA de las 40 muestras se realizó el análisis de RFLPs, para lo cual se utilizó la enzima MspI, los resultados se pudieron observar en un gel de agarosa 1%, se muestra en las figuras 12-18, todos los geles se corrieron con un marcador molecular de 3000pb.

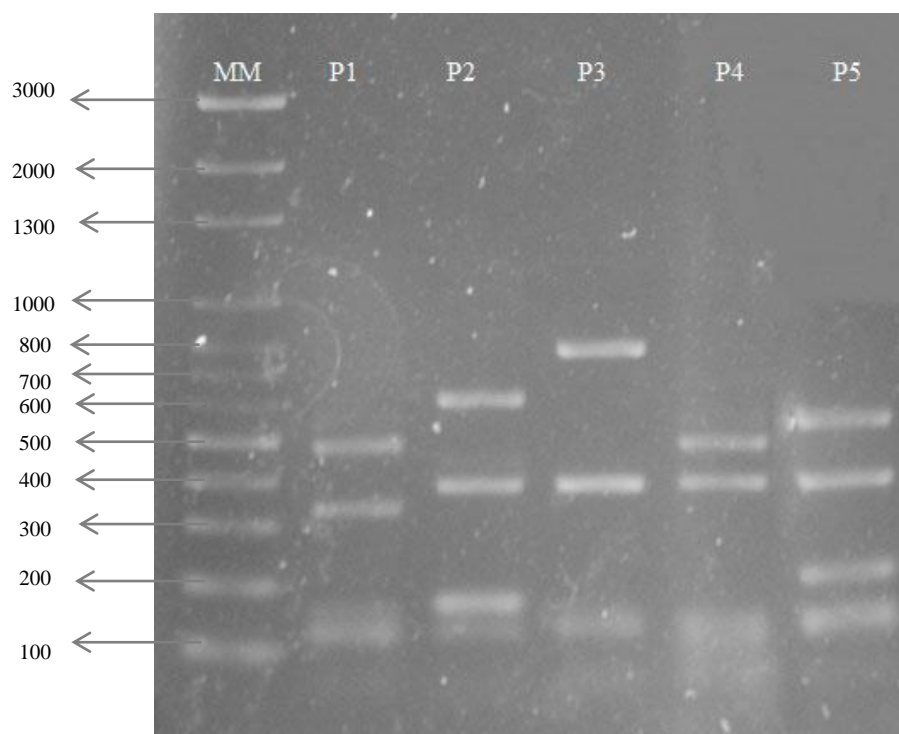


Figura 12: Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P1, P2, P3, P4, P5.

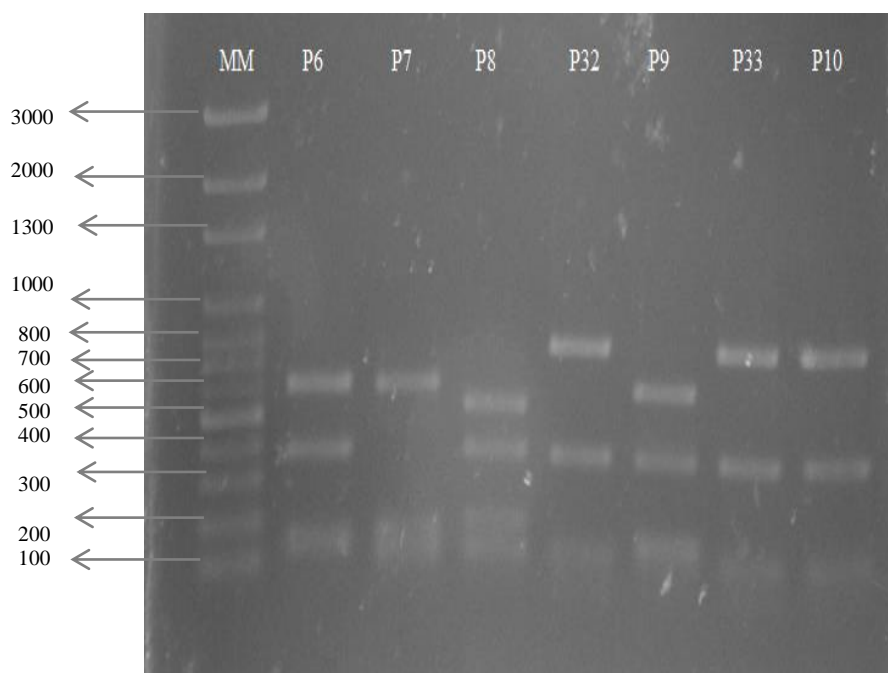


Figura 13: Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P6, P7, P8, P32, P33, P10.

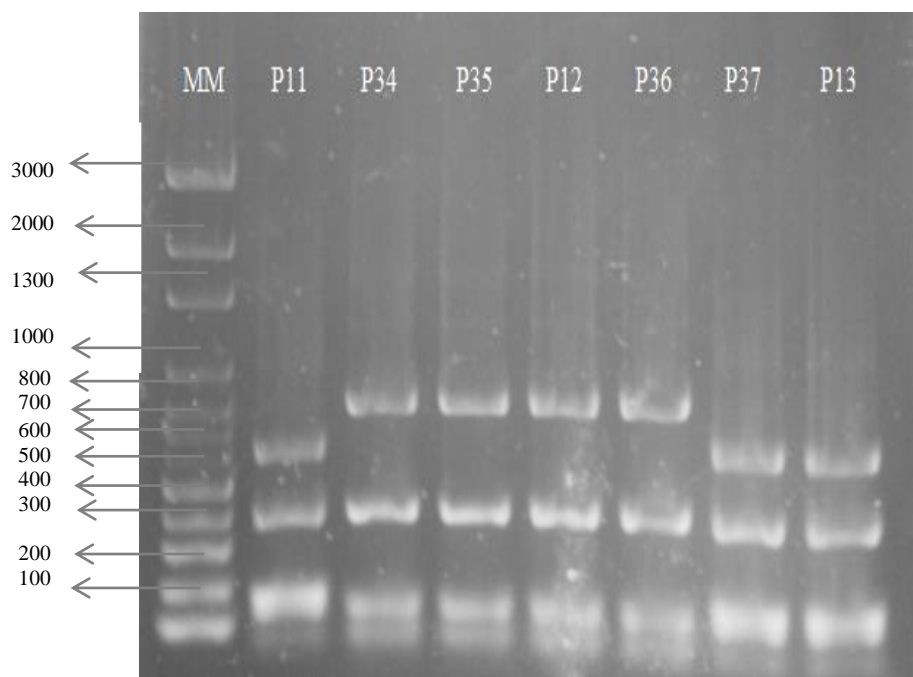


Figura 14: Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortando con la enzima MspI, muestras P11, P34, P35, P37, P13.

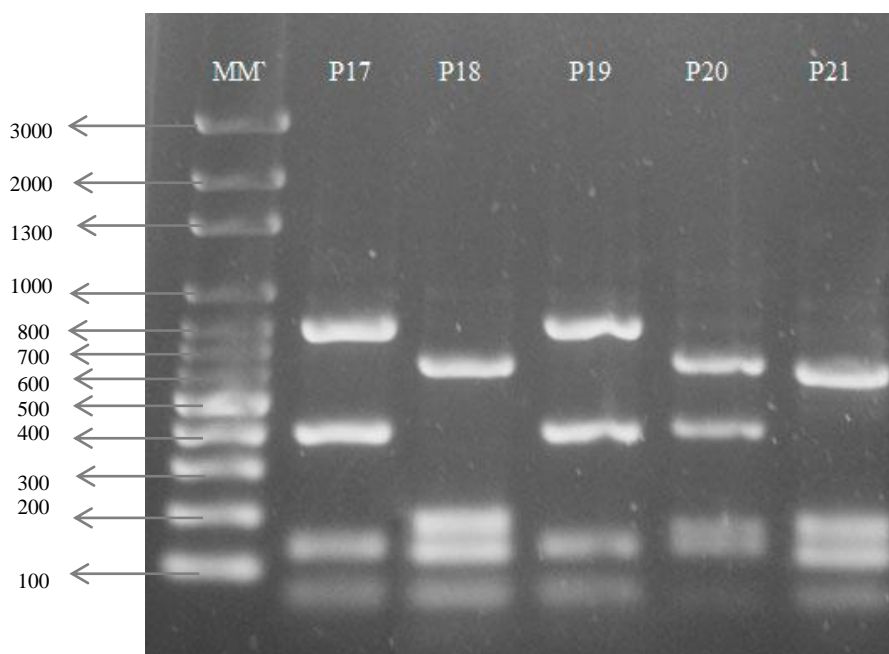


Figura 15: Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P17, P18, P19, P20, P21.

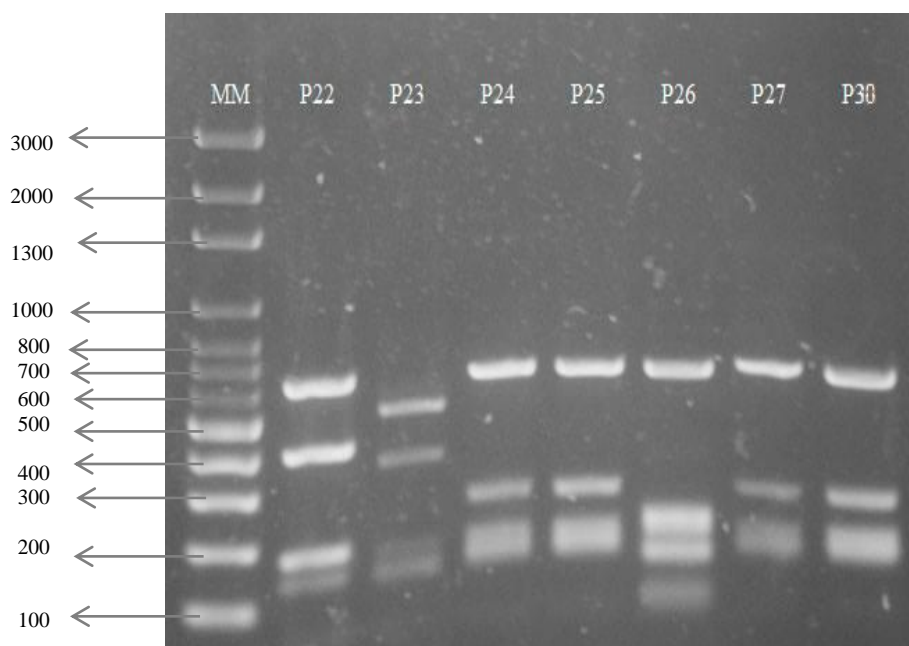


Figura 16: Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P22, P23, P24, P25, P26, P27, P30.

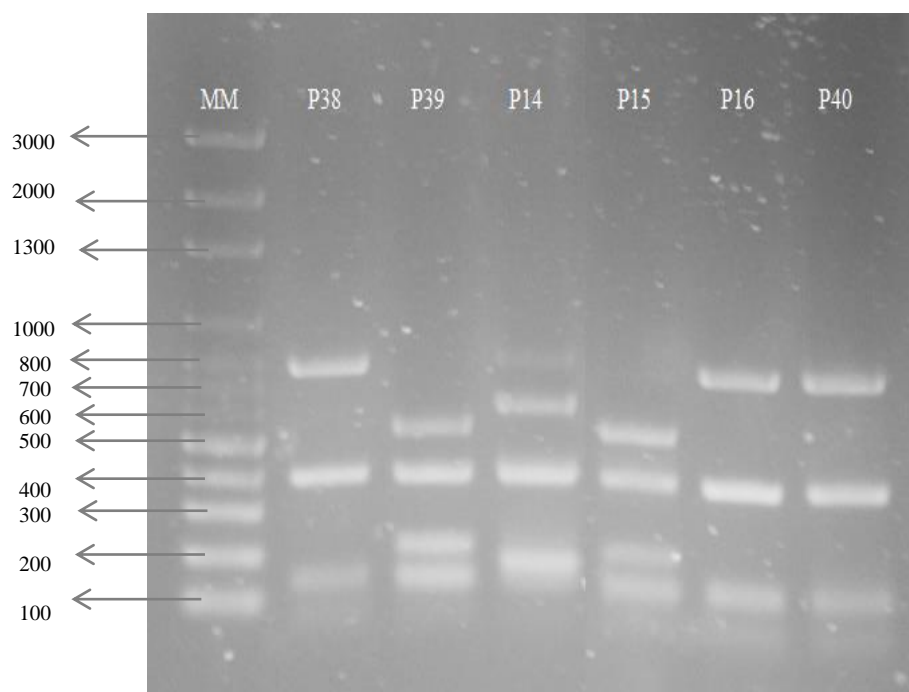


Figura 17: Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P38, P39, P14, P15, P16, P40.

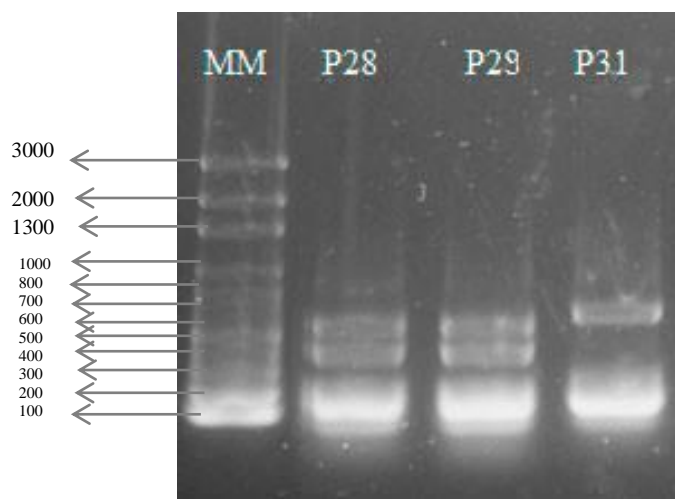


Figura 18: Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, muestras P30, P28, P31.

Se identificaron los fragmentos de restricción iguales y se los agruparon, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4.

Fragmentos de restricción por grupos

Grupo	Fragmentos de restricción similares
1	P3=P32=P33=P10=P34=P35=P12=P36=P38=P17=P19=P16
2	P2=P9=P11=P13=P37=P40
3	P24=P25=P27=P30=P31
4	P21=P7=P18=P26
5	P8=P15=P39
6	P28=P29
7	P6=P20
8	P22
9	P23
10	P14
11	P1
12	P4
13	P5

Como se puede ver en la tabla 4, se identificaron 13 grupos de fragmentos de restricción, para tener resultados confirmativos y comprobar que las cepas clasificadas en cada grupo eran las mismas, se enviaron a secuenciar del grupo 1, 6 cepas; del grupo 2, 4 cepas; del grupo 3, 5 cepas; del grupo 4, 4 cepas; de los grupos 5, 6 y 7, 2 cepas de cada uno; y de los grupos del 8 al 13 todas las cepas.

Una vez seleccionadas las cepas que se iban a mandar a secuenciar, se procedió a purificar y cuantificar los productos de PCR para obtener la concentración final requerida.

3.6 Secuencias de las bacterias aisladas

La empresa MacroGen entrega los resultados en forma digital, como se observa en la figura 19. Los resultados se procesaron en el programa Geneious R9.1. Se cargaron los cromatogramas en formato *.abi de todas las muestras, reversas y complementaria. Para cada cepa se formó la secuencia consenso, con la opción “De Novo Alignment”, posteriormente se eliminaron las regiones pobres de los extremos y se analizó la secuencia manualmente para corregir o eliminar los conflictos presentados. Finalmente se exporta la secuencia en formatos FASTA.



Figura 19: Captura de pantalla de la presentación de los resultados digitales.

3.7 BLAST

La secuencia consenso se analizó en el NCBI, con la herramienta Nucleotide BLAST (blastn), la comparación se hizo tomando en cuenta Secuencias Tipo (Sequences from type material). Como resultado se obtuvieron microorganismos que se presentan en la tabla 5.

En la tabla 6, se presenta el número de cepas que pertenecen a cada bacteria identificada.

Tabla 5:

Microorganismos termófilos identificados en la fuente geotermal Papallacta.

Cepa	Cepas iguales	Organismo más próximo ^a	Número de acceso (NCBI)	Query Coverage	Max Ident	Filo
P1	P23	<i>Thermoactinomyces intermedius</i>	NR_041760.1	100%	99%	Firmicutes
P2	P9	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152	100%	99%	Firmicutes
	P11					
	P13					
	P14					
	P37					
	P40					
P3	P10	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	KM593303.1	100%	99%	Firmicutes
	P12					
	P16					
	P17					
	P19					
	P32					
	P33					
	P34					
	P35					
	P36					
P38						
P4		<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	NR_043227.1	100%	99%	Proteobacteria (β)
P5		<i>Bacillus subtilis</i>	KJ812207.1	100%	100%	Firmicutes
P6	P20	<i>Aeribacillus pallidus</i>	NR_026515.1	100%	97%	Firmicutes
	P24					
	P25					
	P27					
	P30					
	P31					
P7	P18	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NR_115284.1	100%	97%	Firmicutes
	P21					
	P26					
P8	P15	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR_118996.1	100%	99%	Firmicutes
	P28					
	P29					
	P39					
P22		<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	NR_026516.1	100%	99%	Firmicutes

^a Organismo más próximo según la base de datos GenBank.

Tabla 6:

Número de cepas aisladas de cada bacteria termófila identificada.

Bacteria	Número de cepas aisladas que se obtuvieron	
<i>Thermoactinomyces intermedius</i>	2	5%
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	7	18%
<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	12	30%
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	1	3%
<i>Aeribacillus pallidus</i>	7	18%
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	4	10%
<i>Bacillus licheniformis</i>	5	13%
<i>Bacillus subtilis</i>	1	3%
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	1	3%
Total	40	100%

3.8 Construcción del árbol filogenético

Posterior a la identificación de las bacterias, se obtuvieron grupos de secuencias que representaban al mismo microorganismo por lo que de cada grupo se escogió una al azar. Además se utilizó las secuencias de los organismos tipo encontrados en el NCBI y 3 secuencias de microorganismos termófilos diferentes al de esta investigación.

Se hizo un alineamiento de todas las secuencias nombradas, en el programa MEGA6 con la herramienta MUSCLE, se eliminaron las partes ambiguas en el programa en línea Gblocks y finalmente se realizó el análisis filogenético en MEGA6 obteniéndose de esta forma el árbol filogenético representado en la figura 20.

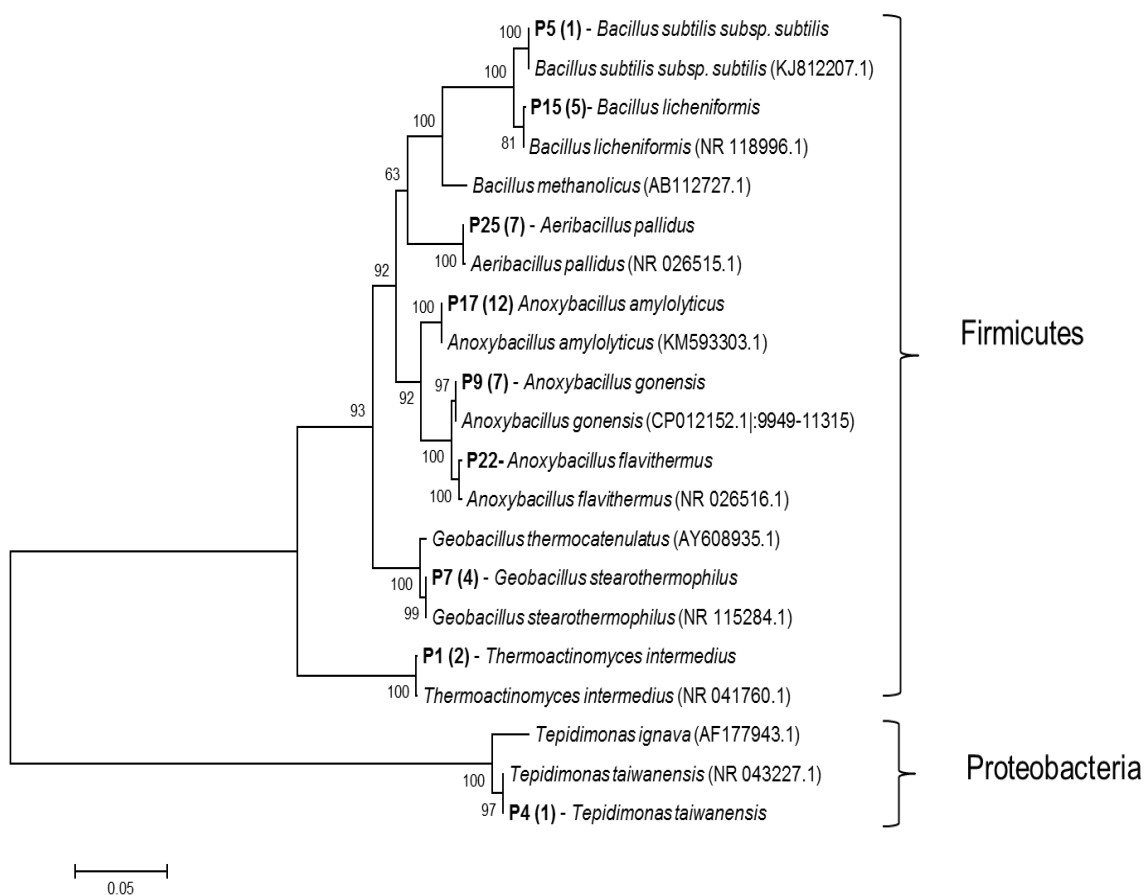


Figura 20: Árbol filogenético basado en las secuencias 16S rRNA, de las bacterias de la fuente geotermal Papallacta en comparación con organismos tipo. Los números entre paréntesis muestran la cantidad de cepas obtenidas de esa especie en este estudio, se encuentra el número de acceso en el NCBI y el filo al que pertenecen las bacterias (Firmicutes y Proteobacteria).

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El Ecuador es un país con abundante biodiversidad sin embargo la investigación en este campo es escasa (Flores, 2008). En el ámbito microbiológico los estudios están dirigidos en su mayoría a suelos, por lo que es importante realizar nuevos enfoques científicos que nos permitan explorar nuestros recursos naturales para desarrollar aplicaciones que contribuyan al desarrollo del país (Bernal, 2015).

La diversidad microbiana y su abundancia, se ve influenciada por factores ambientales como los nutrientes y la composición mineral del agua, y por factores biológicos. Los organismos procariotas acuáticos forman una fracción significativa de la naturaleza (Liu *et al.*, 2009). En los sistemas geo e hidrotermales están presentes en su mayoría bacterias y arqueas termófilas, cabe mencionar que de estos ecosistemas se han aislado bastantes microorganismos termófilos y más de 20 géneros diferentes de archaeas hipertermófilas en diferentes partes del mundo (Arab *et al.*, 2000).

Nuestro país tiene varias fuentes geotermales, las cuales han sido ampliamente estudiadas en el ámbito fisicoquímico por esta razón se conoce que son ricas en minerales, por lo que presentan algunas propiedades curativas, relajantes y se las utiliza para dar terapias contra el estrés, son diuréticas, desinflamatorias y antialérgicas (Pérez, 2014). En la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo recientemente se realizó una tesis que se refiere al análisis microbiológico de las aguas termales de Gaupante (Tungurahua) enfocado explícitamente a la búsqueda de bacterias patógenas, para lo cual se empleó el método rápido de Petrifilm y la identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas; los resultados sirvieron para plantear la implementación de un tratamiento de aguas que garantice la calidad de las piscinas y la salud de los turistas. Este es el único estudio que se ha hecho en el campo microbiológico en aguas termales (Cruz, 2015). No se han registrado estudios de identificación de la comunidad microbiana presente en estas aguas para obtener los microorganismos, estudiarlos y dar nuevas aplicaciones utilizando los recursos y ventajas que pueden brindarnos.

Este trabajo se enfocó en el aislamiento e identificación de microorganismos termófilos de la fuente geotermal Papallacta. La temperatura que posee el agua termal es de 54°C con un pH de 8,2, condiciones a las que fueron aisladas las bacterias, también presenta altas cantidades de sodio, cloro, sulfatos (Morales, 2011). Estos factores son favorables para el desarrollo de este tipo de microorganismos por lo que se investigaron medios de cultivo apropiados para su desarrollo.

Las bacterias tuvieron buen crecimiento en medio M9, el cual posee bastantes nutrientes entre los que se encuentran el cloruro de sodio, cloruro de calcio y sulfato de magnesio, los mismos que han sido identificados en análisis fisicoquímicos de la fuente geotermal Papallacta, por lo que suplen las necesidades de los microorganismos (Morales, 2011; Pérez, 2014). También se probaron medios como el R2A, LB, ANS, que poseen cloro, sodio y compuestos como la triptona y otras fuentes de carbono que permiten el desarrollo de microorganismos, además que se han usado en proyectos científicos llevados a cabo en otras partes del mundo y en los que las condiciones de las fuentes geotermales son muy similares a la de Papallacta, siendo la temperatura y el pH los dos factores ambientales más importantes que afectan a las comunidades procariotas (Song *et al.*, 2010). En el Anexo B se puede ver el medio de cultivo en el que crece cada bacteria.

Se obtuvieron las bacterias termófilas: *Anoxybacillus amylolyticus*, *Aeribacillus pallidus*, *Anoxybacillus gonensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces intermedius*, *Tepidimonas taiwanensis* y *Anoxybacillus flavithermus*.

En la tabla 6, se puede ver que siete de las nueve bacterias obtenidas pertenecen al género *Bacillus* y son consideradas termófilas, excepto *B. subtilis* que es un microorganismo mesófilo y *B. licheniformis* que es termófilo facultativo, que debido a su capacidad de formar esporas puede desarrollarse en ambientes termales además muestra que bacterias mesófilas y termófilas facultativas son capaces de vivir y

compartir ambientes extremos con microorganismos termófilos; ambos son capaces de producir proteasas por lo que son de interés industrial (Cihan *et al.*, 2012).

En género *Bacillus* es ampliamente diverso y distribuido en la naturaleza, en su mayoría las bacterias termófilas de este género son Gram positivas o Gram variables, forman esporas y son aerobias o anaerobias facultativas (Nazina *et al.*, 2001). Los microorganismos de este género que tienen un crecimiento óptimo en un rango de temperatura de 45 a 70°C, están clasificados en los géneros *Bacillus*, *Aerobacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Cerasibacillus*, *Caldalkalibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Sulfobacillus*, *Brevibacillus*, *Ureibacillus*, *Thermobacillus* and *Thermoactinomyces* (Logan *et al.*, 2009; Nazina *et al.*, 2001). Puesto que estos microorganismos forman esporas pueden sobrevivir a ambientes extremos como altas temperaturas, pH y ambientes salinos por tal razón se pueden encontrar bacterias mesófilas que forman esporas en ambientes termófilos. Las bacterias de los géneros mencionados tienen gran interés en biotecnología debido a la resistencia de sus enzimas a ciertos factores (pH y temperatura) y pueden ser utilizadas en procesos industriales como por ejemplo pectato liasas (Cihan *et al.*, 2012; Derekova *et al.*, 2008).

Thermoactinomyces intermedius: es un microorganismo termoalcalófilo, bacilo aerobio Gram positivo. En general los actinomicetos termófilos crecen en el compost, paja estiércol y suelo, tiene esporas resistentes lo que les permite desarrollarse en ambientes extremos, algunos están relacionados con la neumonitis. *Thermoactinomyces intermedius* se ha encontrado en el área subtropical de Jujuy Argentina en suelos ligeramente alcalinos a un rango de temperatura de 50-60°C, y pH de 5,5-8 (Carrillo *et al.*, 2009).

Una aplicación interesante de este actinomiceto es que se han extraído enzimas termoestables por ejemplo la fenilalanina deshidrogenasa usada como catalizador industrial en la síntesis de la L-fenilalanina y reactivo clínico para la determinación selectiva de L-fenilalanina y L-piruvato, además produce el pigmento melanina en medios de cultivo que no tienen tirosina (Hou y Shaw, 2008).

Anoxybacillus gonensis: es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo pero que crece bien en condiciones aerobias, las colonias son de 2-3 mm de diámetro y es mótil. Fue descubierto en una fuente termal de Gonen (Turquía) de donde proviene el nombre de la especie, *gonensis*, y *Anoxybacillus* debido a que está relacionado genéticamente con *Anoxybacillus flavithermus*. Fue aislado a una temperatura de 55-60°C, y un rango de pH de 7,5-8 (Belduz *et al.*, 2003).

Forma endosporas, catalasa y oxidasa positivo. Hidroliza la gelatina y el almidón, Utiliza como fuente de carbono la glucosa, glucógeno, rafinosa, sucrosa, xilosa, fructosa y manito. Su desarrollo es inhibido si el medio tiene altas concentraciones de NaCl siendo la óptima de 4%. Posee la enzima xilosa isomerasa que le permite utilizar D-xilosa y transformarla en D-xilulosa, y la glucosa isomerasa que isomeriza D-glucosa en D-fructosa (Belduz *et al.*, 2003).

Anoxybacillus amylolyticus: es un bacilo Gram positivo de 0.5-2µm, anaerobio facultativo, mótil, forma esporas, crece en un rango de temperatura de 45-65°C, con un pH óptimo de 7. Catalasa positivo y oxidasa negativo, tiene la capacidad de reducir el nitrato a nitrito, hidroliza el almidón. Utiliza como fuente de carbono la galactosa, maltosa, rafinosa y sucrosa. No crece en altas concentraciones de NaCl como máximo 3% (Poli *et al.*, 2006).

Produce un exopolisacárido y sintetiza una actividad amilolítica. También ha sido encontrada en el monte Rittmann en la Antártida y fue aislada una temperatura de 61 °C y pH de 5.6 (Poli *et al.*, 2006). Se registró un estudio en el que se cultivó el mismo organismo en presencia de metales pesados, para observar la biosíntesis y la actividad de α -amilasa, como resultado se obtuvo que hay una disminución en la producción y actividad de la enzima, por lo que podría servir como prueba para la detección de trazas de metales en diferentes ambientes (Poli *et al.*, 2009).

Tepidimonas taiwanensis: este microorganismo fue aislado por primera vez de una fuente geotermal en Pingting ubicada al sur de Taiwan, la temperatura óptima de crecimiento fue de 55°C, sin embargo puede tolerar un rango de 35-60°C; con un pH de

7 en agar LB (Luria-Bertani). Es un bacilo aerobio Gram negativo motil, con un tamaño de 0,4-0,5µm de diámetro y 0,8-2,0µm de largo. No forma esporas. Es una beta Proteobacteria, la única encontrada en el presente estudio. Tiene la actividad proteasa alcalina que es de interés científico debido a que es activa y estable en ambientes extremos (Chen *et al.*, 2006). La bacteria también ha sido encontrada en Chhoti Anthoni, una fuente geotermal de India Central, a una temperatura de 52°C y pH de 7.8, en este estudio se revela que tienen genes que ayudan a la oxidación de tiosulfato en sulfato es decir tiene propiedades quimiolitotróficas (Dhakan *et al.*, 2016).

Las proteasas tienen aplicaciones biotecnológicas principalmente en la industria farmacéutica, comida y detergentes. Dichas enzimas llaman mucho la atención ya que tienen actividad a temperaturas altas, pueden resistir un rango de temperatura de 50-60°C, pH elevados y son estables en la presencia de agentes surfactantes y oxidantes (Chen *et al.*, 2006).

Bacillus subtilis: es un bacilo aerobio Gram positivo, catalasa positiva. Puede crecer en un rango de temperatura de 20-40°C pero tiene la capacidad de formar esporas lo que le permite resistir altas temperaturas, por esta razón se lo pudo identificar a 54°C en la fuente geotermal Papallacta. Por lo general se encuentra en el suelo pero también se lo puede encontrar en agua, se encuentra distribuida extensamente en la naturaleza. Crece en ambientes salinos y son aerobios pero también pueden ser aerobios facultativos, (Márquez, 2007).

Una aplicación interesante de este microorganismo es la obtención de bacitrina-A, el que es utilizada para para tratar la meningitis bacteriana, produce amilasa la cual degrada el almidón convirtiéndolo en dextrina y también enzimas proteolíticas (Cruz, 2015). Recientemente se realizó una investigación en la que se aisló liquenasa de *Bacillus subtilis* 168, la proteína se utiliza en la producción de biocombustibles, debido a que las existentes en el mercado no suplen con eficiencia las necesidades biocatlíticas, se aisló liquenasas con características termoestables de la cepa nombrada (Wang *et al.*, 2016).

El bacilo también se ha encontrado en las aguas termales de Guapante en la provincia de Tungurahua a una temperatura de 26°C y pH de 7,6; y en fuentes termales de Turquía, fue aislado a una temperatura de 30°C y pH de 6-9 (Cruz, 2015; Cihan *et al.*, 2012).

Aeribacillus pallidus: anteriormente se denominaba *Geobacillus pallidus*, se hizo una reclasificación en el año 2010 y ahora se denomina *Aeribacillus pallidus*. Se encontró también en fuentes termales de México y Tailandia a un rango de temperatura de 50-75°C y pH de 8 (Miñana-Galbis *et al.*, 2010; Yasawong *et al.*, 2011). Son bacilos aerobios Gram positivos alcalino tolerantes, móviles, un tamaño de 0,8-0,9µm de diámetro y 2-5µm de largo, forman endosporas, catalasa y oxidasa positiva (Miñana-Galbis *et al.*, 2010).

Puede desarrollarse en un rango de temperatura de 30-67°C y un pH de 7-8, crece en medios que contienen hasta 10% de NaCl. Es capaz de producir una enzima llamada pectato liasa (transaminasas pectato) la cual se utiliza en la extracción y clarificación de zumos de frutas, vino, fermentación de café, etc., además produce lipasas, proteasas y amilasas en condiciones termófilas (Pinzón-Martínez *et al.*, 2010; Yasawong *et al.*, 2011).

Geobacillus stearothermophilus: es un bacilo Gram positivo, aerobio, catalasa y oxidasa positivo (König *et al.*, 2010). Las esporas que forma el microorganismo son catalogadas como las más resistentes dentro del grupo de bacterias aerobias formadoras de esporas, una aplicación es que se usan para probar métodos de esterilización principalmente en área alimenticia, si la técnica inactiva las esporas es altamente eficiente (Mtimet *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2003). Mayoritariamente se encuentra en sedimentos. Se han encontrado en Islanda a una temperatura de 66-96°C y pH de 9-10, y en Fiji de 66°C y pH de 6,5-7,5, también se han encontrado estudios en los que ha sido cultivado a temperaturas desde 50°C para ensayos experimentales (Tobler y Benning, 2011; Narayan *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2003).

La bacteria tiene un alto potencial de absorción de Cadmio por lo que puede ser utilizada en movilización de metales para tratamiento ambientales (Narayan *et al.*, 2008); otra

aplicación es la de producción de alcohol deshidrogenasa por lo que brinda varias aplicaciones industriales (Guagliardi *et al.*, 1996).

Bacillus licheniformis: es un bacilo anaerobio facultativo Gram positivo, se encuentra en el suelo, forma esporas, es capaz de realizar el proceso de desnitrificación (Rey *et al.*, 2004). Se han registrado su presencia en fuentes geotermales de Turquía en un rango de temperatura de 25-55°C y en Arabia Saudita a una temperatura de 60 °C a un pH de 7,7. (Cihan *et al.*, 2012; Khiyami *et al.*, 2012).

Tiene aplicaciones biotecnológicas en la fabricación y producción de enzimas extracelulares que contribuyen al ciclo de nutrientes en los ecosistemas, antibióticos y productos bioquímicos, además de la producción de proteasas que se usan en la industria de detergentes, amilasas para la hidrólisis del almidón y dimensionamiento de papel, penicilinasas y tranferasas. Las proteasa principalmente se usan en la industria de detergentes. Estudios taxonómicos han mostrado que está bastante relacionado con *Bacillus subtilis* (Rey *et al.*, 2004).

Anoxybacillus flavithermus: es un bacilo anaerobio facultativo Gram positivo, ha sido aislado en Wairakei una fuente geotermal de Nueva Zelanda, a una de 60°C. Se encuentra en alimentos procesados como contaminante como por ejemplo en la gelatina. Se caracteriza por producir carotenoides lo que le da un color amarillo oscuro a las bacterias (Saw *et al.*, 2008).

Este microorganismo es estudiado debido a que se piensa que regula la formación del biofilm según las condiciones ambientales, también por su capacidad de crecer en sitios saturados con sílice lo cual sugiere que participa en el proceso de sinterización que es un tratamiento térmico de polvo o triturado, para obtener productos metálicos aumentando el reforzamiento entre las partículas (Saw *et al.*, 2008; Cembrero *et al.*, 2005).

En el análisis molecular se obtuvieron secuencias de 1500 pares de bases aproximadamente del gen 16S rRNA (Cuebas *et al.*, 2011), en la tabla 5 se muestra el porcentaje de similitud de las bacterias identificadas con las secuencias tipo, las especies

del género *Bacillus* tiene un 99% de similitud con las especies tipo excepto *Bacillus subtilis* con 100% de similitud. Las especies del género *Tepidomonas* un 99%, *Aeribacillus* 97%, *Geobacillus* 97% y *Anoxybacillus* 99% de similitud con secuencias tipo respectivamente.

Se realizó un árbol filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA, en el programa MEGA 6, se hizo un alineamiento de secuencias usando MUSCLE. Para eliminar los fragmentos ambiguos se utilizó el programa Gblocks. Se encontró el mejor modelo al que se ajusta el árbol, siendo HKY+G (Hasegawa-Kashino-Yano). Como se puede ver en la figura 20, cada especie aislada está relacionada con una especie tipo encontrada en la base de datos GenBank. Se utilizaron otras especies como *Bacillus methanolicus* que se relaciona con *B. subtilis* y *B. licheniformis*; *Geobacillus thermocatenulatus* vinculada con *Geobacillus stearothermophilus*; y *Tepidimonas ignava* con *Tepidomonas taiwensis*, las especies nombradas tienen un parentesco genético a las secuencias de las bacteria obtenidas en Papallacta.

El árbol filogenético del gen 16S rRNA, muestra principalmente la clasificación de las bacterias identificadas según el filo, en la figura 20 podemos observar que una de los nueve bacterias pertenece al subdivisión β de Proteobacteria y las ocho restantes a firmicutes.

Como podemos ver en la tabla 6, *Anoxybacillus amylolyticus* se obtuvieron en total 12 cepas, *Anoxybacillus gonensis* 7, *Aeribacillus pallidus* 7, *Bacillus licheniformis* 5, *Geobacillus stearothermophilus* 4, *Thermoactinomyces intermedius* 2, *Tepidimonas taiwanensis* 1 y *Anoxybacillus flavithermus* 1.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Se aislaron nueve cepas termófilas de la fuente geotermal Papallacta: *Anoxybacillus amylolyticus* (12), *Anoxybacillus gonensis* (7), *Aeribacillus pallidus* (7), *Bacillus licheniformis* (5), *Thermoactinomyces intermedius* (2), *Tepidimonas taiwanensis* (1), *Bacillus subtilis* (1), y *Anoxybacillus flavithermus* (1), encontradas también en diferentes fuentes geotermales del mundo.

Las cepas termófilas obtenidas crecen a una temperatura de 54°C y pH de 8,2.

Se realizó un cepario, para tener una colección de las bacterias termófilas aisladas de la fuente geotermal Papallacta.

Se utilizaron técnicas dependientes de cultivo para obtener cepas puras aisladas de las muestras de la fuente geotermal Papallacta.

Para la identificación de las cepas se utilizaron técnicas independientes de cultivo como: amplificación del gen 16S rRNA, RFLPs y secuenciación Sanger.

Las bacterias aisladas poseen potenciales aplicaciones biotecnológicas encontradas en la investigación bibliográfica realizada, principalmente por las enzimas que producen ya que son altamente termoestables, lo que ayudan a mejorar la eficiencia de varios procesos industriales.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Es necesario realizar un análisis de agua para obtener las características fisicoquímicas de la fuente geotermal, lo que nos brinda información del metabolismo de los microorganismos presentes y el tipo exacto de ecosistema en el que se desarrollan.

Sería aconsejable realizar pirosecuenciación para tener información de la comunidad microbiana no cultivable presente en el agua termal y de esta forma ampliar el conocimiento en el área así como en la biodiversidad del país.

Producir y extraer las enzimas para estudiarlas y emplearlas en aplicaciones industriales en el campo biotecnológico lo que permitirá obtener avances científicos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Acuña, P. A. G., Ángel, L. S. G., Montoya, E. B., Corrales, L. C., & Sánchez, L. C. (2008). Aislamiento e identificación de microorganismos del género *Methanococcus* y *Methanobacterium* de cuatro fuentes de Bogotá DC. *NOVA*, 6(10).

Adley, C. (2006). *Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols*. New Jersey. EEUU: Humana Press.

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.

Arab, H., Völker, H., & Thomm, M. (2000). *Thermococcus aegaeicus* sp. nov. and *Staphylothermus hellenicus* sp. nov., two novel hyperthermophilic archaea isolated from geothermally heated vents off Palaeochori Bay, Milos, Greece. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(6), 2101-2108.

Baker, G. C., Gaffar, S., Cowan, D. A., & Suharto, A. R. (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiology Letters*, 200(1), 103-109.

Belduz, A. O., Dulger, S., & Demirbag, Z. (2003). *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1315-1320.

Bernal, G. (2015). La microbiología de suelo en el Ecuador: situación actual de la investigación. Quito, Ecuador. X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Recuperado 28/03/2016, de <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/1.-La-Microbiologia-de-Suelos.pdf>

Brujin, F. (2011). *In Handbook of Molecular Microbial Ecology II*. Singapore: Wiley Blackwell.

Campbell, N., Mitchell, L., & Reece, J. (2001). El análisis de fragmentos de restricción es un método poderoso que detecta diferencias en las secuencias de ADN. En E. Quintanar (Ed.), *Biología Conceptos y relaciones* (pp. 628). México DF: México.

Carrillo, L., Ahrendts, M. B., & Maldonado, M. J. (2009). Alkalithermophilic actinomycetes in a subtropical area of Jujuy, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(2), 112-116.

Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C., & Luque, M. (2005). Microorganismos extremófilos. En F. Castillo (coord.), *Biotecnología ambiental*. (pp. 385). Madrid: España: Tébar.

Cembrero, C., Giménez, C., Guillamón, M., Pérez, M. (2005). Proceso de sinterización. En M. Romo (Ed), *Ciencia y Tecnología de materiales*. (pp 11). España: Pearson.

Chen, T. L., Chou, Y. J., Chen, W. M., Arun, B., & Young, C. C. (2006). *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. *Extremophiles*, 10(1), 35-40.

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*, 43(1), 309-324.

Cruz, V. M. (2015). Estudio microbiológico de las Aguas Termales de Guapante ubicado en la parroquia de San Andrés perteneciente al cantón Santiago de Píllaro-Tungurahua.

Cuebas, M., Sannino, D., & Bini, E. (2011). Isolation and characterization of arsenic resistant *Geobacillus kaustophilus* strain from geothermal soils. *Journal of basic Microbiology*, 51(4), 364-3

de Oliveira, T. B., Gomes, E., & Rodrigues, A. (2015). Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. *Extremophiles*, 19(1), 31-37.

Derekova, A., Mandeva, R., & Kambourova, M. (2008). Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1697-1702.

Dhakan, D. B., Saxena, R., Chaudhary, N., & Sharma, V. K. (2016). Draft genome sequence of *Tepidimonas taiwanensis* strain MB2, a chemolithotrophic thermophile isolated from a hot spring in central India. *Genome announcements*, 4(1), e01723-15. 71.

Díaz, G. R., & Wachter, R. C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoamer. Microbiol*, 45(1-2), 30-40.

Flores, F. J. (2008). Bacterias aerobias formadoras de esporas procedentes del bosque protector Mindo-Nambillo, pH, temperatura y diferentes fuentes de almidón como sustrato para la producción de amilasas.

Fonseca, D., Meteus, H., Contreras, N. (2010). Práctica 4: Análisis mediante enzimas de restricción. En G. de la Parra (Ed), *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica*. (pp. 47). Bogotá. Colombia: Universidad del Rosario.

Granados, R., Villaverde, C. (2003). *Microbiología. Características y clasificación bacteriana*. España. Paraninfo.

Guagliardi, A., Martino, M., Iaccarino, I., De Rosa, M., Rossi, M., & Bartolucci, S. (1996). Purification and characterization of the alcohol dehydrogenase from a novel strain of *Bacillus stearothermophilus* growing at 70 C. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 28(2), 239-246.

Guerrero, J., Egea, F., & Martínez, E. (2013). Interdisciplinariedad en Biotecnología. En *Jornadas Internacionales sobre Agricultura Intensiva* (pp. 101). España: Universidad de Almería.

Heller, Orians, Purves, Hillis, & Savada, D. (2009). Reconstrucción y uso de filogenias. En S. Fernández (Ed), *Vida: La ciencia de la biología* (pp. 1226). Madrid. España : Médica Panamericana.

Hou, C. T., & Shaw, J. F. (Eds.). (2008). *Biocatalysis and bioenergy*. Hoboken, NJ: Wiley.

Islas, S., Velasco, A., Becerra, A., Delaye, L., & Lazcano, A. (2007). Extremophile and the origin of life. *ASMscience*, 10 (1), 3-10.

Jan, J., & Le Borgne, S. (2001) Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad.

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*, 45(9), 2761-2764.

Javed, M. M., Zahoor, S., Sabar, H., Haq, I. U., & Babar, M. E. (2012). Thermophilic bacteria from the hot springs of Gilgit (Pakistan). *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(1), 83-87.

Khiyami, M. A., Serour, E. A., Shehata, M. M., & Bahkha, A. H. (2014). Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(17), 4053-4062.

König, H. (2010). Prokaryotic Cell Wall Compounds: Structure and Biochemistry. *Springer*, 1, 459-476.

Liu, B., Zhou, F., Wu, S., Xu, Y., & Zhang, X. (2009). Genomic and proteomic characterization of a thermophilic *Geobacillus* bacteriophage GBSV1. *Research in microbiology*, 160(2), 166-171.

Llarch, A., Logan, N. A., Castellví, J., Prieto, M. J., & Guinea, J. (1997). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial ecology*, 34(1), 58-65.

Madigan, M., Martinjo, J., Parker, J. (2009). *Biología de los Microorganismos*. España. Pearson.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3), 461-488.

Márquez, F. J. T. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo.

Mayo, B., & Flórez, A. B. (2005). Técnicas microbiológicas novedosas para caracterizar productos fermentados tradicionales.

Miñana-Galbis, D., Pinzón, D. L., Lorén, J. G., Manresa, À., & Oliart-Ros, R. M. (2010). Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(7), 1600-1604.

Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A. G., Venaille, L., Leguérinel, I., Coroller, L., & Couvert, O. (2016). Die another day: Fate of heat-treated *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 spores during storage under growth-preventing conditions. *Food Microbiology*, 56, 87-95.

Morales Simbaña, R. R. (2011). Plan de negocios para mejorar la situación financiera del complejo de aguas termales de Jamanco situado en Papallacta.

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*, 23(4), 350-352.

Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G.*

thermoglucoasidius and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.

NCBI. (2014). National Center for Biotechnology Information. Recuperado: 02 27, 2016, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>

Perez, O. G. V. (2014). *Diseño de un sistema centralizado de calentamiento doméstico de agua potable mediante el aprovechamiento de energía geotérmica* (Doctoral dissertation, QUITO/EPN/2014).

Pérez de Castro, A. (2000). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Recuperado: 02 27, 2016, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

Pinzón-Martínez, D. L., Rodríguez-Gómez, C., Miñana-Galbis, D., Carrillo-Chávez, J. A., Valerio-Alfaro, G., & Oliart-Ros, R. (2010). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environmental technology*, 31(8-9), 957-966.

Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., De Appolonia, F., ... & Nicolaus, B. (2006). *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). *Systematic and applied microbiology*, 29(4), 300-307.

Poli, A., Salerno, A., Laezza, G., di Donato, P., Dumontet, S., Nicolaus, B. (2009). Resistencia a metales pesados de algunos termófilos: uso potencial de alfa-amilasa de *Anoxybacillus amylolyticus* como un bioensayo enzimática microbiana. Recuperado 20-01-2016 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19070660>

Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., ... & Olsen, P. B. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome biology*, 5(10), 1-12.

Rodríguez, E. (2013). Alineamiento múltiple de secuencias. Recuperado: 02 28, 2016, de: <http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion07.pdf>

Saw, J. H., Mountain, B. W., Feng, L., Omelchenko, M. V., Hou, S., Saito, J. A., ... & Galperin, M. Y. (2008). Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome Biol*, 9(11), R161.

Scientific, T. (2010). NanoDrop 8000 Spectrophotometer V2.2 User Manual . Recuperado: 02 16, 2016, de: <http://www.nanodrop.com/Library/nd-8000-v2.2%20-users-manual-8.5%20x%2011.pdf>

Sen, S. K., Raut, S., Satpathy, S., Rout, P. R., Bandyopadhyay, B., & Mohapatra, P. K. D. (2014). Characterizing Novel Thermophilic Amylase Producing Bacteria From Taptapani Hot Spring, Odisha, India. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(12).

Siqueira, J. F., Fouad, A. F., & Roças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of oral microbiology*, 4.

Song, Z. Q., Chen, J. Q., Jiang, H. C., Zhou, E. M., Tang, S. K., Zhi, X. Y., ... & Li, W. J. (2010). Diversity of Crenarchaeota in terrestrial hot springs in Tengchong, China. *Extremophiles*, 14(3), 287-296.

Suárez, V., & Cueto Vigil, M. C. (2012). *Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño* (Doctoral dissertation).

Tobler, D. J., & Benning, L. G. (2011). Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects. *Extremophiles*, 15 (4), 473-485.

Urbietta, M. S., González-Toril, E., Bazán, Á. A., Giaveno, M. A., & Donati, E. (2015). Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acidic geothermal area of Copahue (Neuquén, Argentina). *Extremophiles*, 19(2), 437-450.

Vasek, O., Hebert, E., S. de Giori, G., Raya, R., & Fusco, A. (2000). Secuencia parcial del gen 16S rRNA de cepas constituyentes. Recuperado 26 02, 2016, de: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-051.pdf>

Voet, D., Voet, J. (2004) *Bioquímica. Clonación molecular-Enzimas de restricción*. Monte Video. Uruguay, Médica panamericana.

Voet, D., Voet, J., Pratt, C. (2006). Purificación y análisis de proteínas. En M. Gismondi (Ed), *Fundamentos de Bioquímica*. (pp.107). México. Médica Panamericana.

Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., & Chansiri, K. (2011). Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao dam hot spring, Thailand. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5294-5303.

Wang, J., Wang, Y., Wang, X., Zhang, D., Wu, S., & Zhang, G. (2016). Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1.

Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2003). Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high-pressure carbon dioxide treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7124-7129.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. USA: CRC Press.

Zavala, J. (2005). *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular*. Yucatán. México: UADY.