



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS
TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL “CHACHIMBIRO”
MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES.**

FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA

Director: Andrés Izquierdo Ph.D.

Mayo, 2017



2015 PIC 002 “Análisis y caracterización microbiológica y molecular de la comunidad microbiana en fuentes geotermales del Ecuador”



GEOTERMAL

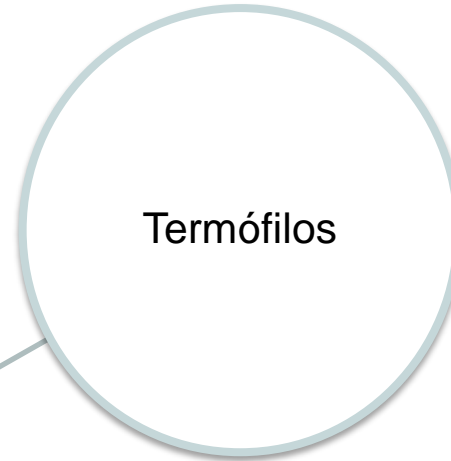
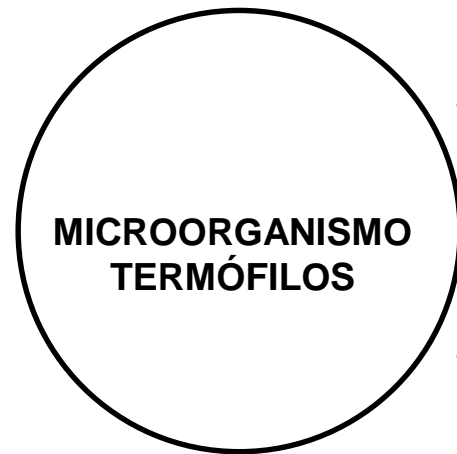


Introducción

Microorganismos
extremófilos



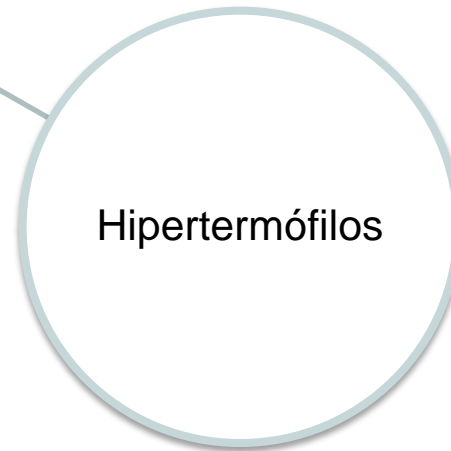
- Bacterias
- Hongos
- Arqueas
- Microalgas



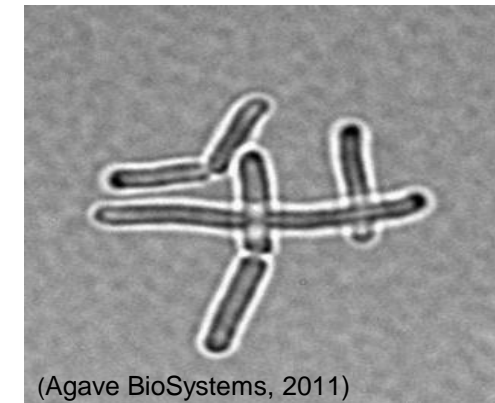
45 °C - 80 °C



(Diane, 1976)
Thermus aquaticus



> 80 °C



(Agave BioSystems, 2011)
Bacillus stearothermophilus



APLICACIONES

Industrial

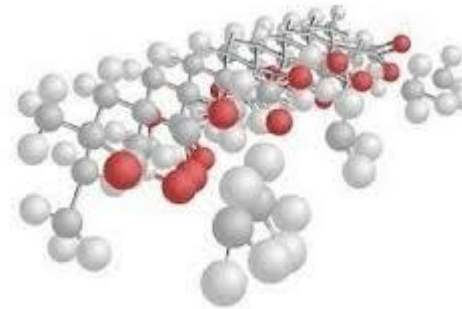
- Enzimas: simplifican procesos industriales
- Taq polimerasa: técnicas de biología molecular



<http://apuntesbiotecnologiageneral.blogspot.com/2014/05/tecnologia-de-la-fermentacion-o.html>

Medio Ambiente

Sintetizar biopolímeros (bioplásticos) → degradables

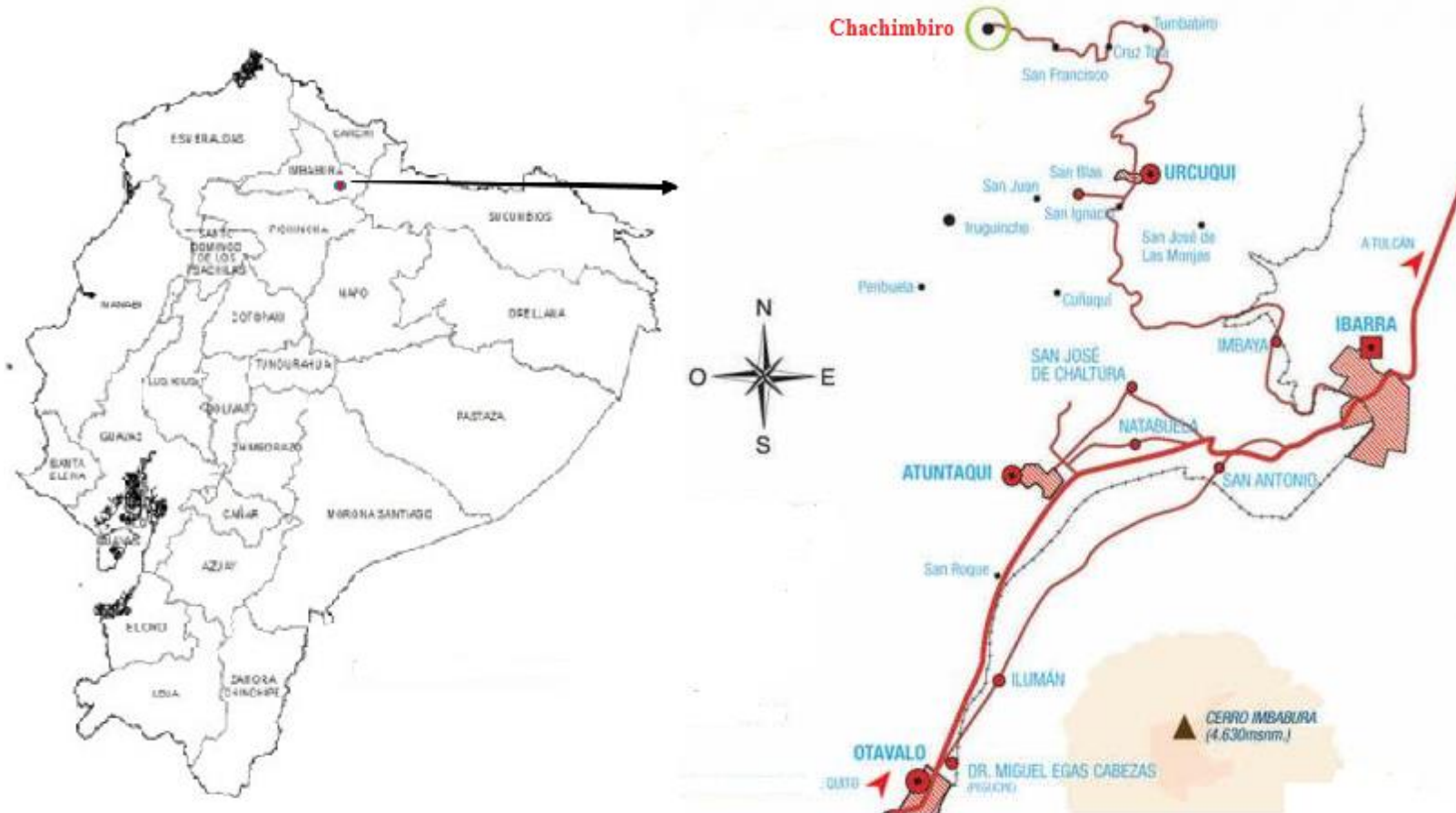


Medicina

Enzimas termoestables → utilizadas en la medicina como biocatalizadores



Fuente geotermal Chachimbiro



Ubicación: En la provincia de Imbabura, cantón Urcuquí, al noroeste del Ecuador

La temperatura varía entre los 45 y 60°C

Altura Media: 3050 m.s.n.m.

Contienen altas concentraciones de bicarbonatos y carbonatos

(Brígida.R & Vallejo.C, 2007).

Fuente geotermal Chachimbiro (Santagua, 2017)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Fuente geotermal Chachimbiro

Pun	Descripción	pH	As Tota l ug/L	Cl- mg/ L	HCO ₃ mgCaC O ₃ /L	PO ₄ mg(P-)/L	NO ₃ mg/L	SO ₄ = mg/L	Fe+ mg/L	Ca+ mg/L	K+ mg/L	Na+ mg/L	Mg mg/L
P17	Punto alto Chachimbiro, arriba balneario	7,63	394	506	112,56	2,62	22,05	35,62	0,74	17,36	133,12	268,25	33
P18	Tanque arriba del balneario	6,1	656	513	196,4	7,44	10,27	30,26	0,77	18,3	184,62	270,45	41,2
P19	Fuente Principal	7,13	510	519	213,2	3,01	23,17	34,74	0,82	14,77	198	269,2	38,7
P20	Q.Cachiyacu. Balneario Chachimbiro	7,28	844	515	182	2,45	9,19	22,55	0,98	15,77	208,5	265,55	39,2
P21	Tanque en el balneario	6,47	639	514	206,2	3,49	16,72	36,99	0,88	14,39	203,25	270,5	39,4
P22	Unos metros arriba del tanque anterior	6,15	550	516	199,25	1,00	17,92	46,25	0,79	14,49	204,58	269,45	38,7
P23	Piscina del balneario	7,16	297	512	195,96	2,81	10,35	19,24	0,94	9,52	202,56	266,15	38,9
P24	Piscina bajo el balneario, piscina tilapi:	8	249	485	189,48	1,46	12,96	24,40	0,82	2,83	200,05	265,15	36,8
P25	Empieza la quebrada, Q. Cachiyacu Punto Francisco. Puente, agua regadio	8,12	166	487	204,3	7,00	18,40	25,67	0,87	4,73	180,23	265,85	40,1
P26	Regadio	8,37	117	476	226,28	1,99	18,48	29,87	1,02	3,44	172,25	264,4	38,5
P27	Acequia de la Quebrada Cachiyacu	7,77	6	125	24,4	1,99	13,55	7,24	0,99	0,62	8,38	97,3	0,6
P28	Curso de la Quebrada Cachiyacu	8,66	86	356	176,76	0,82	17,43	26,45	0,84	5,34	149,75	176,35	35,6

(Brígida.R & Vallejo.C, 2007).



GENERAL:

- Identificar bacterias, microalgas y hongos termófilos presentes en la fuente geotermal Chachimbiro mediante técnicas microbiológicas y moleculares.

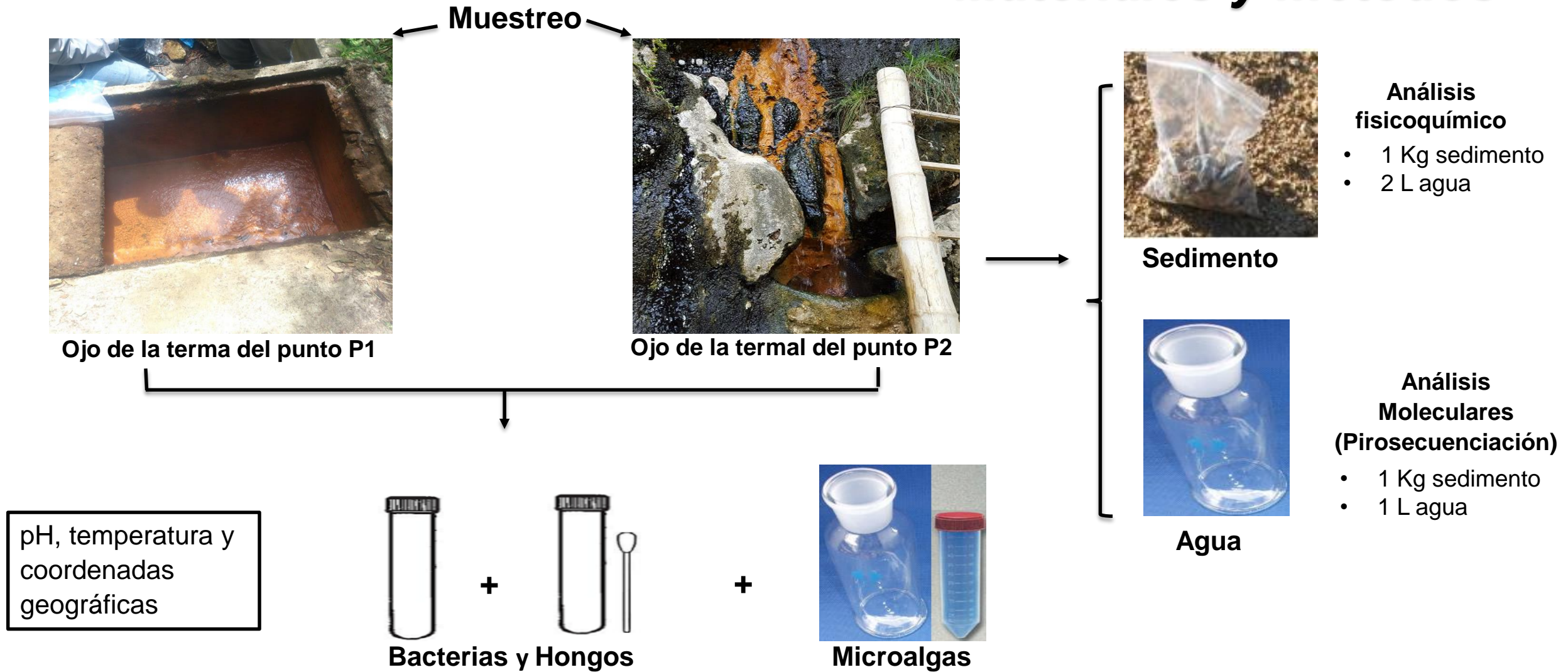


ESPECÍFICOS

- Caracterizar comunidades microbianas aplicando técnicas dependientes de cultivo microbiológico.
- Identificar microorganismos termófilos mediante técnicas moleculares.
- Elaborar un cepario de las cepas aisladas presentes en la fuente geotermal Chachimbiro.

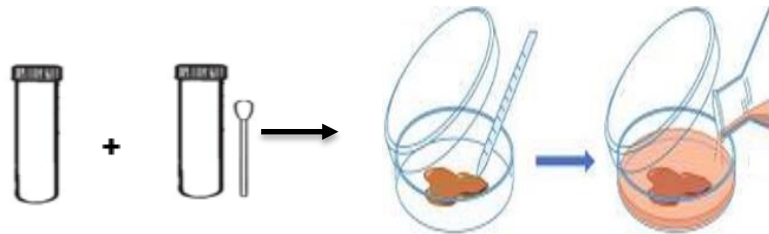


Materiales y métodos

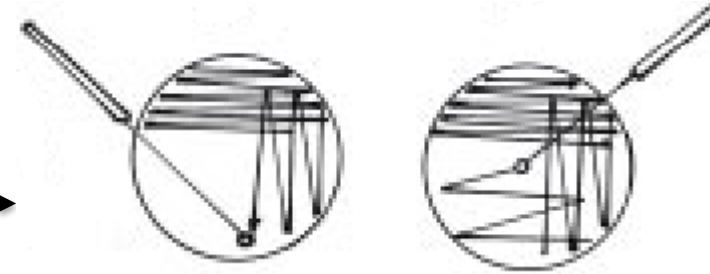


Materiales y métodos

Procesamiento de muestras



Siembra en medio sólido



Aislamiento



Cultivos puros

Se evaluó las características macro y microscópicas de las cepas aisladas

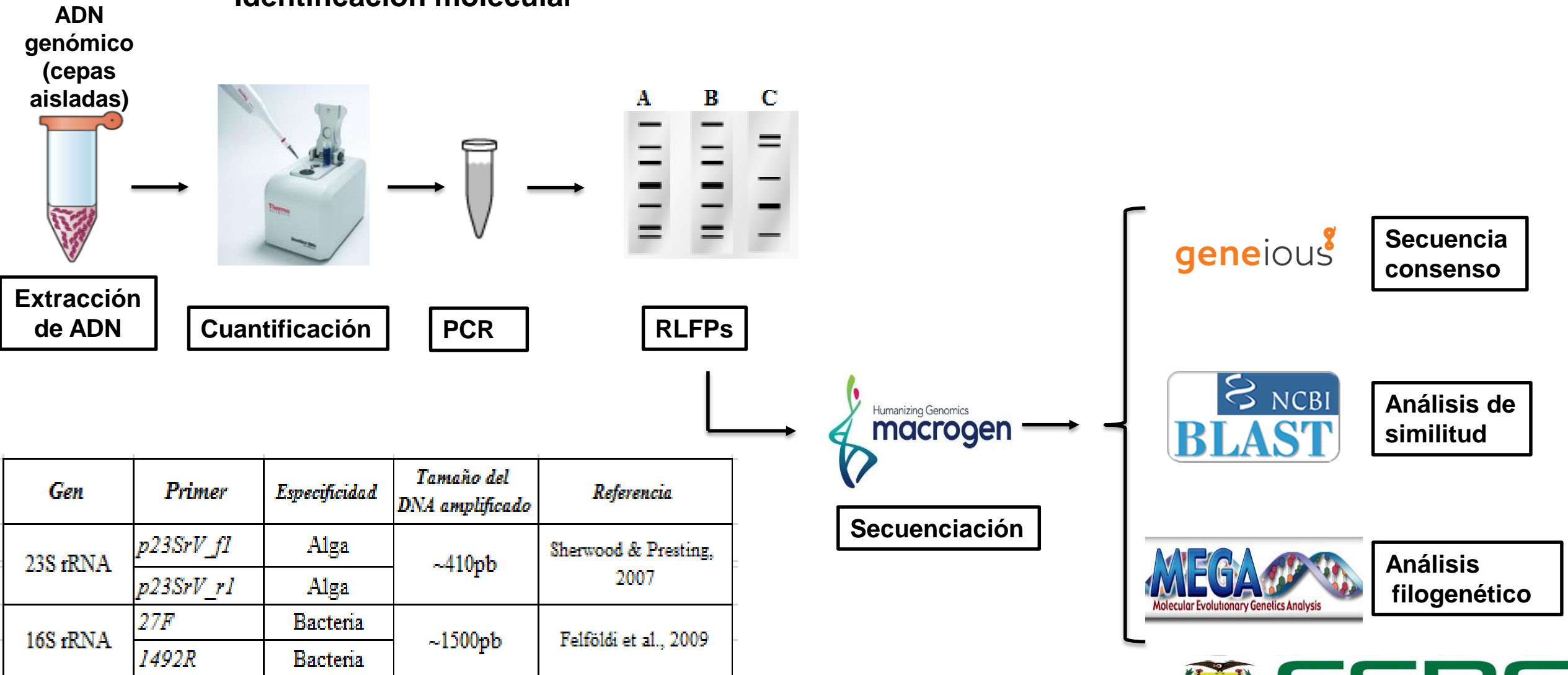


Medios
BACTERIAS: LB y R2A
MICROALGAS: BG11
HONGOS: PDA



Materiales y métodos

Identificación molecular



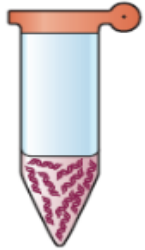
Gen	Primer	Especificidad	Tamaño del DNA amplificado	Referencia
23S rRNA	<i>p23SrV_f1</i>	Alga	~410pb	Sherwood & Presting, 2007
	<i>p23SrV_r1</i>	Alga		
16S rRNA	<i>27F</i>	Bacteria	~1500pb	Felföldi et al., 2009
	<i>1492R</i>	Bacteria		



Materiales y métodos

Identificación molecular

Muestras de
agua y
sedimento



Extracción
de ADN

Cuantificación



Pirosecuenciación

<i>Primer</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Tamaño del DNA amplificado</i>	<i>Referencia</i>
p23SrV_f1	Alga	~410pb	Sherwood & Presting, 2007
p23SrV_r1	Alga		
27F	Bacteria	~1500pb	Felföldi et al., 2009
519R	Bacteria		
ITS1F-Bt1	Hongos	~650pb	White, 1990
ITS1F-Bt1	Hongos		
Archea349F	Arquea	~500pb	Lane et al., 1991
Archea806R	Arquea		



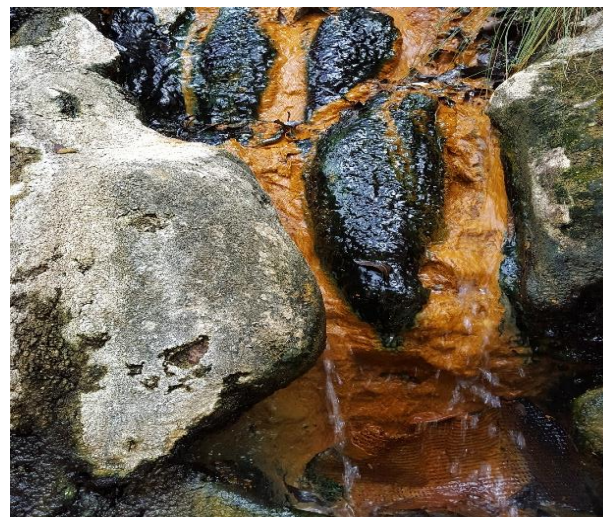
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Resultados y discusión

Características físicas de la fuente geotermal Chachimbiro



Ojo de la terma del punto P1



Ojo de la terma del punto P2

Ojo de la terma	T [°C]	pH	Coordenadas	Altura	Hora
P1	58,8	7,28	N 00°25.705'	2539 m.s.n.m	13:00:00.
P2	56	7,7	W 078°11.906'		13:30:00.

Resultados y discusión

Análisis fisicoquímico

Análisis fisicoquímico agua

PARAMETRO	UNIDADES	RESULTADO
AGUAS Y SUELOS		
Arsénico	mg/L	0,001
Cloruros	mg/L	4580,7
Cobre	mg/L	< 0,05
Conductividad Eléctrica	uS/cm	6500
Hierro	mg/L	1,6
Manganeso	mg/L	0,2
pH	unid pH	6,5
Sólidos Sedimentables	mg/L	< 0,1
Sólidos Totales	mg/L	> 2000
Sólidos Volátiles	mg/L	220
Sólidos No Volátiles	mg/L	3360
Sodio	mg/L	> 50
Potasio	mg/L	> 50
Magnesio	mg/L	> 100
Calcio	mg/L	> 100
Sulfatos	mg/L	44,2
Alcalinidad Total	mg/L	420

Análisis fisicoquímico sedimentos

PARAMETRO	UNIDADES	RESULTADO
AGUAS Y SUELOS		
Cadmio	mg/kg	3,5
Cloruros	mg/kg	2170,5
Materia orgánica	%	33,99
pH	unid pH	7,5
Cobre	mg/kg	11,7
Conductividad	uS/cm	>2500
Potasio	mg/kg	>500
Zinc	mg/kg	36,8
Calcio	mg/kg	> 4800
Nitrógeno Total	mg/kg	< 2530
Hierro	mg/kg	>9200
Manganeso	mg/kg	338
Magnesio	mg/kg	> 900



Resultados y discusión

Aislamiento

28 cepas
Bacterianas



Cepa (25) *Bacillus*

5 colonias
Microalgas



Cepa (H4) *Fischerella*, 100X

Ningún hongo

Presencia de hongos
no cultivables.



Resultados y discusión

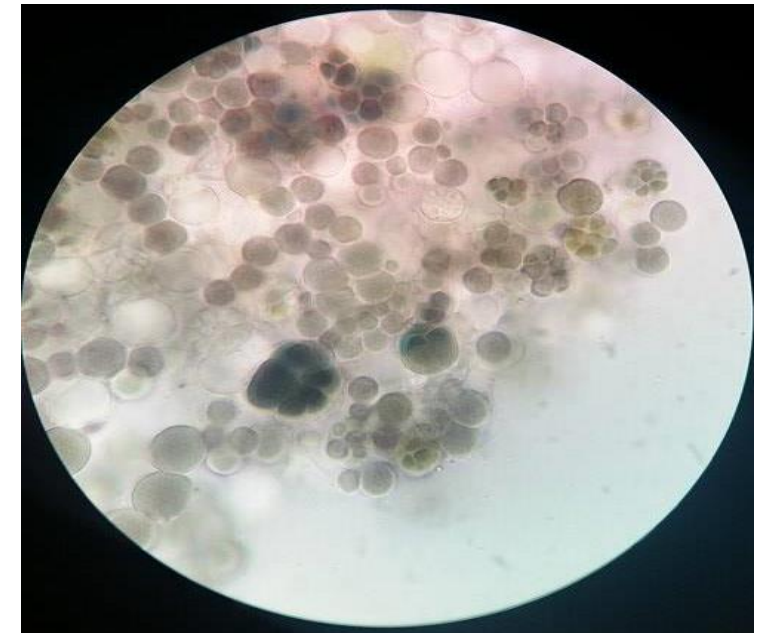
Características microscópicas



Tinción Gram. Cepa (8)
Fictibacillus gelatini, bacilos Gram
(+), 100X



Tinción Gram. Cepa (15) *Bacillus*
licheniformis, bacilo Gram (+),
100X.

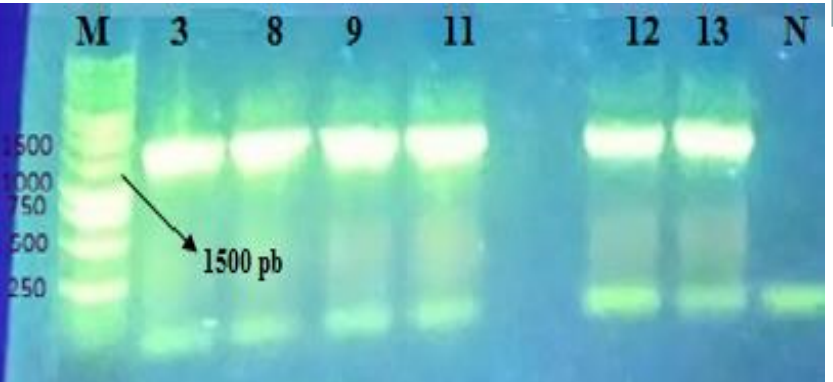
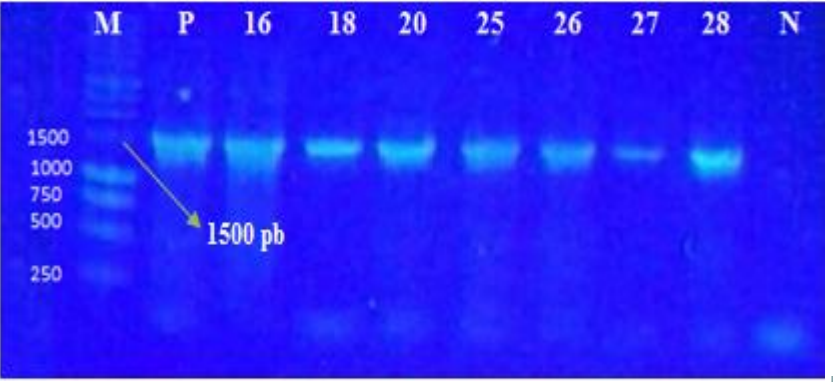


Cepa (H5) *Stanieria*
cyanosphaera, 100X

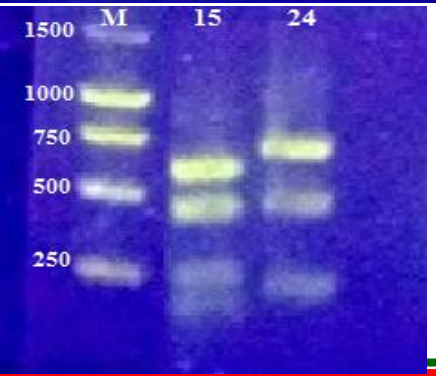
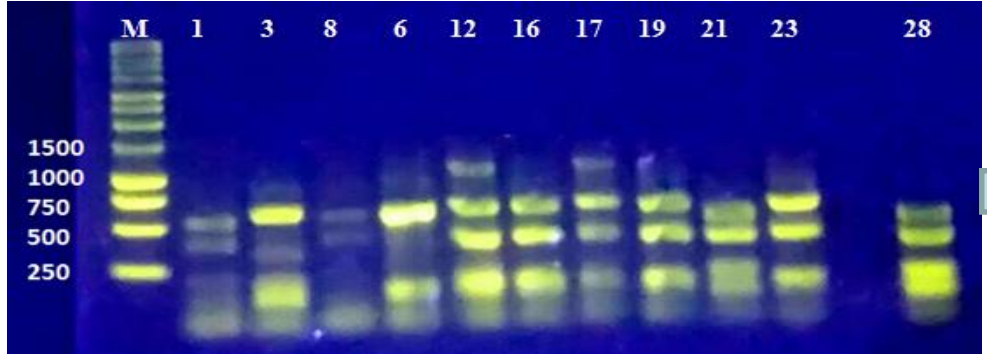
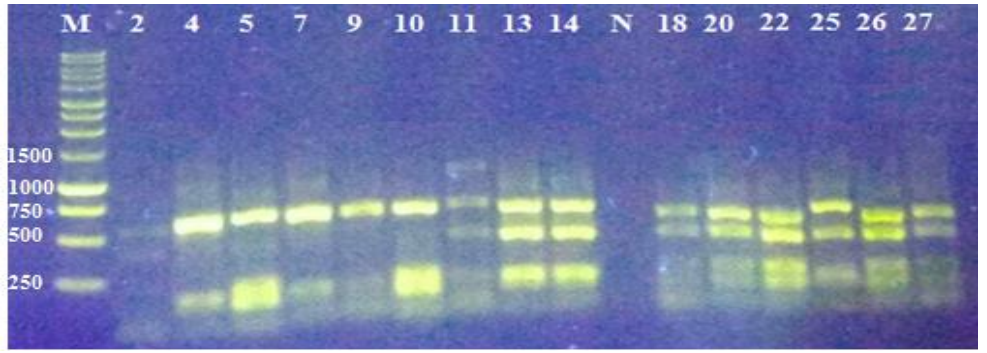
Resultados y discusión

Identificación molecular (Bacterias)

Productos amplificados por PCR del gen 16S rRNA



RFLPs del gen 16S rRNA con la enzima MspI



Grupo	Fragmentos de restricción similares
A	1=15*=18=20=22*=26*=27*
B	7=9*=13=14*=21*=25*
C	3*=5*=10=24*
D	12*=16*=17*=19*=23*
E	4*=8*
F	2*
G	6*
H	28*
I	11*

* Cepas enviadas a secuenciar a la compañía MacroGen-Korea

Resultados y discusión

Identificación molecular (Bacterias)



22
productos
de PCR



Aislado	Identificación		Organismo más próximo *	Acceso GenBank	Orden **
	Query coverage	% de identidad		#	
2	100	99	<i>Bacillus tequilensis</i>	KJ847721.1	Bacillales
3	100	99	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	AB682661.1	Bacillales
4	99	99	<i>Fictibacillus gelatini</i>	NR_025595.1	Bacillales
5	64	95	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	AB682661.1	Bacillales
6	93	95	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
8	99	99	<i>Fictibacillus gelatini</i>	NR_025595.1	Bacillales
9	100	99	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	AB682661.1	Bacillales
11	100	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
12	100	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
14	99	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
15	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
16	100	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
17	-	-	--	--	--
19	100	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
21	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
22	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
23	100	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
24	93	95	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
25	100	96	<i>Bacillus licheniformis</i>	CP000002.3	Bacillales
26	91	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
27	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
28	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales



Resultados y discusión

Identificación molecular (Bacterias)

Aislado	Identificación		Organismo más próximo *	Acceso	Orden **
	Query coverage	% de identidad		GenBank #	
2	100	99	<i>Bacillus tequilensis</i>	KJ847721.1	Bacillales
3	100	99	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	AB682661.1	Bacillales
4	99	99	<i>Fictibacillus gelatini</i>	NR_025595.1	Bacillales
5	64	95	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	AB682661.1	Bacillales
6	93	95	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
8	99	99	<i>Fictibacillus gelatini</i>	NR_025595.1	Bacillales
9	100	99	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	AB682661.1	Bacillales
11	100	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
12	100	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
14	99	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
15	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
16	100	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
17	-	-	--	--	--
19	100	100	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
21	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
22	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
23	100	99	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	CP012152.1	Bacillales
24	93	95	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
25	100	96	<i>Bacillus licheniformis</i>	CP000002.3	Bacillales
26	91	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
27	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales
28	100	99	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX785171.1	Bacillales

Bacteria*	Cepas Iguales**	Número de cepas aisladas que se obtuvieron
<i>Bacillus tequilensis</i>	2	1
<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	3, 5, 9	3
<i>Fictibacillus gelatini</i>	4, 8	2
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	11, 12, 14, 16, 19, 23	6
<i>Bacillus licheniformis</i>	6, 15, 21, 22, 24, 26, 27, 28	8
Cepa hasta género (<i>Bacillus</i>)	25	1

* Organismo más próximo a la base de datos GenBank.

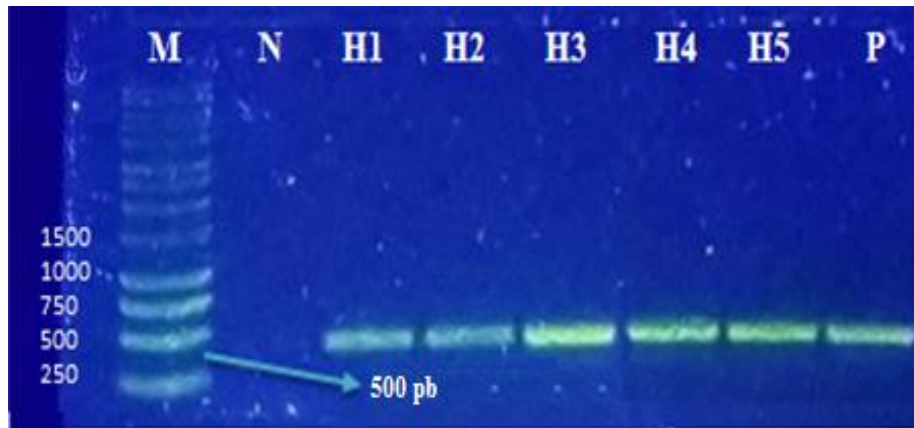
** Cepas iguales entre los organismos más próximos



Resultados y discusión

Identificación molecular (Microalgas)

Productos amplificados por PCR del gen 23S rRNA



Aislado	Identificación		Query Coverage	% de identidad	Filo **
	Morfológica	Molecular (Organismo más próximo *)			
H1	<i>Oscillatoria</i>	<i>Lyngbya aestuarii</i>	100	91	Cyanobacteria
H2	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc punctiforme</i>	100	96	Cyanobacteria
H3	<i>Didymosphenia</i>	<i>Didymosphenia geminata</i>	100	97	Bacillariophyta
H4	<i>Fischerella</i>	<i>Fischerella muscicola</i>	100	98	Cyanobacteria
H5	<i>Stanieria</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	100	99	Cyanobacteria

* Organismo más próximo a la base de datos GenBank.

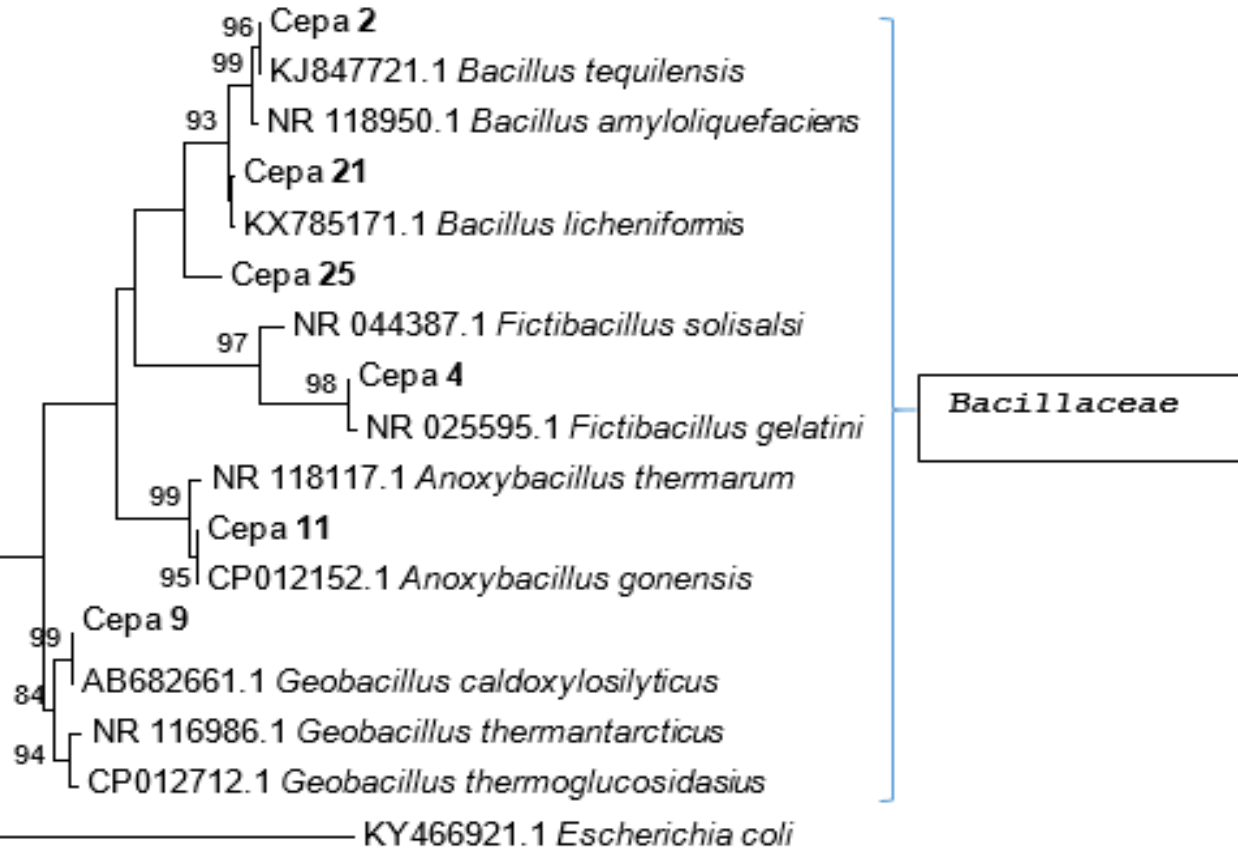
** Clasificación según el NCBI.



Resultados y discusión

Análisis filogenético

Gen 16S rRNA, bacterias



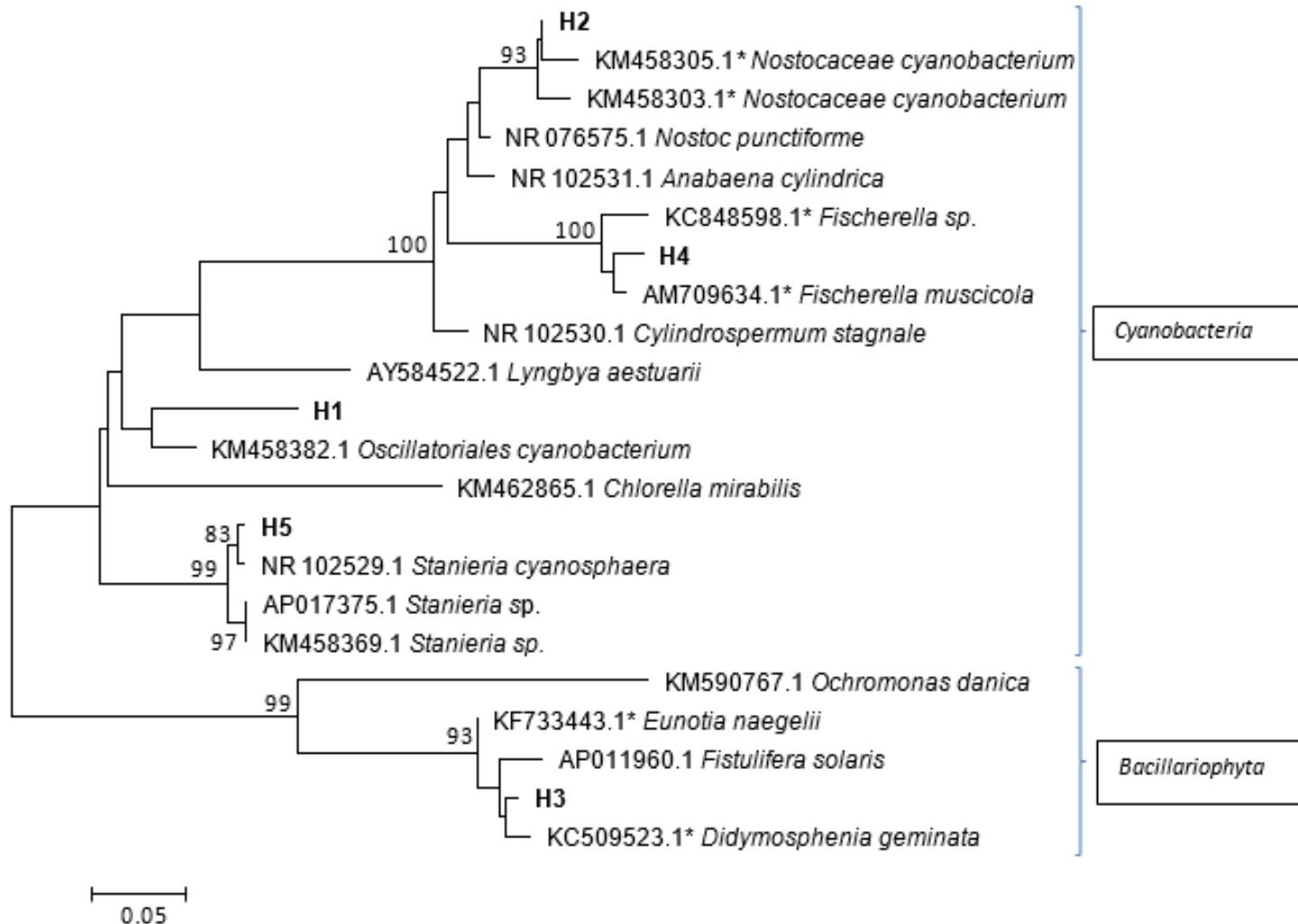
Método de máxima verosimilitud Neighbor-Joining y con un modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano.

0.050



Análisis filogenético

Gen 23S rRNA, microalgas



Resultados y discusión

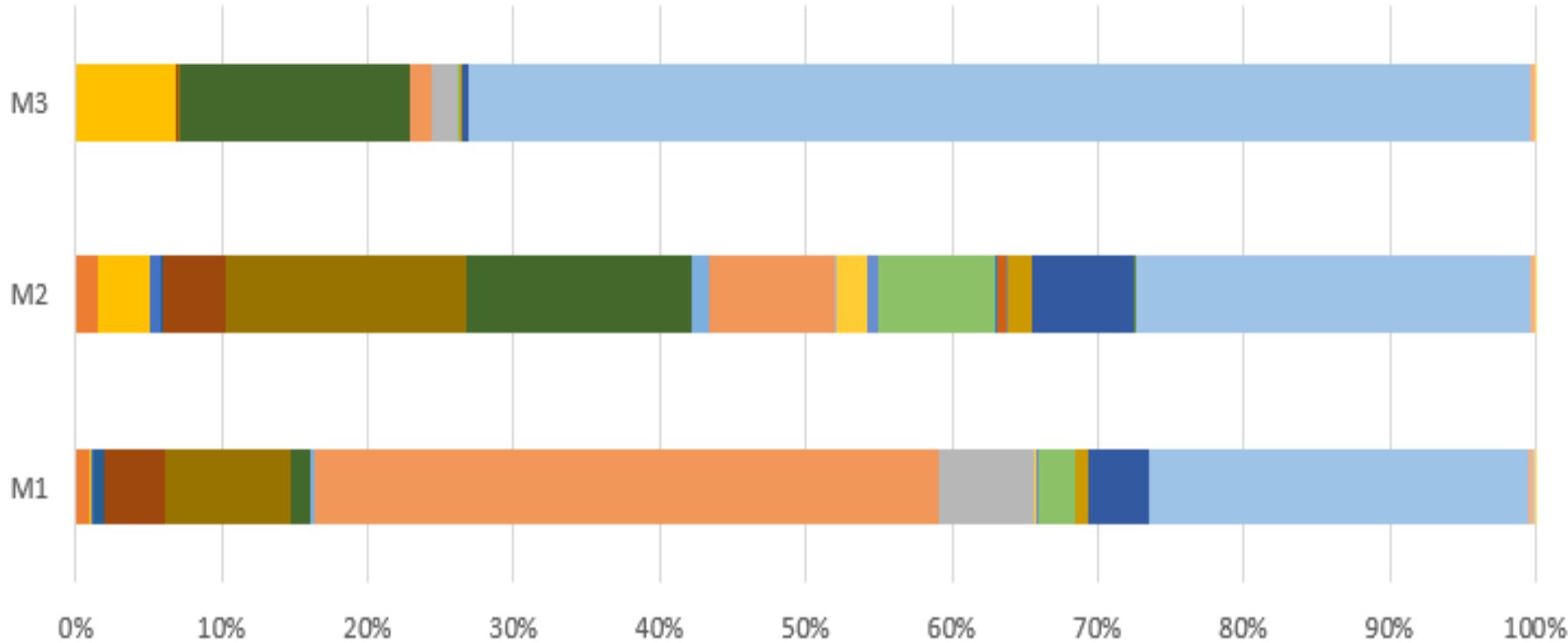
- cepa H5 → identificó a nivel de especie
- H3 y H4 → identificó a nivel de género
- H1 y H2 → identificó a nivel de orden y familia respectivamente

Método de máxima verosimilitud Neighbor-Joining y con un modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano.



Resultados y discusión

Secuencias genómicas bacterianas "Pirosecuenciación"



Pirosecuenciación

Comunidad bacteriana

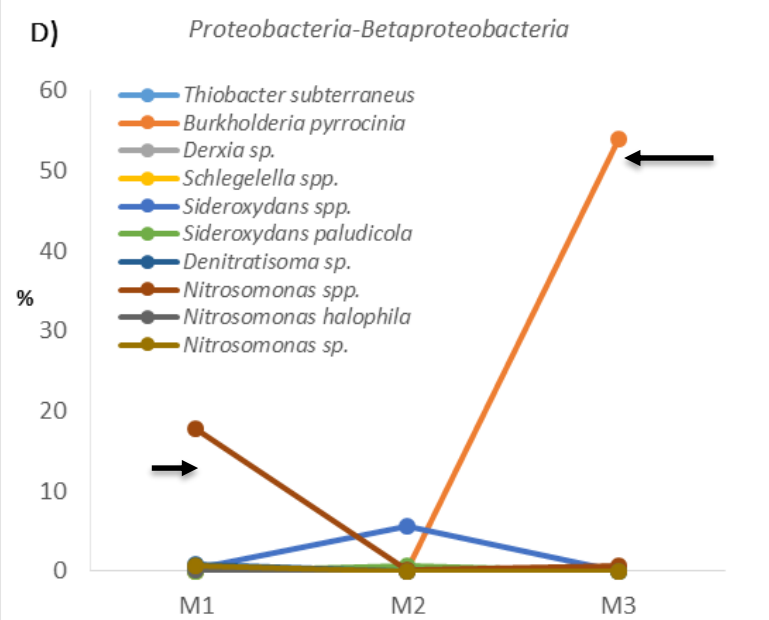
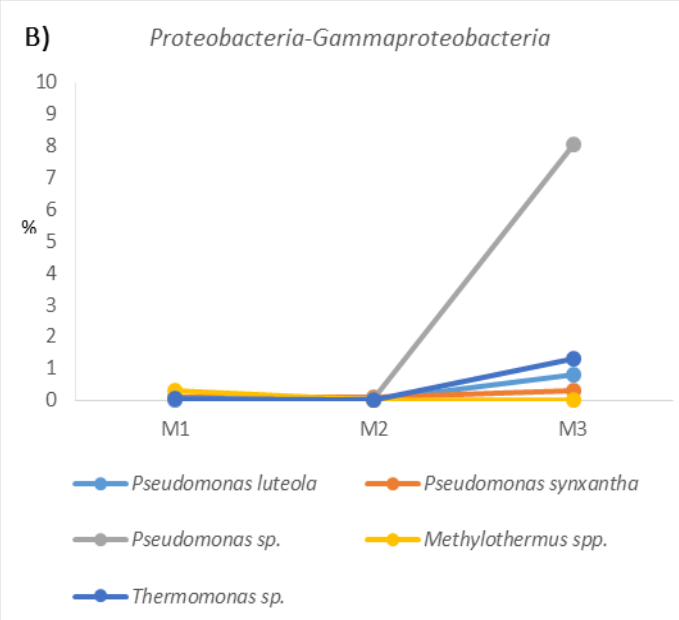
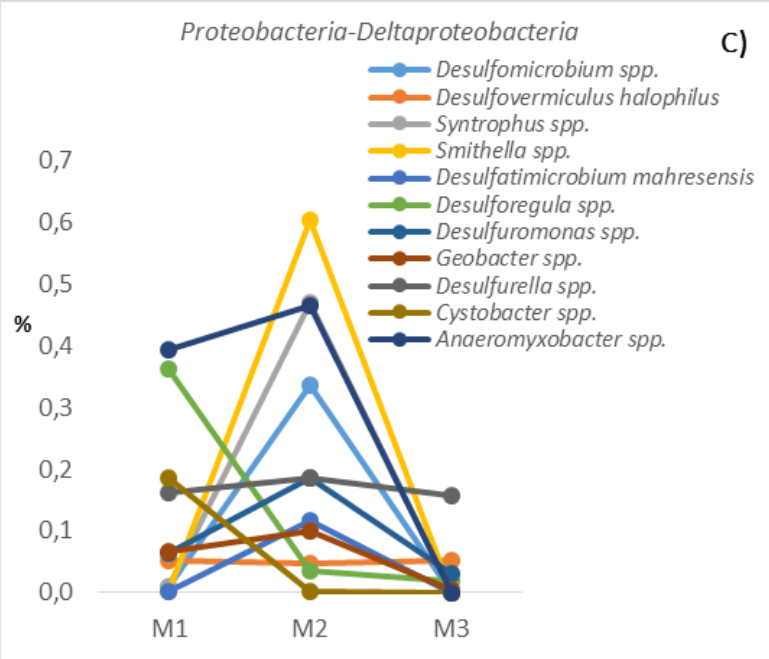
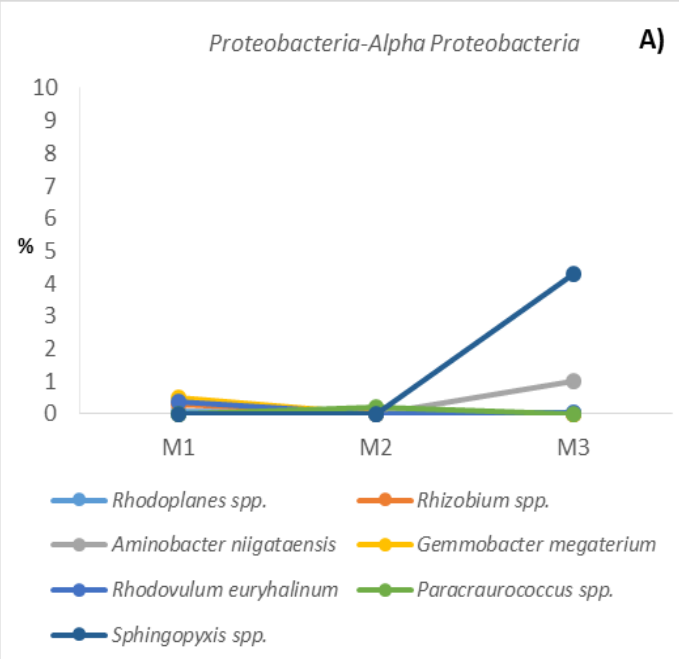
Las secuencias genómicas obtenidas mediante la técnica de pirosecuenciación se clasificaron en unidades taxonómicas operativas (OTUs) usando un umbral de similitud del 97%

Los filos **proteobacteria**, **firmicutes** y **bacteroidetes**

- Fibrobacteres
- Thermodesulfobacteria
- Gemmatimonadetes
- Actinobacteria
- Armatimonadetes
- Lentisphaerae
- Planctomycetes
- Deinococcus_thermus
- Tenericutes
- Nitrospirae
- Deferribacteres
- Firmicutes
- Acetothermia
- Bacteroidetes
- Cyanobacteria
- Chlorobi
- Acidobacteria
- Ignavibacteriae
- Chrysiogenetes
- Aquificae
- Fusobacteria
- Spirochaetes
- Chloroflexi
- Dictyoglomi
- Proteobacteria
- Thermotogae
- Verrucomicrobia
- Caldiserica

Resultados y discusión

Proteobacteria



Pirosecuenciación

Comunidad bacteriana

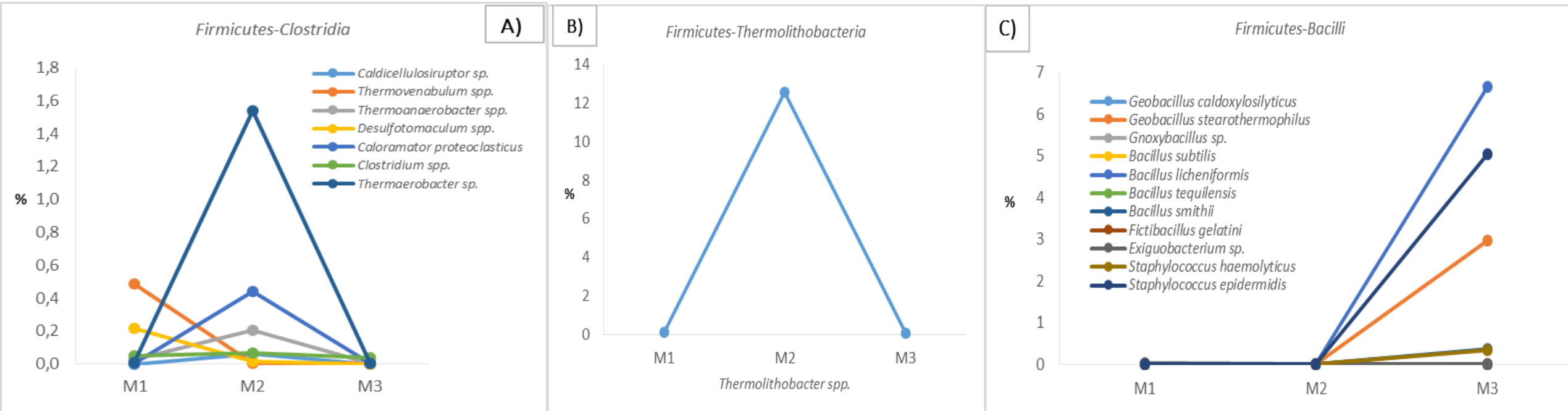


Burkholderia pyrrocinia* y *Nitrosomonas spp. fueron las especies que mayor número de OTUs presentaron en las muestras analizadas.

Resultados y discusión

Pirosecuenciación

Firmicutes



Las cepas aisladas *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Anoxybacillus genensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus tequilensis* y *Fictibacillus gelatini*, coinciden con los resultados de la técnica de pirosecuenciación

La especie *Thermolithobacter spp.* (**Figura B**) presenta el mayor número de OTUs dentro del filo *firmicutes*



Resultados y discusión

Pirosecuenciación

Hongos

M1=8500 y M2=3520.

Se observaron cinco filos: *Gomeromycota*, *Cryptomycota*, *Mucoromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota*)



Paramicrosporidium fungal sp., *Hygrocybe persistens* y *Hydnотryopsis setchellii*

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	M1	M2	
<i>Gomeromycota</i>	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Diversisporales</i>	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora punctata</i>	14	2	
<i>Cryptomycota</i>				<i>Paramicrosporidium</i>	<i>Paramicrosporidium fungal sp.</i>	4975	359	
<i>Basidiomycota</i>	<i>Tremellomycetes</i>	<i>Tremellales</i>	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus tephrensii</i>	0	57	
					<i>Cryptococcus podzolicus</i>	0	213	
					<i>Cryptococcus sp.</i>	113	15	
			<i>Cryptococcus amylolyticus</i>		0	39		
			<i>Cryptococcus dimennae</i>		0	168		
			<i>Cryptococcus foliicola</i>		8	107		
			<i>Tremellaceae</i>	<i>Tremella</i>	<i>Tremella encephala</i>	147	747	
			<i>Bulleribasidiaceae</i>	<i>Hannaella</i>	<i>Hannaella sp.</i>	0	786	
				<i>Bulleribasidium</i>	<i>Bulleribasidium oberjochense</i>	0	326	
	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Hygrophoraceae</i>	<i>Hygrocybe</i>	<i>Hygrocybe persistens</i>	1017	4	
<i>Mucoromycota</i>	<i>Mucoromycotina</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Actinomucor</i>	<i>Actinomucor elegans</i>	787	4	
<i>Ascomycota</i>	<i>Pezizomycetes</i>	<i>Pezizales</i>	<i>Pezizaceae</i>	<i>Hydnотryopsis</i>	<i>Hydnотryopsis setchellii</i>	1155	4	
	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Debaryomycetaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>Candida catenulata</i>	5	3	
	<i>Sordariomycetes</i>		<i>Magnaporthales</i>	<i>Magnaporthaceae</i>	<i>Mycoleptodiscus</i>	<i>Mycoleptodiscus sp.</i>	0	50
			<i>Trichosphaeriales</i>	<i>Trichosphaeriaceae</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora sp.</i>	1	17
			<i>Hypocreales</i>	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium sp.</i>	1	67
	<i>Dothideomycetes</i>		<i>Pleosporales</i>	<i>Didymellaceae</i>	<i>Phoma</i>	<i>Phoma proteae</i>	0	20
					<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	0	13
				<i>Phaeosphaeriaceae</i>	<i>Sclerostagonospora</i>	<i>Sclerostagonospora sp.</i>	3	12
				<i>Didymosphaeriaceae</i>	<i>Deniquelata</i>	<i>Deniquelata montagnulaceae sp.</i>	0	21
				<i>Cucurbitariaceae</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>Pyrenochaeta sp.</i>	0	48
				<i>Capnodiales</i>	<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	141
<i>Mycosphaerellaceae</i>					<i>Pseudocercospora</i>	<i>Pseudocercospora sp.</i>	19	89
	<i>Botryosphaeriales</i>	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Spencermartinsia</i>	<i>Spencermartinsia viticola</i>	1	49		



Resultados y discusión

Pirosecuenciación

Microalgas

M1=86428 y M2=6125

Se observaron cuatro filos cyanobacteria, chlorophyta, ctreptophyta y euglenida



El filo cyanobacteria obtuvo el mayor número de OTUs.

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	M1	M2	
Cyanobacteria		Nostocales	Stigonemataceae	Stigonema	Stigonema spp.	61980	4025	
Chlorophyta	Mamiellophyceae	Mamiellales	Mamiellaceae	Micromonas	Micromonas pusilla	27	2	
	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae	Chlorella	Chlorella vulgaris	0	16	
				Friedmannia	Friedmannia israeliensis	1	71	
					Trebouxia	Trebouxia simplex	3	177
						Trebouxia brindabellae	52	22
				Microthamnion	Microthamnion kuetzingianum	502	147	
	Prasinophyceae	Pseudoscourfieldiales	Pycnococcaceae	Nephroselmis	Nephroselmis olivacea	20	18	
				Pseudoscourfieldia	Pseudoscourfieldia marina	2436	413	
	Pedinophyceae	Scourfieldiales	Scourfieldiaceae	Scourfieldia	Scourfieldia sp.	129	88	
		Pedinomonadales	Pedinomonadaceae	Pedinomonas	Pedinomonas minor	54	3	
	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	scherrffelia	Scherffelia dubia	9	47	
	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Chlorococcaceae	Ettlia	Ettlia pseudoalveolaris	1	67	
	Ulvophyceae	Ultrichales		Gloeotilopsis	Gloeotilopsis sterilis	139	82	
Chamaetrichon				Chamaetrichon capsulatum	32	15		
Streptophyta	Mesostigmatophyceae	Mesostigmatales	Mesostigmataceae	Mesostigma	Mesostigma viride	14740	372	
Euglenida	Euglenoidea	Euglenales	Phacaceae	Phacus	Phacus segretii	340	7	
			Euglenaceae	Euglena	Euglena sanguinea	1	39	
					Euglena granulata	22	22	
			Strombomonas	Strombomonas acuminata	57	0		
Trachelomonas	Trachelomonas cingulata	5133	39					



Resultados y discusión

Pirosecuenciación

Arqueas

M1=92734 y M2=39787.

Se observaron cuatro filos *crenarchaeota*, *korarchaeota*, *euryarchaeota* y *thaumarchaeota*



La especie *Candidatus nitrososphaera gargensis* presento el mayor número de OTUs

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	M1	M2		
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thermoprotei</i>	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Desulfurococcaceae</i>	<i>Thermosphaera</i>	<i>Thermosphaera aggregans</i>	2	251		
		<i>Thermoproteales</i>	<i>Thermofilaceae</i>	<i>Thermofilum</i>	<i>Thermofilum sp.</i>	111	66		
<i>Korarchaeota</i>				<i>Candidatus Korarchaeum</i>	<i>Candidatus korarchaeum cryptofilum</i>	0	31		
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanococci</i>	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanothermococcus</i>	<i>Methanothermococcus sp.</i>	334	2		
				<i>Methanococcus</i>	<i>Methanococcus spp.</i>	1340	3		
						<i>Methanococcus sp.</i>	41	23	
				<i>Methanobacterium bryantii</i>		43	0		
	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanobacterium sp.</i>	6	11		
					<i>Methanobacterium formicicum</i>	14	0		
					<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobrevibacter sp.</i>	72	0	
	<i>Thermoplasmata</i>	<i>Methanomassiliicoccales</i>	<i>Methanomassiliicoccaceae</i>		<i>Methanomassiliicoccus</i>	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	45	26	
					<i>Thermogymnomonas</i>	<i>Thermogymnomonas sp.</i>	14345	5923	
		<i>Thermoplasmatales</i>		<i>Thermoplasmataceae</i>		<i>Thermoplasma</i>	<i>Thermoplasma sp.</i>	303	82
						<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanosarcina sp.</i>	45
	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosarcinales</i>			<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanosaeta sp.</i>	59	51	
<i>Thermococci</i>					<i>Thermococcales</i>	<i>Thermococcaceae</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>Thermococcus sp.</i>	0
				<i>Aciduliprofundum</i>	<i>Aciduliprofundum sp.</i>	316	314		
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrososphaeria</i>	<i>Nitrososphaerales</i>	<i>Nitrososphaeraceae</i>	<i>Nitrososphaera</i>	<i>Nitrososphaera sp.</i>	1623	174		
				<i>Candidatu nitrososphaera</i>	<i>Candidatus nitrososphaera sp. thuava</i>	54	141		
					<i>Candidatus nitrososphaera gargensis</i>	73819	2589		
					<i>Candidatus nitrososphaera</i>	61	6		
					<i>Candidatus Nitrosocaldus.</i>	<i>Candidatus nitrosocaldus yellowstonii</i>	0	349	
					<i>Candidatus nitrosocaldus sp.</i>	2	30		
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Cenarchaeales</i>	<i>Cenarchaeaceae</i>	<i>Cenarchaeum</i>	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	45	7			
				<i>Candidatus Nitrosotalea</i>	<i>Candidatus nitrosotalea</i>	10	1		
				<i>Candidatus Micrarchaeum</i>	<i>Candidatus micrarchaeum acidiphilum</i>	18	14		



Resultados y discusión

Aplicaciones de las cepas identificadas en la fuente geotermal Chachimbiro

Bacillus licheniformis

- India (40-60 °C). (Acharya *et al.*, 2012)
- Bacilo Gram-positivo
- Formador de endoesporas

Producción de enzimas termoestables (proteasas y amilasas) → grandes cantidades



Anoxybacillus gonensis

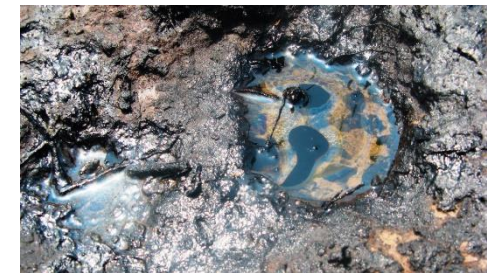
- Turquía (50-70 °C) (Belduz *et al.*, 2003)
- Bacilo Gram-positivo
- Formador de endoesporas

Producir biopolímeros (Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB))

Biodegradables



Absorber iones metálicos en soluciones acuosas



Resultados y discusión

Aplicaciones de las cepas identificadas en la fuente geotermal Chachimbiro

Geobacillus caldoxylosilyticus

Asilado de hábitat halófilos

- Bacilo Gram-positivo
- Formador de endoesporas

Control biológico

Lactonasas
(metalo- I^2 -
lactamasa (GCL)

→ Degradar →

Diversas lactonas N-
acylhomoserine (AHL)

→ Bacterias Gram-negativas



Quórum (capacidad de
inactivar la comunicación
química)

←

**Regular la
expresión de genes
virulentos**



Resultados y discusión

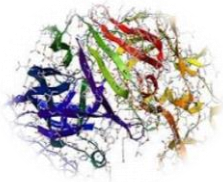
Aplicaciones de las cepas identificadas en la fuente geotermal Chachimbiro

Microalgas

Cianobacterias



Producen compuestos con actividades antibacteriales y antifúngicas



Fischerella muscico



Produce metabolitos inhibitorios intracelulares en todas las etapas de su ciclo de crecimiento



Inhiben el crecimiento de algunos microorganismos



Resultados y discusión

Cepario



Se realizó un cepario, con las cepas aisladas, para futuras investigaciones.



Conclusiones

- Se aislaron e identificaron seis cepas bacterianas, cinco a nivel de especie *Anoxybacillus gonensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Fictibacillus gelatini* y una a nivel de género *Bacillus*.
- Se aislaron e identificaron cinco microalgas. El filo Cyanobacteria (microalgas procariotas) fue el grupo dominante.
- Mediante la técnica de pirosecuenciación se identificaron cinco filos (Gomeromycota, Cryptomycota, Mucoromycota, Basidiomycota y Ascomycota), pertenecientes al reino Fungi.
- Además de la identificación de bacterias, hongos y microalgas, se identificaron cuatro filos (Euryarchaeota, Korarchaeota, Thaumarchaeota y Crenarchaeota) dentro del reino Arquea, mediante la técnica de pirosecuenciación.



Conclusiones

- Las cepas aisladas poseen aplicaciones biotecnológicas descritas en investigaciones científicas en todo el mundo, principalmente por sus moléculas termoestables, como es el caso de la bacteria *Geobacillus caldoxylosilyticus*, recientemente descubierta y estudiada por su relación al control de enfermedades patógenas, ya que puede regular la expresión de genes virulentos.
- Con las cepas identificadas se realizó un cepario, se les asignó un código y se los archivó en una base de datos, con el propósito de obtener una colección de todas las cepas termófilas aisladas de la fuente geotermal Chachimbiro, para futuras investigaciones.



Recomendaciones

- Es necesario realizar la identificación molecular de las cepas bacterianas, con la ayuda de otros genes, como la amplificación de los genes rpoB (subunidad β de la ARN polimerasa) y gyrB (subunidad β de la ADN girasa).
- Se recomienda secuenciar los seis productos de PCR bacterianos restantes (1, 7, 10, 13, 18 y 20).
- Se deja establecido que esta investigación abre posibles estudios, como la extracción de nuevas enzimas termoestables, para emplearlas en el campo biotecnológico.



Agradecimientos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Andrés Izquierdo, Ph.D
Alma Koch, MS.c
Ing. Renato Naranjo
Francisco Flores, Ph.D



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Agradecimientos



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



*A Dios, a mis padres
y familia*



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Gracias por su atención

