



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

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

**TEMA: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y ALGAS  
MESÓFILOS Y TERMÓFILOS DE LAS FUENTES  
GEOTERMALES: EL RIÑÓN- PROVINCIA DEL AZUAY Y  
GUAPÁN- PROVINCIA DEL CAÑAR.**

**AUTOR: NARANJO ROJAS YANARA GABRIELA**

**DIRECTOR: MSc. KOCH KAISER ALMA ROSEL**

**SANGOLQUÍ**

**2017**

# CERTIFICACIÓN



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y ALGAS MESÓFILOS Y TERMÓFILOS DE LAS FUENTES GEOTERMALES: EL RIÑÓN- PROVINCIA DEL AZUAY Y GUAPÁN- PROVINCIA DEL CAÑAR** realizado por **YANARA GABRIELA NARANJO ROJAS** ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **YANARA GABRIELA NARANJO ROJAS** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Julio 2017.

MSc. ALMA KOCH  
DIRECTORA

## AUTORIA DE RESPONSABILIDAD



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

### AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **YANARA GABRIELA NARANJO ROJAS**, con cédula de identidad N° 172557261-2 declaro que este trabajo de titulación **"IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y ALGAS MESÓFILOS Y TERMÓFILOS DE LAS FUENTES GEOTERMALES: EL RIÑÓN- PROVINCIA DEL AZUAY Y GUAPÁN- PROVINCIA DEL CAÑAR"**, 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, Julio 2017.

  
YANARA GABRIELA NARANJO ROJAS  
C.C 172557261-2

# AUTORIZACIÓN



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## AUTORIZACIÓN

Yo, **YANARA GABRIELA NARANJO ROJAS**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, **"IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y ALGAS MESÓFILOS Y TERMÓFILOS DE LAS FUENTES GEOTERMALES: EL RIÑÓN- PROVINCIA DEL AZUAY Y GUAPÁN- PROVINCIA DEL CAÑAR"** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, Julio 2017.

YANARA GABRIELA NARANJO ROJAS

C.C 172557261-2

A mis padres  
**Amanda del Carmen Rojas López**  
**y Wilson Raúl Naranjo.**

Pues a su manera tan distinta han sabido estar en los momentos  
clave. Los amo con el corazón.

*Gracias por haberme permitido vivir y desarrollarme, esto es para  
Uds.*

## AGRADECIMIENTOS

Ahora me doy cuenta de lo difícil que es ponerle punto final a una etapa de la vida. Es una sensación extraña y hasta cierto punto difícil de afrontar, por momentos quisiera que regresara el tiempo y volver a iniciar, pero luego entiendo que solo es miedo a lo desconocido. En realidad es tanta la felicidad que siento por haber llegado al momento de culminar, y la dicha de saber que aunque fue complicado, es momento de continuar.

Muchas han sido las personas que se han visto involucradas de una u otra manera en este tiempo de investigación, principalmente los docentes que han sido una guía y me han brindado su apoyo, no solo en el laboratorio, sino también mediante conversaciones y consejos, que me han permitido crecer como persona y profesional.

Quiero presentar mi agradecimiento a la Máster Alma Koch, directora de este trabajo, quien ha sido una de las mejores maestras que he tenido a lo largo de la carrera, sembrando en mí el gusto por la microbiología y todo lo que la materia comprende. Además me permitió ser parte del Laboratorio de Microbiología, en donde aprendí a manejar nuevas técnicas de identificación microbiana y donde pude poner en práctica todos los conocimientos adquiridos. También me gustaría mencionar al Doctor Andrés Izquierdo, quien es el director del proyecto de identificación de microorganismos provenientes de fuentes geotermales del Ecuador y que ha estado desde el inicio con el grupo de "Termas", permitiendo que nos relacionemos como buenos compañeros de trabajo, valorando la unión y la amistad que se ha creado.

Me gustaría mencionar a mis compañeros tesisistas: Carito, Mopo y Roque, con quienes iniciamos esta recta final, fuimos a los muestreos y tuvimos la oportunidad de conocernos y compartir muy buenas experiencias. A Beto, que a pesar de entrar después al grupo, también nos ayudó en la organización de algunos eventos. Chicos, sin ustedes el laboratorio no hubiera sido lo mismo, y entre risas y complicidades se llegaron a ganar un lugar en mi corazón.

Espero que ahora que la vida nos aparta sigamos en contacto y que cada uno cumpla sus sueños. ¡Gracias chicos!

Mi agradecimiento a mis amigas de la universidad: Ali, Mishu, Chovis y Aleja, que son las personas con las que compartí los últimos semestres de la carrera, entre bromas y estudio pudimos salir adelante. Las quiero mucho chicas y que su vida sea llena de bendiciones.

A mis amigas del colegio Cynthia, Jahaira y Katy, que forman parte de mi vida hasta ahora pues son el regalito de vida que me dio los años y espero que nunca nos apartemos. A Kathe, quien es más que mi mejor amiga, es mi hermana de otra madre, creo que siempre serás parte de mi familia, un pequeño y reducido grupo. Creo que mi vida no sería la misma sin ninguna de ellas.

Hubieron momentos a lo largo del tiempo de tesis, en los que el peso de los días pasaban dejando frustración y estrés, muchas veces pensé que era demasiado trabajo. En ese instante Leo fue la persona que me dio ánimos y de una forma divertida, me permitió mirar todo desde un enfoque diferente, haciendo que recobre energía. A ti ¡Muchas gracias!

Finalmente quiero agradecer a mi familia, mis padres y hermana. Quiero que sepan que a pesar de todo lo que vivimos día a día, son las únicas personas con las que podré contar de manera certera. Mi pequeña hermanita Vane, quiero agradecerte por estar ahí en todo momento y por ser mi pilar fundamental, todo este esfuerzo y trabajo es por ti. Espero un día poderte ver en la misma etapa en la que me encuentro y créeme que no me sentiré menos orgullosa de lo que estoy ahora de ti. Sigue siendo luchadora. Te amo pequeña.

A los que están y a lo que por la premura del asunto no he podido mencionar. Millón de gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN .....	ii
AUTORIA DE RESPONSABILIDAD .....	iii
AUTORIZACIÓN .....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	viii
LISTADO DE FIGURAS .....	xi
LISTADO DE TABLAS .....	xv
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	xvii
RESUMEN .....	xviii
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Formulación del problema</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Justificación del problema</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. Objetivos de la investigación</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3.1. Objetivo general</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4. Marco teórico</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4.1. Microorganismos extremófilos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4.2. Características de los microorganismos extremófilos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4.3. Adaptaciones de microorganismos a condiciones ambientales extremas</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4.4. Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4.5. Descripción de las Fuentes Geotermales</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5. Hipótesis de la investigación</b> .....	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1. Participantes</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2. Localización geográfica</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.1. Localización de la fase de campo</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.2. Localización de la fase de laboratorio</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3. Periodo de investigación</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4. Metodología</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4.1. Fase de Campo</b> .....	<b>23</b>

2.4.2. Fase de Laboratorio.....	26
2.4.2.8. Análisis de RFLPs.....	30
2.4.3. Análisis de secuencias .....	31
2.4.3.3. Análisis filogenético.....	32
2.4.3.3. Análisis de la composición microbiana de las fuentes geotermales mediante secuenciación masiva - Illumina .....	32
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>34</b>
3.1. Caracterización de los sitios de muestreo .....	34
3.2. Análisis fisicoquímico .....	34
3.3. Obtención de cultivos puros .....	35
3.4. Características microscópicas de los cultivos .....	36
3.5. Extracción de ADN .....	40
3.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	41
3.6.1. Amplificación del gen ARNr 16S .....	41
3.6.2. Amplificación del gen 23S .....	46
3.6.3. Amplificación de la región ITS.....	46
3.7. Análisis de similitud .....	47
3.8. Análisis filogenético .....	49
3.9. Análisis de la composición microbiana de las fuentes geotermales mediante secuenciación masiva - Illumina.....	54
3.9.1. Comunidad de Arqueas .....	56
3.9.2. Comunidad Bacteriana .....	63
3.9.3. Comunidad de Algas .....	84
3.9.4. Comunidad de Hongos .....	91
3.9. Construcción de cepario .....	95
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>96</b>
4.1. Análisis fisicoquímicos de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	96
4.2. Aislamiento de microorganismos por técnicas de microbiología tradicional .....	98
4.3. Identificación de cepas de bacterias, algas y hongos mediante biología molecular.....	99
4.4. Cepas identificadas en las fuentes geotermales El Riñón y Guapán presentes en otras fuentes geotermales del mundo y sus aplicaciones .....	100
4.5. Análisis de Secuenciación masiva - Illumina .....	107
4.5.1. Comunidad de Arqueas .....	108
4.5.2. Comunidad Bacteriana .....	109

4.5.3. Comunidad de Algas .....	112
4.5.4. Comunidad de Hongos .....	113
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	114
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	116
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	117

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Etapas de la Técnica de PCR (Agrobiotecnología, 2017).....	10
<b>Figura 2:</b> Subunidades de un ribosoma procarionta (ChunLab, 2017).....	11
<b>Figura 3:</b> Regiones conservadas (color verde) e hipervariables (V1-V9, color gris) de un gen ARN r 16S (ChunLab, 2017).....	12
<b>Figura 4:</b> Gen ARNr 23S (Sidney, 2004). .....	12
<b>Figura 5:</b> Región ITS (Quaedvlieg et al., 2011). .....	13
<b>Figura 6:</b> Esquema de análisis por RFLPs (Posik, et al., 2007). .....	14
<b>Figura 7:</b> Árbol filogenético (Letunic, 2007).....	17
<b>Figura 8:</b> Ubicación geográfica de las fuentes geotermales el Riñón- Provincia de Azuay (GoogleMaps, 2017). .....	22
<b>Figura 9:</b> Ubicación geográfica de las fuentes geotermales Guapán- Provincia del Cañar (GoogleMaps, 2017). .....	22
<b>Figura 10:</b> Fuente geotermal El Riñón – provincia de Azuay (Naranjo, 2016). .....	24
<b>Figura 11:</b> Fuente geotermal Guapán –provincia del Cañar (Naranjo, 2016).....	24
<b>Figura 12:</b> Recolección de muestras Fuente geotermal El Riñón y Guapán respectivamente (Naranjo, 2016). .....	25
<b>Figura 13:</b> Cultivos puros obtenidos a partir de la fuente geotermal El Riñón. A: cepa bacteriana P1.5 ( <i>Paenibacillus tundrae</i> ) y B: cepa de microalga P1.2 ( <i>Scenedesmus sp.</i> ).....	35
<b>Figura 14:</b> Cultivos puros obtenidos a partir de la fuente geotermal Guapán. A: cepa bacteriana P4.14 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ), B: cepa de microalga P4.8 ( <i>Fischirella sp.</i> ) y C: cepa fúngica ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ). .....	36
<b>Figura 15:</b> Tinción Gram de la cepa bacteriana P1.6 ( <i>Bacillus glycinifermentans</i> ), proveniente de la fuente geotermal El Riñón en aumento 100X.....	37
<b>Figura 16:</b> Tinción Gram, cepa bacteriana P1.12 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ), proveniente de la fuente geotermal El Riñón en aumento 100X. ....	37
<b>Figura 17:</b> Tinción Gram, cepa bacteriana P3.5 ( <i>Anoxybacillus flavithermus</i> ), proveniente de la fuente geotermal Guapán en aumento 100X. ....	38
<b>Figura 18:</b> Tinción Gram, cepa bacteriana P3.9 ( <i>Paenibacillus barengoltzi</i> ), proveniente de la fuente geotermal Guapán en aumento 100X. ....	38
<b>Figura 19:</b> Microalga G6 ( <i>Scenedesmus sp.</i> ) proveniente de la fuente geotermal El riñón en aumento 100X. ....	39
<b>Figura 20:</b> Microalga G2 ( <i>Leptolyngbya boryana</i> ), proveniente de la fuente geotermal Guapán en aumento 100X.....	39
<b>Figura 21:</b> Cepa fúngica ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ) con aumento 40X. ....	40
<b>Figura 22:</b> Gen ARNr 16S de las 29 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal El Riñón. (M: Marcador molecular, CN: Control negativo) .....	41
<b>Figura 23:</b> Gen ARNr 16S de las 33 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal Guapán. (M: Marcador molecular).....	42

<b>Figura 24:</b> RFLPs de los amplicones tratados con la enzima MspI del gen ARNr 16S de las 29 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal El Riñón. (M: Marcador molecular) .....	43
<b>Figura 25:</b> RFLPs de los amplicones tratados con la enzima MspI del gen ARNr 16S de las 33 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal Guapán. (M: Marcador molecular) .....	44
<b>Figura 26:</b> Gen 23S rRNA de capas de algas aislada de la fuente geotermal Guapán (G2, G3, G4, G5, G7, G8) y El Riñón (G1, G6, G9). (M: Marcador molecular; CN: control negativo) .....	46
<b>Figura 27:</b> Región ITS de la cepa fúngica aislada de la fuente geotermal Guapán (M: Marcador molecular, CN: Control negativo).....	46
<b>Figura 28:</b> Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias aisladas de la fuente geotermal El Riñón (12, 16, 112, 22, 25, 27, 210, s11, s14, s19, s22)....	50
<b>Figura 29:</b> Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias aisladas de la fuente geotermal Guapán (35, 38, 41 y 410).....	51
<b>Figura 30:</b> Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen 23S rRNA para microalgas de las fuentes geotermales El Riñón (G6) y Guapán (G2, G3, G4, G7 y G8).....	52
<b>Figura 31:</b> Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen ITS para la cepa fúngica aislada de la fuente geotermal Guapán (JR).....	53
<b>Figura 32:</b> Distribución completa de los filum de Arqueas de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	57
<b>Figura 33:</b> El filum <i>Crenarchaeota</i> , se encuentra constituido por des clases: Crenarchaeota y Thermoprotei. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	57
<b>Figura 34:</b> El filum <i>Euryarchaeota</i> , se encuentra constituido por siete clases: Thermococci, Euryarchaeota, Methanococci, Thermoplasmata, Methanobacteria, Methanomicrobia y Halobacteria. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán .....	58
<b>Figura 35:</b> Los filum Parvarchaeota y Thaumarchaeota, se encuentran constituido por una clase: Parvarchaeota y Thaumarchaeota respectivamente. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán ....	58
<b>Figura 36:</b> Especies del filum Euryarchaeotas, perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 1 y 2) .....	62
<b>Figura 37:</b> Especies del filum Euryarchaeotas, perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 3).....	63
<b>Figura 38:</b> Distribución completa de los filum de Bacterias de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	64

<b>Figura 39:</b> El filum Firmicutes se encuentran constituido por seis clases: Firmicutes, Erysipelotrichia, Bacilli, Clostridia, Negativicute y Thermolithobacteria. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	65
<b>Figura 40:</b> El filum Bacteroidetes se encuentran constituido por cinco clases: Bacteroidetes, Flavobacteria, Sphingobacteria, Bacterioidia y Cytophagia. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	65
<b>Figura 41:</b> El filum Proteobacteria se encuentran constituido por seis clases: Alphaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gammaproteobacterias, Deltaproteobacterias, Epsilonproteobacterias y Oligoproteobacterias. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	66
<b>Figura 42:</b> Géneros del filum Bacteroidetes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	77
<b>Figura 43:</b> Géneros de la clase Bacilli, perteneciente al filum Firmicutes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	78
<b>Figura 44:</b> Géneros de la clase Clostridia, perteneciente al filum Firmicutes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	79
<b>Figura 45:</b> Géneros de la clase Negativicutes y Thermolithobacteria, perteneciente al filum Firmicutes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	79
<b>Figura 46:</b> Géneros de la clase Alfaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	80
<b>Figura 47:</b> Géneros de la clase Betaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	81
<b>Figura 48:</b> Géneros de la clase Gammaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	82
<b>Figura 49:</b> Géneros de la clase Deltaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 1 y 2).....	83
<b>Figura 50:</b> Géneros de la clase Epsilonproteobacteria perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	84
<b>Figura 51:</b> Distribución completa de los filum de Algas de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	85
<b>Figura 52:</b> El filum Chorophyta se encuentra constituido por siete clases: Pedinophyceae, Mamiellophyceae, Cholophyta, Ulvophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae y Nephorselmidophyceae. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	86
<b>Figura 53:</b> El filum Cyanobacteria y Eucariota se encuentran constituidos por una clase con su mismo nombre cada uno. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	86

<b>Figura 54:</b> El filum Streptophyta se encuentra constituido por cuatro clases: Liliopsida, Streptophyta, Chlorokybophyceae y Mesostigmatophyceae. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	87
<b>Figura 55:</b> Especies del filum Chlorophyta, perteneciente para .....	90
<b>Figura 56:</b> Especies del filum Chlorophyta, perteneciente para .....	91
<b>Figura 57:</b> Distribución completa de los filum de Hongos de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	92
<b>Figura 58:</b> Especies del filum <i>Ascomycota</i> , perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán.....	94

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación de organismos extremófilos de acuerdo a la temperatura (T°) .....	5
<b>Tabla 2:</b> Clasificación de organismos según su pH .....	7
<b>Tabla 3:</b> Clasificación de organismos según su tolerancia a la sal .....	8
<b>Tabla 4:</b> Datos hidrogeoquímicos de la fuente geotermal El Riñón.....	19
<b>Tabla 5:</b> Criterios a evaluarse de las colonias aisladas. ....	27
<b>Tabla 6:</b> Componentes de la PCR.....	29
<b>Tabla 7:</b> Cebadores para PCR de Bacterias (16S rRNA), microalgas (23SrRNA) y hongos (ITS).....	30
<b>Tabla 8:</b> Componentes de la reacción de RFLPs. ....	31
<b>Tabla 9:</b> Lista de primers usados en la secuenciación masiva - Illumina .....	33
<b>Tabla 10:</b> Datos de Fuente Geotermal el Riñón .....	34
<b>Tabla 11:</b> Datos de Fuente Geotermal Guapán .....	34
<b>Tabla 12:</b> Resumen comparativo de fragmentos de restricción de la fuente geotermal El Riñón .....	45
<b>Tabla 13:</b> Resumen comparativo de fragmentos de restricción de la fuente geotermal Guapán .....	45
<b>Tabla 14:</b> Análisis de las secuencias bacterianas de la fuente geotermal El Riñón con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI. ....	47
<b>Tabla 15:</b> Análisis de las secuencias bacterianas de la fuente geotermal Guapán con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI. ....	48
<b>Tabla 16:</b> Análisis de las secuencias de microalgas con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI.....	48
<b>Tabla 17:</b> Análisis de las secuencias de microalgas con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI.....	49
<b>Tabla 18:</b> Cepas de microorganismos agrupados de acuerdo a los resultados de los análisis de similitud y filogenéticos. ....	54
<b>Tabla 19:</b> Concentración de ADN obtenidas para secuenciación masiva - Illumina. ....	55
<b>Tabla 20:</b> OTUs totales y las librerías obtenidas a partir de los datos de secuenciación masiva - Illumina. ....	56
<b>Tabla 21:</b> Porcentaje de los Filum de la comunidad de Arqueas.....	56
<b>Tabla 22:</b> Géneros obtenidos a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Arqueas provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	59
<b>Tabla 23:</b> Géneros de arqueas constituidos por un mayor número de especies.....	60
<b>Tabla 24:</b> Especies obtenidas a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Arqueas provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	61
<b>Tabla 25:</b> Porcentaje de los principales Filum de la comunidad bacteriana.....	64

<b>Tabla 26:</b> Géneros obtenidos a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	67
<b>Tabla 27:</b> Géneros de arqueas constituidos por un mayor número de especies.....	71
<b>Tabla 28:</b> Especies obtenidas a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	72
<b>Tabla 29:</b> Porcentaje de los principales Filum de la comunidad bacteriana.....	84
<b>Tabla 30:</b> Géneros obtenidos a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Algas provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	88
<b>Tabla 35:</b> Especies obtenidas a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Algas provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	89
<b>Tabla 32:</b> Géneros obtenidos a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Hongos provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	93
<b>Tabla 33:</b> Especies obtenidas a partir de los resultados de secuenciación masiva - Illumina para Hongos provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.....	94

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**pH:** Potencial de hidrógeno

**°C:** Grados centígrados

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosomal

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

**GPS:** Global Positioning System

**AN:** Agar nutrient

**PDA:** Agar papa dextrosa

**CN:** Caldo nutriente

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**µm:** Micrómetro

**mL:** Mililitro

**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfatos

**kb:** Kilobase

**pb:** Pares de Bases

**V:** Voltio

**mA:** Miliamperio

**mM:** milimolar

## RESUMEN

Las fuentes geotermales conforman una parte importante de la riqueza natural existente en Ecuador, provienen de volcanes o fallas geológicas y han sido utilizadas como fuentes de esparcimiento. Sin embargo, son pocos los estudios de identificación microbiológica que se han realizado en ellas. Las fuentes geotermales El Riñón y Guapán se encuentran ubicadas en las provincias de Azuay y Cañar a temperaturas máximas de 34.2°C y 52.86°C respectivamente y un pH de 7. Mediante la amplificación de los genes 16S rRNA, 23S rRNA y la región ITS se logró identificar bacterias mesófilas como *Paenibacillus tundrae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, entre otras y termófilas como *Paenibacillus barengoltzii*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Brevibacillus thermoruber*; microalgas pertenecientes a los filum *Clorofita* y *Cianobacterias*; y una especie fúngica *Aspergillus fumigatus*. Los análisis de secuenciación masiva - Illumina de muestras de sedimentos establecieron la diversidad completa de la comunidad microbiana dentro de los dominios Arquea, Bacteria, Alga y Hongo de las fuentes geotermales. Se determinó que los filum Euryarchaeota, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Chlorophyta y Ascomycota como son los que obtuvieron mayor número de lecturas OTUs. Los microorganismos aislados se encuentran relacionados con la microbiota de las fuentes geotermales y suelos geotérmicos de otras partes del mundo.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **MOSÓFILOS**
- **TERMÓFILOS**
- **GENES**
- **SECUENCIACIÓN**
- **SECUENCIACIÓN MASIVA**

## ABSTRACT

Geothermal sources form an important part of the natural wealth that exists in Ecuador, come from volcanoes or geological faults and have been used as sources of recreation. However, few microbiological identification studies have been performed on them. The geothermal sources El Riñón and Guapán are located in the provinces of Azuay and Cañar, with temperatures of 34.2 ° C and 52.86 ° C respectively and a pH of 7. By amplifying the 16S rRNA genes, 23S rRNA and the ITS region were able to identify mesophilic bacteria such *Paenibacillus tundrae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, among others and thermophiles such *Paenibacillus barengoltzii*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Brevibacillus thermoruber*; Microalgae belonging to the filum *Chlorophyta* and *Cyanobacteria*; and a fungal species *Aspergillus fumigatus*. The analysis of massive sequencing of sediment samples established the complete diversity of the microbial community within the domains Arquea, Bacteria, Algae and Fungus of geothermal sources. It was determined that filum Euryarchaeota, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Chlorophyta and Ascomycota as the highest number of OTUs readings. The microorganisms found are related to the microbiota of geothermal sources and geothermal soils from other parts of the world.

### KEY WORDS:

- **MOSOPHILES**
- **THERMOPHILES**
- **GENES**
- **SEQUENCE**
- **MASSIVE SEQUENCING**

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del problema

El Ecuador posee varias fuentes geotermales por encontrarse ubicado a lo largo del callejón interandino, rodeado de volcanes activos e inactivos de los cuales se originan aguas a altas temperaturas, que son recolectadas y usadas para la creación de piscinas generalmente aprovechadas como lugares de esparcimiento y relajación. Existen algunos estudios fisicoquímicos donde se permite evidenciar las condiciones a las cuales se encuentran las fuentes termales ecuatorianas, identificando sus niveles de pH, temperatura, alcalinidad, hidrogeoquímica, entre otras (Quinche & Velastegui, 2014).

Debido a la variedad de ecosistemas en el Ecuador existen microorganismos capaces de adaptarse a diferentes condiciones, no solo las mencionadas, sino también resistencia a metales pesados y condiciones anaerobias (Bravo, 2014). Sin embargo, los estudios de identificación de microorganismos de las fuentes geotermales ecuatorianas son escasos.

En el 2016, las investigaciones realizadas por Janina Arias y Renato Naranjo, iniciaron con el proceso de identificación de microorganismos a nivel molecular en sus estudios “Isolation and molecular identification of bacterial community from Papallacta geothermal spring in Ecuador” y “Isolation and identification of eukaryotic algae and cyanobacteria from five geothermal springs in Ecuador” respectivamente, aumentando el interés en esta área.

El presente estudio pretende aislar e identificar bacterias, hongos y algas mesófilos y termófilos de las fuentes geotermales: El Riñón- Provincia del Azuay y Guapán- Provincia del Cañar. Mediante el uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo, con énfasis en las técnicas moleculares.

## 1.2. Justificación del problema

El Ecuador es reconocido como un país megadiverso debido a la cantidad de especies que existen en una determinada área por consecuencia de las regiones y climas que se presentan en el territorio (Bravo, 2014).

Las fuentes geotermales también experimentan variaciones, debido a que sus características fisicoquímicas dependen del lugar en el que se encuentran, lo que permite determinar diferencias en las condiciones de temperatura, pH, salinidad o cantidad de metales pesados. Por lo tanto, el desarrollo de los microorganismos está sujeto a una adaptación a los ambientes en los que se encuentra cada una de las termas ecuatorianas, teniendo como resultado microorganismos extremófilos.

El estudio de este tipo de microorganismos ha sido de gran interés para la comunidad científica; una de las primeras investigaciones se llevó a cabo por Johnson, B., desde el año de 1995 en el Parque Nacional Yellowstone. Por otro lado países como India (Sen, y otros, 2014), China (Song, y otros, 2010), Chile (Lacourt Mora, 2010) y Argentina (Urbieto, y otros, 2015), también han realizado investigaciones de caracterización de los microorganismos que habitan sus fuentes geotermales

En nuestro país existen pocas investigaciones que hablan del conocimiento o identificación de los microorganismos autóctonos, sin embargo es importante estudiarlos para darles un valor real y potencial (Estrella, Manosalvas, Mariaca, & Rivadeneira, 2005).

La identificación de la microbiota está enfocada actualmente en los usos que puede tener dentro de avances biotecnológicos que buscan optimizar los procesos industriales al integrarlos en la cadena productiva, con el objetivo de obtener un producto con bajo costo de inversión y características excelentes de comercialización como pueden ser las proteínas y enzimas. Además, pueden ser parte de tecnologías ecológicas cuyo objetivo es la descontaminación de suelo y agua.

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Identificar bacterias, hongos y algas mesófilos y termófilos de las fuentes geotermales: el Riñón- provincia del Azuay y Guapán- provincia del Cañar.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar las fuentes geotermales: el Riñón y Guapán mediante la toma de muestras de agua y sedimentos.
- Aislar microorganismos mesófilos y termófilos mediante técnicas dependiente de cultivo y microbiología tradicional.
- Identificar los microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo para establecer su taxonomía.

### **1.4. Marco teórico**

#### **1.4.1. Microorganismos extremófilos**

Se llaman extremófilos a los microorganismos que pueden vivir en condiciones extremas de temperatura, presión, radiación, salinidad, acidez, disponibilidad de oxígeno, nutrientes, entre otros. Son organismos que poseen estructuras o adaptaciones que les permite desarrollarse de manera exitosa en este tipo de ambientes (Ramírez, Serrano, & Sandoval, 2006).

Su descubrimiento se produjo a mediados de los años 60, desde entonces se ha establecido un repentino interés en diferentes áreas de estudio que buscan descubrir las particularidades adaptativas que poseen como: termoestabilidad en sus enzimas, estructuras de protección (endoesporas) y el cumplimiento de sus funciones biológicas (Haki & Rakshit, 2003), con el objetivo de ser aplicados dentro del campo de la biotecnología y la industria (Morozkina, y otros, 2010)

#### **1.4.2. Características de los microorganismos extremófilos**

Los organismos extremófilos generalmente pertenecen a los dominios de Archaea y Bacteria, constituidos por organismos unicelulares dentro reino de los Procariotas (Brock & Darlan, 1970). Su desarrollo en ambientes extremos se debe a características como:

- Enzimas estables: conocidas como extroenzimas, que son capaces de catalizar reacciones químicas en ambientes extremos de temperaturas o pH, su función principal es proteger el ADN.
- Enzimas específicas para metabolizar metales pesados.
- Monocapa lipídica de la membrana celular, la misma que les confiere mayor estabilidad.
- Equilibrio osmótico, esta característica les permite acumular sales en su interior evitando la deshidratación.

Los extremófilos también pueden incluir organismos eucariontes como hongos y protistas (algas y protozoos) que, al igual que los procariontes, poseen adaptaciones para sobrevivir. Ciertos hongos (solos o en comunidad con algas formando líquenes) pueden adaptarse a condiciones de alcalinidad, altas o bajas temperaturas, entre otras (Rampelotto, 2013), por ejemplo *Rhizomucor miehei*, *Thermoascus aurantiacus*, *Phanerochaete chrysosporium*. Así también, ciertas algas como *Achanthes exigua*, *Mougeotia sp.* y *Cyanidium caldarium* pueden crecer a altas temperaturas (Satyanarayana, Raghukumar, & Shivaji, 2005).

### **1.4.3. Adaptaciones de microorganismos a condiciones ambientales extremas**

Los microorganismos son capaces de desarrollarse en ambientes con condiciones extremas de temperatura, presión, pH y salinidad.

#### **1.4.3.1. Temperatura**

La temperatura es un factor importante dentro del desarrollo de los microorganismos, cada especie tiene un rango de temperatura particular que incluye: mínima, óptima y máxima, donde se puede evidenciar la velocidad de crecimiento (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Según Baker y sus colaboradores (2001), los microorganismos se pueden clasificar en tres grupos principales de acuerdo a esos rangos de temperatura:

**Tabla 1**  
**Clasificación de organismos extremófilos de acuerdo a la temperatura**

Organismos	Temperatura
Termófilos	35-70 °C,
Termófilos extremos	55-85 °C
Hipertermófilos	75-113 °C

Fuente: (Baker, Gaffar, Cowan, & Shuharto, 2001)

Dentro de la naturaleza, los organismos predominantes son los mesófilos, entre ellos se encuentran especies de bacterias, enterobacterias, arqueobacterias, hongos y algas (Morozkina, y otros, 2010).

Algunos estudios han demostrado que la adaptación que poseen los microorganismos extremófilos se debe a cambios conformacionales de las proteínas que incrementan la producción de ácidos grasos en las membranas plasmáticas. Un cambio de las bases nitrogenadas, han permitido que su límite de actividad sea más amplio y pueda funcionar a altas temperaturas. Por otro lado, han desarrollado estructuras protectoras que mantienen las condiciones extremas ajenas a las células o la síntesis de extremozimas (Deive, y otros, 2010). Entre las bacterias y arqueobacterias capaces de sobrevivir a elevadas temperaturas tenemos: *Thermus aquaticus*, *T. thermophilus*, *Thermodesulfobacterium commune*, *Sulfolobus acidocaldarius*, que han sido aisladas de fuentes termales, respiraderos hidrotermales submarinos y pozos de petróleo (Satyanarayana, Raghukumar, & Shivaji, 2005).

En el reino de los eucariotas, aunque la mayoría vive en condiciones mesófilas, también se pueden encontrar organismos extremófilos por ejemplo hongos termófilos que crecen a una temperatura máxima de 50 °C y mínima de 20 °C. Se ha determinado que la temperatura óptima es de 45°C como: *Myceliophthora* y *Rasamsonia byssochlamydoides* (Brito de Olivera, Gómez, & Rodríguez, 2014).

### **1.4.3.2. Presión**

Según Rodríguez y sus colaboradores (2005), los microorganismos se encuentran expuestos a diferentes concentraciones osmóticas, que ejerce presión en la membrana plasmática. La mayoría, generalmente prefiere desarrollarse en ambientes isotónicos, donde mantienen un equilibrio con la presión intracelular. Existen otros que son capaces de soportar presiones de hasta 300 atm y se encuentran en las profundidades de las aguas marinas o incluso de aguas dulces. Se distinguen dos grupos: Barotolerantes (toleran altas presiones) y Barófilos (necesitan altas presiones para vivir).

Los microorganismos barotolerantes se han encontrado a 3000 metros de profundidad, en donde pueden experimentar presiones de hasta 300 a 400 atm. Este tipo de bacterias también pueden crecer sin ningún problema a 1 atm de presión debido a que la velocidad de crecimiento del cultivo no sufre variación (Berenguer & Sanz, 2004).

Por otro lado, los barófilos tienen un crecimiento óptimo a presiones más elevadas y se dividen en dos grupos: barófilos moderados, capaces de soportar presiones de 1 a 400 atm y los barófilos estrictos que se desarrollan a presiones superiores a 400 atm (Berenguer & Sanz, 2004).

Los efectos de la presión en las membranas celulares, proteínas y genes de expresión han sido investigados minuciosamente. Se encontró que una respuesta a las altas presiones se relaciona con la cantidad relativa de monoinsaturación y polisaturación de la membrana plasmática de los microorganismos, por ejemplo: *Alteromonas sp.* presenta una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en su membrana celular, lo que la vuelve más fluida y contrarresta los efectos del aumento de la viscosidad causada por la alta presión. Otro microorganismo como *Shewanella sp.* usa un tipo de mecanismo diferente, poseen un operón que es activado en respuesta a la presión que experimenta y de esta manera permite el buen funcionamiento de sus reacciones internas (Satyanarayana, Raghukumar, & Shivaji, 2005).

### 1.4.3.3. Potencial hidrógeno (pH)

El pH es el encargado de indicar el estado en el que se encuentra un ambiente, sea este ácido, neutro o básico (Panichi & La Ruffa, 2007).

Es posible encontrar microorganismos en diferentes condiciones de pH, si embargo, cada uno debe mantener su pH interno neutro (pH= 6.8-7) para permanecer saludable y evitar que se destruyan macromoléculas lábiles o sencibles, pues una variación repentina del pH, conduce al cambio conformacional de las proteínas y enzimas propias del organismo (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Los microorganismos extremófilos crecen a condiciones específicas de pH fuera de las cuales no podrían desarrollarse con plenitud, las reacciones químicas que se producen dentro de las células son sensibles a los cambios externos de acidez o alcalinidad, y dependiendo de su rango, se los puede clasificar de acuerdo a la tabla 2 (Tortora, Funke, & Case, 2007).

**Tabla 2**  
**Clasificación de organismos según su pH**

Organismo	pH
Acidófilos	pH entre 1-5
Neutrófilos	pH entre 6-8
Alcalófilos	pH entre 9-11

Fuente: (Tortora, Funke, & Case, 2007)

Los acidófilos son capaces de obtener energía de compuestos minerales reducidos, emplean mecanismos de supervivencia como membranas cargadas positivamente y una alta capacidad de regulación interna, además de sistemas únicos de transporte. *Thermoplasma*, *Ferroplasma* y *Picrophilus*, son tres géneros de procariotas que pueden crecer hasta un pH cercano a cero, *Cyanidium caldarium* es un alga roja que crece a un pH de 0.5 a 3. También existen organismos del reino Fungi como *Acontium cylatium*, *Cephalosporium sp.* y *Trichosporon cerebriae* que también soportan un pH de cero (Rothschild & Mancinelli, 2001) y (Castillo Rodríguez, 2005).

Los organismos alcalófilos pueden ser aislados de ambientes neutros, pero principalmente se encuentran en los que tienen altas cantidades de carbonato sódico (conocidos como lagos sódicos). Los procariontes mejor adaptados son bacterias aeróbicas del género *Bacillus*, también arqueobacterias de los géneros *Natronobacterium* y *Natronomonas*. Su adaptación a estos sistemas hostiles se debe a que la superficie celular que es capaz de discriminar y mantener el interior del organismo a pH neutro mediante polímeros ácidos asociados a la membrana, como los ácidos galacturónico, glucónico, glutámico y aspártico que reducen el pH de la superficie gracias a sus cargas negativas (Castillo Rodríguez, 2005).

#### **1.4.3.4. Salinidad**

Según Islas y colaboradores (2007), los organismos tolerantes a las diferentes concentraciones de sal, se encuentran distribuidos en las zonas costeras donde existen descargas marinas o en reservorios de sales minerales. Se consideran halófilos, a los microorganismos que pueden vivir en un hábitat cuyo contenido de sal sea al menos del 8%. Pueden ser clasificados como se describe en la tabla 3.

**Tabla 3**  
**Clasificación de organismos según su tolerancia a la sal**

<b>Organismos</b>	<b>Salinidad</b>
Halófilos discretos:	requieren 1-6% NaCl
Halófilos moderados	requieren 6-15% NaCl
Halófilos extremos	requieren 15-30% NaCl

Fuente: (Islas, Velasco, Becerra, Delaye, & Lazcan, 2007)

Los microorganismos que se destacan en este grupo son algas marinas, cianobacterias marinas y de agua dulce, ciertas bacterias fototróficas y arqueobacterias se denominan halófilas extremas. También existen algunos organismos del dominio Eucariota que sobreviven a éstas condiciones como por ejemplo *Dunaniella salina* (Islas, Velasco, Becerra, Delaye, & Lazcan, 2007).

#### **1.4.4. Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo**

##### **1.4.4.1. Extracción de ADN**

El ADN genómico es utilizado para identificar las características genéticas de los microorganismos (Amaru, y otros, 2006 ). La extracción del material genético consiste en tres etapas: disgregación celular, inactivación de las nucleasas intracelulares y la separación de los ácidos nucleicos del resto de los componentes celulares (Jiménez, Gobernando, & Sánchez, 2012).

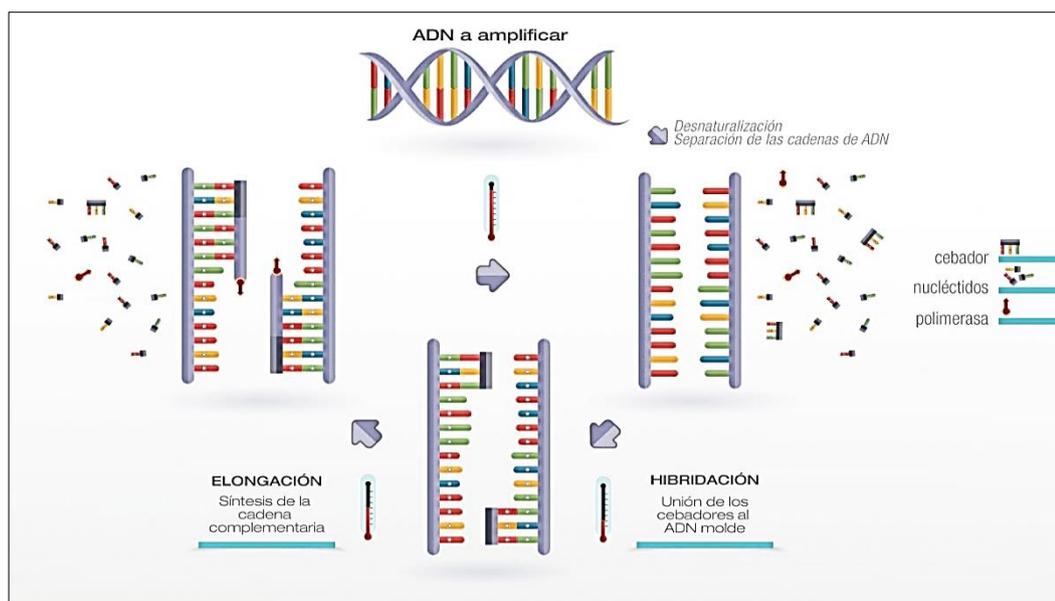
Los protocolos de extracción celular pueden ejecutarse mediante distintas técnicas que permitan la obtención del material genético de forma íntegra. El primer paso puede realizarse por medios mecánicos o con el uso de químicos que fraccionen la pared celular, las proteínas y el ADN son liberados de la célula y son precipitados por medio de sales y enzimas que evitan la degradación de ADN. Posteriormente, con ayuda de alcohol, se lava el ADN genómico y se lo precipita a bajas temperaturas. Finalmente es diluido en agua estéril o soluciones que mantienen un pH neutro para evitar la degradación (Bruns, Ashwood, & Burtis, 2007).

##### **1.4.4.2. PCR**

La técnica molecular de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) permite identificar a los microorganismos de un modo más eficiente. Fue inventada por el bioquímico estadounidense Kary Mullis en 1983, y ha sido incluida en diferentes estudios dentro de los campos de las ciencias biológicas, agropecuarias y salud; con el objetivo de la identificación de especies mediante análisis filogenéticos (Rodríguez Sánchez & Barrera Saldaña, 2004).

Es una técnica que permite multiplicar una secuencia de ADN que se obtiene a partir de las extracciones celulares, dando como resultado millones de copias de un fragmento altamente conservado del genoma como los genes ribosomales 16S en bacterias, 23S en algas y la región ITS en hongos (Mas, y otros, 2001). Esta característica permite establecer las distancias filogenéticas entre las especies (Herrera, 2007).

El proceso se lleva a cabo en reacciones que contienen agua, buffer de PCR,  $MgCl_2$  o  $KCl$ , dNTPs, cebador delantero, cebador reverso, ADN molde y la enzima polimerasa. Son colocadas en un termociclador que se programa con las condiciones específicas de temperatura a las que los cebadores trabajan mejor. Generalmente consisten en 30 o 40 ciclos, que repiten tres etapas: Desnaturalización ( $95^{\circ}C$ ), donde las cadenas de ADN se abren formando cadenas sencillas. Alineamiento, etapa en la que el equipo se ajusta a temperaturas entre  $40^{\circ}C$  y  $60^{\circ}C$ , que permite la formación de puentes de hidrógeno entre oligonucleótidos y ADN, crea una región de doble cadena y la polimerasa se alinea a este fragmento en sentido  $5'$  a  $3'$ , agrega unas bases nitrogenadas que refuerzan esas uniones. Finalmente la temperatura se sube a  $72^{\circ}C$ , lo que permite la etapa de extensión, momento en el que la polimerasa alcanza su actividad máxima. El ciclo continua con la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los nuevos ofragmentos una vez que se encuentran alineados como se observa en la figura 1 (Vinuesa-Burgos, 2009).



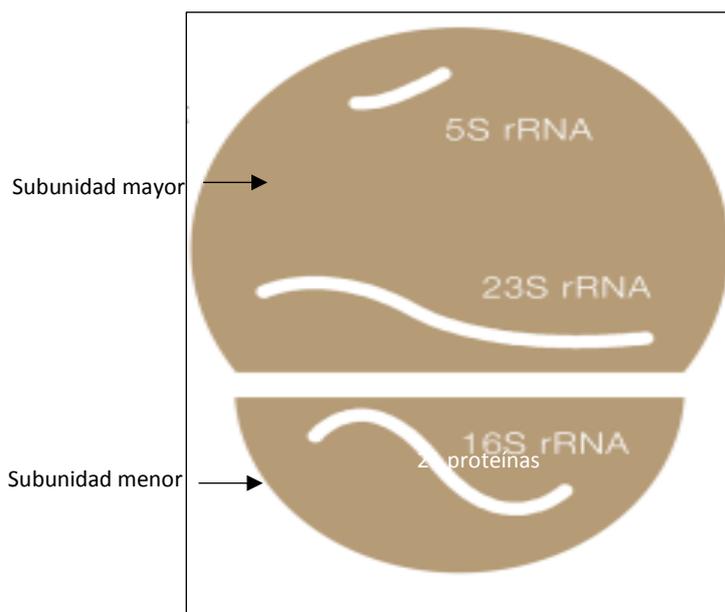
**Figura 1. Etapas de la Técnica de PCR**

**Fuente: (Agrobiotecnología, 2017)**

#### **1.4.4.2.1. Gen ribosomal 16S**

El ribosoma bacteriano se encuentra compuesto por dos subunidades de tamaños desiguales, una de 50S (1542 pb) y la otra de 30S (1542 pb), con un valor total de sedimentación de 70S; el gen ribosomal 16S es un

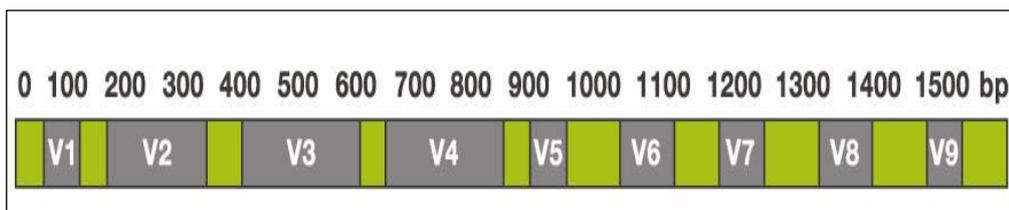
componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariontes, que además posee 21 proteínas diferentes (figura 2). Las secuencias que codifican genes ARNr se encuentra altamente conservadas y contiene información natural del microorganismo y es usada para determinar, mediante comparaciones, la distribución universal de mismo. Por lo que esta macromolécula se toma en cuenta dentro de estudio relacionados con filogenia y taxonomía bacterianas (Herrera, 2007).



**Figura 2. Subunidades de un ribosoma procarionte**

**Fuente: (ChunLab, 2017)**

El gen ribosomal 16S ARNr es un polirribonucleótido que contiene aproximadamente 1500 nucleótidos, se denomina como ADN ribosomal 16S, está conformado por una cadena sencilla que se pliega, adquiriendo una estructura secundaria, caracterizada por tener segmentos de doble cadena que permiten la formación de asas y hélices. Contiene regiones conservadas y regiones menos conservadas o hipervariables (figura 3). Las regiones conservadas son de gran ayuda para el diseño de iniciadores universales que permitan la amplificación de las regiones hipervariables de la mayoría de los ARNr de los microorganismos presentes en una comunidad, a su vez, las regiones menos conservadas (hipervariables) aportan información útil para los estudios de filogenética y taxonomía entre especies (Valenzuela-Gonzalez, Casillas-Hernandez, Villalpando, & Vargas-Albores, 2015).



**Figura 3. Regiones conservadas (color verde) e hipervariables (V1-V9, color gris) de un gen ARN r 16S**

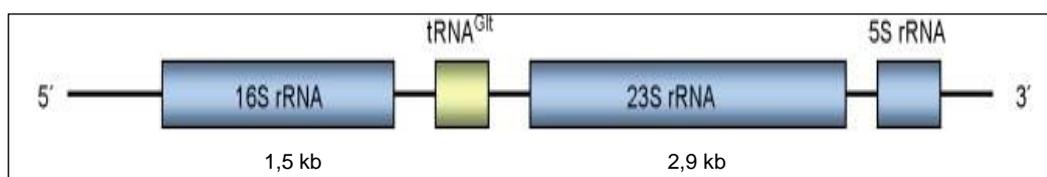
**Fuente: (ChunLab, 2017)**

El análisis del gen ARNr 16S permite plantear comparaciones entre especies bacterianas, donde puede alcanzar valores de confiabilidad hasta un 97% de secuencias idénticas, es decir, el microorganismo tiene una alta probabilidad de que pertenezca o no a una misma especie y se puede evaluar las distancias evolutivas entre ellas (Vasek, Hebert, De Giori, Rata, & Fusco, 2005).

#### **1.4.4.2.2. Gen ARNr 23S**

El análisis de la secuencia correspondiente al gen ARNr 23S puede aportar más información acerca de las relaciones filogenéticas de especies de microalgas y bacterias debido a que este gen ribosomal contiene regiones más variables (figura 4) (Sallen, Rajoharison, Desvarenne, Quinn, & Mabilat, 1996).

Por lo tanto, puede ser usado para determinar la distancia filogenética de especies que han sido estrechamente relacionadas a partir del gen ARNr 16S, mostrando un alto grado de variabilidad al comparar estos dos genes (Van der Giessen, Haring, & Van der Zeijst, 1994). Sin embargo su uso se ha visto obstaculizado principalmente debido a su gran tamaño de aproximadamente 2,9 kb, es aproximadamente dos veces más grande que el gen ribosomal 16S (Sallen, Rajoharison, Desvarenne, Quinn, & Mabilat, 1996).



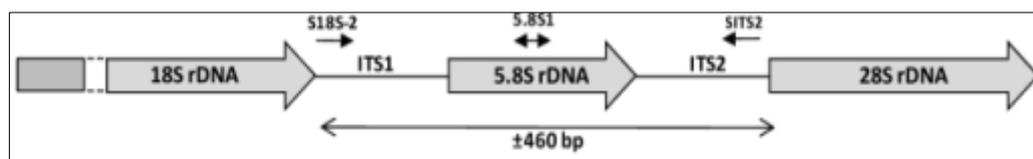
**Figura 4. Gen ARNr 23S**

**Fuente: (Sidney, 2004)**

### 1.4.4.2.3. Región ITS

El ribosoma eucariótico, se encuentra constituido por las unidades 18S, 5.8S y 28S (figura 5). La región ITS (Internal Transcribed Spacer), corresponde a la unidad 5.8S, que se encuentra localizada entre 18S y 28S. La subunidad ARNr 18S se la usa comúnmente para estudios filogenéticos, homológamente al gen 16S usado para diagnóstico bacteriano, pues tiene menor variabilidad para el reino fungi. Mientras que el gen 28S rRNA se usa para discriminar especies, sola o en conjunto con las región ITS (Schoch, y otros, 2012).

Esta región se considera un requisito para la caracterización y clasificación a nivel de orden, familia, género y especie de organismos del reino fungí, permitiendo una medida de las distancias filogenéticas. Además, su velocidad de evolución permite evaluar la variación interespecifica de una amplia diversidad de organismos eucariotas como hongos, algas, protozoos, vertebrados, entre otros (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).



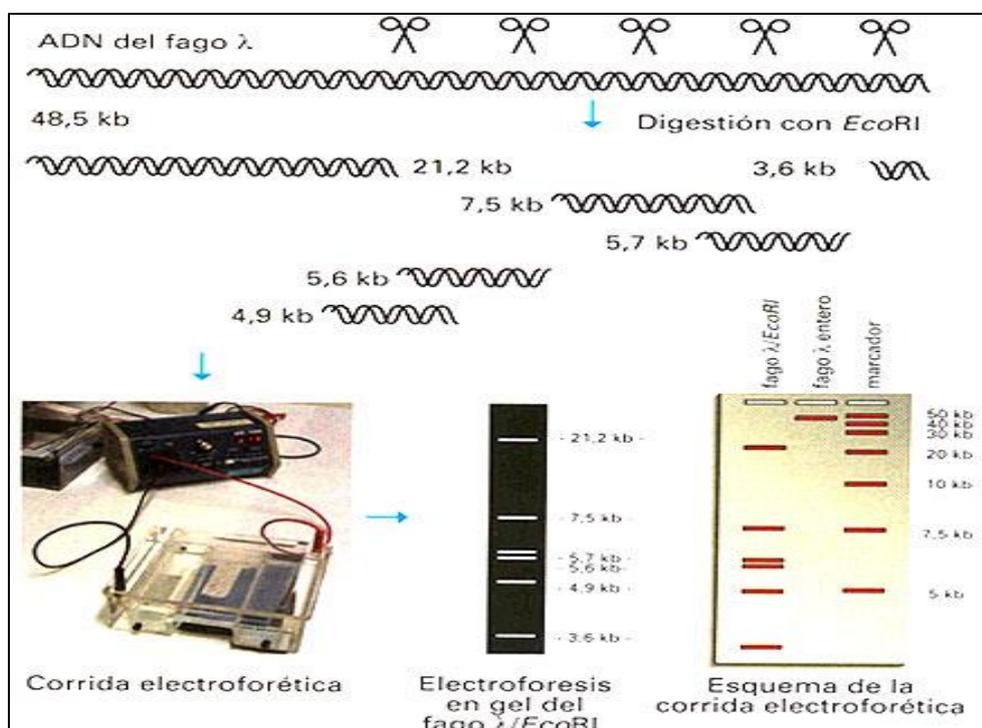
**Figura 5. Región ITS**

**Fuente: (Quaedvlieg, y otros, 2011)**

### 1.4.4.3. RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

El Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, conocidos como RFLP, es una técnica introducida a partir de 1984 por Alec Jeffreys en investigaciones de enfermedades hereditarias. El ADN es tratado con una o más endonucleasas, conocidas como enzimas de restricción que cortan el genoma en sitios específicos de nucleótidos (cada enzima de restricción reconoce y corta en un sitio único de restricción), generando un número de fragmentos de ADN de diferentes longitudes (figura 6). Luego el patrón de bandas polimórficas correspondientes a los fragmentos pueden ser reveladas por medio de un gel de electroforesis (Ratón, 2004).

Algunos estudios utilizan una variante de la técnica, conocida como RFLP-PCR. En ella se amplifican fragmentos específicos de ADN por PCR (genes 16s, Región ITS, entre otros) y luego son tratados con las endonucleasas de restricción para determinar las relaciones filogenéticas entre especies (Poussier, y otros, 2000)



**Figura 6. Esquema de análisis por RFLPs**

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

#### **1.4.4.4. Secuenciación Sanger**

El método original de Sanger es conocido como método de los didesoxinucleótidos (ddNTP), debido a que estos nucleótidos desempeñan un papel fundamental en el fragmento que copian. A diferencia de nucleótidos naturales, éstos carecen de un oxhidrilo en la posición 3' de la desoxirribosa, de modo que tras su unión con la copia del fragmento sintetizado, evita más repeticiones; además cada uno lleva unido un colorante fluorescente diferente. El proceso consta de cuatro reacciones separadas y cada una trabaja con un nucleótido modificado (ddNTP-flúor). Al final se obtienen fragmentos de diferentes longitudes. Para finalizar se corre en un gel de electroforesis y mediante un láser se excita la fluorescencia de cada marcador o ddNTP-flúor y se determina el color al que corresponde. La sucesión de

colores equivale a la sucesión de bases de nucleótidos que se encuentran codificando el ADN (Solari, 2004).

La secuenciación de Sanger es la técnica más utilizada y efectiva para el análisis de secuencias de ADN. Permite la determinación de cualquier fragmento genómico que ha sido previamente purificado (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2008). Su procedimiento es realizado por medio de enzimas de restricción, las cuales permiten la obtención de numerosas copias de una secuencia de ADN. Hoy en día, es posible analizar secuencias de cualquier fragmento de ADN proveniente de extractos de ADN que han sido amplificados por la técnica de PCR (Jiménez, Gobernando, & Sánchez, 2012).

#### **1.4.4.5. Secuenciación masiva - Illumina**

La secuenciación masiva es una técnica que nace por la necesidad de generar más reacciones de secuenciación en paralelo. Esta técnica, incorpora la detección óptica de emisión de fluorescencia de los nucleótidos implantados para determinar la composición de la hebra de ADN (Cadena-Zamudio, Martínez-Peña, Guzmán-Rodríguez, Arteaga-Garibay, & De Morelos, 2016). La luz se interpreta en flujogramas para que puedan ser analizados por un programa informático y regresa la información de las secuencias de nucleótidos que contiene (Bautista, 2010).

Es un proceso mucho más eficiente, que permite analizar todas las secuencias de ADN que se encuentran contenidas en las muestras de agua o sedimentos. Permite obtener la mayoría de organismos existentes, incluyendo aquellos no cultivables (Vasek, Hebert, De Giori, Rata, & Fusco, 2005).

#### **1.4.4.6. Análisis bioinformáticos**

Los análisis de bioinformática se desarrollan por la integración de varias disciplinas (biología, computación y tecnología de la información). Pueden ser realizados gracias a la aparición de bases de datos que contienen información de las secuencias de microorganismos como NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EUA) que permite el acceso libre para que los investigadores puedan realizar comparaciones entre secuencias de

nucleótidos y aminoácidos (Garza-Ramos, Silva-Sánchez, & Martínez-Romero, 2009).

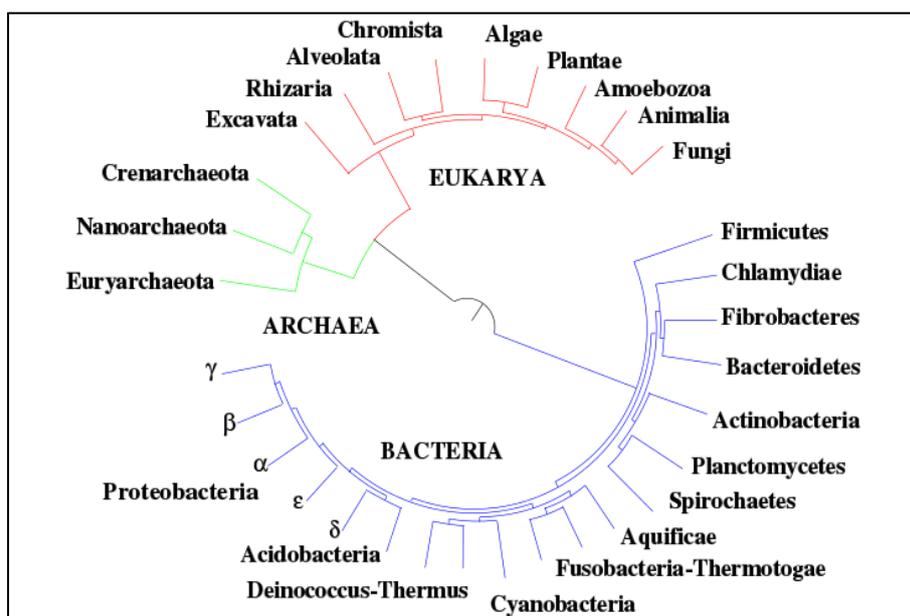
Para que el análisis de datos sea eficiente es necesario realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas, lo que da como resultado una secuencia consenso que se compara en la base de datos mediante un BLASTN (Salavert Torres, 2011).

BLASTN es una herramienta del National Center for Biotechnology Information, NCBI. Determina el porcentaje de identidad, porcentaje de cobertura de las secuencias, la puntuación del alineamiento (S) y el valor E. (NCBI, 2017).

#### **1.4.4.7. Árboles filogenéticos**

Los arboles filogenéticos aparecen a partir de la Teoría de la evolución de Charles Darwin que aparece en su obra “Origen de las especies” en 1859. Consiste en una representación esquemática de organismo y microorganismos que tienen un descendiente común (Mendoza, 2012), y se ubican mediante relaciones anidadas y jerárquicas, se puede establecer la descendencia evolutiva (figura 7) (Lessa, Tomasco, & D’Anatro, 2015).

En la actualidad, con el avance de la biología molecular, se puede construir los árboles filogenéticos a partir del análisis de moléculas como ADN, ARN o proteínas. Generalmente se usa el ADN, debido a que proporciona mayor información y permite estudiar especies cercanamente emparentadas (Mendoza, 2012). La construcción de árboles filogenéticos se lleva a cabo mediante el uso de programas bioinformáticos como genious y mega7 (Lessa, Tomasco, & D’Anatro, 2015).



**Figura 7: Árbol filogenético**

**Fuente: (Letunic, 2007)**

#### **1.4.4.8. Aplicaciones**

La búsqueda sistemática de usos sostenibles de los elementos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad, es conocida como Bioprospección (Gómez-Rodríguez, 2008). La diversidad microbiana es una herramienta importante para la generación de productos y procesos (Ríos, Crespo, Terrazas, & Alvarez, 2007), por ejemplo en la industria se ha logrado determinar buenos resultados al introducir microorganismos, que aumentan la estabilidad y rendimiento del proceso, permitiendo un completo control sobre variables como la viscosidad y fluidez (Panda, Sahu, & Tayung, 2012).

Los procesos biotecnológicos se han centrado en las propiedades y ventajas que pueden otorgar los microorganismos que habitan ambientes extremófilos, debido a que las condiciones, de un proceso industrial, imitan a las de su entorno (Ríos, Crespo, Terrazas, & Alvarez, 2007), de ahí nace la necesidad de la identificación y caracterización de la diversos microorganismos.

Los microorganismos termófilos pueden ser usados como vectores para la obtención de subproductos o pueden intervenir dentro de procesos de remediación y descontaminación del medio ambiente gracias a la

termoestabilidad en sus enzimas y proteínas, esta característica se debe a que poseen interacciones moleculares como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos, enlaces a metales y puentes de disulfuro, también cuentan con sustituciones de ciertos aminoácidos dentro de la estructura, lo que las fortalece aún más y les confiere la característica de resistencia a los efectos de desnaturalización (Pedroza, Álvarez, & Poutou, 1997). Por lo tanto pueden representar una alternativa a los procesos químicos convencionales (Ríos, Crespo, Terrazas, & Alvarez, 2007).

Algunas enzimas termoestables que han sido utilizadas dentro del campo de la biología molecular, fueron aisladas de microorganismos termófilos como en el caso de DNA polimerasas, DNA ligasas, restrictasas y fosfatasas (Suarez Nunez, Alazard, Vives Ramirez, Monroy Hermosillo, & Fernandez Linares, 2002).

Otros microorganismos son usados como productores de enzimas que intervienen en procesos como: la reducción de los compuestos clorados y dióxidos de cloro en la industria del papel (celulasas y xilanasas), la hidrólisis de componentes que interfieren en la producción de vino (D-xilosidasa, componente del complejo hemicelulítico), en el procesamiento de alimentos y biocombustibles (glucosidasa) (Ríos, Crespo, Terrazas, & Alvarez, 2007).

#### **1.4.5. Descripción de las Fuentes Geotermales**

Los sistemas geotermales por lo general se ubican en zonas delgadas de las placas tectónicas, poseen condiciones de temperatura alta, propias de la actividad volcánica de la corteza terrestre, que permite crear impresionantes puntos de salida como los grandes géiseres en el parque Yellowstone, ubicado en Wyoming –Montana (Panichi & La Ruffa, 2007). Sin embargo, existen otras áreas donde la corteza terrestre no es tan delgada, pero permiten la manifestación de aguas termales, este es el caso de las piscinas calientes mineralizadas, o incluso flujos subterráneos que dejan a su paso, la formación de sedimentos como piedras calizas (Brock & Darlan, 1970). En Ecuador, se pueden observar muchas fuentes mineralizadas, entre ellas están El Riñón y

Guapán ubicadas en las provincias de Azuay y Cañar, respectivamente, que son objeto de este estudio.

#### **1.4.5.1. Fuente geotermal El riñon – provincia de Azuay**

La fuente geotermal El Riñon, se encuentra ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia de Baños a 8 km sur-oeste de la ciudad de Cuenca, con coordenadas de longitud 79°0,3'701"O y latitud 2°55'352"S, aproximadamente a una altura de 2700 mts. Posee una temperatura variable de 32 a 34°C, puede ser considerada como geoterma de aguas mesófila (Mercurio, 2011). Sin embargo, la temperatura de esta fuente puede variar de acuerdo a la temporada del año en la que se encuentra, de acuerdo a Quinche & Velastegui (2014), se han registrado temperaturas de hasta 72°C, en su estudio comparativo entre las fuentes geotermales El Riñón y Baños de agua Santa. En la tabla 4 se observan los datos hidrogeoquímicos de la fuente geotermal El Riñón, que se realizaron en el estudio.

**Tabla 4**  
**Datos hidrogeoquímicos de la fuente geotermal El Riñón**

Parámetro	Valor reportado
T °C	72
pH	6.5 a 7.0
Na <sup>+</sup>	748,40 mg/L
K <sup>+</sup>	55,75 mg/L
Ca <sup>++</sup>	118,96 mg/L
Mg <sup>++</sup>	28,08 mg/L
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<0,001 mg/L
Fe <sup>+</sup>	<0,5
Mn <sup>+</sup>	0,078 mg/L
Conductividad	<3 900 [uS/cm]
Dureza	412 mg/L
Salinidad	Alta

Fuente: (INAMHI., 2013)

#### **1.4.5.2. Fuente geotermal Guapán- provincia de Azogues**

La fuente geotermal Guapán, se encuentra ubicada en la provincia de Cañar, cantón Azogues, parroquia Guapán, km. 65 vía Quito – Guapán, 15 minutos de la ciudad de Azogues (González Rodríguez, 2011). Con coordenadas de longitud 78°50'820"O y altitud 2°42'566"S.

aproximadamente a una altura de 2688 mts. Se encuentra a una temperatura variable de 45 – 55.5°C. Es considerada una fuente geotermal termófila (Mercurio, 2011). No se han reportado datos de los estudios fisicoquímicos para esta fuente geotermal.

### **1.5. Hipótesis de la investigación**

El agua y sedimentos provenientes de las aguas geotermales: el Riñón- Provincia del Azuay y Guapán- Provincia del Cañar contienen bacterias, algas y hongos mesófilos y termófilos cultivables.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1. Participantes**

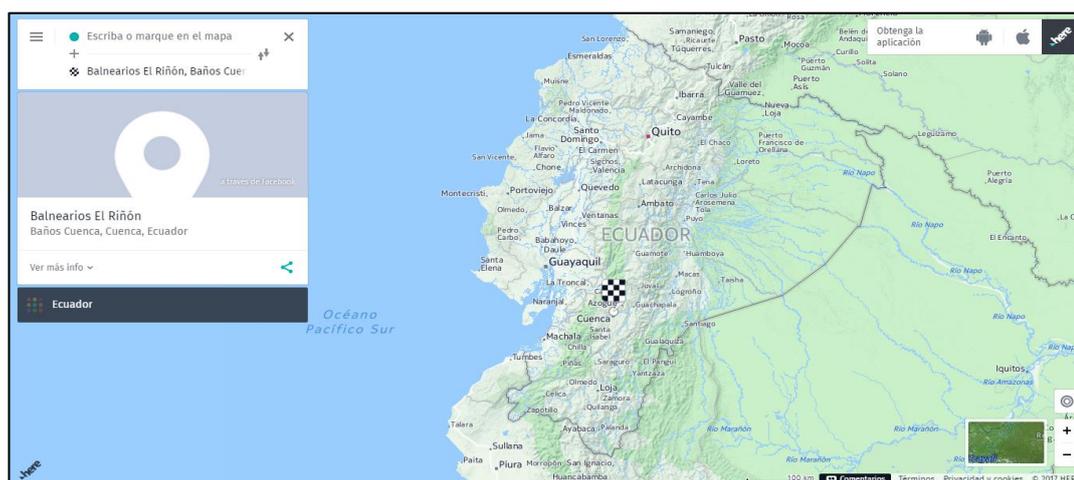
El proyecto de tesis fue desarrollado por la señorita Yanara Gabriela Naranjo Rojas, con la colaboración de MSc. Alma Koch, directora del proyecto de investigación y Andrés Izquierdo, Ph.D., como asesor científico.

#### **2.2. Localización geográfica**

El proyecto de investigación constó de dos fases de trabajo. La primera fue una fase de campo, en la que se llevó a cabo la recolección de muestras a partir de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán. La segunda se realizó a nivel del laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, para el aislamiento e identificación de bacterias, algas y hongos proveniente de las muestras recolectadas.

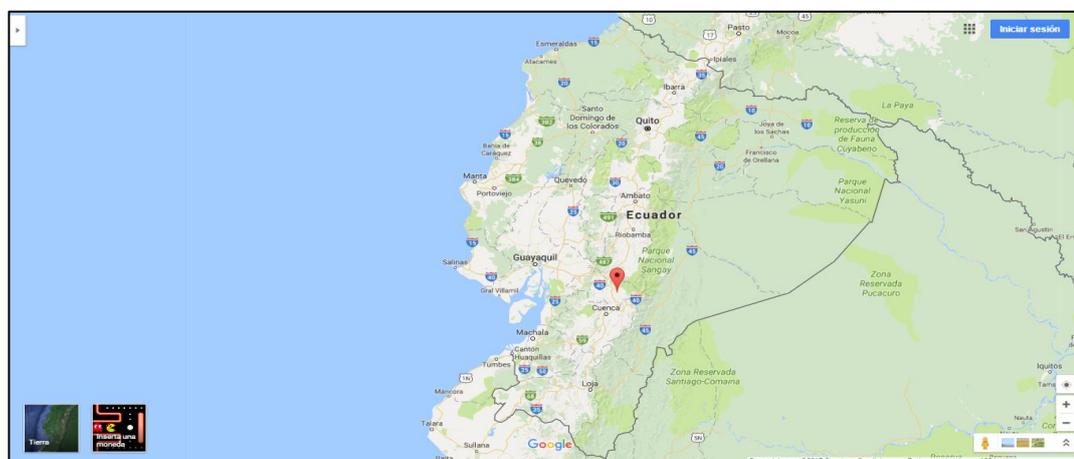
##### **2.2.1. Localización de la fase de campo**

Para la fase de campo, se realizó la toma de muestras de dos zonas del Ecuador: La primera en la provincia de Azuay, cantón Cuenca, parroquia de Baños (El Riñón), con coordenadas de longitud  $79^{\circ}0,3'701''\text{O}$  y latitud  $2^{\circ}55'352''\text{S}$ , aproximadamente a una altura de 2700 mts; y la segunda en la provincia de Cañar, cantón Azogues, parroquia Guapán, km. 65 vía Quito – Guapán, con coordenadas de longitud  $78^{\circ}50'820''\text{O}$  y altitud  $2^{\circ}42'566''\text{S}$ , aproximadamente a una altura de 2688 mts. (Figuras 9 y 10 respectivamente).



**Figura 8. Ubicación geográfica de las fuentes geotermales el Riñón-  
provincia de Azuay**

**Fuente: (GoogleMaps, 2017)**



**Figura 9. Ubicación geográfica de las fuentes geotermales Guapán-  
provincia del Cañar**

**Fuente: (GoogleMaps, 2017).**

### 2.2.2. Localización de la fase de laboratorio

La fase de aislamiento e identificación de bacterias, hongos y algas mesófilos y termófilos proveniente de las aguas geotermales, se realizará en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, ubicado en la Av. El Progreso s/n, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador; con

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

### **2.3. Periodo de investigación**

La investigación se desarrolló desde Abril de 2016 hasta Febrero de 2017, con una duración de 11 meses.

### **2.4. Metodología**

La realización del presente proyecto constó, como ya se mencionó, de dos etapas para lograr cumplir con el objetivo: fase de campo y fase de laboratorio.

#### **2.4.1. Fase de Campo**

##### **2.4.1.1. Caracterización del sitio de muestreo**

Para la caracterización fisicoquímica de las fuentes geotermales se recolectó 2 L de agua y 1 Kg de sedimentos en recipientes estériles que fueron almacenados a 4°C como recomienda Freire, 2008, y posteriormente fueron llevadas al laboratorio del Centro de Servicios Ambientales y Químicos (CESAQ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, donde se realizaron los análisis.

Las muestras fueron tomadas una sola vez en cada una de las fuentes geotermales y se etiquetaron con los siguientes parámetros: Coordenadas y altitud: mediante la ayuda de un GPS; Temperatura: mediante un termómetro digital se determinó la temperatura a la que se recogió la muestra; y pH: con un pH-metro, se tomó el valor al que se encontraban las termas en ese instante.

##### **2.4.1.2. Toma de muestras**

La toma de muestras se realizó el 7 de abril de 2016. Para esta fase primero se estableció el mejor sitio de muestreo, que son los ojos de agua de las fuentes geotermales, como se observa en la figura 10 (El Riñón) y figura 11 (Guapán), Los ojos de agua son los lugares donde se observa el

nacimiento o brote de agua directamente de aberturas en la tierra de cada una de las termas. Se establecieron dos puntos de muestreo en cada geoterma:



**Figura 10. Fuente geotermal El Riñón – provincia de Azuay**



**Figura 11. Fuente geotermal Guapán –provincia del Cañar**

Se mantuvo condiciones estériles para las herramientas de recolección de muestras. Además se usó implementos de protección personal: guantes y mandil.



**Figura 12. Recolección de muestras Fuente geotermal El Riñón y Guapán respectivamente**

#### ***2.4.1.2.1. Muestras para aislamiento de bacterias y hongos***

Para el aislamiento de bacterias y hongos se procedió a recolectar sedimentos con ayuda de isopos estériles y se colocó en un tubo con 6mL de medio de cultivo líquido: Czapek (medio mineral de pH 7) y Caldo nutriente (medio enriquecido a pH 7). Las muestras se recogieron por triplicado en cada uno de los puntos. Posteriormente se realizó el aislamiento de bacteria a partir del medio Czapek y hongos a partir del Caldo nutriente. Se mantuvieron las muestras a 30°C (el Riñón) y 50°C (Guapán) aproximadamente hasta su procesamiento en el laboratorio.

#### ***2.4.1.2.2. Muestras para aislamiento de microalgas***

Para la recolección de muestras de algas mesófilas y termófilas se procedió a tomar rocas (con crecimiento de algas) en tubos falcon de 50mL y en fundas ziploc estériles para las dos termas. Se mantuvieron las condiciones de temperatura de acuerdo al sitio de aislamiento.

### **2.4.1.2.3. Muestras para Secuenciación masiva - Illumina**

Para los análisis de secuenciación masiva - Illumina se realizó la recolección de agua y sedimentos en tubos falcon de 50mL. El procedimiento se lo realizará por duplicado en cada una de las termas y se mantuvieron las condiciones de temperatura de cada terma.

## **2.4.2. Fase de Laboratorio**

### **2.4.2.1. Procesamiento y siembra de las muestras**

Para el cultivo de bacterias se procesó las muestras de la siguiente manera: De las muestras de sedimentos se tomó 1mL de medio líquido (Czapek líquido) y se inoculó por la técnica de extensión, en el mismo medio, pero sólido. Para las muestras de agua, se tomó directamente 1mL y se inoculó en medio sólido Czapek. Posteriormente se incubó por 24 a 48 horas a la temperatura de 30°C (el Riñón) y 50°C (Guapán), este procedimiento se realizó por duplicado (Nava-Pérez, García-Gutiérrez, Camacho-Báez, & Vázquez-Montoya, 2012).

El aislamiento de hongos se realizó mediante el mismo protocolo descrito anteriormente. Se tomó 1mL de cada muestra de sedimentos recolectada en caldo nutriente y se sembró por extensión en PDA, posteriormente se incubó a las temperaturas de cada una de las termas. Se esperó crecimiento en un periodo de cinco a siete días (Islas, Velasco, Becerra, Delaye, & Lazcan, 2007).

Para el cultivo de algas se agito el recipiente que contenía la muestra (para lograr un desprendimiento) o realizó un frotis directamente sobre la superficie de la roca con algas. Posteriormente se inoculó tres gotas en los medios sólidos Algae, Nitrofosca, BG11, BG110, mediante la técnica de extensión. Cada caja se colocó bajo un fotoperiodo de 24h de luz (entre 1000 y 2000 lux) y 24h de oscuridad. Se mantuvieron a temperatura ambiente. Finalmente se incubó por un periodo de 7 días o hasta su crecimiento (Naranjo, y otros, 2016).

La composición de cada medio utilizado se encuentra en el anexo B.

#### 2.4.2.2. Determinación de las características macroscópicas del cultivo

Una vez obtenido el crecimiento de los microorganismos en las cajas petri, se observaron diferentes morfologías de colonias que fueron evaluadas de acuerdo los criterios de caracterización que se encuentran descritos en la tabla 5 para las cepas de bacterias y microalgas. Para la cepa fúngica, se observó la pigmentación y el aspecto del micelio.

**Tabla 5**  
**Criterios a evaluarse de las colonias aisladas.**

Forma de la colonia	Ejemplos
Puntiforme (cabeza de alfiler)	
Circular	
Filamentosa	
Irregular	
<b>Elevación de la colonia</b>	
Plana	
Elevada	
Convexa	
<b>Bordes de la colonia</b>	
Uniforme (liso)	
Irregular	

Fuente: (Forbes, 2009)

#### 2.4.2.3. Determinación de las características microscópicas del cultivo

Con el objetivo de confirmar la pureza de las cepas de bacterias se realizó la tinción diferencial Gram para la determinación de la morfología de las bacterias y si son Gram positivas o negativas; mientras que para microalgas y hongos se observó al microscopio directamente la de algas y hongos. Se utilizó el microscopio Olympus CX21, con un aumento de 100X.

#### **2.4.2.4. Aislamiento de microorganismos a partir de las colonias**

Para el aislamiento se volvieron a sembrar las bacterias mediante la técnica de estriado en una nueva caja petri con medio sólido Czapek, el mismo procedimiento se realizó para las algas y se sembró en medio sólido BG11. Mientras que los hongos fueron replicados al cortar un cuadrado de agar con micelio en crecimiento que se sembró en el medio PDA con bactericida. Las cajas se dejaron incubar por 24 horas a las temperaturas de las termas.

Una vez que se observó el crecimiento de bacterias y microalgas, se seleccionaron colonias individuales que se encontraron dentro del estriado y se les pasó tubos con medio inclinado. Se corroboró que solo se tomara una colonia y se volvió a verificar la pureza mediante tinción diferencial Gram (Forbes, 2009). El mismo procedimiento se realizó en microalgas y hongos.

#### **2.4.2.5. Preparación del cepario**

Las cepas de bacterias, hongos y microalgas fueron conservadas por criopreservación en glicerol. Para ello se sembró cada cepa en medio líquido hasta obtener abundante biomasa. Luego se tomó 800  $\mu$ L de caldo inoculado y se colocó 200  $\mu$ L de glicerol en tubos ependorf de 2 mL. Se dejó a -20 °C por una semana y posteriormente se las guardó a -80 °C. La cepa fúngica se sembró en medio PDA inclinado y se cubrió completamente con aceite mineral. Se mantuvo a 4 °C.

#### **2.4.2.6. Extracción de ADN**

La identificación molecular de microorganismos aislados se realizó mediante diferentes protocolos:

Para las cepas bacterianas se utilizó un método de extracción enzimático (Arce, Quesada, Montero, & Platero, 2007), anexo C1.

El ADN de la cepa fúngica se extrajo mediante el protocolo de "Minipreparación de ADN" (Weising, Nybom, Wolff, & Meyer, 1995), descrito en el anexo C2.

Para el aislamiento de ADN de cada microalga se realizó con ayuda del método un método mecánico de ruptura celular mediante perlas de vidrio descrito por (Cai & Wolk, 1990). Los pasos se describen en el anexo C3.

Para las muestras de sedimentos y agua (secuenciación masiva - Illumina) se realizó la extracción de ADN, mediante los kits de extracción: Power Soil DNA Isolation Kit y Power Water Isolation Kit de la casa comercial MoBio, los pasos se detallan en el anexo C4.

Todas las concentraciones de ADN extraído fueron cuantificadas mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop 8000UV-Vis y se determinó los radios de pureza para cada muestra.

#### **2.4.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Posteriormente se amplificó las secuencias de los genes 16S, ITS y 23S para las cepas aisladas de bacterias, hongos y algas respectivamente. Se utilizó un volumen final de PCR de 25µL. La preparación de la Master Mix, se realizó con el kit GoTaq® GreenMasterMix de Promega, de acuerdo como se indica en la tabla 6.

**Tabla 6**  
**Componentes de la PCR.**

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

\*La concentración de cebadores fue de 0,5µM para 16S rRNA, 23S rRNA e ITS.

Una vez obtenido la reacción de 25 µL de la Máster Mix, se colocó en el Termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de alineamiento (tabla 7) por 1min, 72°C por 1 min y 72 por 7,5 min. Finalmente se mantuvo a 4°C por 10 min.

**Tabla 7**  
**Cebadores para PCR de Bacterias (16S rRNA), microalgas (23SrRNA) y hongos (ITS).**

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	T <sup>a</sup>	Tamaño **	Referencia
<b>ARNr</b>	27F	AGATTTGATYMTGGCTCAG	55	~1500p	Cihan <i>et al.</i> , 2012
<b>16S</b>	1492R	ACGGYTACCTTGTTACGACTT		b	
<b>ARNr</b>	p23SrV_f1	GGA CAG AAA GAC CCT ATG	55	~410pb	Sherwood & Presting, 2007
<b>23S</b>		AA			
	p23SrV_r1	TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG			
<b>ITS</b>	ITS1F-Bt1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	55	~650pb	White, <i>et al.</i> , 1990
	ITS4Rbt	TCCTCCGCTTATTGATATGC			

\*T<sup>a</sup> = Temperatura de alineamiento de los cebadores. \*\*Tamaño del fragmento de amplificado.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en un gel al 1% de agarosa con el visualizador GelStar™ (10X concentrado en DMSO). La electroforesis se realizó a 100 V, 300 mA por un tiempo de 40 min. Se utilizó un marcador molecular 1 kb ADN Ladder (Promega). Finalmente se observó el gel de agarosa en el equipo High Performance UV - transiluminador.

#### 2.4.2.8. Análisis de RFLPs

Debido al número de cepas bacterianas obtenidas se procedió a realizar un análisis de RFLPs con el objetivo de identificar las cepas iguales. Se utilizaron los productos de PCR obtenidos a partir de las cepas bacterianas y se pusieron en contacto con la enzima MspI (BioLabs), encargada de realizar el proceso de digestión de las muestras, cortando en las secuencias CCGC para la hebra superior y GGCC para la cadena complementaria. El volumen final de las muestras fue de 20 µL como se observa en la tabla 8.

**Tabla 8**  
**Componentes de la reacción de RFLPs**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10X NE buffer	2
BSA 100X	0,2
MspI	0,25
Agua ultra pura	7,55
Producto de PCR	10
Volumen final	20

Fuente: (Adley *et al.*, 2006).

Se incubó las reacciones a temperatura de 37 °C por 2 h. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un gel de electroforesis al 1% agarosa, bajo las siguientes condiciones: a 100 V y 300 mA por 50 min. Se utilizó un marcador molecular 1 kb DNA ladder (Promega). El gel fue revelado en el equipo transiluminador (High Performance UV) y se observaron los patrones de fragmentos de restricción para cada una de las cepas bacterianas. Las cepas fueron clasificadas de acuerdo a la similitud en los patrones de corte en diferentes grupos.

#### **2.4.2.9. Secuenciación**

Finalmente, los productos de PCR de las cepas de bacterias, algas y hongos obtenidos fueron enviados a la compañía MacroGen en Korea, para su posterior purificación y secuenciación. El volumen enviado por cada muestra fue de 20  $\mu\text{L}$  a una concentración de aproximadamente 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Además se enviaron 25  $\mu\text{L}$  de cada cebador a una concentración 10 nM (tabla 7).

#### **2.4.3. Análisis de secuencias**

##### **2.4.3.1. Ensamblaje de Secuencias**

Los resultados de las secuencias de ADN enviadas por la empresa MacroGen (Korea), fueron analizadas mediante el uso del software Geneious 10.0.8. Posteriormente las secuencias forward y reverse fueron ensambladas para construir los contigs con una alta sensibilidad, utilizando un límite de

probabilidad de error de 0.02. Finalmente se obtuvieron las secuencias consenso.

#### **2.4.3.2. Análisis de similitud y homología**

Con ayuda de BLASTN se corrieron las secuencias consenso y fueron comparadas con secuencias de material tipo (organismos autenticados y cultivables) de la base de datos NCBI. Se analizaron los parámetros de porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura de cada una de las secuencias obtenidas para determinar el parentesco o la identidad de las cepas.

#### **2.4.3.3. Análisis filogenético**

Para el análisis filogenético se tomó en cuenta las secuencias de microorganismos tipo que presentaban mayor porcentaje de identidad y de cobertura, generalmente las primeras entradas sugeridos por el NCBI.

Mediante el uso del software MEGA 7 (herramienta Muscle) se realizaron los alineamientos de las secuencias. Las regiones ambiguas que aún se presentaban fueron eliminadas mediante el software de acceso online Gblocks ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)).

Finalmente, con las secuencias consenso y las secuencias de organismos más próximos, se construyó los árboles filogenéticos. Usando el modelo de evolución que más se ajusta para la construcción de la filogenia. Los árboles se construyeron de acuerdo al método Neighbor-joining de máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 y con un modelo evolutivo Kimura 2.

#### **2.4.3.3. Análisis de la composición microbiana de las fuentes geotermales mediante secuenciación masiva - Illumina**

Este proceso se lo llevó a cabo en los laboratorios MRDNA Molecular Research LP en USA, donde se realizó la amplificación del ADN genómico obtenido de las muestras de agua y sedimentos. Los genes utilizados fueron: Archaeal 16S para Arqueas, 16s rRNA para bacterias, 23S rRNA para algas y la región ITS para hongos (Brito, 2014), (tabla 9).

**Tabla 9****Lista de primers usados en la Secuenciación masiva - Illumina**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencias (5'-3')</b>	<b>Tamaño del ADN amplificado</b>	<b>Referencias</b>
Arquea 16S	Archea349F	GYGCASCAGKCGMGAAW GGACTACVSGGGTATCTA	~500 pb	Lane, <i>et al.</i> , 1991
	Archea806R	AT		
ARNr 16S	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTC AG	~500 pb	Felfoldi, <i>et al.</i> , 2009
	519R	CGGTTACCTTGTTACGACT T		
ARNr 23S	P23SrV_fl	GGACAGAAAGACCCTATG AA	~410 pb	Sherwood & Presting, 2007
	P23SrV_rl	TCAGCCTGTTATCCCTAGA G		
Región ITS	ITS1F-Btl	CTTGGTCATTTAGAGGAA GTAA	~650 pb	White, 1990
	ITS1F- Btl	TCCTCCGCTTATTGATATG C		

Se enviaron cuatro muestras, dos de cada una de las fuentes geotermales, el volumen enviado por cada muestra fue de 20µL a concentraciones mayores a 20 ng/µL. Además se enviaron 25µL de cada cebador a una concentración 10nM.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1. Caracterización de los sitios de muestreo

Las fuentes geotermales se encuentran ubicadas a la intemperie. Se determinaron dos puntos de muestreo (ojos de agua o vertientes) para cada una. Los datos como coordenadas, altura, temperatura y pH que fueron medidos en el área, en el Riñón (tabla 10) y Guapán (tabla 11). La fuente geotermal El Riñón se encuentra a una temperatura promedio de 32,11°C, mientras que Guapán se encuentra a 52,54°C. Las dos termas reportan un pH neutro:

**Tabla 10**

**Datos de Fuente Geotermal el Riñón**

Puntos de muestreo	Coordenadas	Altura [m.s.n.m]	T [°C]	pH
P1	S 02°55.352'	2700	34.2	7
P2	O 79°0,3.701'		30.01	7

**Tabla 11**

**Datos de Fuente Geotermal Guapán**

Puntos de muestreo	Coordenadas	Altura [m.s.n.m]	T [°C]	pH
P1	S 02°42.566'	2688	52.23	7
P2	O 78°50.820'		52.86	7

#### 3.2. Análisis fisicoquímico

Los resultados de los análisis fisicoquímicos otorgados por el laboratorio del Centro de Servicios Ambientales y Químicos (CESAQ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de las muestras de agua y sedimentos de

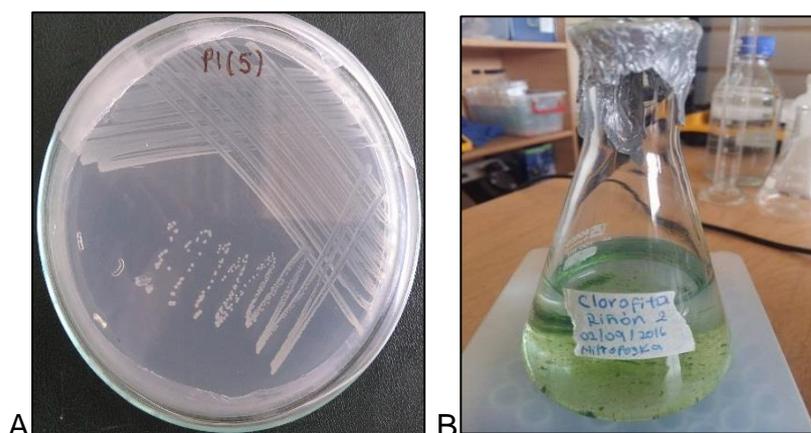
la fuente geotermal El Riñón se encuentran expuestos en los anexos A1 y A2 respectivamente. Se reportan valores fuera de rango que corresponden a algunos elementos como: sodio, potasio y magnesio en la muestra de agua y calcio, magnesio, azufre, hierro y potasio en la muestra de sedimentos (anexo A3).

Se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos de la muestra de agua para la fuente geotermal de Guapán en el anexo A4. Se reportan elementos fuera de rango como: Sodio, potasio, calcio y magnesio (anexo A5).

### 3.3. Obtención de cultivos puros

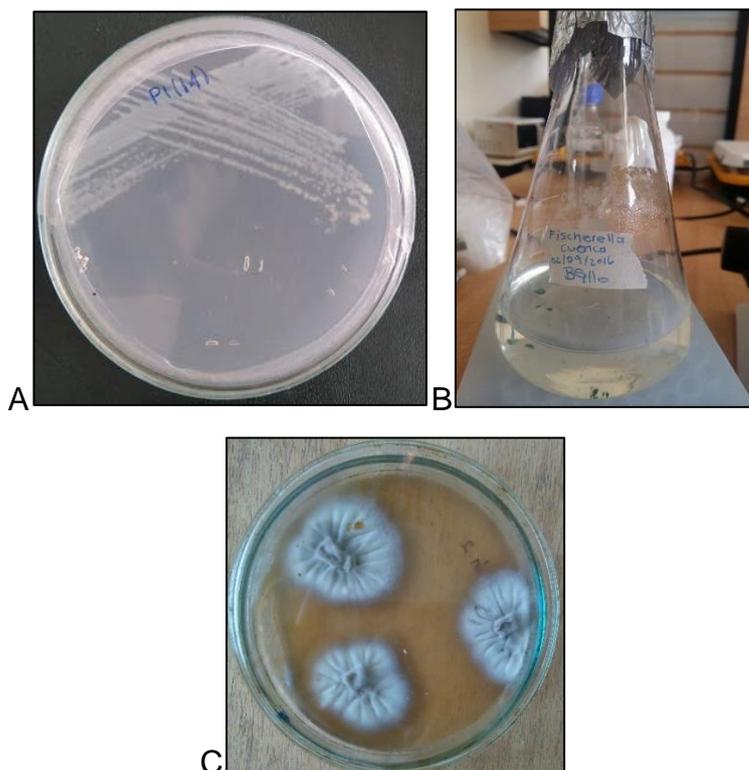
Para la fuente geotermal El Riñón se obtuvo un total de 30 cultivos puros: 29 cepas de bacterias, 1 de microalgas. Para la fuente geotermal Guapán se encontró un total de 39 cultivos puros: 33 cepas de bacterias, 5 de microalgas y 1 fúngica. En el anexo D1 se muestran las características macroscópicas de cada cepa cultivadas en el laboratorio y en el anexo D2 se presenta el tipo de muestra del que fue aislado (agua o sedimento) al momento de ser cultivado.

En la figura 13 se puede observar fotografías de cultivos puros obtenidos de la fuente geotermal el Riñón.



**Figura 13. Cultivos puros obtenidos a partir de la fuente geotermal El Riñón. A: cepa bacteriana P1.5 (*Paenibacillus tundrae*) y B: cepa de microalga P1.2 (*Scenedesmus sp.*).**

En la figura 14 se puede observar fotografías de cultivos puros obtenidos de la fuente geotermal Guapán.



**Figura 14. Cultivos puros obtenidos a partir de la fuente geotermal Guapán. A: cepa bacteriana P4.14 (*Bacillus licheniformis*), B: cepa de microalga P4.8 (*Fischirella sp.*) y C: cepa fúngica (*Aspergillus fumigatus*).**

### 3.4. Características microscópicas de los cultivos

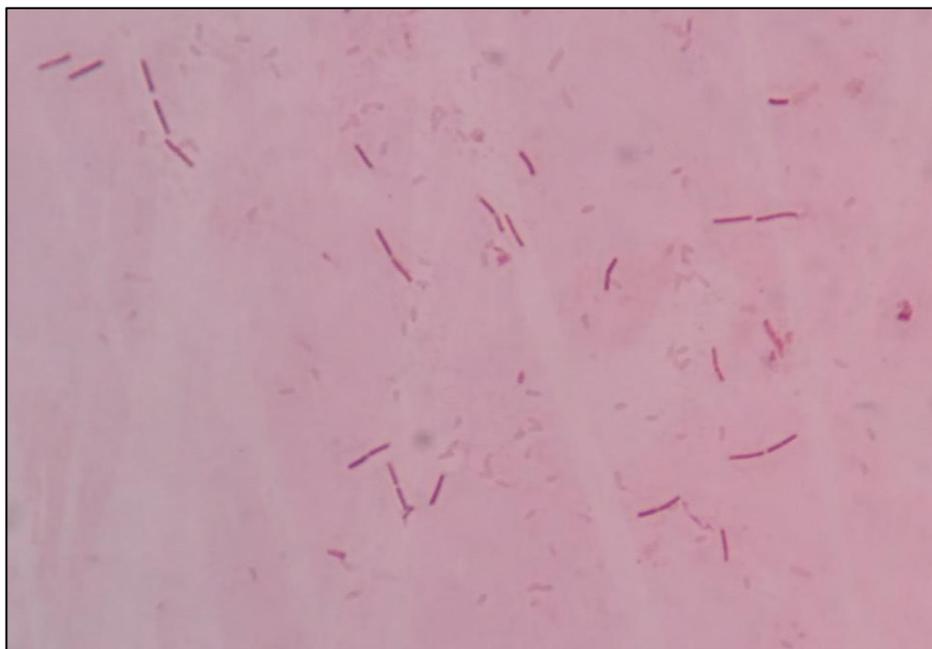
Las cepas bacterianas fueron sometidas a tinción diferencial Gram y luego fueron observadas al microscopio. Se determinó que la mayoría de las 29 cepas de bacterias son Gram positivas y en menor cantidad Gram negativas en los aislados de la fuente geotermal El Riñón. Mientras que las 37 cepas aisladas de la fuente geotermal Guapán, son Gram positivas, como se ve en el anexo D2. A continuación se presentan fotografías capturadas con el microscopio Olympus CX21, con un aumento de 100X, de las tinciones Gram de distintas cepas bacterianas:



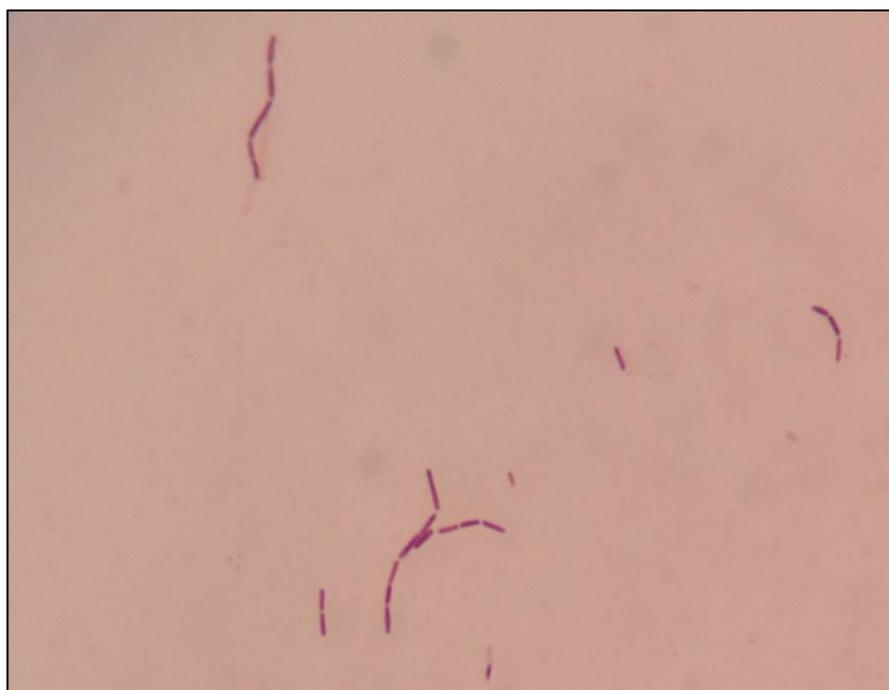
Figura 15. Tinción Gram de la cepa bacteriana P1.6 (*Bacillus glycinifermentans*), proveniente de la fuente geotermal El Riñón en aumento 100X.



Figura 16. Tinción Gram, cepa bacteriana P1.12 (*Bacillus licheniformis*), proveniente de la fuente geotermal El Riñón en aumento 100X.

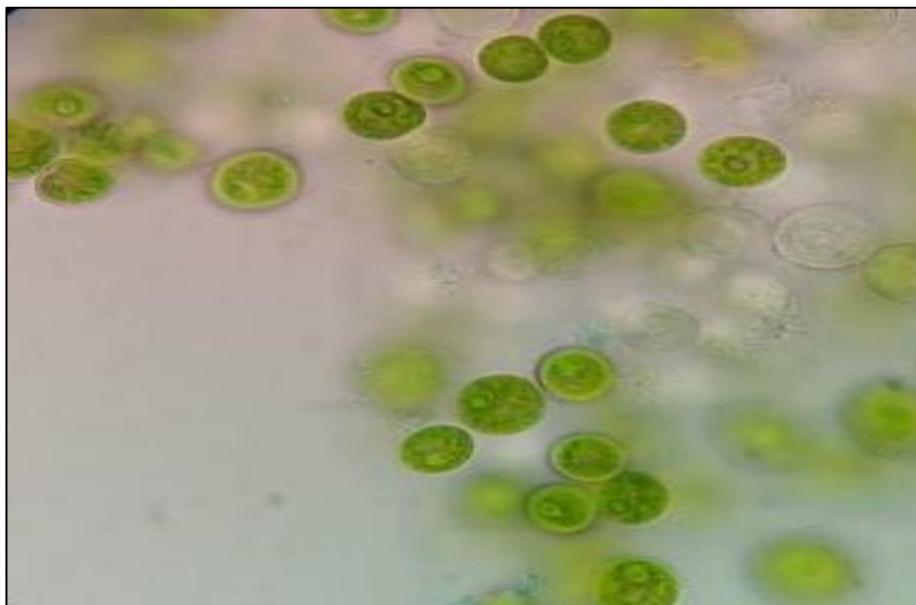


**Figura 17. Tinción Gram, cepa bacteriana P3.5 (*Anoxyacillus flavithermus*), proveniente de la fuente geotermal Guapán en aumento 100X.**

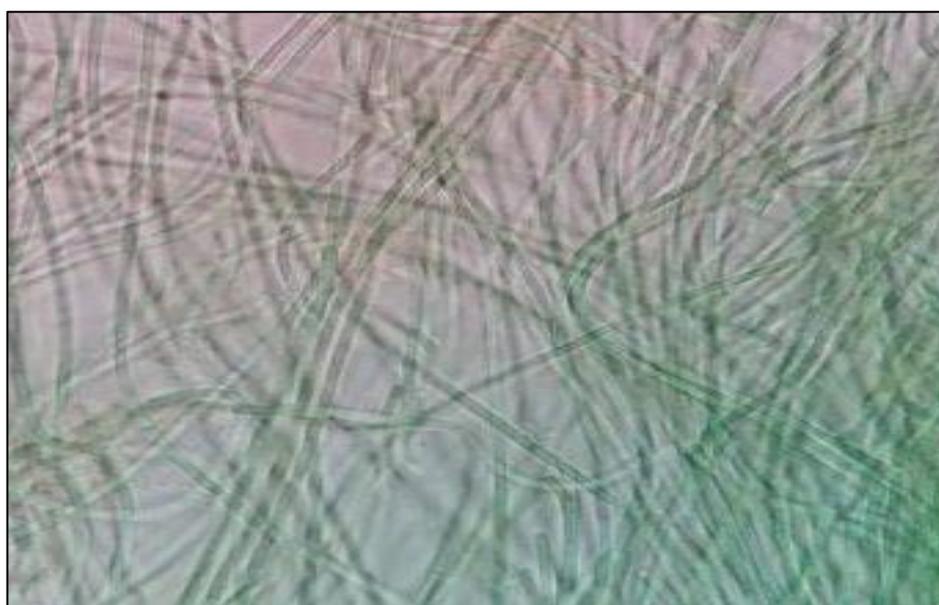


**Figura 18. Tinción Gram, cepa bacteriana P3.9 (*Paenibacillus barengoltzi*), proveniente de la fuente geotermal Guapán en aumento 100X.**

También se observaron las cepas de microalgas aisladas en el microscopio sin ninguna tinción. Las características del cultivo se encuentran detalladas en el anexo D4. A continuación se presentan fotografías captadas con el microscopio Olympus CX21 en aumento 100X.

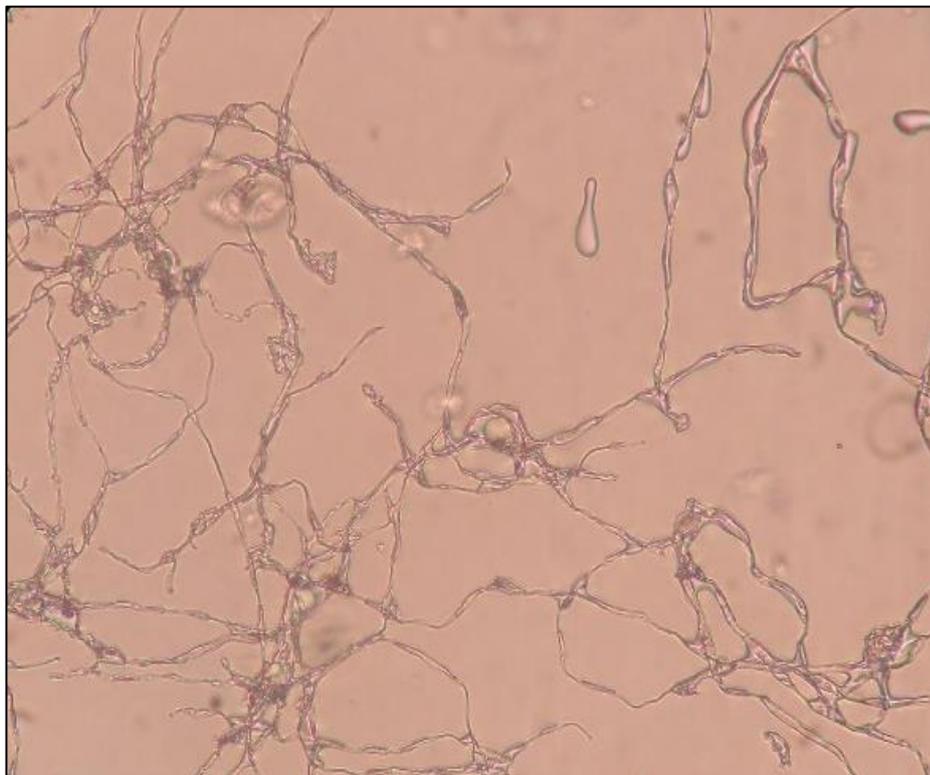


**Figura 19. Microalga G6 (*Scenedesmus sp.*) proveniente de la fuente geotermal El riñón en aumento 100X.**



**Figura 20. Microalga G2 (*Leptolyngbya boryana*), proveniente de la fuente geotermal Guapán en aumento 100X.**

La especie fúngica también fue observada con el microscopio Olympus CX21 en aumento 100X, directamente, como se muestra en la siguiente figura:



**Figura 21. Cepa fúngica (*Aspergillus fumigatus*) con aumento 40X.**

### **3.5. Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las cepas bacterianas, fúngicas y de algas aisladas, fue un paso importante para la identificación molecular. Mediante los métodos de extracción correspondientes a cada grupo de microorganismos, se logró obtener material genético en altas concentraciones y de buena calidad a partir de los cultivos líquidos para bacterias y algas, y sólido para la especie fúngica.

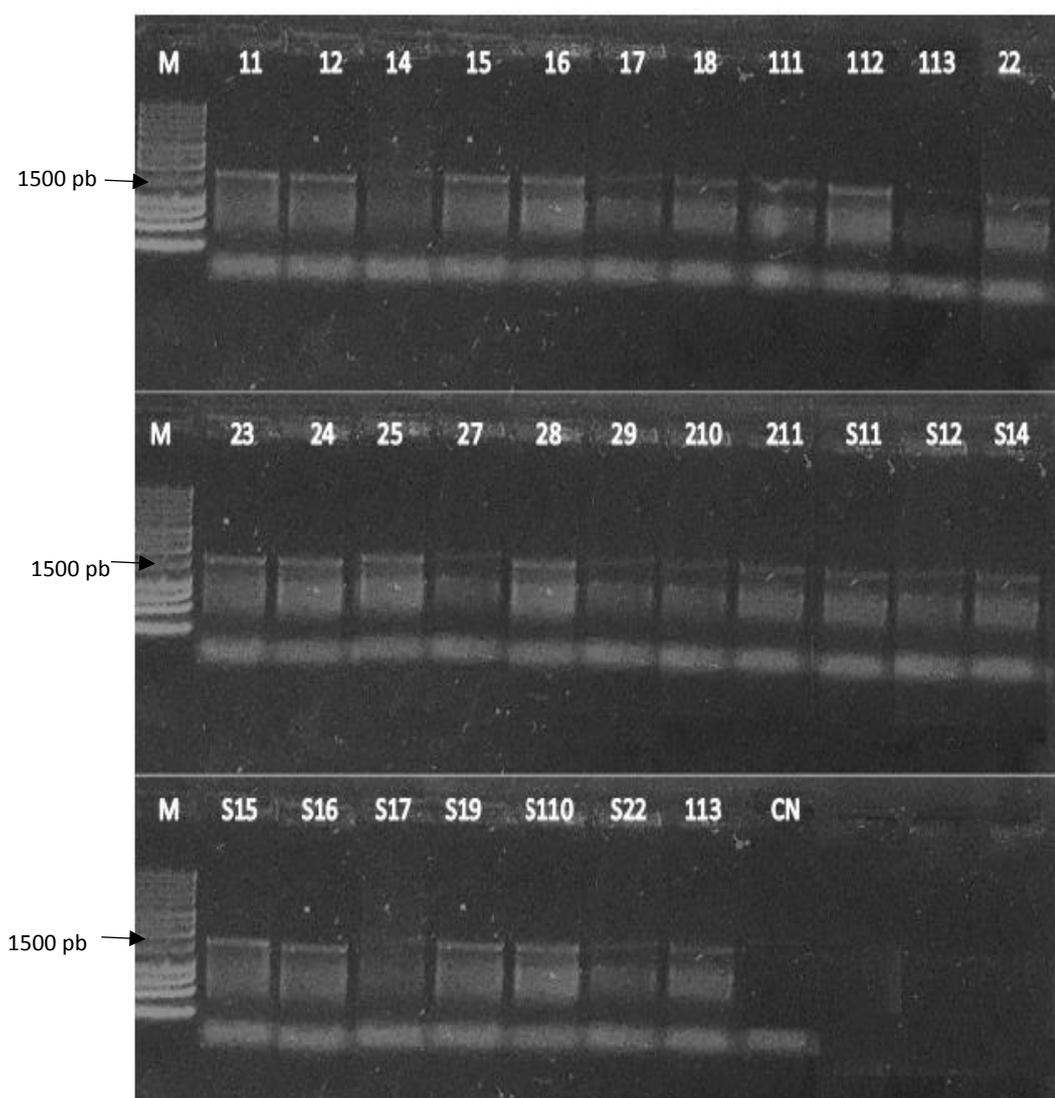
El resumen de los resultados obtenidos de las extracciones de las cepas bacterianas se encuentra en el anexo E1, de algas en el anexo E2 y para la especie fúngica en el anexo E3.

### 3.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

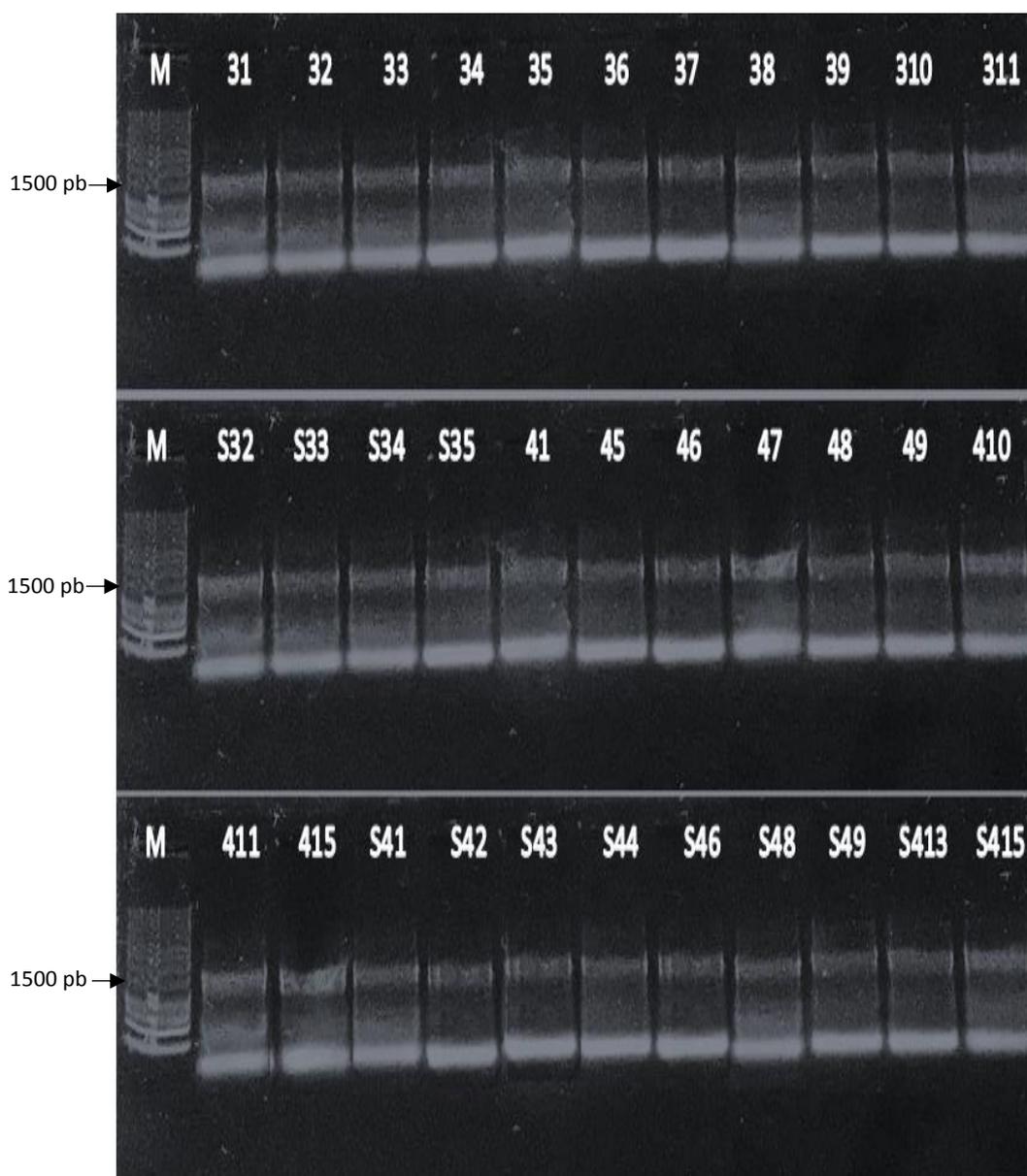
La amplificación de los genes de las cepas aisladas de bacterias, hongos y algas de las dos fuentes geotermales, se realizó a partir de la reacción en cadena de polimerasa.

#### 3.6.1. Amplificación del gen ARNr 16S

Se amplificó el gen ARNr 16S que posee 1500 pb aproximadamente, para las cepas de bacterias procedentes de las cepas aisladas de las fuentes geotermales El Riñón (Figura 22) y Guapán (Figura 23):



**Figura 22. Gen ARNr 16S de las 29 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal El Riñón. (M: Marcador molecular, CN: Control negativo)**



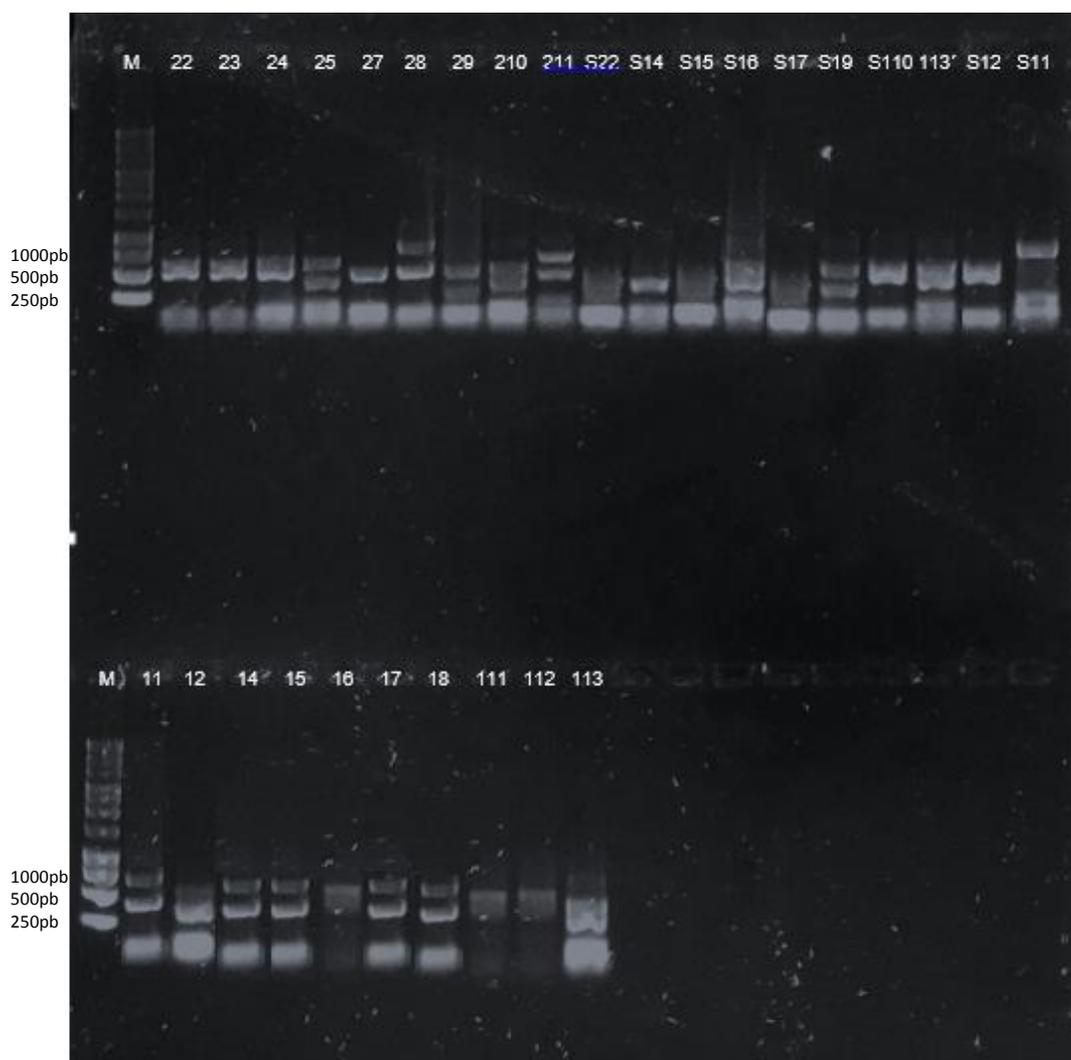
**Figura 23. Gen ARNr 16S de las 33 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal Guapán. (M: Marcador molecular).**

### **3.6.1.1. Análisis de RFLPs**

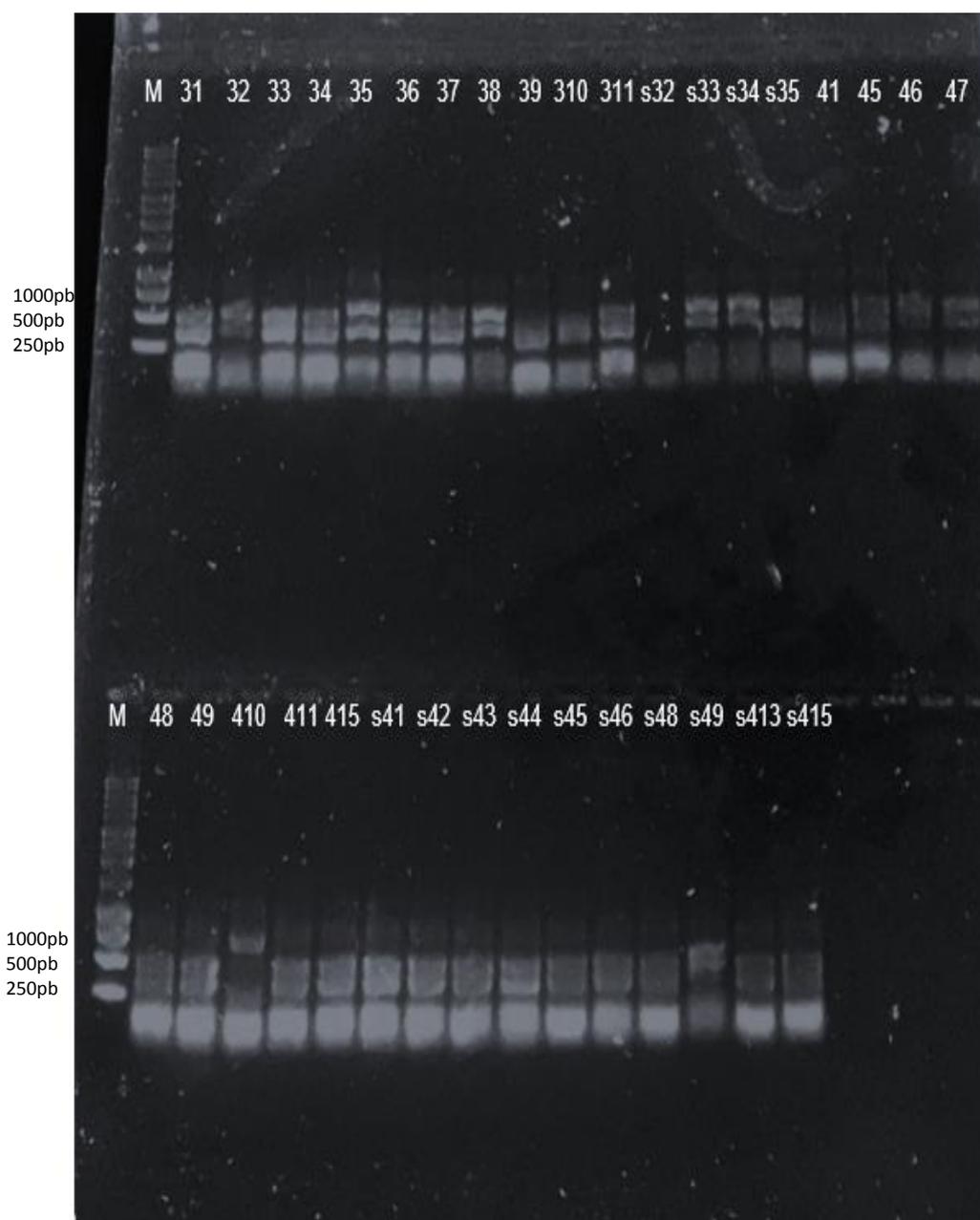
Debido a que el número de bacterias obtenidas en el proceso de aislamiento fue extenso y que, tanto las características macroscópicas y microscópicas, mantienen cierta similitud entre los cultivos, fue necesario aplicar la técnica de RFLPs, que permitió clasificarlas en diferentes grupos por medio del patrón de corte obtenido de cada una de las cepas.

Para este análisis se tomó los productos de PCR (gen ARNr 16S) de las cepas bacterianas y mediante el uso de la enzima *MspI* se logró la digestión de los amplicones de las dos fuentes geotermales.

Finalmente los fragmentos creados fueron observados en un gel de agarosa al 1%. En las siguientes figuras se presentan los resultados para la fuente geotermal El Riñón (figura 24) y Guapán (figura 25):



**Figura 24. RFLPs de los amplicones tratados con la enzima *MspI* del gen ARNr 16S de las 29 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal El Riñón. (M: Marcador molecular)**



**Figura 25. RFLPs de los amplicones tratados con la enzima MspI del gen ARNr 16S de las 33 cepas bacterianas aisladas de la fuente geotermal Guapán. (M: Marcador molecular)**

En las tabla 12 y 13 se observa el resumen de los grupos de las cepas bacterianas que se formaron a partir de los patrones de corte iguales obtenidos mediante la técnica de RFLPs para las fuentes geotermales El Riñón y Guapán respectivamente:

Tabla 12

**Resumen comparativo de fragmentos de restricción de la fuente geotermal El Riñón**

<b>Número de grupo</b>	<b>Cepas repetidas</b>
<b>Grupo 1</b>	11*, 14*,15*, 17*, 18*, 25*, 29*, 211*, s19*, 28*
<b>Grupo 2</b>	22*, 23,24*, 210*
<b>Grupo 3</b>	113*, 113*, s16
<b>Grupo 4</b>	s12*, s110*
<b>Grupo 5</b>	16, 111*, 112*
<b>Grupo 6</b>	S11
<b>Grupo 7</b>	12*
<b>Grupo 8</b>	27*, S14*
<b>Grupo 9</b>	s22*, s15, s17, s16*, 210
<b>Grupo 10</b>	s11*

Las cepas con (\*) fueron enviadas a secuenciación

Tabla 13

**Resumen comparativo de fragmentos de restricción de la fuente geotermal Guapán**

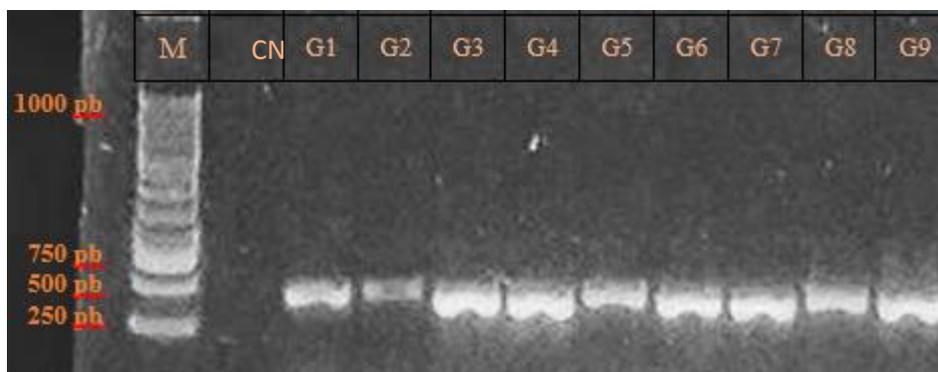
<b>Número de grupo</b>	<b>Cepas repetidas</b>
<b>Grupo 1</b>	31*,32*,33*,34*,36*,37*,38*,311*, 41*,45*,46*
<b>Grupo 2</b>	35*,s33*,s34*, s35*,47
<b>Grupo 3</b>	39,310*
<b>Grupo 4</b>	48,49,411*,s41*,s42,s43*,s44,s45*,s46,s48*,s413*,s415*
<b>Grupo 5</b>	410*
<b>Grupo 6</b>	S49*

Las cepas con (\*) fueron enviadas a secuenciación

Para corroborar los resultados, los productos de PCR de las cepas bacterianas fueron enviados a MacroGen (empresa Koreana), que se encargó de realizar la secuenciación de las muestras.

### 3.6.2. Amplificación del gen 23S

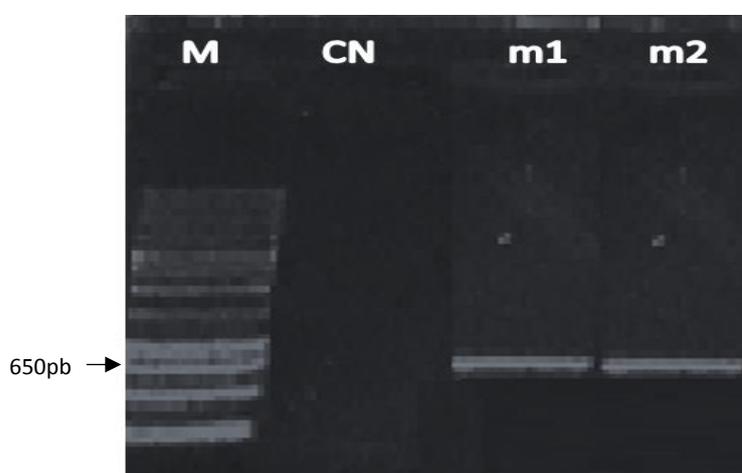
En las cepas de algas se amplificó el Gen ARNr 23S que tiene un tamaño aproximado de 410 pb (figura 26):



**Figura 26. Gen 23S rRNA de capas de algas aislada de la fuente geotermal Guapán (G2, G3, G4, G5, G7, G8) y El Riñón (G1, G6, G9). (M: Marcador molecular; CN: control negativo)**

### 3.6.3. Amplificación de la región ITS

Finalmente para la amplificación de la cepa fúngica aislada a partir de la fuente geotermal Guapán, se utilizó la región ITS que tiene una longitud de aproximadamente 650 pb. En la figura 27 se observa la reacción por duplicado:



**Figura 27. Región ITS de la cepa fúngica aislada de la fuente geotermal Guapán (M: Marcador molecular, CN: Control negativo).**

### 3.7. Análisis de similitud

Los resultados de secuenciación obtenidos de la empresa Macrogen fueron procesados mediante el software Geneious 10.0.8, obteniéndose la secuencia consenso con la que se realizó el análisis de similitud en la bases de datos del NCBI. Para dicho análisis, se utilizó la herramienta Nucleotide BLAST (blastn), que comparó las secuencias de las cepas de bacterias, algas y hongos aisladas en el laboratorio con las que se encuentran registradas en el sistema. El resumen de los principales grupos de bacterias obtenidos se presenta en la tabla 14 para la fuente geotermal El Riñón y 15 para la fuente geotermal Guaán, todas las bacterias fueron identificadas a nivel de especie, debido a que el porcentaje de identidad fue mayor al 97%.

**Tabla 14**

**Análisis de las secuencias bacterianas de la fuente geotermal El Riñón con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI.**

Cepa	Organismo más próximo	Aceso GenBank	Query Coverage	Max Ident	Filo
<b>El Riñón</b>					
12*	<i>Paenibacillus tundrae</i>	NR044525.1	100%	99%	Firmicutes
16*	<i>Bacillus glycinifermentans</i>	KT005408.1	100%	99%	Firmicutes
22*, 24, 23	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	NR113346.1	100%	99%	Proteobacteria
25*	<i>Bacillus circulans</i>	NR112632.1	100%	99%	Firmicutes
27*	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	NR121739.1	100%	99%	Proteobacteria
111, 112*	<i>Bacillus licheniformis</i>	KY174334.1	100%	99%	Firmicutes
210*	<i>Bacillus subtilis</i>	KY013010.1	100%	99%	Firmicutes
S11*	<i>Brevibacillus agri</i>	NR113767.1	100%	99%	Firmicutes
S14*	<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i>	NR113767.1	100%	99%	Firmicutes
S19*	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	KC208617.1	100%	99%	Firmicutes
S22*	<i>Aeromonas caviae</i>	NR029252.1	100%	99%	Proteobacteria

Las cepas señaladas con (\*), son las secuencias consenso usadas en la construcción del árbol filogenético

Tabla 15

**Análisis de las secuencias bacterianas de la fuente geotermal Guapán con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI.**

Cepa	Organismo más próximo	Aceso GenBank	Query Coverage	Max Ident	Filo
<b>Guapán</b>					
31,33,34,37,38*,46,411, s33,s34,s43,s48,s413,s415,32,36,45, s41,s46,s49	<i>Bacillus licheniformis</i>	KY174334.1	100%	99%	Firmicutes
35*	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	NR117774.1	99%	99%	Firmicutes
39,41*	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	KP704353.1	100%	99%	Firmicutes
410*	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	NR112213.1	100%	99%	Firmicutes

Las cepas señaladas con (\*), son las secuencias consenso usadas en la construcción del árbol filogenético

En la tabla 16, se observa los grupos de microalgas que fueron obtenidos mediante los análisis de similitud. Solo la cepa G7 fue identificada a nivel de especie (*Cyanobacterium aponinum*) con un porcentaje de identidad de 99%, mientras las otras cepas solo se identificaron a nivel de Familia (91%).

Tabla 16

**Análisis de las secuencias de microalgas con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI.**

Cepa	Organismo más próximo	Aceso GenBank	Query Coverag	Max Iden	Familia
<b>El Riñón</b>					
G1,G6*, G9	<i>Scenedesmus sp.</i>	FJ968741.1	100%	90%	Scenedesmaceae
<b>Guapán</b>					
G2*	<i>Leptolyngbya boryana</i>	KC848641.1	93%	91%	Leptolyngbyaceae
G3*	<i>Lyngbya aestuarii</i>	AY584522.1	100%	91%	Oscillatoriaceae
G4*	<i>Nostoc sp.</i>	AP017295.1	93%	91%	Nostocaceae
G7*	<i>Cyanobacterium aponinum</i>	NR102522.1	100%	99%	Cyanobacteriaceae
G8*	<i>Fischerella sp</i>	AP017305.1	93%	91%	Hapalosiphonaceae

Las cepas señaladas con (\*), son las secuencias consenso usadas en la construcción del árbol filogenético

Finalmente la cepa fúngica fue identificada a nivel de especies como *Aspergillus fumigatus*, con un porcentaje de identidad del 100%, como se observa en la tabla 17.

**Tabla 17**

**Análisis de las secuencias de microalgas con la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI.**

Cepa	Organismo más próximo	Acesso GenBank	Query Coverag	Max Ident	Filo
JR*	<i>Aspergillus fumigatus</i>	NR121481.1	100%	100%	Ascomycota

La cepa señaladas con (\*), son las secuencias consenso usadas en la construcción del árbol filogenético

### 3.8. Análisis filogenético

La construcción de los árboles filogenéticos se realizó mediante el uso de las secuencias consenso obtenidas en el análisis de similitud, se tomó en cuenta las de mejor calidad de cada uno de los grupos de las cepas de microorganismos identificadas en las fuentes geotermales El Riñón y Guapán, conjuntamente se recopiló información de las secuencias de los organismos cercanos taxonómicamente.

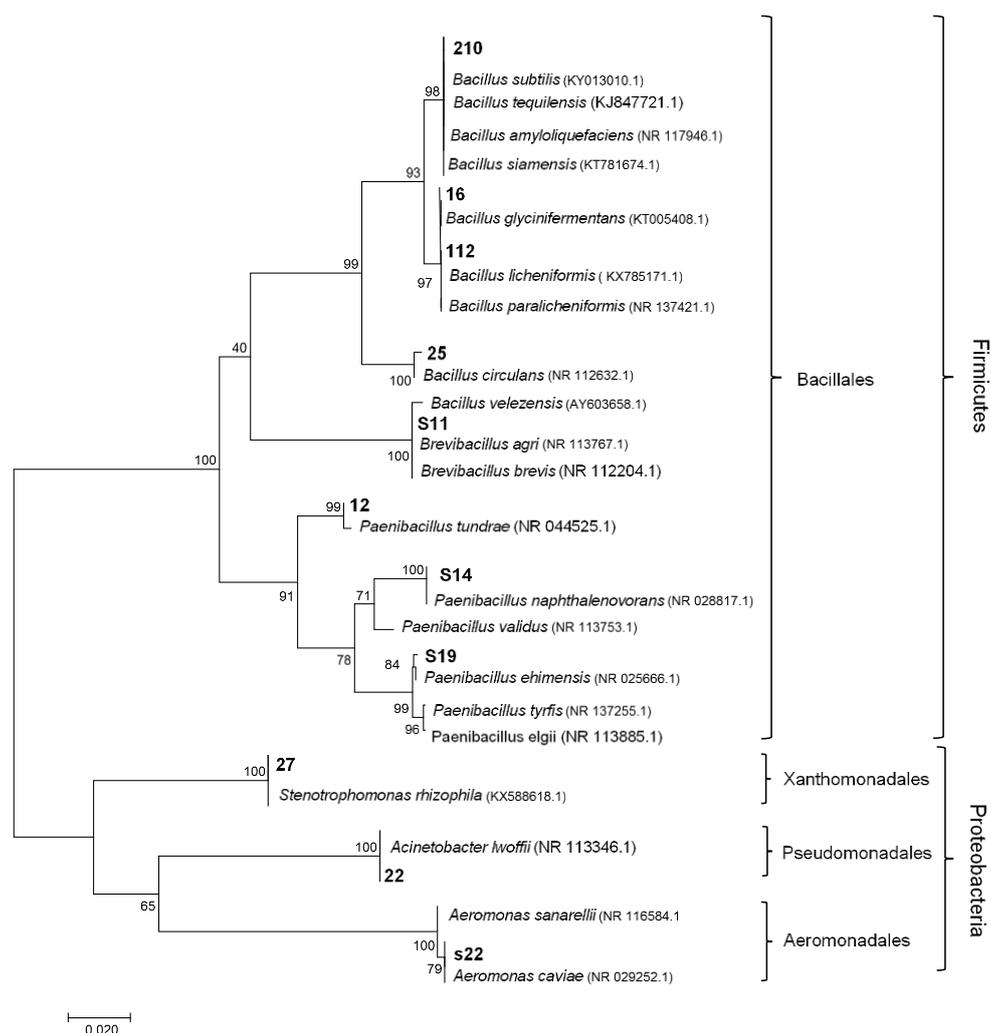
Las regiones ambiguas que se encontraban contenidas en las secuencias seleccionadas fueron eliminadas con el software online Gblocks. Luego se realizó el alineamiento con ayuda de la herramienta MUSCLE del programa MEGA 7.

La construcción de los árboles fitogenéticos para las especies de bacterias, algas y hongos fueron obtenidos también en el programa MEGA 7 con el método de máxima verosimilitud Neighbor-Joining, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2.

En la figura 28 se muestra el árbol filogenético construido con secuencias del gen 16S rRNA de bacterias aisladas a partir de la fuente geotermal El Riñón y se comprobó la identificación taxonómica de las cepas aisladas (tabla 19): cepa 12 (*Paenibacillus tundrae*), 16 (*Bacillus glycinifermentans*), 112 (*Bacillus licheniformis*), 22 (*Acinetobacter lwoffii*), 25 (*Bacillus circulans*), 27

(*Stenotrophomonas rhizophila*), 210 (*Bacillus subtilis*), s11 (*Brevibacillus agri*), s14 (*Paenibacillus naphthalenovorans*), s19 (*Paenibacillus ehimensis*) y s22 (*Aeromonas caviae*).

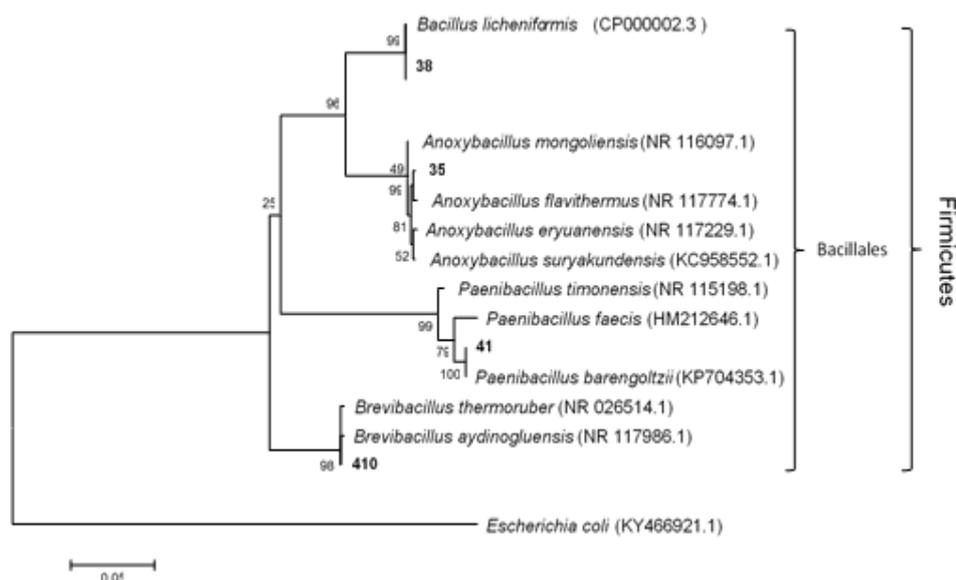
Para la construcción del siguiente árbol filogenético no se logró seleccionar un organismo que actuará como outgroup debido a que la topografía de los árboles se vió afectada.



**Figura 28. Árbol filogenético construido con el método máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias aisladas de la fuente geotermal El Riñón (12, 16, 112, 22, 25, 27, 210, s11, s14, s19, s22).**

El árbol filogenético construido con secuencias del gen 16S rRNA de las cepas de bacterias aisladas a partir de la fuente geotermal Guapán (figura 29) y se comprobó la identificación taxonómica de las cepas aisladas (tabla 19): cepa 35 (*Anoxybacillus flavithermus*), 38 (*Bacillus licheniformis*), 41 (*Paenibacillus barengoltzii*) y 410 (*Brevibacillus thermoruber*).

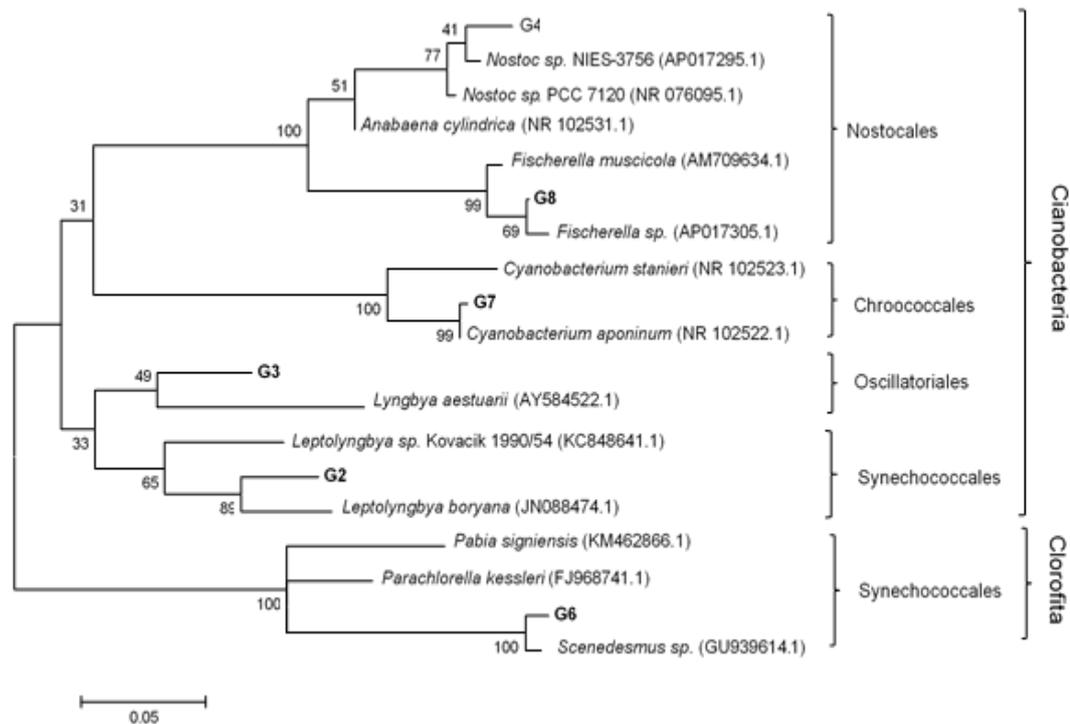
Para este análisis filogenético se seleccionó a la bacteria *Escherichia coli* como outgroup.



**Figura 29. Árbol filogenético construido con el método máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias aisladas de la fuente geotermal Guapán (35, 38, 41 y 410).**

En la figura 30 se muestra el árbol filogenético construido a partir del gen ARNr 23S para las cepas de microalgas aisladas a partir de las fuentes geotermales El Riñón (G6) y Guapán (G2, G3, G4, G7 y G8). Se confirma que la identificación de las cepas de microalgas llegó a nivel especie para G7 (*Cyanobacterium aponinum*) y a familia para G6 (*Scenedesmus*), G2 (*Leptolyngbyaceae*), G3 (*Oscillatoriaceae*), G4 (*Nostocaceae*), y G8 (*Hapalosiphonaceae*).

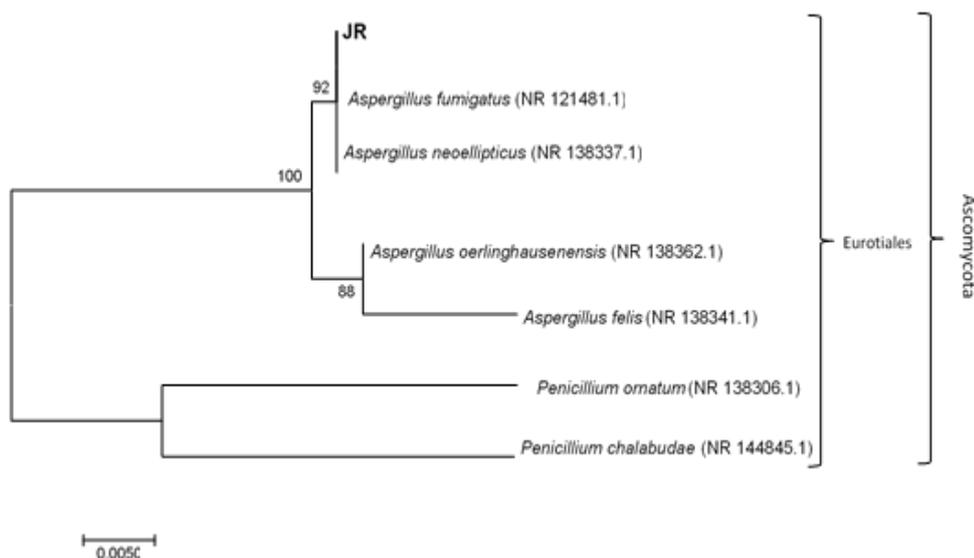
Para la construcción del siguiente árbol filogenético no se seleccionó un outgroup debido a que la topografía de los árboles se vio afectada.



**Figura 30. Árbol filogenético construido con el método máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen 23S rRNA para microalgas de las fuentes geotermales El Riñón (G6) y Guapán (G2, G3, G4, G7 y G8).**

Finalmente, en la figura 31 se muestra la construcción del árbol filogenético para la región ITS de la cepa fúngica aislado de la fuente geotermal Guapán, la cepa fue identificada a nivel de especie como *Aspergillus fumigatus*, con un porcentaje de identidad del 100%.

Para la construcción de este árbol filogenético no se seleccionó organismos outgroup debido a que la topografía del árbol se vio comprometida.



**Figura 31. Árbol filogenético construido con el método máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 y el modelo de evolución Kimura 2, de secuencias del gen ITS para la cepa fúngica aislada de la fuente geotermal Guapán (JR).**

Los análisis de similitud y filogenéticos permitieron clasificar a los organismos de acuerdo al porcentaje de identidad y las distancias filogenéticas que se obtuvieron en relación a los organismos taxonómicos más cercanos. Se identificaron a nivel de especies a todas las bacterias, la cepa fúngica (JR) y una cepa de microalga (G7), muestras que el resto de cepas de algas fueron identificadas a nivel de Familia, como se mostró en las tablas 19, 20 y 21, y en las figuras 28, 29, 30 y 31.

En la tabla 18 se observa el número de cepas de microorganismos aislados en el laboratorio a partir de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán, ordenados de acuerdo a los grupos de especies o familias que se formaron mediante la identificación molecular.

Tabla 18

**Cepas de microorganismos agrupados de acuerdo a los resultados de los análisis de similitud y filogenéticos.**

Organismo	Organismos más próximos	Numero de Cepas aisladas
<b>El Riñón</b>		
<b>Bacteria</b>	<i>Paenibacillus tundrae</i>	1
	<i>Acinetobacter pittii</i>	7
	<i>Bacillus glycinifermentans</i>	1
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3
	<i>Bacillus circulans</i>	1
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1
	<i>Bacillus licheniformis</i>	2
	<i>Bacillus subtilis</i>	1
	<i>Brevibacillus agri</i>	1
	<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	7
	<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i>	1
	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	1
	<i>Aeromonas caviae</i>	1
	<b>Microalga</b>	<i>Scenedesmus sp.</i>
<b>Total</b>		30
<b>Guapán</b>		
<b>Bacteria</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	29
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	1
	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	2
	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	1
<b>Microalga</b>	<i>Leptolyngbya boryana</i>	1
	<i>Leptolyngbya aestuarii</i>	1
	<i>Cyanobacterium aponinum</i>	1
	<i>Fischerella sp.</i>	1
	<i>Nostoc sp.</i>	1
<b>Hongo</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1
<b>Total</b>		39

### 3.9. Análisis de la composición microbiana de las fuentes geotermales mediante secuenciación masiva - Illumina

Con el objetivo de conocer la composición real de la comunidad de microorganismos presentes en las fuentes geotermales El Riñón y Guapán se

enviaron muestras de ADN extraídas de sedimento y agua para un análisis de secuenciación masiva - Illumina a los laboratorios MRDNA Molecular Research LP en USA. La empresa se encargó de la amplificación de los genes Archaeal 16S (arqueas), ARNr 16S (bacterias), ARNr 23S para algas y la región ITS para hongos.

Las muestras enviadas contenían 20µL y las concentraciones de ADN se encuentran detalladas en la tabla 19. De igual manera, se envió 25µL de cada primer a una concentración de 10ug/µL, los primers fueron citados en la tabla 9.

**Tabla 19**

**Concentración de ADN obtenidas para la secuenciación masiva - Illumina**

Procedencia	Muestra	Concentración ng/ul	260/280
<b>El Riñón</b>			
Sedimento	M1	27,58	1,65
Agua	R3	42,47	1,50
<b>Guapán</b>			
Sedimento	G2.1	21,36	1,89
Agua	G1	41,12	2,51

Los resultados de secuenciación masiva - Illumina se obtuvieron solamente a partir de las muestras de sedimentos de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán, debido a que el ADN de las muestras de agua enviadas no fueron óptimas para este análisis.

La técnica permitió amplificar un mayor número de secuencias de microorganismos procedentes de las fuentes, las cuales se clasificaron en unidades taxonómicas operativas (OTUs) mediante un 97% de similitud. Las OTUs no quiméricas y de alta calidad fueron 318541 para la fuente geotermal El riñón y 407641 para la fuente geotermal Guapán y se las distribuyeron en cuatro librerías como se observa en la tabla 20.

**Tabla 20**

**OTUs totales y las librerías obtenidas a partir de los datos de Secuenciación masiva - Illumina.**

Librerías	OTUs		Porcentaje %	
	El Riñón	Guapán	El Riñón	Guapán
Arqueas	78132	7420	24,53	1,82
Bacterias	84218	127958	26,44	31,39
Algas	80392	133875	25,24	32,84
Hongos	75799	138388	23,80	33,95
<b>OTUs Totales</b>	318541	407641	100	100

### 3.9.1. Comunidad de Arqueas

La comunidad de arqueas de acuerdo con la tabla 20, representó el 24,53% para la fuente geotermal El Riñón, mientras que para la geoterma Guapán fue de 1,82% del número total de OTUs.

#### 3.9.1.1. Análisis de Filum

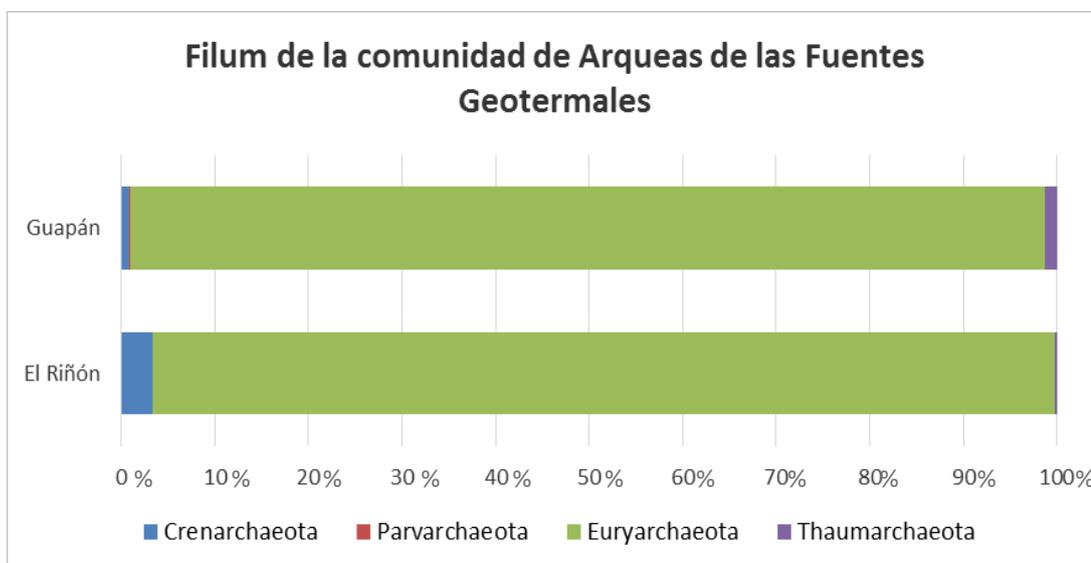
Los resultados obtenidos muestran que la comunidad de arqueas se encuentra constituida por cuatro filum, de los cuales se ve la predominancia del filum *Euryarchaeota* con un 96,39% en la fuente geotermal El Riñón, mientras que para Guapán tiene un valor de 97,80%, como se muestra en la tabla 21.

**Tabla 21**

**Porcentaje de los Filum de la comunidad de Arqueas**

Filum	El Riñón	Guapán
Crenarchaeota	3,39%	0,86%
Parvarchaeota	0,02%	0,09%
Euryarchaeota	96,39%	97,80%
Thaumarchaeota	0,20%	1,24%

En el gráfico 32 se muestra la distribución de los filum de la comunidad de Arqueas, de acuerdo a los porcentajes presentados en la tabla 21.

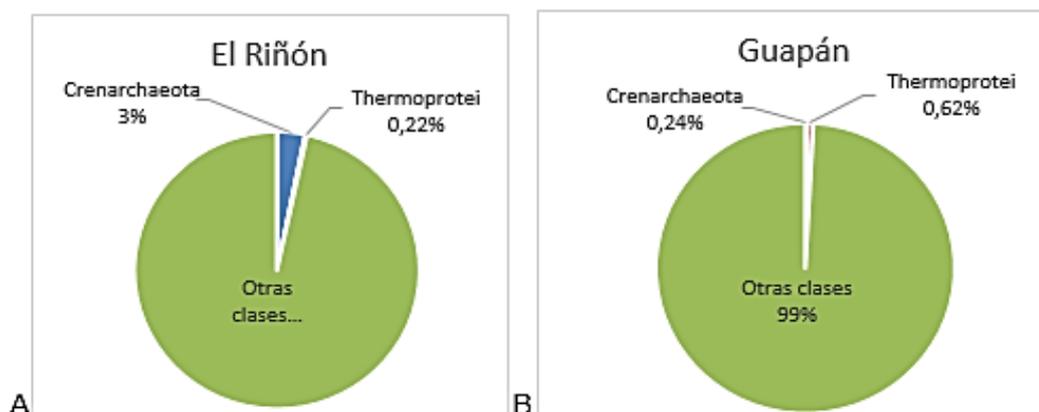


**Figura 32. Distribución completa de los filum de Arqueas de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

### 3.9.1.2. Análisis de Clase

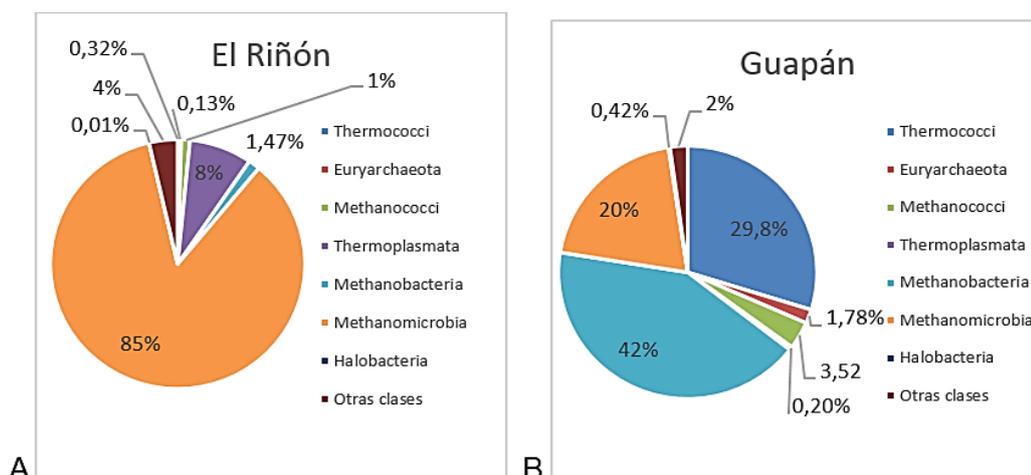
En las siguientes figuras se presenta las clases para los filum de Crenarchaeota, Euryarchaeota, Parvarchaeota y Thaumarchaeota.

#### a) Crenarchaeota



**Figura 33. El filum *Crenarchaeota*, se encuentra constituido por des clases: Crenarchaeota y Thermoprotei. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

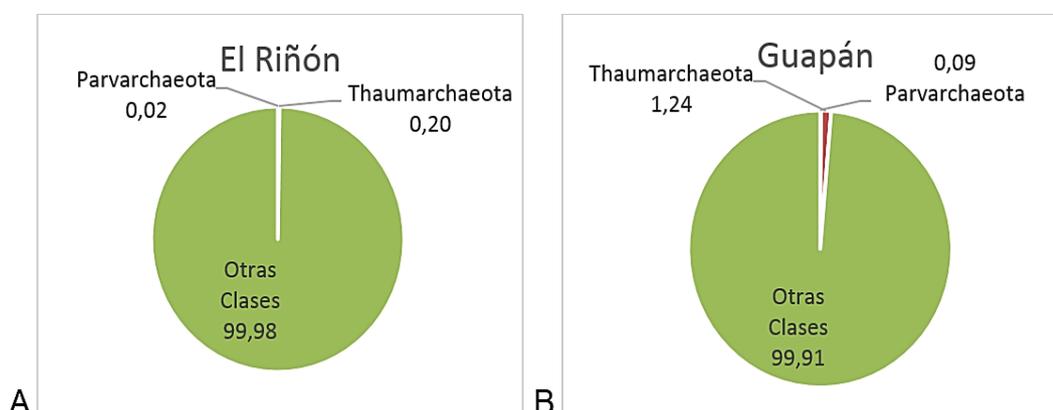
## b) Euryarchaeota



**Figura 34.** El filum *Euryarchaeota*, se encuentra constituido por siete clases: Thermococci, Euryarchaeota, Methanococci, Thermoplasmata, Methanobacteria, Methanomicrobia y Halobacteria. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán

## c) Parvarchaeota y Thaumarchaeota

La abundancia de las clases de los filum Parvarchaeota y Thaumarchaeota fueron graficadas conjuntamente debido a que cada una posee una sola clase de su mismo nombre y su porcentaje es menor al 5%.



**Figura 35.** Los filum Parvarchaeota y Thaumarchaeota, se encuentran constituido por una clase: Parvarchaeota y Thaumarchaeota respectivamente. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán

### 3.9.1.3. Análisis de los principales géneros

Se realizó un análisis a nivel de género de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina, se utilizaron aquellos que tenían lecturas mayores a cero OTUs, debido a que solo se obtuvieron 30 géneros, la mayoría de los cuales se encontraron dentro del filum Euryarchaeota (17), Thaumarchaeota (5), Crenarchaeota (4) y Candidatus Micrarchaeota (1). En la tabla 22, se observan los géneros agrupados de acuerdo a su filum correspondiente:

**Tabla 22**

**Géneros obtenidos a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Arqueas provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	OTU R	OTU G	
Candidatus Micrarchaeota				<i>Candidatus micrarchaeum</i>	16	7	
Crenarchaeota	Thermoprotei	Desulfurococcales	Desulfurococcaceae	<i>Stetteria</i>	19	0	
				<i>Desulfurococcus</i>	8	0	
				<i>Thermosphaera</i>	74	9	
				<i>Staphylothermus</i>	13	2	
				<i>Thermofilum</i>	55	35	
Euryarchaeota	Halobacteria	Haloferacales	Halorubraceae	<i>Halohasta</i>	6	4	
	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanosphaera</i>	2	387	
				<i>Methanobacterium</i>	343	2548	
				<i>Methanobrevibacter</i>	805	183	
	Methanococci	Methanococcales	Methanococcaceae	<i>Methanothermococcus</i>	344	4	
				<i>Methanococcus</i>	379	257	
				<i>Methanotorris</i>	138	0	
	Methanomicrobia	Methanocellales	Methanocellaceae	<i>Methanocella</i>	75	5	
				Methanomicrobiales	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	654
		Methanomicrobiaceae	<i>Methanogenium</i>			40	0
		Methanoregulaceae	<i>Methanolinea</i>			5483	3
		Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	77	22	
	Methanosaetaceae			<i>Methanosaeta</i>	60376	1451	
	Thermococci	Thermococcales	Thermococcaceae	<i>Thermococcus</i>	100	2136	
				<i>Palaeococcus</i>	5	74	
	Thermoplasmata	Methanomassiliicoccales	Methanomassiliicoccaceae	<i>Methanomassiliicoccus</i>	382	7	
				Thermoplasmatales	Thermoplasmataceae	<i>Thermogymnomonas</i>	5828
		<i>Thermoplasma</i>	20			4	
Thaumarchaeota				<i>Candidatus nitrosotalea</i>	6	2	
		Nitrosopumilales	Nitrosopumilaceae	<i>Nitrosopumilus</i>	3	0	
		Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	<i>Cenarchaeum</i>	23	4	
	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	<i>Nitrososphaera</i>	115	81	
				<i>Candidatus nitrososphaera</i>	13	5	
				<i>Candidatus nitrosocaldus</i>	2477	18	

### 3.9.1.4. Análisis de las principales especies

Para trabajar los resultados a nivel de especie fue necesario seleccionar a aquellas que tuvieron lecturas mayores a cero OTUs en cada muestra enviada. Mediante este análisis se pudo conocer la diversidad total existente en las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.

Se determinó que la comunidad de Arqueas se encuentra constituida por 35 especies, distribuidas en 30 géneros, de los cuales cinco se encuentran conformados por más de dos: *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosaeta*, *Candidatus Nitrosocaldus* y *Nitrososphaera*, por lo que reportan mayor número de lecturas, como se resume en la tabla 23.

**Tabla 23**

#### Géneros de arqueas constituidos por un mayor número de especies

Género	Número de especies	El Riñón	Guapán
<i>Methanobacterium</i>	5	343	2548
<i>Methanosaeta</i>	2	60376	1451
<i>Methanococcus</i>	2	309	63
<i>Candidatus nitrosocaldus</i>	2	2467	18
<i>Nitrososphaera</i>	2	112	81

Las especies con mayor número de lecturas fueron: *Methanosaeta sp.* (60376 OTUs en El Riñón y 1451 OTUs en Guapán), *Candidatus nitrososphaera gargensis* (101 OTUs en El Riñón y 79 OTUs en Guapán), *Methanobacterium aarhusense* (1909 OTUs en Guapán), *Thermococcus radiotolerans* (2115 OTUs en Guapán) y *Methanobrevibacter sp.* (805 OTUs en El Riñón). A continuación, en la tabla 24 se presentan las especies organizadas de acuerdo a su respectivo filum, clase, orden, familia y género.

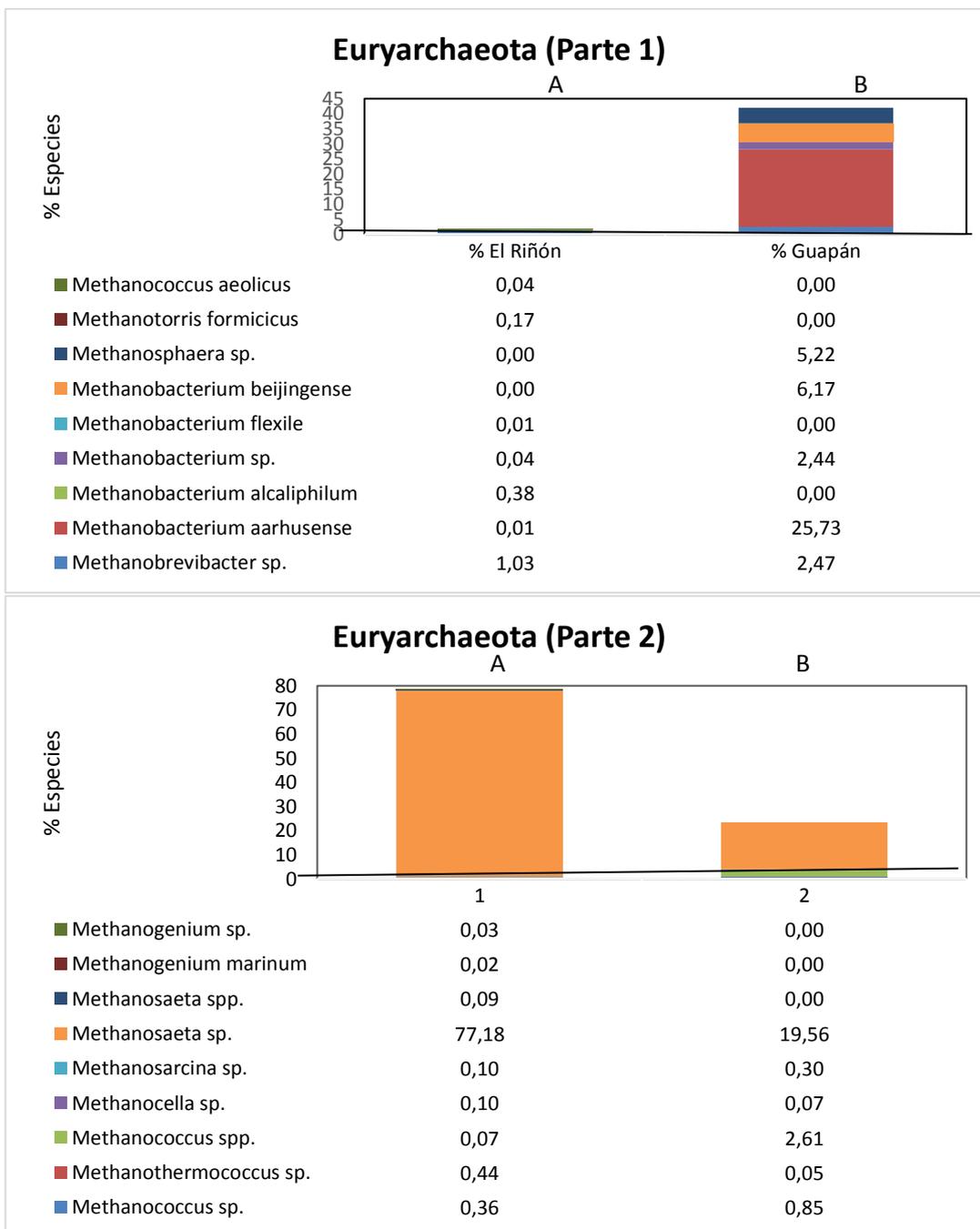
Tabla 24

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva  
- Illumina para Arqueas provenientes de las fuentes geotermales El  
Riñón y Guapán**

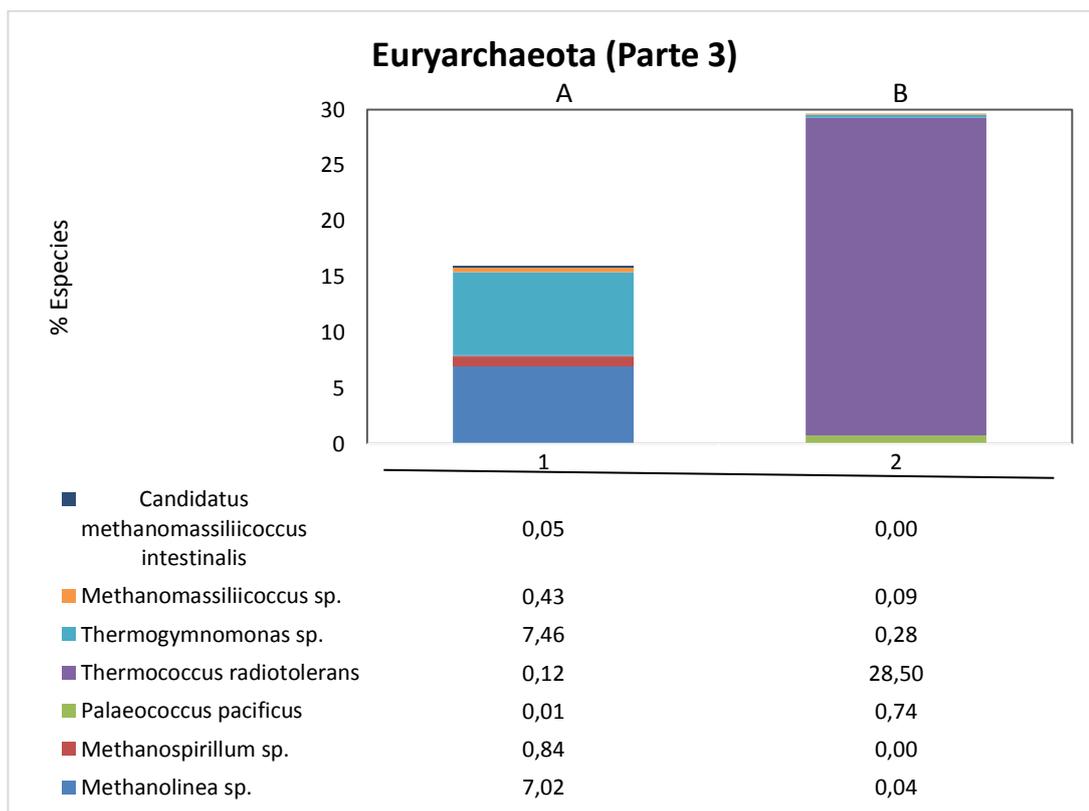
Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	OT U R	OT C
Candidatus Micrarchaeota				Candidatus Micrarchaeum	Candidatus micrarchaeum acidiphilum	16	7
Crenarchaeota	Thermoprotei	Thermoproteales	Thermofilaceae	Thermofilum	Thermofilum sp.	47	35
			Desulfurococcaceae	Stetteria	Stetteria hydrogenophila	19	0
			Desulfurococcaceae	Termosphaera	Termosphaera aggregans	74	9
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter	Methanobrevibacter sp.	805	183
				Methanobacterium	Methanobacterium aarhusense	5	19
					Methanobacterium aicalphilum	300	0
					Methanobacterium sp.	28	181
					Methanobacterium flexile	10	0
					Methanobacterium beijingense	0	45
				Methanosphaera	Methanosphaera sp.	2	387
	Methanococci	Methanococcales	Methanocaldococcaceae	Methanotorris	Methanotorris formicus	134	0
			Methanococcaceae	Methanococcus	Methanococcus aeolicus	30	0
					Methanococcus sp.	279	63
				Methanothermococcus	Methanothermococcus sp.	343	4
				Methanococcus	Methanococcus spp.	52	194
	Methanomicrobia	Methanocellales	Methanocellaceae	Methanocella	Methanocella sp.	75	5
		Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	Methanosarcina	Methanosarcina sp.	77	22
			Methanosaetaceae	Methanosaeta	Methanosaeta sp.	60302	14
					Methanosaeta spp.	74	0
		Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	Methanogenium	Methanogenium marinum	13	0
					Methanogenium sp.	27	0
			Methanoregulaceae	Methanolinea	Methanolinea sp.	548	3
			Methanospirillaceae	Methanospirillum	Methanospirillum sp.	654	0
	Thermococci	Thermococcales	Thermococcaceae	Palaeococcus	Palaeococcus pacificus	5	55
				Thermococcus	Thermococcus radiotolerans	96	211
	Thermoplasmata	Thermoplasmatales		Thermogymnomonas	Thermogymnomonas sp.	5828	21
		Methanomassiliococcales	Methanomassiliococcaceae	Methanomassiliococcus	Methanomassiliococcus sp.	336	7
				Methanomassiliococcus	Candidatus methanomassiliococcus intestinalis	41	0
Thaumarchaeota		Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	Cenarchaeum	Cenarchaeum symbiosum	23	4
	Nitrososphaeria	Candidatus Nitrosocaldales	Candidatus Nitrosocaldaceae	Candidatus Nitrosocaldus	Uncultured candidatus nitrosocaldus sp.	2238	5
					Candidatus nitrosocaldus yellowstonii	229	13
		Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae		Candidatus nitrososphaera	13	5
				Nitrososphaera	Candidatus nitrososphaera gargensis	101	79
					Nitrososphaera sp.	11	2

### 3.9.1.5. Porcentaje de especies de Arqueas

Los resultados permitieron determinar que el filum con mayor número de especies para Arqueas es Euryarchaeota, constituido por 25 integrantes. En la siguientes figuras (36 y 37) se presentan los porcentajes de cada uno:



**Figura 36. Especies del filum Euryarchaeotas, perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 1 y 2)**



**Figura 37. Especies del filum Euryarchaeotas, perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 3)**

### 3.9.2. Comunidad Bacteriana

La comunidad bacterianas de acuerdo con la tabla 20, representó el 26,44% para la fuente geotermal El Riñón, mientras que para la geoterma Guapán fue de 31,39% del número total de OTUs.

#### 3.9.2.1. Análisis de Filum

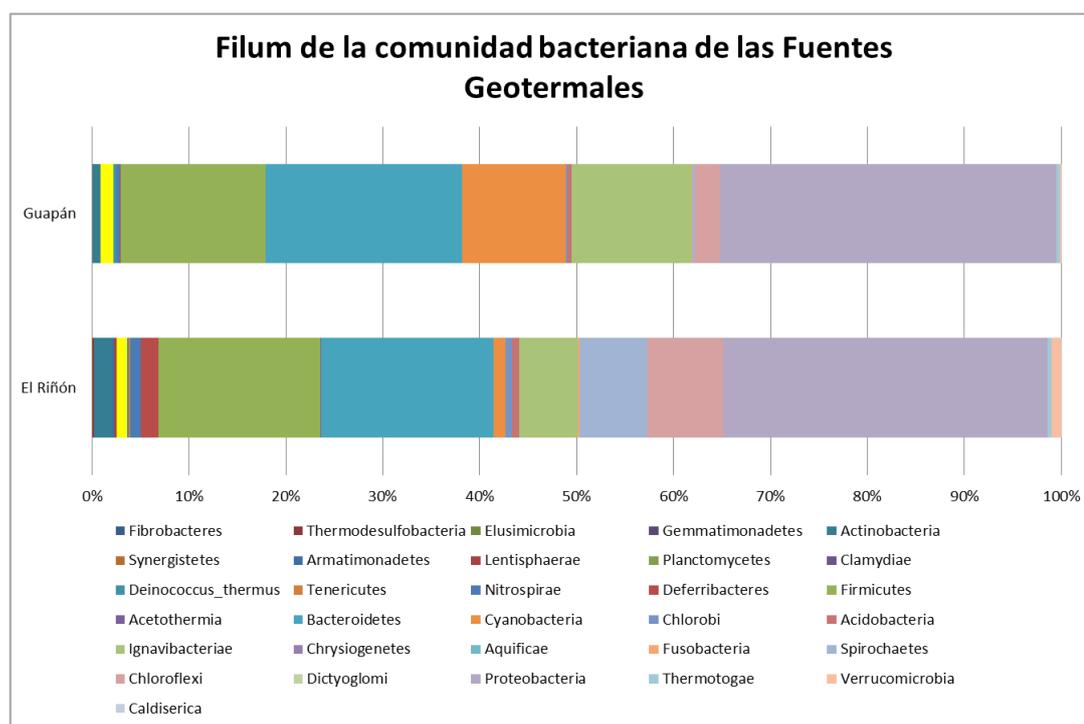
Los resultados obtenidos muestran que la comunidad bacteriana se encuentra constituida por 30 fila. La tabla 25 muestra el porcentaje los principales filum para bacterias, de los cuales se ve la predominancia de Proteobacteria con un 33,42% en la fuente geotermal El Riñón, mientras que para Guapán tiene un valor de 34,72%.

Tabla 25

## Porcentaje de los principales Fila de la comunidad bacteriana

Filum	El Riñón	Guapán
Firmicutes	16,71%	14,91%
Bacteroidetes	17,78%	20,32%
Proteobacteria	33,42%	34,72%

En el gráfico 38 se muestra la distribución de los fila de la comunidad bacteriana.

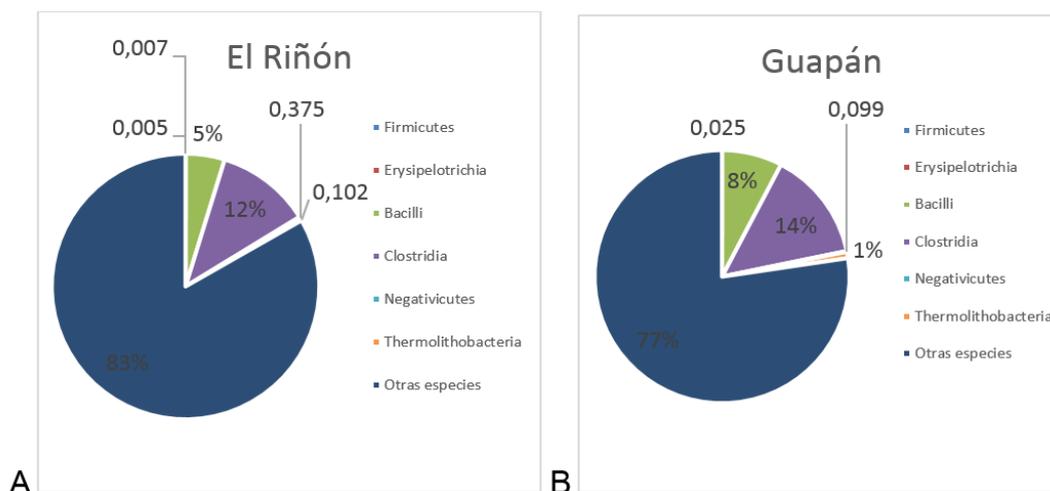


**Figura 38. Distribución completa de los filum de Bacterias de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

### 3.9.2.2. Análisis de Clase

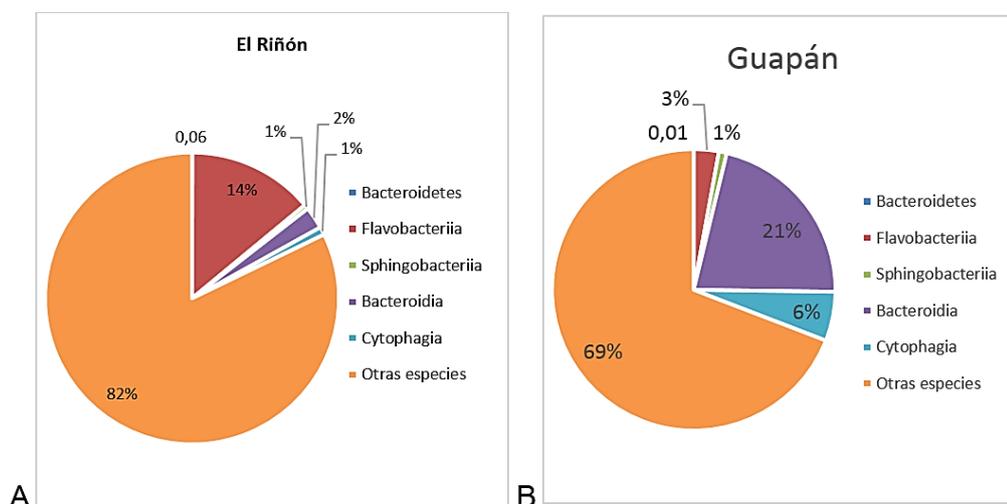
En las siguientes figuras se muestran los filum que obtuvieron mayor porcentaje de lecturas en los análisis de Secuenciación masiva - Illumina para las dos fuentes geotermales. Proteobacteria esta constituido por seis clases.

## a) Firmicutes



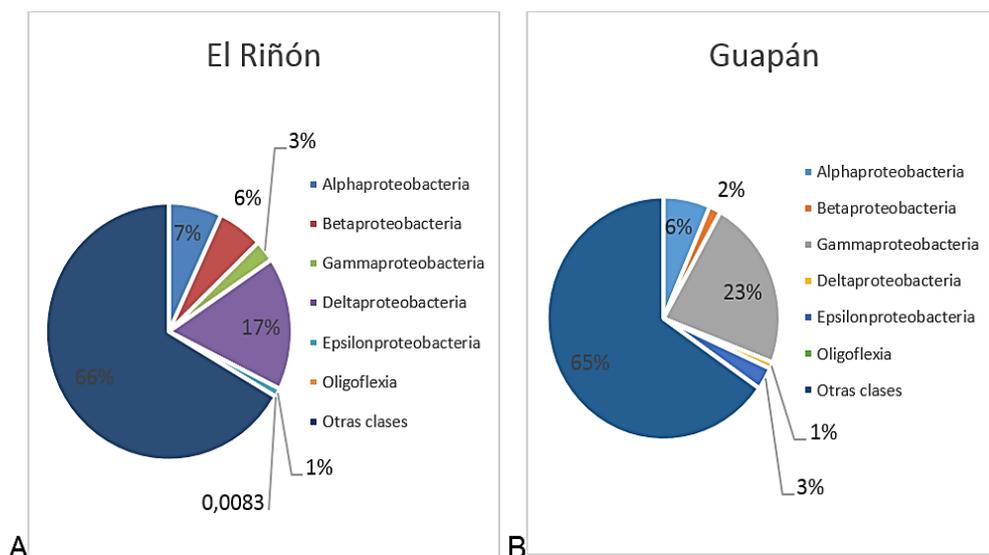
**Figura 39. El filum Firmicutes se encuentran constituido por seis clases: Firmicutes, Erysipelotrichia, Bacilli, Clostridia, Negativicute y Thermolithobacteria. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

## b) Bacteroidetes



**Figura 40. El filum Bacteroidetes se encuentran constituido por cinco clases: Bacteroidetes, Flavobacteria, Sphingobacteria, Bacterioidia y Cytophagia. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

### c) Proteobacteria



**Figura 41. El filum Proteobacteria se encuentran constituido por seis clases: Alphaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gammaproteobacterias, Deltaproteobacterias, Epsilonproteobacterias y Oligoproteobacterias. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

#### 3.9.2.3. Análisis de los principales géneros

Se realizó un análisis a nivel de género de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina, para ello se utilizaron aquellos que obtuvieron lecturas mayores a 100 OTUs por la cantidad de géneros obtenidos y para destacar los más importantes. Los filum con mayor número de géneros fueron: Bacteroidetes (11), Firmicutes (20) y Proteobacteria (55).

En la tabla 26 se muestran los géneros ordenados de acuerdo a su filum correspondiente.

Tabla 26

**Géneros obtenidos a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	OTU R	OTU G	A		
Acidobacteria	Actinobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	<i>Acidobacterium</i>	444	448			
		Acidothermales	Acidothermaceae	<i>Acidothermus</i>	145	0			
		Corynebacteriales	Tsukamurellaceae	<i>Tsukamurella</i>	112	738			
		Micrococcales	Intrasporangiaceae	<i>Tetrasphaera</i>	751	19			
		Holophagales	Holophagaceae	<i>Holophaga</i>	97	19			
Armatimonadetes	Armatimonadia	Armatimonadales	Armatimonadaceae	<i>Armatimonas</i>	114	0			
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	548	1784	1		
			Marinilabiales	Marinilabiaceae	<i>Alkaliflexus</i>	217	17		
			Prolixibacteraceae	<i>Mariniphaga</i>	615	97			
				<i>Prolixibacter</i>	385	45			
	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	<i>Cytophaga</i>	431	4363			
				<i>Ohtaekwangia</i>	195	282			
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aequorivita</i>	5	113			
				<i>Maribacter</i>	30	1208			
				<i>Flavobacterium</i>	1143	758			
				Schleiferiaceae	<i>Schleiferia</i>	0	135		
Saprosiriales				Saprosiraceae	<i>Candidatus aquirestis</i>	3	163		
Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	190	479				
Chlorobi	Chlorobia	Clorobiales	Chlorobiaceae	<i>Chlorobium</i>	546	253			
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	<i>Bellilinea</i>	1983	2021			
				<i>Anaerolinea</i>	2306	120			
				<i>Longilinea</i>	276	45			
				<i>Thermanaerothrix</i>	509	111			
				<i>Levilinea</i>	236	1			
				Caldilineales	Caldilineaceae	<i>Caldilinea</i>	48	262	
				Chloroflexales	Chloroflexaceae	<i>Chloroflexus</i>	126	669	
Dehalococcoidia	Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae	<i>Dehalococcoides</i>	1019	37				
Cyanobacteria	Cyanobacteria	Nostocales	Hapalosiphonaceae	<i>Fischerella</i>	104	2447			
			Scytonemataceae	<i>Scytonema</i>	108	3			
			Synechococcales	Leptolyngbyaceae	<i>Leptolyngbya</i>	47	2630		
			Pleurocapsales	Dermocarpellaceae	<i>Stanieria</i>	358	5353		
		Oscillatoriothycideae	Chroococcales	Cyanobacteriaceae	<i>Cyanobacterium</i>	14	2808		
			Oscillatoriales	Coleofasciculaceae	<i>Geitlerinema</i>	239	2		
		Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	<i>Aliifodinibius</i>	122	16	
<i>Flexistipes</i>	1579					67			
Deinococcus- Thermus Firmicutes	Deinococci	Thermales	Thermaceae	<i>Thermus</i>	62	455			
	Bacilli	Bacillales		<i>Exiguobacterium</i>	604	268	1		
Bacillaceae			<i>Anoxybacillus</i>	5	6	G			

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y G (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán). Continúa...

Tabla 26

**Géneros obtenidos a partir de los resultados de Secuenciación masiva -  
Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El  
Riñón y Guapán (Parte 2)**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	OTU R	OTU G	A			
Firmicutes	Bacilli	Bacillales		<i>Bacillus</i>	2880	1779	G,R			
			Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>	0	0	G,R			
				<i>Paenibacillus</i>	7	8				
			Pasteuriaceae	<i>Pasteuria</i>	131	52				
			Planococcaceae	<i>Paenisporosarcina</i>	254	574				
				<i>Planococcus</i>	19	485				
				<i>Planomicrobium</i>	25	799				
			Clostridia				<i>Acidaminobacter</i>	427	9	
						Clostridiales incertae Clostridiaceae	<i>fFusibacter</i>	106	901	
							<i>Clostridium</i>	7426	8742	
					<i>Lutispora</i>	490	44			
					<i>Proteiniclasticum</i>	0	176			
				Lachnospiraceae	<i>Lachnoclostridium</i>	3	187			
				Peptostreptococcaceae	<i>Peptoclostridium</i>	28	204			
					<i>Sporacetigenium</i>	285	5			
				Ruminococcaceae	<i>Acetivibrio</i>	298	54			
				Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacter</i>	135	4		
		Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Pelosinus</i>	287	76			
		Thermolithobacteria	Thermolithobacterales	Thermolithobacteraceae	<i>Thermolithobacter</i>	86	678			
	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	141	52			
	Ignavibacteriae	Ignavibacteria	Ignavibacteriales	Ignavibacteriaceae	<i>Ignavibacterium</i>	5091	15845			
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>Victivallis</i>	186	2			
	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	<i>Candidatus magnetobacterium</i>	413	2			
<i>Nitrospira</i>					441	147				
<i>Thermodesulfovibrio</i>					59	285				
Planctomycetes	Plantomycetia	Planctomycetales	Plantomycetaceae	<i>Blastopirellula</i>	35	126				
				<i>Bythopirellula</i>	8	142				
				<i>Pirellula</i>	197	315				
				<i>Planctomyces</i>	434	860				
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	<i>Hyphomicrobium</i>	153	108				
			Methylocystaceae	<i>Albibacter</i>	40	1841				
			Rhizobiaceae	<i>Sinorhizobium</i>	1578	9				
				<i>Rhizobium</i>	137	888	R			
			Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Albidovulum</i>	24	934			
					<i>Gemmobacter</i>	426	390			

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y R (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán).

Continúa...

Tabla 26.

**Géneros obtenidos a partir de los resultados de Secuenciación masiva -  
Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El  
Riñón y Guapán (Parte 3)**

Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	OTU R	OTU G	A			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Pannonibacter</i>	2	2	R			
				<i>Paracoccus</i>	102	462				
				<i>Rhodobacter</i>	1210	848				
				<i>Rhodovulum</i>	12	850				
				<i>Roseivivax</i>	12	433				
				<i>Rubrimonas</i>	24	50				
				<i>Magnetospirillum</i>	197	4				
				<i>Altererythrobacter</i>	134	43				
				Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	103	320			
					<i>Erythrobacter</i>	522	31			
				Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Curvibacter</i>	441	6	
							Oxalobacteraceae	<i>Duganella</i>	216	2
						<i>Massilia</i>	184	1		
						Gallionellales	Gallionellaceae	<i>Sideroxydans</i>	219	34
	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	<i>Hydrogenophilus</i>			64	101			
			<i>Thiobacillus</i>			2113	315			
	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>		146	349				
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Azoarcus</i>		68	914				
			<i>Methyloversatilis</i>		752	32				
	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae		<i>Aeromonas</i>	17	860	R		
		Chromatiales	Chromatiaceae		<i>Thiohalocapsa</i>	116	0			
			Ectothiorhodospiraceae		<i>Thioalkalivibrio</i>	11	165			
		Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	<i>Marinospirillum</i>	3	415				
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	21	1	R			
				<i>Psychrobacter</i>	27	1133				
			Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	1022	3196				
Vibrionales		Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	29	7738					
Xanthomonadales		Rhodanobacteraceae	<i>Dokdonella</i>	203	46					
		Xanthomonadaceae	<i>Rehaibacterium</i>	423	4593					
	<i>Stenotrophomonas</i>		0	0	R					
Deltaproteobacteria	Desulfobacteriales	Desulfobacteraceae	<i>Desulfatirhabdium</i>	103	0					
			<i>Desulfococcus</i>	137	2					
			<i>Desulforegula</i>	1427	13					
			Desulfuromonales	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i>	1395	49			
	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	<i>Desulfurella</i>	167	195					

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y R (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán). Continúa...

Tabla 26

**Géneros obtenidos a partir de los resultados de Secuenciación masiva -  
Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El  
Riñón y Guapán (Parte 4)**

Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	OTU R	OTU G	A			
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	<i>Desulfuromonas</i>	5581	80				
				<i>Desulfosarcina</i>	176	1				
				<i>Pelobacter</i>	286	1				
				<i>Desulfomicrobium</i>	324	16				
				Myxococcales	Nannocystineae	<i>Desulfovibrio</i>	1392	106		
						<i>Haliangium</i>	158	1		
						<i>Plesiocystis</i>	102	0		
				Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Desulfobacca</i>	161	29		
						<i>Syntrophus</i>	113	4		
				Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	<i>Desulforhabdus</i>	107	50		
						<i>Desulfatimicrobium</i>	223	178		
						<i>Syntrophobacter</i>	1285	26		
				Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>	74	3796	
							Helicobacteraceae	<i>Sulfuricurvum</i>	745	1
				Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales		<i>Exilispira</i>	1218	3
Leptospiraceae	<i>Leptospira</i>	261	38							
Spirochaetaceae	<i>Spirochaeta</i>	2262	186							
Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	1992	87							
Thermotogae	Thermotogae	Mesoaciditogales	Mesoaciditogaceae	<i>Mesoaciditoga</i>	242	311				
		Kosmotogales	Kosmotogaceae	<i>Kosmotoga</i>	137	71				
Verrucomicrobia	Opitutae	Opitutales	Opitutaceae	<i>Opitutus</i>	249	1				
	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales		<i>Pedosphaera</i>	247	5				
			Verrucomicrobiaceae	<i>Luteolibacter</i>	1	128				
				<i>Verrucomicrobium</i>	230	14				

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y G (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán).

### 3.9.2.4. Análisis de las principales especies

Para trabajar los resultados a nivel de especie fue necesario seleccionar a aquellas que tuvieron lecturas mayores a 100 OTUs en cada muestra enviada, de esta manera es posible conocer las especies totales que se encuentran en cada una de las fuentes geotermales.

Se determinó que la comunidad bacteriana se encuentra constituida por 139 especies, distribuidas en 133 géneros, de los cuales *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Treponema*, están conformados por cuatro especies y reportan número altos de lecturas, como se resume en la tabla 27.

**Tabla 27.**

#### **Géneros de bacterias constituidos por un mayor número de especies**

<b>Género</b>	<b>Número de especies</b>	<b>OTUs El Riñón</b>	<b>OTUs Guapán</b>
<i>Bacillus</i>	4	2824	1715
<i>Pseudomonas</i>	4	1007	3161
<i>Treponema</i>	4	1975	87

Las especies con mayor número de OTUs fueron: *Flavobacterium spp.* (11208 OTUs en El Riñón y 738 OTUs en Guapán), *Bellilinea spp.* (1782 OTUs en El Riñón y 1748 OTUs en Guapán) y *Gemmobacter megaterium* (423 OTUs en El Riñón y 373 OTUs en Guapán). En la tabla 28 se presentan las especies organizadas de acuerdo a su filum, clase, orden, familia y género.

Tabla 28

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán.**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	R	G	A	
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	Acidobacterium spp.	441	448		
		Corynebacteriales	Tsukamurellaceae	Tsukamurella	Tsukamurella spp.	112	738		
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidothermales	Acidothermaceae	Acidothermus	Acidothermus cellulolyticus	145	0		
		Micrococcales	Intrasporangiaceae	Tetrasphaera	Tetrasphaera spp.	751	19		
		Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	Cutibacterium	Propionibacterium acnes	8	7		
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales			Mariniphaga bacteroidales bacterium	615	97		
			Bacteroidaceae	Bacteroides	Bacteroides spp.	538	17825		
			Porphyromonadaceae	Dysgonomonas	Dysgonomonas capnocytophagoide	7	0		
		Marinilabiales	Prolixibacteraceae	Prolixibacter	Prolixibacter spp.	385	45		
		Marinilabiales	Marinilabiaceae	Alkaliflexus	Alkaliflexus spp.	217	14		
	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Cytophaga	Cytophaga	Cytophaga spp.	323	185	
					Cytophaga sp.		22	4177	
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Aequorivita	Aequorivita	Aequorivita sp.	5	113	
					Flavobacterium	Flavobacterium spp.	11208	738	
					Flavobacterium sp.		184	20	
Maribacter					Maribacter sp.	30	1208		
Schleiferiaceae					Schleiferia	Schleiferia thermophila	0	135	
Ignavibacteria	Ignavibacteriales	Ignavibacteriaceae	Ignavibacterium	Ignavibacterium	Ignavibacterium sp.	404	15385		
				Ignavibacterium spp.		4608	94		
Saprosipria	Saprosiprales	Saprosipraceae	Candidatus Aquirestis	Candidatus aquirestis calciphila	3	163			
Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	Sphingobacterium spp.	190	479			
Balneolaetota	Balneolia	Balneolales	Balneolaceae	Aliifodinibius	Aliifodinibius sp.	122	16		
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	Chlorobiaceae	Chlorobium	Chlorobium spp.	546	253		
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Anaerolinea	Anaerolinea	Anaerolinea spp.	2139	114	
					Anaerolinea thermophila		167	6	
					Bellilinea	Bellilinea caldifistulae	201	273	
					Bellilinea spp.		1782	1748	
					Levilinea	Levilinea saccharolytica	236	1	
					Longilinea	Longilinea spp.	276	45	
					Thermanaerotherix	Thermanaerotherix daxensis	506	74	
					Caldiilineae	Caldiilineales	Caldiilineaceae	Caldiilinea	Caldiilinea spp.
Chloroflexia	Chloroflexales	Chloroflexaceae	Chloroflexus	Chloroflexus	Chloroflexus aurantiacus	27	141		
				Chloroflexus spp.		99	527		

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y R (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán). Continúa...

Tabla 28

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán (Parte 2)**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	R	G	A
Chloroflexi	Dehalococcoidia	Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae	<i>Dehalococcoides</i>	<i>Dehalococcoides</i> spp.	101 3	11	
Cyanobacteria		Synechococcales	Leptolyngbyaceae	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Leptolyngbya</i> spp. <i>Leptolyngbya</i> sp.	6 41	592 185 9	
	Cyanobacteria	Nostocales	Hapalosiphonaceae	<i>Fischerella</i>	<i>Fischerella</i> sp.	104	244 2	
			Scytonemataceae	<i>Scytonema</i>	<i>Scytonema arcangelii</i>	108	3	
		Pleurocapsales	Dermocarpellaceae	<i>Stanieria</i>	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	358	535 3	
		Oscillatoriothycideae	Coleofasciculaceae	<i>Geitlerinema</i>	<i>Geitlerinema</i> sp.	187	1	
	Oscillatoriothycideae	Chroococcales	Cyanobacteriaceae	<i>Cyanobacterium</i>	<i>Cyanobacterium aponinum</i> <i>Cyanobacterium</i> spp.	3 11	413 239 5	
Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	<i>Flexistipes</i>	<i>Flexistipes</i> sp.	157 9	67	
Deinococcus-Thermus	Deinococci	Thermales	Thermaceae	<i>Thermus</i>	<i>Thermus</i> spp.	62	455	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales		<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium</i> sp. <i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	31 573	182 3 855	
			Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus selenatarsenatis</i> <i>Bacillus</i> sp.	366 3 678 177 7	41 4 15 165 5	R
			Paenibacillaceae	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i> spp.	3	1	G
				<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. <i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	1 3	0 0	G
			Planococcaceae	<i>Paenisporosarcina</i>	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i>	254	574	
				<i>Planomicrobium</i>	<i>Planomicrobium koreense</i>	5	773	
				<i>Planococcus</i>	<i>Planococcus citreus</i>	18	397	
			Pasteuriaceae	<i>Pasteuria</i>	<i>Pasteuria</i> spp.	131	52	
Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>Victivallis</i>	<i>Victivallis</i> spp.	186	2	
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	<i>Thermodesulfovibrio</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i> spp.	57	284	
				<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i> spp.	440	146	
Opiritatus	Opiritutae	Opiritutales	Opiritutaceae	<i>Opiritutus</i>	<i>Opiritutus</i> spp.	243	1	
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Isosphaera	<i>Isosphaera</i>	<i>Isosphaera</i> spp.	64	34	
			Planctomycetaceae	<i>Bythopirellula</i>	<i>Bythopirellula goksoyri</i>	8	142	
				<i>Blastopirellula</i>	<i>Blastopirellula</i> spp.	35	126	
				<i>Planctomyces</i>	<i>Planctomyces</i> spp.	434	859	
			Planctomycetaceae	<i>Pirellula</i>	<i>Pirellula</i> spp.	193	314	

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y R (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán). Continúa...

Tabla 28

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva  
- Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El  
Riñón y Guapán (Parte 3)**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	R	G	A	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	<i>Albibacter</i>	<i>Albibacter methylovorans</i>	40	1841		
			Rhizobiaceae	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium spp.</i>	157	8	9	
				<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium spp.</i>	79	888	R	
			Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Albidovulum</i>	<i>Albidovulum inexpectatum</i>	6	901	
					<i>Gemmobacter</i>	<i>Gemmobacter megaterium</i>	423	373	
					<i>Pannonibacter</i>	<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	2	2	R
		<i>Paracoccus</i>			<i>Paracoccus sp.</i>	70	220		
					<i>Paracoccus denitrificans</i>	1	165		
		<i>Rhodovulum</i>			<i>Rhodovulum euryhalinum</i>	12	849		
			<i>Roseovarius</i>	<i>Roseovarius sp.</i>	46	167			
			<i>Roseivivax</i>	<i>Roseivivax sp.</i>	12	433			
			Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Magnetospirillum</i>	<i>Magnetospirillum sp.</i>	185	4	
		Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter citreus</i>	395	15		
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	71	92		
				<i>Curvibacter</i>	<i>Curvibacter spp.</i>	214	5		
			<i>Curvibacter</i>	<i>Curvibacter sp.</i>	227	1			
			<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	3	0			
			Oxalobacteraceae	<i>Duganella</i>	<i>Duganella spp.</i>	213	0		
				<i>Massilia</i>	<i>Massilia timonae</i>	105	1		
		Gallionellales	Gallionellaceae	<i>Sideroxydans</i>	<i>Sideroxydans paludicola</i>	155	7		
		Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiobacillus spp.</i>	169	5	304	
				<i>Thiobacillus sp.</i>		363	5		
		Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas spp.</i>	133	244		
Rhodocyclales		Rhodocyclaceae	<i>Azoarcus</i>	<i>Azoarcus spp.</i>	61	884			
	<i>Methyloversatilis</i>		<i>Methyloversatilis universalis</i>	687	24				
Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	<i>Thiohalocapsa</i>	<i>Thiohalocapsa halophila</i>	116	0			
		Ectothiorhodospiraceae	<i>Thioalkalivibrio</i>	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>	8	162			
	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	<i>Marinospirillum</i>	<i>Marinospirillum alkaliphilum</i>	3	415			
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	18	1			
			<i>Psychrobacter</i>	<i>Psychrobacter glacincola</i>	27	1130	4		
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	138	118				
<i>Pseudomonas spp.</i>			623	76					

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y R (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán). Continúa...

Tabla 28

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán (Parte 4)**

Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	R	G	A			
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	66	124				
					<i>Pseudomonas stutzeri</i>	180	284	3			
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>	18	534	5			
					<i>Vibrio cholerae</i>	11	238	6			
					<i>Aquimonas</i>	7	272				
					<i>Dokdonella</i>	194	23				
		Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	<i>Aquimonas</i>	<i>Aquimonas spp.</i>	7	272				
					<i>Dokdonella koreensis</i>	194	23				
					Xanthomonadaceae	<i>Rehabacterium</i>	<i>Rehabacterium terrae</i>	423	459	3	
							<i>Desulfovibrio</i>	889	13		
	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio spp.</i>	485	2			
						<i>Desulfomicrobium</i>	241	15			
						<i>Desulfomicrobium spp.</i>	0	1			
						Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	<i>Desulfatirhabdium</i>	<i>Desulfatirhabdium</i>	100	0
									<i>Desulfococcus</i>	127	2
									<i>Desulforegula</i>	1427	13
									<i>Desulfosarcina</i>	176	1
						Desulfurellales	Desulfurellaceae	<i>Desulfurella</i>	<i>Desulfurella spp.</i>	167	194
									<i>Pelobacter</i>	258	0
						Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	<i>Pelobacter</i>	<i>Pelobacter spp.</i>	5581	73
									<i>Desulfuromonas</i>	1329	35
						Myxococcales	Nannocystineae	<i>Nannocystaceae</i>	<i>Plesiocystis</i>	102	0
									<i>Haliangium</i>	158	1
						Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	<i>Syntrophobacter</i>	<i>Syntrophobacter pfennigii</i>	1255	11
									<i>Desulforhabdus</i>	107	50
									<i>Desulfatimicrobium</i>	223	178
									<i>Desulfobacca</i>	141	1
<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	723	1									
Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae	<i>Sulfuricurvum</i>	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	74	376	0				
				<i>Arcobacter</i>	74	376	0				
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetales	<i>Exilispira</i>	<i>Exilispira thermophila</i>	1218	3				
					Spirochaetaeaceae	<i>Treponema</i>	<i>Treponema spp.</i>	979	79		
							<i>Treponema primitia</i>	369	6		
							<i>Treponema spirochaeta caldaria</i>	406	0		

\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y R (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán). Continúa...

Tabla 28

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Bacterias provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán (Parte 5)**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	R	G	A
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	<i>Treponema stenostreptum</i>	22	2	
						1		
				<i>Spirochaeta</i>	<i>Spirochaeta spp.</i>	85	13	
		<i>Spirochaeta sp.</i>	0					
				13	173			
				79				
		25	38					
		2						
Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteriales	Thermodesulfobacteriaceae	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>Thermodesulfobacterium spp.</i>	11	58	
						9		
Thermotogae	Thermotogae	Mesoaciditogales	Mesoaciditogaceae	<i>Mesoaciditoga</i>	<i>Mesoaciditoga lauensis</i>	24	311	
						2		
		Kosmotogales	Kosmotogaceae	<i>Kosmotoga</i>	<i>Kosmotoga spp.</i>	13	71	
						7		
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	<i>Verrucomicrobium</i>	<i>Verrucomicrobium spp.</i>	23	14	
							0	
		Verrucomicrobia	<i>Pedosphaera</i>	<i>Pedosphaera spp.</i>	22	4		
						4		

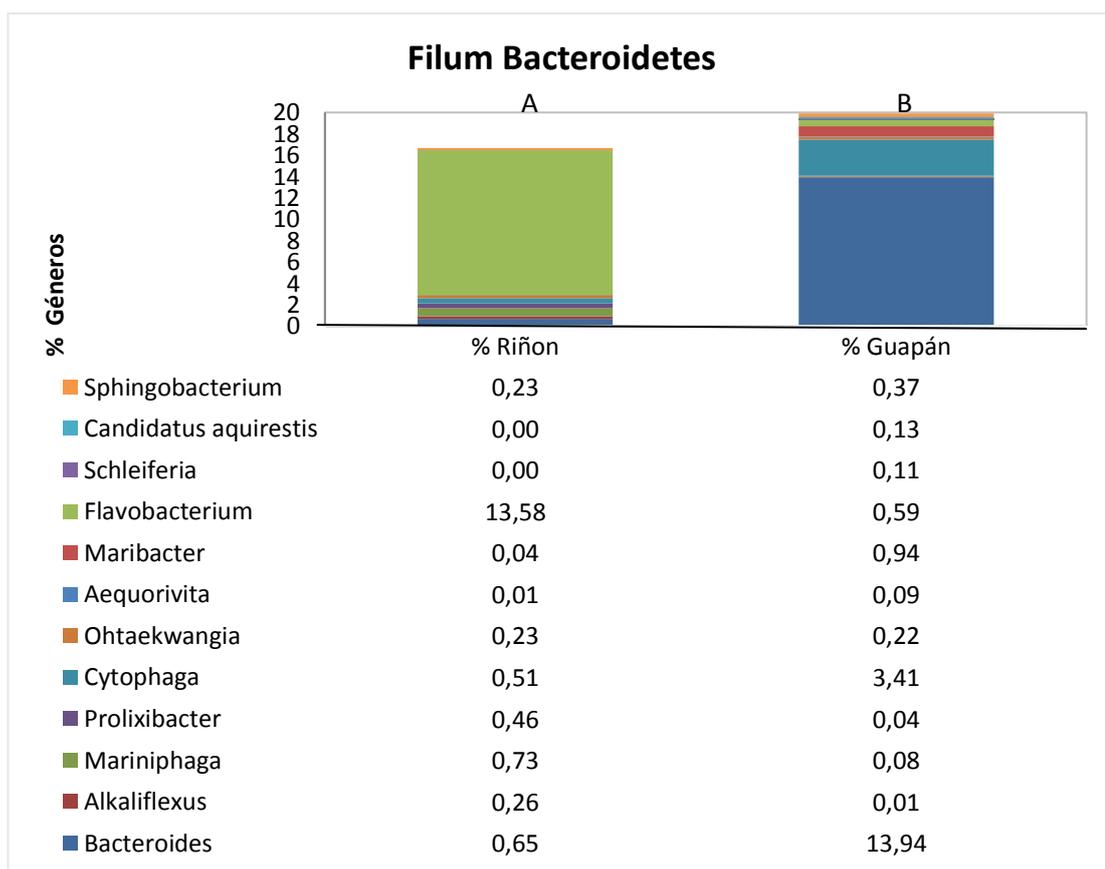
\*Columna A, se refiere a las especies aisladas en laboratorio; R (aislados a partir de fuente geotermal El Riñón) y G (aislados a partir de la fuente geotermal Guapán). “sp” (certeza del género pero no de la especie en singular) o “spp” (certeza del género pero no de la especie en plural) (Amaro, Aycaguer & Carnevia, 1999).

### 3.9.2.5. Porcentaje de géneros representativos en Bacterias

Debido a que los resultados para bacterias en su mayoría llegaron a nivel de género, se presentan los que constituyen los principales filum (Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias):

#### a) Bacteroidetes

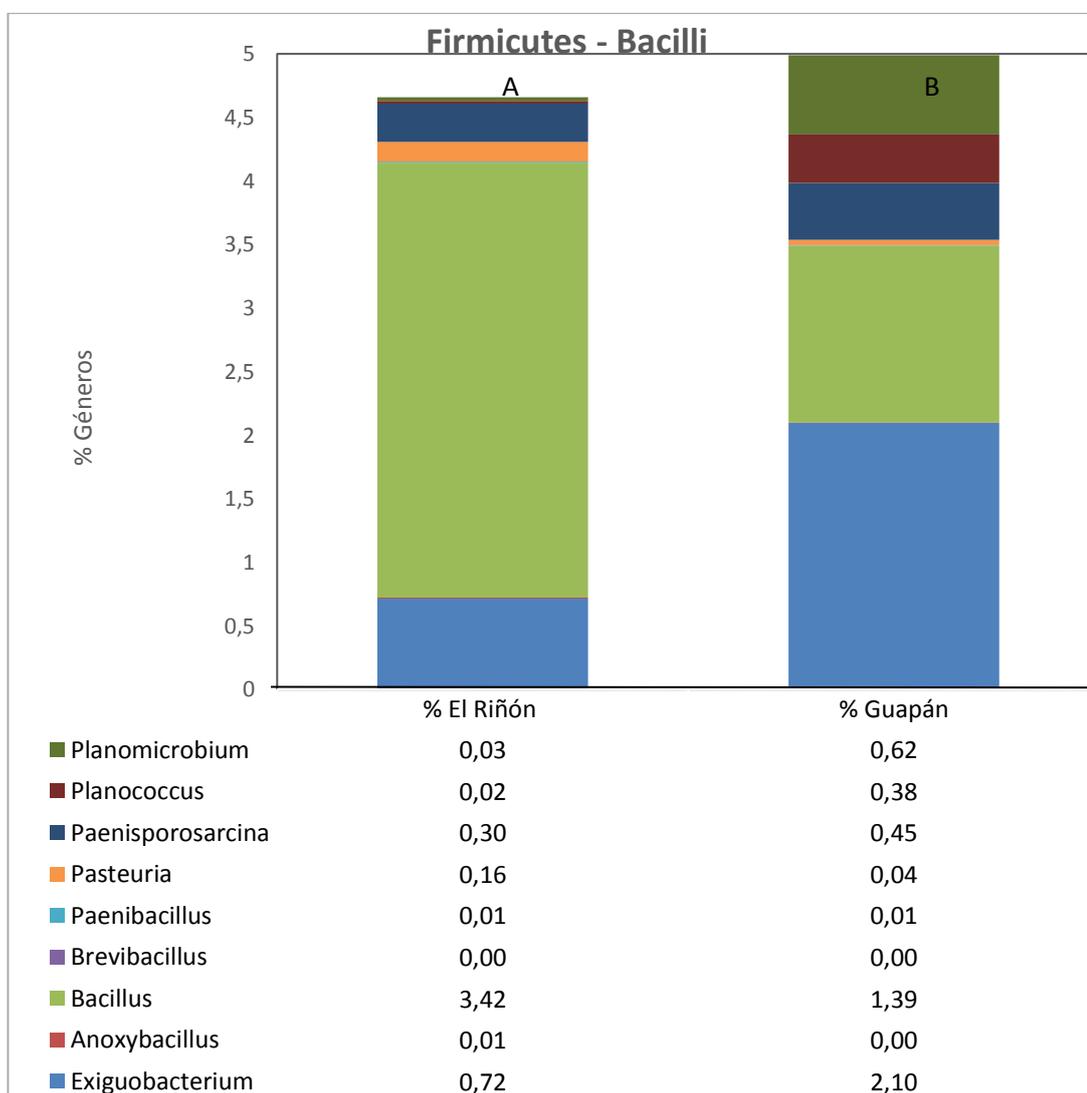
En la siguiente figura, se muestran los 12 géneros pertenecientes a la clase Bacteroidetes:



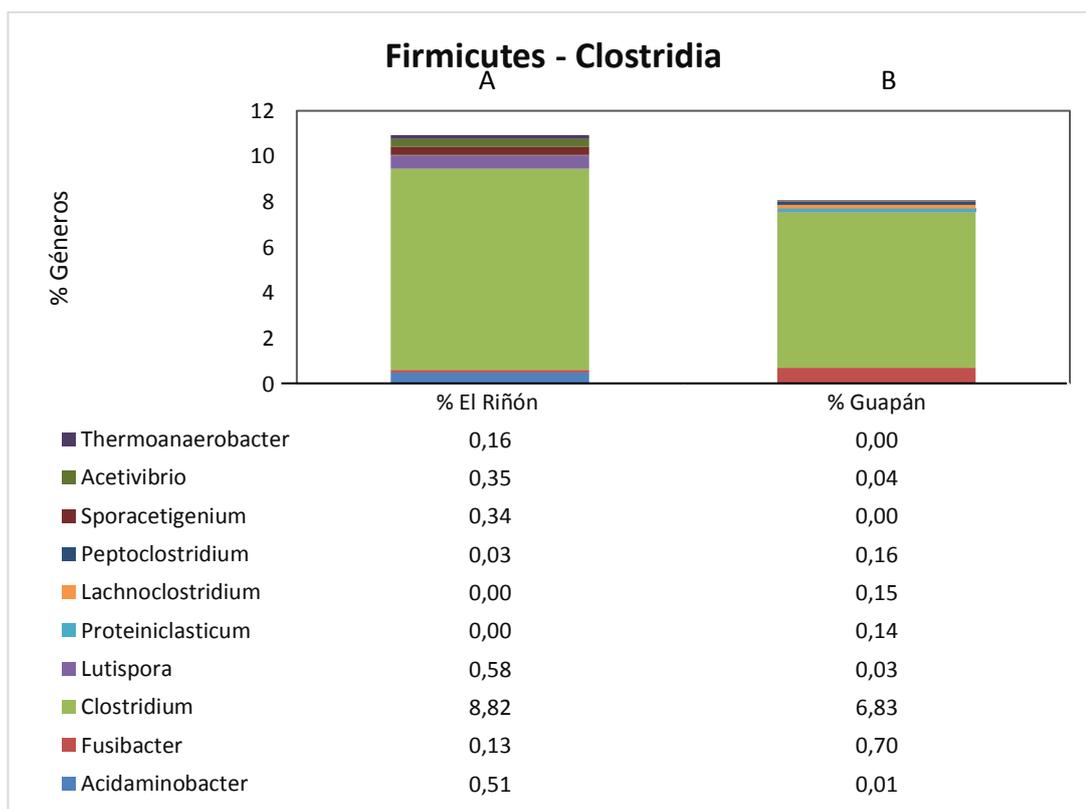
**Figura 42. Géneros del filum Bacteroidetes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

## b) Firmicutes

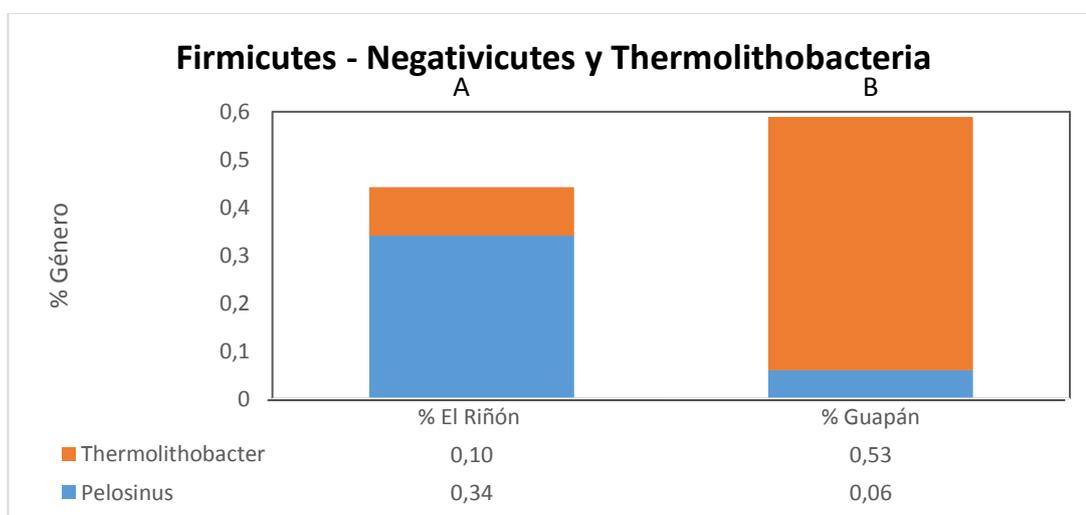
El filum Firmicutes se encuentra constituido por las clases Bacilli (9 géneros), Clostridia (10), Negativicutes (1) y Thermolithobacteria (1); las figuras 43, 44 y 45 muestran los porcentajes de cada uno:



**Figura 43. Géneros de la clase Bacilli, perteneciente al filum Firmicutes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**



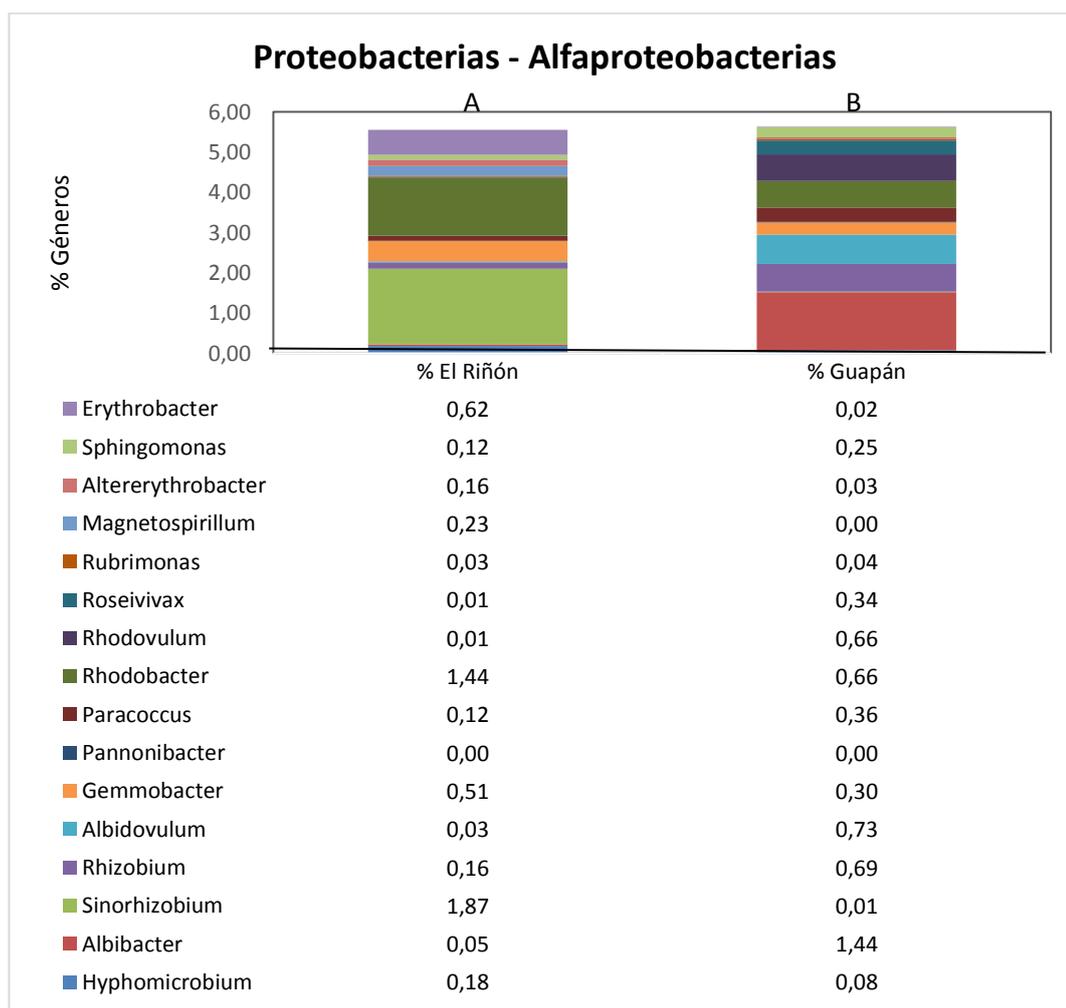
**Figura 44. Géneros de la clase Clostridia, perteneciente al filum Firmicutes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**



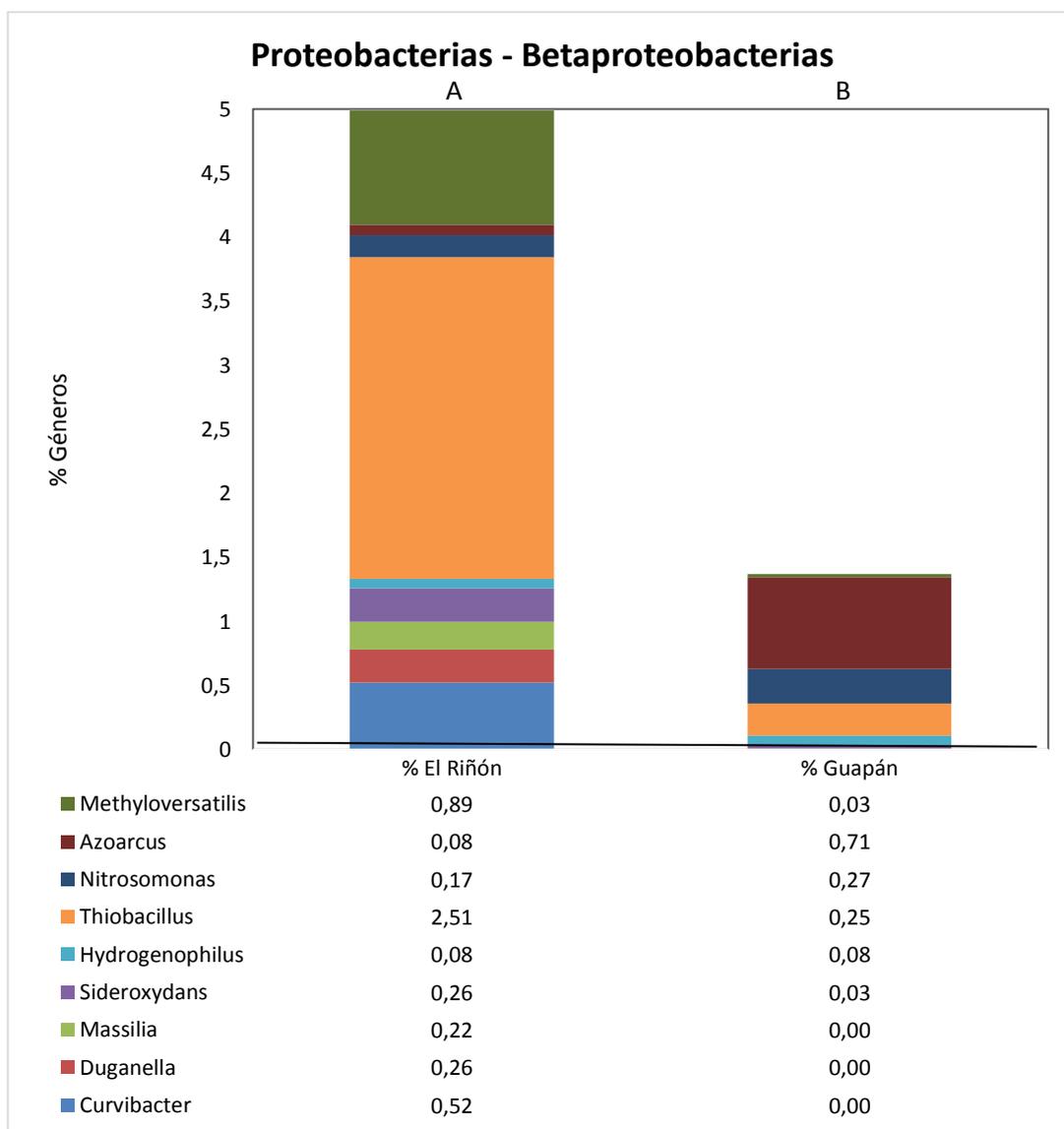
**Figura 45. Géneros de la clase Negativicutes y Thermolithobacteria, perteneciente al filum Firmicutes para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

### c) Proteobacterias

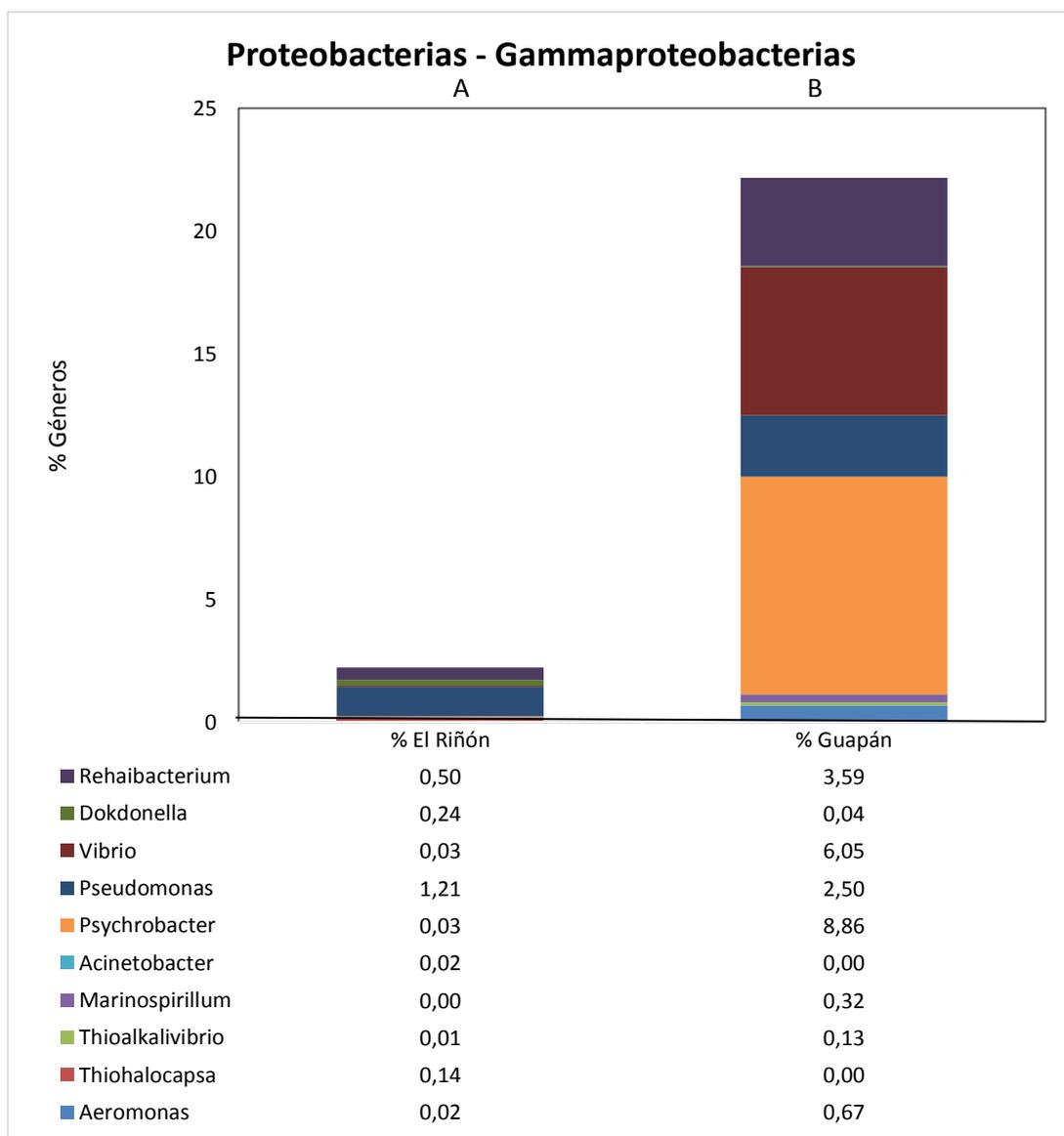
El filum Proteobacteria es el que posee mayor número de géneros repartidos en cinco clases: Alfaproteobacterias (16), Betaproteobacterias (9), Gammaproteobacterias (9), Deltaproteobacterias (18) y Epsilonproteobacteria (2). En las siguientes figuras 46, 47, 48, 49 y 50 se muestran los porcentajes para cada uno:



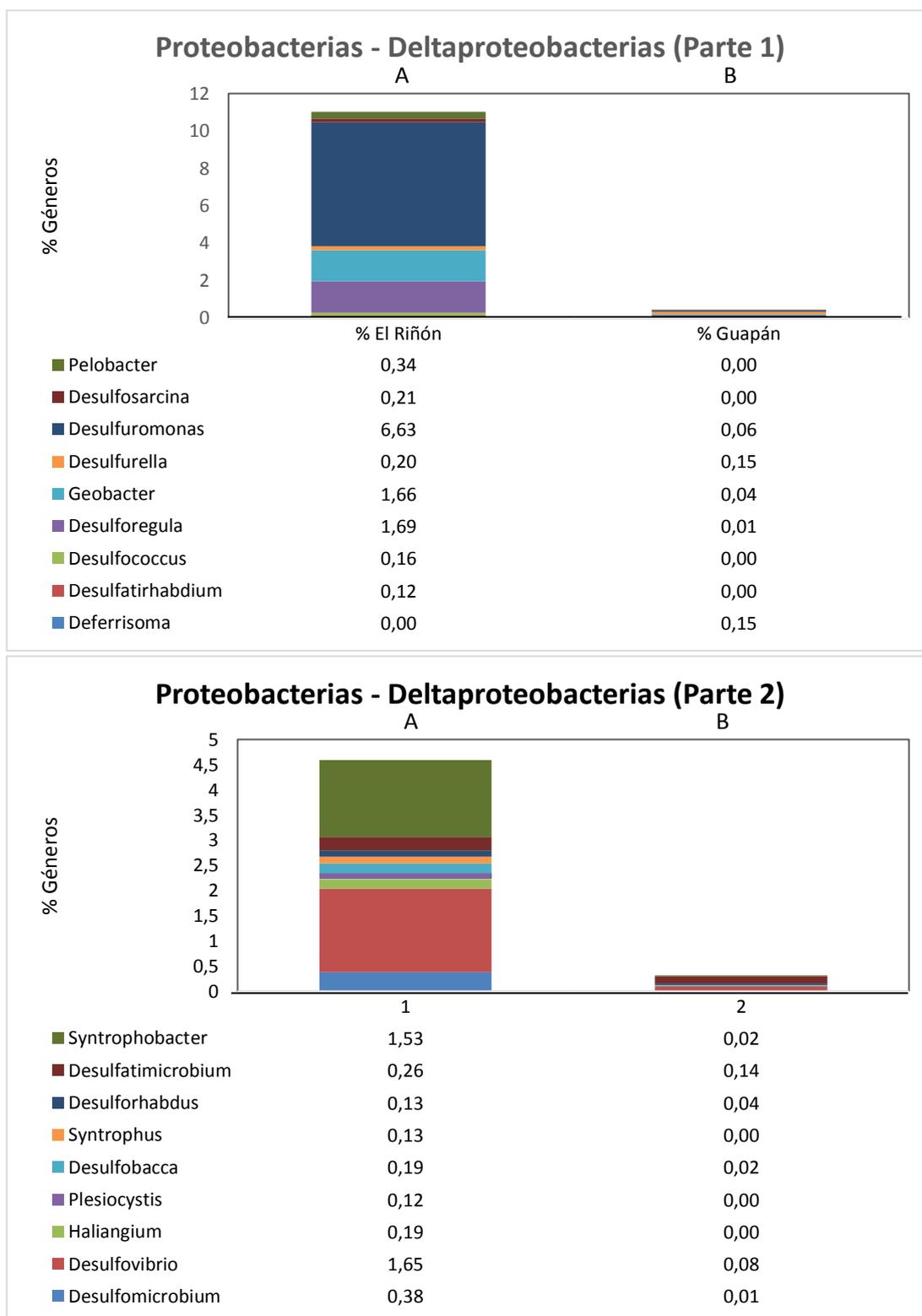
**Figura 46. Géneros de la clase Alfaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**



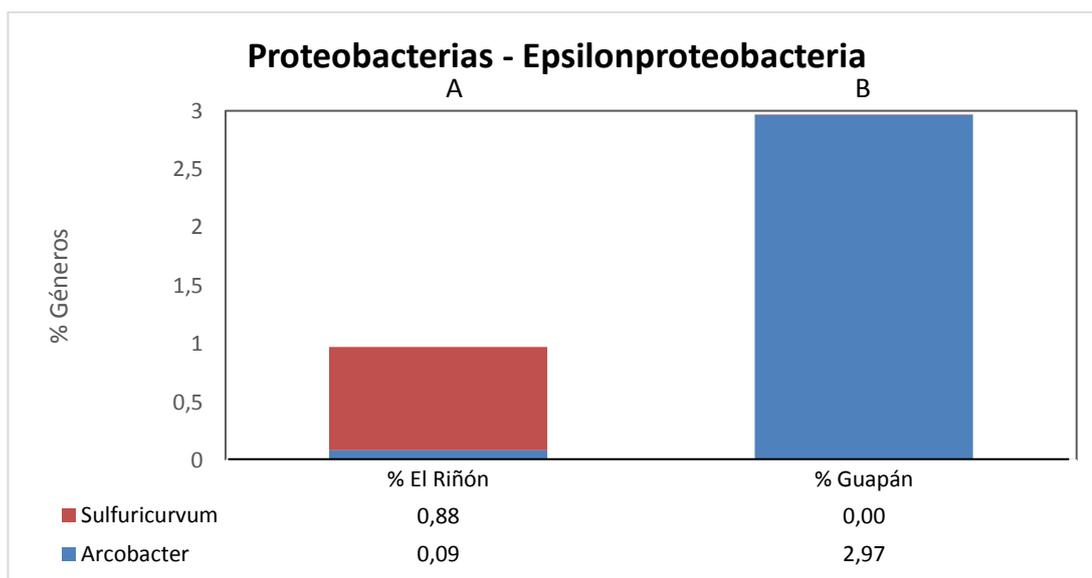
**Figura 47. Géneros de la clase Betaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**



**Figura 48. Géneros de la clase Gammaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**



**Figura 49. Géneros de la clase Deltaproteobacterias, perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 1 y 2)**



**Figura 50. Géneros de la clase Epsilonproteobacteria perteneciente al filum Proteobacterias para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

### 3.9.3. Comunidad de Algas

La comunidad de algas, de acuerdo con la tabla 20, representó el 25,24% para la fuente geotermal El Riñón, mientras que para la geoterma Guapán fue de 32,84% del número total de OTUs.

#### 3.9.3.1. Análisis de Filum

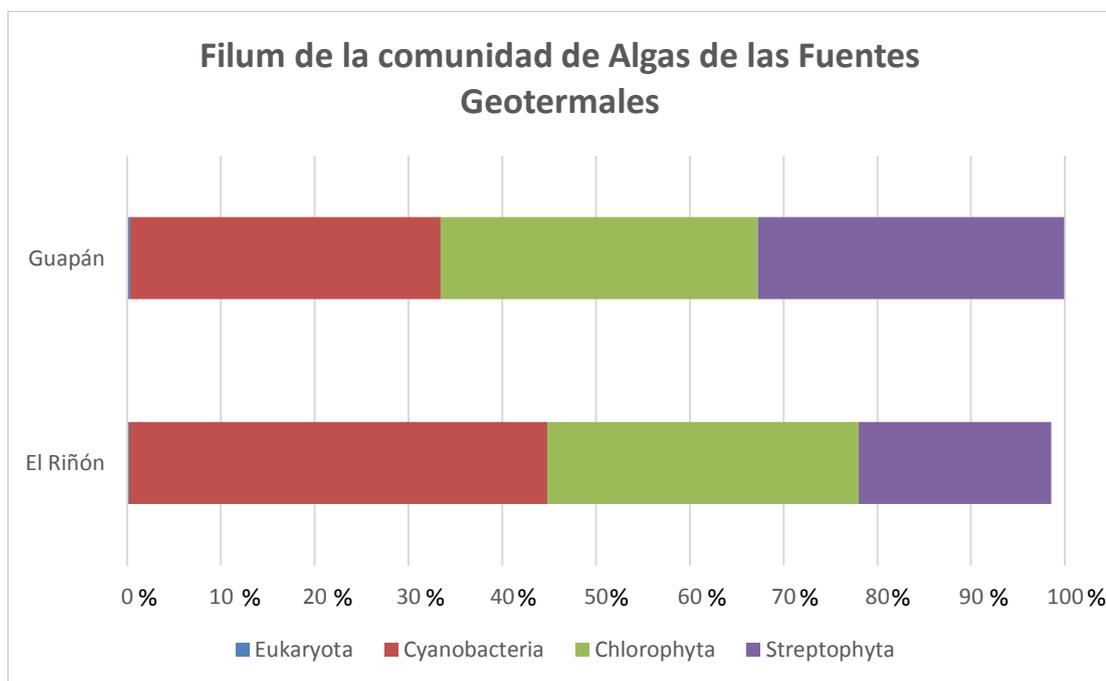
Los resultados obtenidos muestran que la comunidad de algas se encuentra constituida por cuatro fila, de los cuales se ve la predominancia del filum Cyanobacteria con un 44,62% en la fuente geotermal El Riñón, mientras que para Guapán tiene un valor de 33,09%, como se muestra en la tabla 29.

**Tabla 29**

#### Porcentaje de los principales Filum de la comunidad bacteriana

Filum	El Riñón	Guapán
Eukaryota	0,17%	0,32%
Cyanobacteria	44,62%	33,09%
Chlorophyta	33,22%	33,86%
Streptophyta	20,53%	32,66%

En el gráfico 51 se muestra la distribución de los filum de la comunidad de algas.



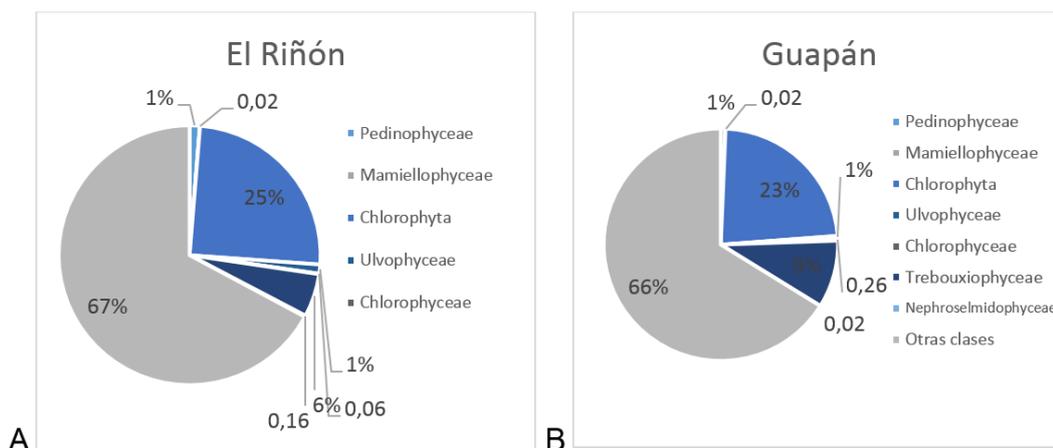
**Figura 51. Distribución completa de los filum de Algas de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

### **3.9.3.2. Análisis de Clase**

Se determinaron 13 clases que se encuentran distribuidas en los cuatro filum de la siguiente manera: Chlorophyta (7), Cyanobacteria (1), Eukariota (1) y Streptophyta (4).

A continuación se presentan las figuras 52, 53 y 54 que representan el porcentaje de las clases para cada uno de los filum de acuerdo al número de OTUs que obtuvieron en los análisis de Secuenciación masiva - Illumina.

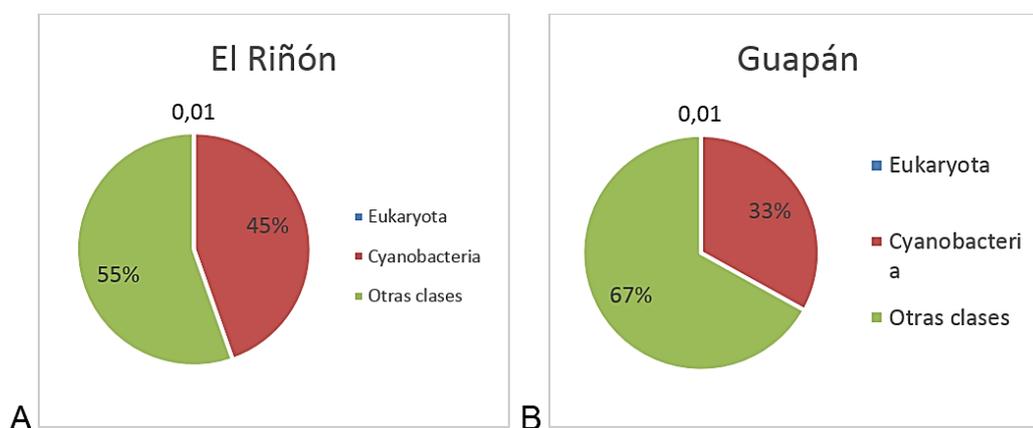
### a) Chlorophyta



**Figura 52: El filum Chlorophyta se encuentra constituido por siete clases: Pedinophyceae, Mamiellophyceae, Chlorophyta, Ulvophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae y Nephroselmidophyceae. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

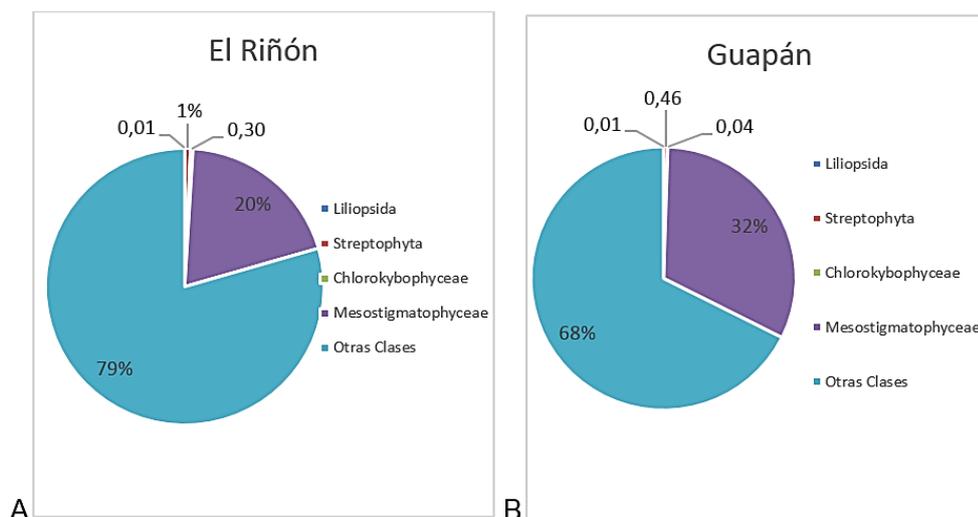
### b) Cyanobacteria y Eukariota

Las las clases de los filum Cyanobacteria y Eucariota fueron graficadas conjuntamente debido a que cada una posee una sola clase de su mismo nombre.



**Figura 53. El filum Cyanobacteria y Eucariota se encuentran constituidos por una clase con su mismo nombre cada uno. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

### c) Streptophyta



**Figura 54. El filum Streptophyta se encuentra constituido por cuatro clases: Liliopsida, Streptophyta, Chlorokybophyceae y Mesostigmatophyceae. Para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

#### 3.9.3.3. Análisis de los principales géneros

Se realizó un análisis a nivel de género de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina, para ello se utilizaron aquellos que tenían lecturas mayores a cero OTUs y se determinaron 27 géneros que se encuentran distribuidos en sus cuatro filum de la siguiente manera: Chlorophyta (15), Cyanobacteria (1), Euglenida (4) y Streptophyta (6).

En la tabla 30 se muestran los géneros ordenados de acuerdo a su filum correspondiente.

Tabla 30

**Géneros obtenidos a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Algas provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	OTU R	OTU G
Chlorophyta			Pycnococcaceae	Pseudoscourfieldia	19987	30900
		Pyramimonadales		Pyramimonas	15	80
	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Chlamydomonadaceae	Chlamydomonas	10	298
			Haematococcaceae	Chlorogonium	29	10
	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	Scherffelia	279	4
	Mamiellophyceae	Mamiellales	Mamiellaceae	Micromonas	20	33
	Nephroselmidophyceae			Nephroselmis	127	26
	Pedinophyceae	Pedinomonadales	Pedinomonadaceae	Pedinomonas	98	9
		Scourfieldiales	Scourfieldiaceae	Scourfieldia	901	825
	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae	Chlorella	3	66
		Microthamniales		Asterochloris	64	13
				Friedmannia	399	6
				Trebouxia	1832	1211
				Microthamnion	2023	11278
	Ulvophyceae	Ulotrichales		Chamaetrichon	30	43
				Gloeotilopsis	880	489
Cyanobacteria		Nostocales	Stigonemataceae	Stigonema	35874	44304
Euglenida	Euglenales		Phacaceae	Phacus	544	15
		Euglenales	Euglenaceae	Monomorpha	3	0
			Phacaceae	Discoplastis	44	12
			Euglenaceae	Trachelomonas	42	22
Streptophyta		Canellales	Canellaceae	Canella	33	52
		Piperales	Piperaceae	Piper	22	41
		Proteaales	Platanaceae	platanus	435	524
	Chlorokybophyceae	Chlorokybales	Chlorokybaceae	Chlorokybus	244	57
	Mesostigmatophyceae	Mesostigmatales	Mesostigmataceae	Mesostigma	15721	42719
	Jungermanniosida	Jungermanniales	Cephalozaceae	Odontoschisma	6	307

### 3.9.3.4. Análisis de las principales especies

Para trabajar los resultados a nivel de especie fue necesario seleccionar a aquellas que tuvieron lecturas mayores a cero. Se obtuvieron 33 especies distribuidas en 27 géneros como se muestran en la tabla 31. Las algas aisladas en el laboratorio correspondieron al filum Clorofita.

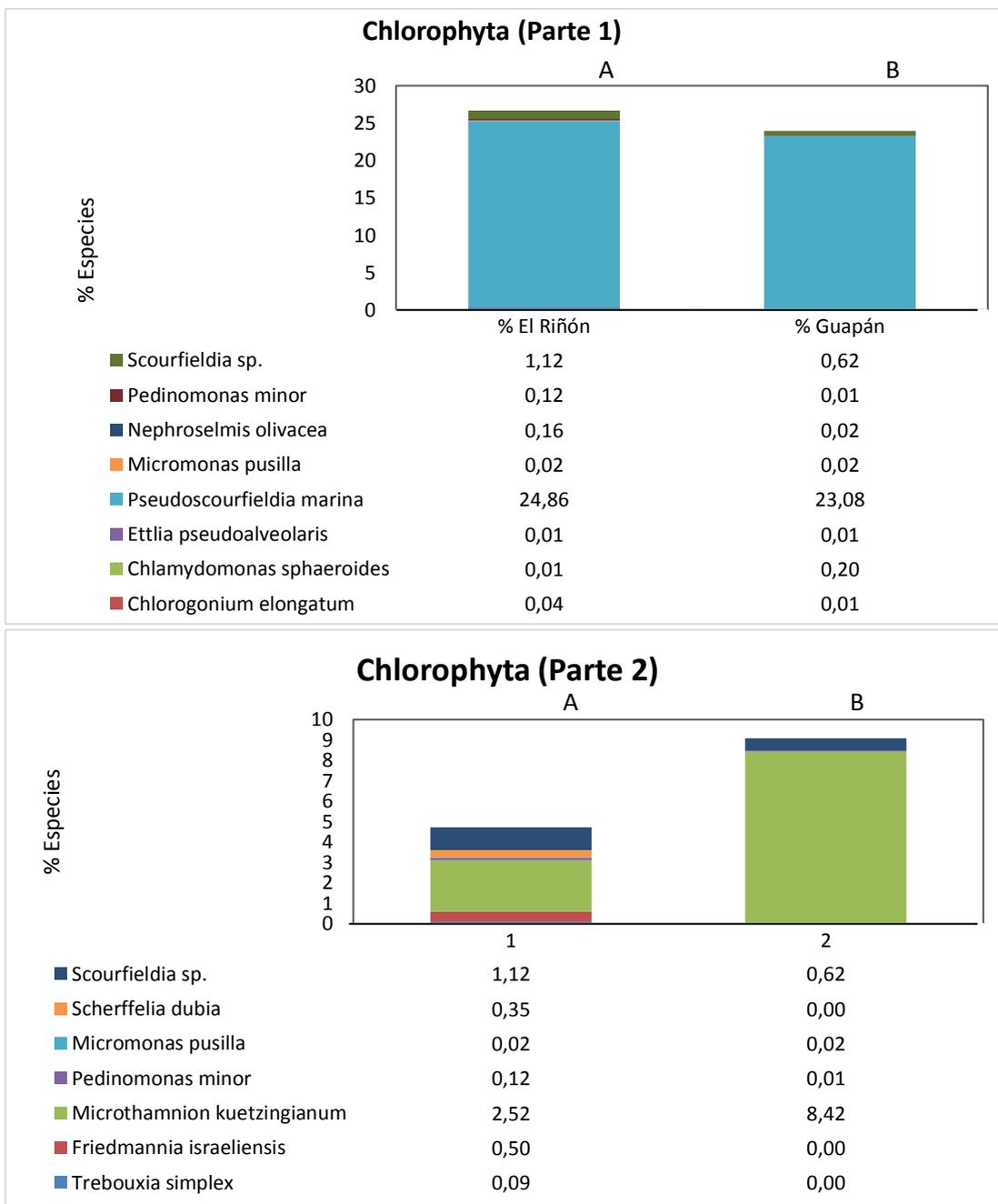
Tabla 31

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva  
- Illumina para Algas provenientes de las fuentes geotermales El Riñón  
y Guapán**

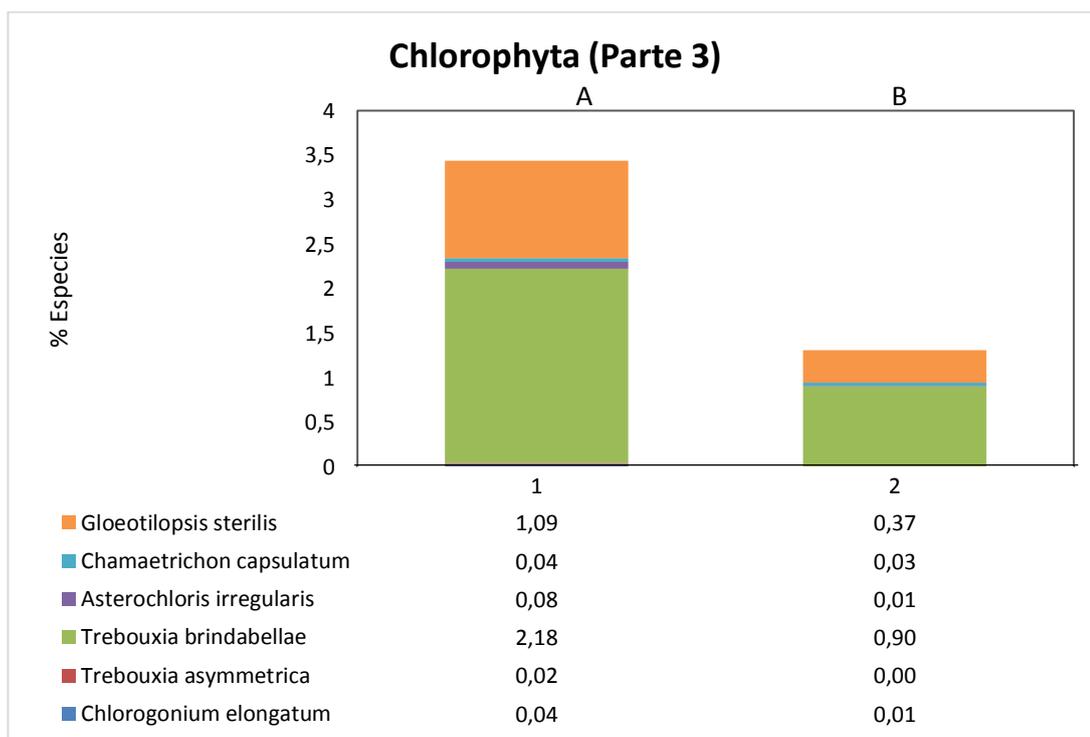
Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	OTU R	OTU G	
Chlorophyta	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	<i>Scherffelia</i>	<i>Scherffelia dubia</i>	279	4	
	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Haematococcaceae	<i>Chlorogonium</i>	<i>Chlorogonium elongatum</i>	29	10	
			Chlamydomonadaceae	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlamydomonas sphaeroides</i>	10	271	
	Mamiellophyceae	Mamiellales	Pycnococcaceae	<i>Ettlia</i>	<i>Ettlia pseudoalveolaris</i>	9	19	
					<i>Pseudoscourfieldia</i>	<i>Pseudoscourfieldia marina</i>	19987	30900
					<i>Micromonas</i>	<i>Micromonas pusilla</i>	20	33
	Nephroselmidophyceae		Nephroselmis	<i>Nephroselmis</i>	<i>Nephroselmis olivacea</i>	127	26	
	Pedinophyceae	Pedinomonadales	Pedinomonadaceae	<i>Pedinomonas</i>	<i>Pedinomonas minor</i>	98	9	
		Scourfieldiales	Scourfieldiaceae		<i>Scourfieldia sp.</i>	901	825	
	Trebouxiophyceae		Microthamniales	<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia simplex</i>	70	1	
			Microthamniales	<i>Friedmannia</i>	<i>Friedmannia israeliensis</i>	399	6	
			Microthamniales	<i>Microthamnion</i>	<i>Microthamnion kuetszingianum</i>	2023	11278	
	Pedinophyceae	Pedinomonadales	Pedinomonadaceae	<i>Pedinomonas</i>	<i>Pedinomonas minor</i>	98	9	
	Mamiellophyceae	Mamiellales	Mamiellaceae	<i>Micromonas</i>	<i>Micromonas pusilla</i>	20	33	
	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	<i>Scherffelia</i>	<i>Scherffelia dubia</i>	279	4	
	Pedinophyceae	Scourfieldiales	Scourfieldiaceae		<i>Scourfieldia sp.</i>	901	825	
	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Haematococcaceae	<i>Chlorogonium</i>	<i>Chlorogonium elongatum</i>	29	10	
	Trebouxiophyceae	Microthamniales		<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia asymmetrica</i>	13	1	
				<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia brindabellae</i>	1749	1206	
				<i>Asterochloris</i>	<i>Asterochloris irregularis</i>	64	11	
			<i>Chamaetrichon</i>	<i>Chamaetrichon capsulatum</i>	30	43		
Ulvophyceae	Ulotrichales		<i>Gloeotilopsis</i>	<i>Gloeotilopsis sterilis</i>	880	489		
				<i>Phacus segretii</i>	514	15		
Euglenida	Euglenales	Phacaceae	<i>Phacus</i>					
		Euglenaceae	<i>Trachelomonas</i>	<i>Trachelomonas cingulata</i>	22	22		
Streptophyta	Piperales	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia</i>	<i>Aristolochia macrophylla</i>	9	2		
			<i>Piper</i>	<i>Piper betle</i>	22	41		
		Platanaceae	<i>Platanus</i>	<i>Platanus occidentalis</i>	435	524		
	Chlorokybophyceae	Chlorokybales	Chlorokybaceae	<i>Chlorokybus</i>	<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	244	57	
	Jungermannioptida	Jungermanniales	Cephaloziaceae	<i>Odontoschisma</i>	<i>Odontoschisma denudatum</i>	6	307	
	Mesostigmatophyceae	Mesostigmatales	Mesostigmataceae	<i>Mesostigma</i>	<i>Mesostigma viride</i>	15721	42719	
	Liliopsida	Alismatales	Araceae;	<i>Spathiphyllum</i>	<i>Spathiphyllum wallisii</i>	7	14	

### 3.9.3.5. Porcentaje de especies representativas de Algas

Los resultados permitieron determinar que el filum con mayor número de especies para Algas es *Chlorophyta*, que se encuentra constituido por 22 integrantes. En las figuras 55 y 56 se presentan los porcentajes de cada uno:



**Figura 55. Especies del filum Chlorophyta, perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 1 y 2)**



**Figura 56. Especies del filum Chlorophyta, perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán (Parte 3)**

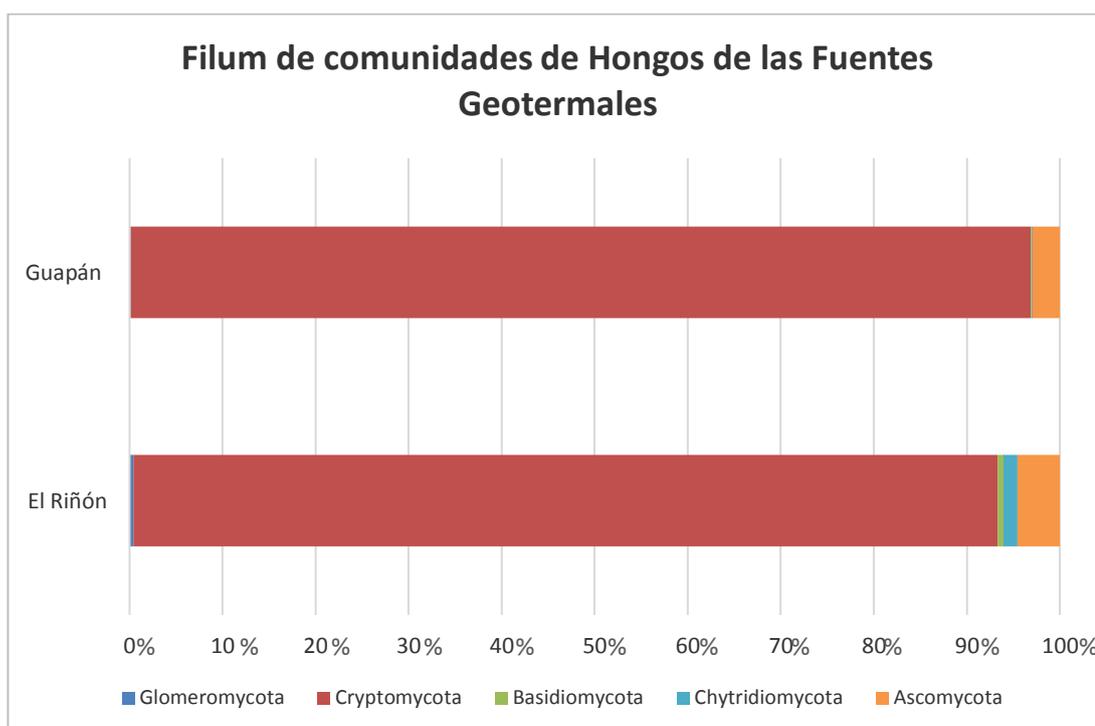
### 3.9.4. Comunidad de Hongos

La comunidad de hongos, de acuerdo con la tabla 20, representó el 23,80% para la fuente geotermal El Riñón, mientras que para la geoterma Guapán fue de 33,95% del número total de OTUs.

#### 3.9.4.1. Análisis de Filum

Los resultados obtenidos muestran que la comunidad de hongos se encuentra constituida por seis fila, de los cuales se ve la predominancia del filum Cryptomycota con un 92,90% en la fuente geotermal El Riñón, mientras que para Guapán tiene un valor de 96,78%.

La figura 57 muestra el porcentaje que ocuparon los filum en la comunidad de hongos:



**Figura 57. Distribución completa de los filum de Hongos de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

#### **3.9.4.2. Análisis de los principales géneros**

Se realizó un análisis a nivel de género de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina, para ello se utilizaron aquellos que tenían lecturas mayores a cero OTUs y se determinaron 14 géneros que se encuentran distribuidos en cinco fila de la siguiente manera: Ascomycota (9), Basidiomycota (1), Chytridiomycota (1), Cryptomycota (1) y Mucoromycota (1).

En la tabla 32 se muestran los géneros ordenados de acuerdo a su filum correspondiente.

Tabla 32

**Géneros obtenidos a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Hongos provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	OTUs R	OTUs G	Aislado		
Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Cyphellophoraceae	<i>Cyphellophora</i>	142	1			
		Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	0	9	G		
	Saccharomycetes	Saccharomycetales			<i>Candida</i>	863	3041		
				Metschnikowiaceae	<i>Clavispora</i>	774	11		
			Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	523	49	
				Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Zopfiella</i>	256	6	
			Lasiosphaeriaceae	<i>Cercophora</i>	247	3			
			Sordariaceae	<i>Gelasinospora</i>	152	2			
		Pezizomycetes	Pezizales	Pezizaceae	<i>Hydnotryopsis</i>	35	354		
	Basidiomycota	Agaricomycetes	Boletales	Boletaceae	<i>Tubosaeta</i>	293	2		
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	Chytridiales	Chytriomycetaceae	<i>Entophlyctis</i>	1139	18			
Cryptomycota				<i>Paramicrosporidium</i>	70415	133928			
Mucoromycota	Glomeromycetes	Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	332	156			

\*El género de la cepa fúngica aislada en la investigación se encuentran marcadas con la letra G (Guapán)

### 3.9.4.3. Análisis de las principales especies

Para trabajar los resultados a nivel de especie fue necesario seleccionar a aquellas que tuvieron lecturas mayores a cero. Se obtuvieron 33 especies distribuidas en 27 géneros como se muestran en la tabla 33:

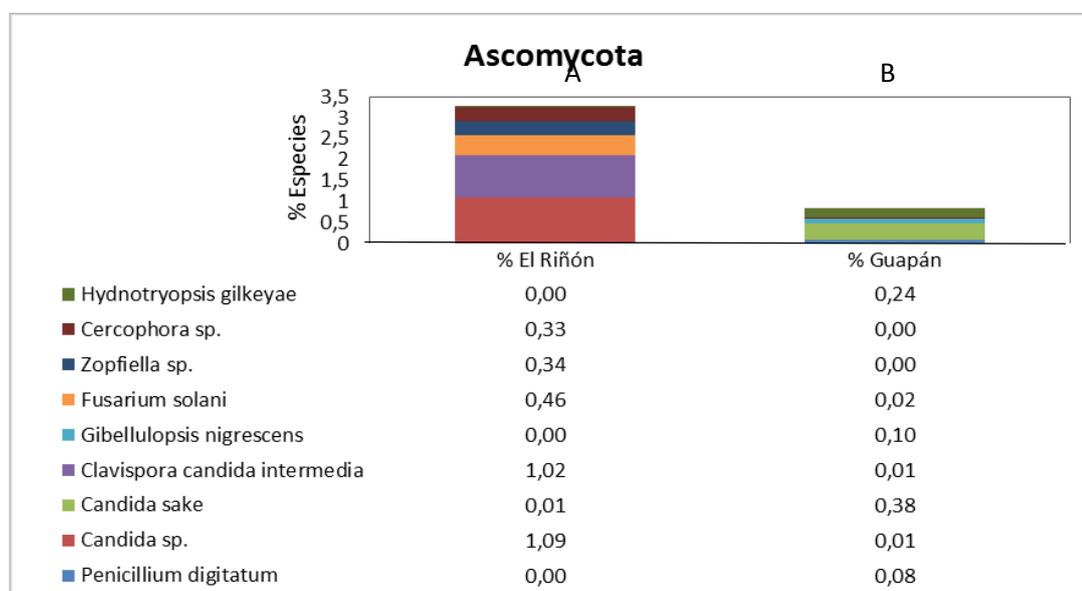
Tabla 33

**Especies obtenidas a partir de los resultados de Secuenciación masiva - Illumina para Hongos provenientes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	OTU R	OTUs G
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	1	105
					<i>Candida</i>	<i>Candida sp.</i>	823
	<i>Candida sake</i>	5	529				
	<i>Clavispora candida intermedia</i>	774	11				
	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae		<i>Gibellulopsis</i>	1	140
					<i>Gibellulopsis nigrescens</i>		
		Hypocreales	Nectriaceae		<i>Fusarium</i>	350	30
					<i>Fusarium solani</i>		
	Sordariales	Chaetomiaceae			<i>Zopfiella</i>	256	6
<i>Zopfiella sp.</i>							
<i>Cercophora</i>					247	3	
	Lasio-sphaeriaceae			<i>Cercophora</i>	247	3	
<i>Cercophora sp.</i>							
	Pezizomycetes	Pezizales	Pezizaceae	<i>Hydnortryopsis</i>	<i>Hydnortryopsis gilkeyae</i>	3	328
Basidiomycota	Agaricomycetes	Boletales	Boletaceae	<i>Tubosaeta</i>	<i>Tubosaeta brunneosetosa</i>	293	2
Cryptomycota					<i>Paramicrosporidium</i>	70415	13392
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	Chytridiales	Chytriomycetaceae	<i>Entophlyctis</i>	<i>Entophlyctis helioformis</i>	1139	8
Mucoromycota	Glomeromycetes	Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora punctata</i>	332	156

#### 3.9.4.4. Porcentaje de especies representativas en Hongos

Los resultados permitieron determinar que el filum con mayor número de especies para Hongos fue *Ascomycota*, que se encuentra constituido por nueve integrantes. En la figura 58 se presentan los porcentajes que ocupan:



**Figura 58. Especies del filum *Ascomycota*, perteneciente para A) Fuente Geotermal El Riñón y B) Fuente Geotermal Guapán**

### **3.9. Construcción de cepario**

Se realizó un cepario con los microorganismos aislados de la fuente geotermal El Riñón, contiene 29 cepas de bacterias, 1 de microalgas; y de la fuente geotermal Guapán, otro que contiene: 33 cepas de bacterias, 5 de microalgas y 1 fúngica. Se mantienen en criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

#### **4.1. Análisis fisicoquímicos de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán**

La temperatura promedio de la fuente geotermal El riñón fue de 32,10°C (34,2°C para el punto 1 y 30,01°C para el punto 2). Sin embargo, Quinche & Velastegui (2014), registraron temperaturas de hasta 72°C (tabla 4) en su estudio, la considerable variación entre los datos obtenidos en este estudio, con los registrados en el 2014, se podría deber a la temporada del año en la que fueron recolectadas las muestras. Mientras que para Guapán se registró una temperatura promedio de 52,54°C (52,23°C en el punto 1 y 52,86°C en el punto 2), de acuerdo a (González Rodríguez, 2011), el rango de temperatura para ésta puede variar entre 45°C a 55,3°C. Con los datos reportados por el INAMHI en el 2013, ubicaron a las fuentes geotermales El Riñón y Guapán, como vertientes de agua mesófila y termófila respectivamente.

Los datos de pH tomados en el momento de muestreo dieron como resultado que los dos sitios obtuvieron valores neutros (7), los cuales fueron confirmados por los análisis fisicoquímicos (CESAQ) de las muestras de agua, dando como resultado 6,8 para la fuente geotermal El Riñón y 7,6 para Guapán, tampoco se observan concentraciones altas de sulfato u otros iones (tablas 10 y 12). El rango de pH de 6,5 a 7,5 es óptimo para el desarrollo de microorganismos debido a que no se encuentra es concentraciones excesivas de iones que afecten a su metabolismo (Villafañe, 2008). Sin embargo, la muestra de sedimento proveniente de El Riñón, presenta un pH ligeramente alcalino de 8,1 (tabla 11), debido a la presencia de varios cationes como (K, Ca, Mg, entre otros), los cuales son utilizados de forma biológica y pueden formar sales poco solubles que se acumulan en el fondo o laterales de las termas o fuentes de aguas naturales (Gómez, 2005).

La concentración de cloruros fue de 844,1 mg/L para El Riñón y 509,5 mg/L para Guapán, por otro lado la concentración de iones de sodio fue mayor a 50 mg/L para el Riñón y Guapán. El sodio constituye el elemento alcalino más abundante que puede estar presente en fuentes de aguas naturales debido a que forma parte de minerales. Al dividir las concentraciones de Na y Cl puede obtener una relación (Na/Cl), que determina la influencia que tiene el agua marina en las masas de agua continentales, si la relación es mayor a 0,55, significa que la influencia es mínima. Debido a que los valores obtenidos fueron 16,88 y 10,18 suponemos que la influencia es mínima y son típicos de aguas de río, lluvia y subterráneas (Nordstrom, Ball, Donahoe, & Whittemore, 1989).

Se encontró que la concentración de potasio fue mayor a 50 mg/L en las muestras de agua de El Riñón y Guapán, mientras que para la muestra de sedimento proveniente de El Riñón fue mayor a 500 mg/L. Se puede apreciar un aumento importante en el análisis de sedimentos, esto se debe a que el potasio puede formar parte de sales, minerales (feldespato o mica) y arcillas, que se encuentran en las fuentes geotermales (Méndez, Armenta, & Silva, 2011).

Se reportó una concentración mayor a 100 mg/L de  $Mg^{2+}$  para las muestras de agua de las dos fuentes geotermales, mientras que en la muestra de sedimento proveniente de El Riñón, alcanzó valores superiores a 900 mg/L. Al igual que en los valores reportados para potasio, se ve un aumento significativo en la concentración de magnesio para los sedimentos y se debe a que puede estar contenido en minerales (dolomita). En general la principal fuente de  $Mg^{2+}$  es la disolución de dolomita o minerales que contienen Mg (Suck, Se-Yeong, Byeong, Byong, & Myong, 1999).

La concentración de metales pesados (As, Cu, Fe) en el agua fue mínima, el único metal que obtuvo un valor representativo fue Manganésio (Mn) para El Riñón con un valor mayor a 100 mg/L. Sin embargo, los valores para la muestra de sedimento de El Riñón fueron: Cd: 3,6 mg/kg; Cu: 15,7 mg/kg;

Mn: 833 mg/kg; Zn: 51,8 mg/kg y Fe: mayor a 14500mg/kg, la acumulación se debe a que tienden a sedimentarse.

Los resultados de conductividad eléctrica fueron mayores para las muestras de agua y sedimentos provenientes de la fuente geotermal El Riñón, con valores de 4020 uS/cm y >2500 uS/cm respectivamente. De acuerdo con el estudio realizado por Quinche & Velastegui (2014), El Riñón tubo una conductividad menor a 3900 uS/cm, lo que reporta un aumento de iones que constituyen las aguas de la fuente en los últimos 2 años. Para la muestra de agua de la fuente geotermal Guapán se reportó un valor de 1614 uS/cm. Debido a que la conductividad eléctrica (CE) puede establecer un indicador de la calidad del agua por la presencia de electrolitos (Dickerson, 1993), se establece que la fuente geotermal Guapán contiene menor cantidad componentes ionicos.

#### **4.2. Aislamiento de microorganismos por técnicas de microbiología tradicional**

Para realizar el aislamiento de bacterias, algas y hongos se mantuvieron bajo las condiciones de temperatura y pH obtenidas en campo para las fuentes geotermales El Riñón y Guapán (tabla 10 y 11), las cuales representan las condiciones ideales para el crecimiento de microorganismos propios y cultivables de las termas en el laboratorio. Las condiciones del área de las muestras adquiridas, deben ser mantenidas para evitar el estrés que puede causar cualquier alteración en su ambiente de vida (Ángeles & Del Rosario, 2014).

Se aislaron un total de 29 cepas bacterianas para El Riñón y 33 cepas para Guapán. En su mayoría presentan una morfología de bacilos Gram positivos. Los mejores resultados para el aislamiento de las cepas fueron obtenidos a partir del medio mineral Czapek por su contenidos de sales (Nitrato sódico, Cloruro de Potasio, Sulfato ferroso, entre otras) y Sacarosa como fuente de carbono (MICROKIT, 2015). El análisis fisicoquímico reveló la presencia de algunos de estos elementos, lo que sugirere que el medio

permite satisfacer las necesidades básicas de las bacterias que fueron aisladas a partir de las dos termas.

Para las microalgas se utilizó el medio general BG11 que incorpora N, Cl, Na, Mg, Ca, K, entre otros. Es considerado como ideal para el aislamiento de microorganismos provenientes de agua dulce, principalmente microalgas (Gómez, y otros, 2015), a partir de este medio se logró el aislamiento de una cepa de microalga proveniente de El Riñón y cinco cepas de Guapán.

La cepa fúngica proveniente de la fuente geotermal Guapán fue aislada a partir del medio artificial PDA que se encuentra constituido por nutrientes importantes para el desarrollo de hongos. Permite una fácil caracterización e identificación de las cepas fúngicas debido a que evita el crecimiento de bacterias al aplicar un bactericida (Cloranfenicol V/V: 1/100) en la composición del medio (Stefanova, Leiva, Larrinaga, & Coronado, 1999).

#### **4.3. Identificación de cepas de bacterias, algas y hongos mediante biología molecular**

Mediante la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S, se identificaron las bacterias: *Paenibacillus tundrae*, *Bacillus glycinifermentans*, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus circulans*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Paenibacillus naphthalenovorans* y *Aeromonas caviae* para la fuente geotermal El Riñón. Mientras que para Guapán se identificaron: *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Paenibacillus barengoltzii* y *Brevibacillus thermoruber*. En las tabla 14 y 15, se puede observar que el porcentaje de cobertura fue del 100% y de identidad el 99% para las cepas aisladas. Debido a que los valores, especialmente de identidad, son mayores al 97% con las secuencias de bacterias previamente descritas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), es posible presumir que se trata de las mismas bacterias (Rodríguez, 2012).

La identificación de microalgas se realizó mediante el gen ARNr 23S, dando como resultados una cepa para la fuente geotermal El Riñón *Scenedesmus sp.*, mientras que para Guapán se obtuvieron cinco microalgas:

*Leptolyngbya boryana*, *Lyngbya aestuarii*, *Nostoc sp.*, *Cyanobacterium aponinum* y *Fischerella sp.* No obstante, los porcentajes de cobertura e identidad (tabla 16), son menores a los obtenidos para bacterias, esto no permite asegurar que se trata de la misma especie de algas; de acuerdo a la identificación microbiológica, no se obtuvo coincidencia con los análisis moleculares. Solo se puede llegar a nivel de familia de las dos maneras, por lo tanto es necesario que se analice la similitud y cercanía de otros genes como COI (Citocromo oxidasa I), que ha sido utilizado para reconocer la variabilidad y encontrar nuevas especies de algas (Montes Berdasco, 2014), o genes implicados en la biosíntesis de polisacáridos y la regulación de las condiciones nutricionales (Álvarez, 2013).

Finalmente, mediante la amplificación de la región ITS se determinó que la cepa fúngica obtenida de la fuente geotermal Guapán fue *Aspergillus fumigatus* con cobertura e identidad del 100%.

#### **4.4. Cepas identificadas en las fuentes geotermales El Riñón y Guapán presentes en otras fuentes geotermales del mundo y sus aplicaciones**

Las fuentes geotermales El Riñón y Guapán se encuentran a temperaturas diferentes (32,10°C y 52,54°C respectivamente), por lo que se ha logrado aislar microorganismos mesófilos y termófilos. Según Morozkina, 2010, los microorganismos mesófilos se encuentran en mayor abundancia en la naturaleza debido a que no necesitan tener mecanismos de conservación, mientras que los organismos extremófilos usan este tipo de adaptaciones para sobrevivir en lugares donde las condiciones de temperatura son superiores a los 40°C.

Se pudo obtener mayor cantidad de cepas en la fuente geotermal El Riñón a comparación de Guapán, esto puede deberse a que mantener las condiciones mesófilas del transporte de muestras desde el campo al laboratorio es mínimo. Sin embargo a pesar de mantener completo rigor en el transporte de muestras termófilas, es posible que se pierda cierta cantidad de calor en el transcurso (Vinueza, 2015).

Las bacterias del orden *Bacillales* son las que se encuentra distribuidas en mayor porcentaje en las cepas aisladas de las fuentes geotermales; pueden desarrollarse ampliamente en diferentes condiciones ambientales, principalmente los géneros *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* (Nazisa, y otros, 2001). Además, aquellas que corresponden a Gram positivas o Gram variables, pueden formar esporas o estructuras de resistencia, que les permite sobrevivir a cambios de temperatura, pH, salinidad, entre otros (Arregui, Calvo, Pérez-Uz, & Serrano, 2008).

Debido a su capacidad de supervivencia a diferentes temperaturas, las bacterias pertenecientes a esos géneros han sido estudiadas para implementarlas en procesos industriales, donde brindan beneficios como la producción de metabolitos secundarios, disminución de la toxicidad de procesos al evitar el uso de sustancias tóxicas, aumento de los índices de producción, entre otros (Hernández, Alfaro, & Arrieta, 2003).

Las bacterias pertenecientes al género *Paenibacillus* aisladas en la fuente geotermal El Riñón fueron *Paenibacillus tundrae*, *Paenibacillus ehimensis* y *Paenibacillus naphthalenovorans* que corresponden a especies mesófilas que sobreviven a una temperatura optima de 30 – 40°C (Cihan, Tekin, Ozcan, & Cokmus, 2012). Mientras *Paenibacillus barengoltzii* aislada a partir de la fuente geotermal Guapán, es uno de los casos especiales de especies pertenecientes al género que a pesar de ser mesófila, puede sobrevivir a 70°C (Verma, Gupta, & Shrikot, 2014). El género fue aislado a partir a partir de 11 estaciones de muestreo en dos fuentes geotermales ubicadas en las provincias de Aegean y Anatolian en Turquía (Cihan, Tekin, Ozcan, & Cokmus, 2012) y en el estado de Himachal Pradesh en la India (Verma, Gupta, & Shrikot, 2014). En ambos estudios fueron identificadas con un porcentaje de similitud de 97 – 99%.

No existen investigaciones dende se haya utilizado las especies *Paenibacillus naphthalenovorans*, *Paenibacillus ehimensis* y *Paenibacillus barengoltzii* dentro de procesos industriales o biotecnológicos. Sin embargo las especies del género *Paenibacillus* pueden intervenir en procesos

industriales en los que se necesite descomponer celulosa (biopolímero compuesto de unidades de  $\beta$ -glucosa), debido a que este tipo de bacterias generan la enzima celulasa, encargada de romper los enlaces glucosídicos para obtener unidades de glucosa (De Castro, y otros, 2011).

Se encontró aplicaciones de otras especies del género *Paenibacillus* que comparte porcentajes de cobertura del 99-100% y de identidad del 95% con las bacterias aisladas en este estudio. *Paenibacillus macerans* es parte del proceso de biosorción espontánea de colorantes como Acid Blue 225 (AB 225) y Acid Blue 062 (AB 062), mediante la bacteria en una solución acuosa. Los resultados demostraron que el proceso es posible debido a la atracción que existe entre la carga positiva de la superficie bacteriana con la negativa de la molécula del tinte en un medio ácido (Çolak, Atar, & Olgun, 2009). *Paenibacillus polymyxa* ha sido utilizado para el control biológico de la enfermedad de la negra canola, causada por el hongo *Leptosphaeria maculans*, gracias a que la bacteria produce fusaricidina A y D, que es un antibiótico lipopéptidico, que actúa contra bacterias gram positivas y hongos (Li, Beatty, Shah, & Jensen, 2007).

Las especies que conforman el género *Bacillus*, identificadas en este estudio fueron: *Bacillus glycinifermentans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, para la fuente geotermal El Riñón y *Bacillus licheniformis* que fue aislada para las dos termas, teniendo un mayor presencia en la fuente geotermal Guapán. Son bacterias mesófilas, pero pueden soportar temperaturas de hasta 45-55°C, con morfología de bacilos Gram positivos (Kim, Dunlap, Kwon, & Rooney, 2015). Las especies *Bacillus glycinifermentans*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se encuentran estrechamente relacionados de acuerdo a análisis en sus propiedades como la producción de enzimas y la inhibición de patógenos (Melly, y otros, 2002). *Bacillus circulans*, a pesar de pertenecer a la misma familia, tiene un porcentaje de similitud del 95% con las con respecto a las anteriores (NCBI, 2017) y mantiene una mayor distancia filogenética como se observa la figura 28.

*Bacillus glycinifermentans* es una bacteria anaerobia facultativa, aislada a partir de cultivos fermentados de soya en Corea. No se han reportado usos industriales de la bacteria debido a que recién se ha logrado caracterizarla. Se ha determinado que puede hidrolizar caseína, esculina y almidón, así como también degrada nitratos (Kim, Dunlap, Kwon, & Rooney, 2015).

*Bacillus circulans* fue aislada a partir de áreas geotérmicas de la Isla Decepción, en el archipiélago de Shetland y ambientes geotermales de la Isla Victoria y las Islas Candlemas (Llarch, Logan, Castellví, Prieto, & Guinea, 1997) y (Logan, y otros, 2000). Sin embargo, en ambos estudios, fueron encontradas en bajos porcentajes, por lo que no se las consideró como propias del medio ese entorno, debido a la distancia filogenética que se encuentra marcada con las otras especies. Es una bacteria estudiada por su producción extracelular de enzima xilanas termofílica, que puede resistir a una temperatura de hasta 70°C por 1 hora, con una actividad del 67%. La enzima fue utilizada para el preblanqueo de pasta de Kraf (materia prima para la elaboración de papel) de acaulipto, reduciendo el uso de cloro (Dhillon, Gupta, Jauhari, & Khanna, 2000).

*Bacillus subtilis* es una bacteria que se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, pudiendo ser encontrada en suelo y agua (Márquez, 2007). Esta bacteria ha sido utilizada como agente de biocontrol hacia especies fúngicas y bacterianas por la producción de depéptidos y péptidos cíclicos. En 1998 se logró aislar un compuesto semejante a Bacillomicina D, que es usado contra el crecimiento hongos pertenecientes al filum Ascomycota (Krebs, y otros, 1998), también ha sido probado contra enfermedades en plantas transmitidas por el suelo. Posteriormente, *Bacillus subtilis* fue utilizado como agente de control en la infección de raíces de *Arabidopsis* por *Pseudomonas syringae*, mediante el uso de un microscopio láser de exploración reveló que las plantas tratadas con *B. subtilis* generaron un biofilm tridimensional cuatro días después de estar en contacto y colonizar las raíces de las plantas, mediante la secreción de surfactina (agente antimicrobiano lipopeptídico) (Bais, Fall, & Vivanco, 2004).

*Bacillus licheniformis* fue una cepa aislada a partir de áreas térmicas de la Isla Decepción, en el archipiélago de Shetland, una fuente termal Savusavu en Fiji y Turquía. Las muestras fueron cultivadas a una temperatura de 37-60°C, a pH neutro y ácido (Llarch, y otros., 1997; Narayan, y otros, 2008; Cihan, 2012). *B. licheniformis* es una bacteria estudiada ampliamente, por poseer genes codificadores de proteasas, pectato liasas, lipasas y varias enzimas degradadoras de polisacáridos (Veith, y otros, 2004). Lin y sus colaboradores (1992), lograron aislar y purificar queratinasa a partir del cultivo de la bacteria. Dentro de la industria, esta enzima puede ser usada para mejorar la calidad y digestibilidad de la harina de plumas utilizada para la fabricación de alimento para animales. Otro uso de *B. licheniformis* fue la producción de biopolímeros floculantes para el tratamiento de aguas residuales y en un amplio rango de procesos industriales. Este descubrimiento, potencia el reemplazo de floculantes sintéticos pues aumenta el riesgo de problemas ambientales debido a que son difíciles de degradar; los biofloculantes son biodegradables y seguros, minimizan los riesgos ambientales (Shih, Van, Yeh, Lin, & Chang, 2001).

Se obtuvieron dos cepas pertenecientes al género *Brevibacillus*: *Brevibacillus agri* aislada de la fuente geotermal El Riñón y *Brevibacillus thermoruber* aislada de Guapán. Son bacilos gram positivos, *B. agri* es capaz de generar esporas que puede sobrevivir a 45°C (Wilson, 2003), mientras *B. thermoruber* es una especie termófila que también genera endoesporas que le permite vivir e diversos ambientes incluyendo rocas, lagos, ambientes actuánticos, entre otros (Yildiz, Radchenkova, Arga, Kambourova, & Oner, 2015).

*Brevibacillus agri* fue encontrada en muestras de suelo de la fuente geotermal Krabi en Tailandia. Se descubrió que ciertas especies son tolerantes a disolventes orgánicos e inorgánicos (acetato de etilo y butilo). En el estudio en el 2009 y sus colaboradores, se aisló a la cepa 13 correspondiente a *B. agri*, que posee esta característica de resistencia y recomienda el uso de la bacteria como un biocatalizador que permita

estabilizar la emulsión de los disolventes en agua para un mejor aprovechamiento de sus funciones químicas (Kongpol, y otros, 2009).

*Brevibacillus thermoruber*, es una bacteria que fue aislada de tres fuentes geotermales ubicadas en Taupo, zona volcánica de Nueva Zelanda que se encontraban a temperaturas superiores a los 65°C (Stott, y otros, 2008). Se ha estudiado esta bacteria por la producción de proteasas a partir del gen Bt-lon, que inducible por calor. Al implantarlo en una bacteria de *E. coli* se pretende que la proteasa Lon, sea capaz de cambiar las necesidades fisiológicas de los microorganismos (Lee, Hsu, & Wu, 2004).

*Stenotrophomonas rhizophila* fue aislada a partir de la fuente geotermal El Riñón. El género *Stenotrophomonas* ha sido descrito a partir de muestras de suelo, agua y rizósferas (Schmidt, Alavi, Cardinale, Müller, & Berg, 2012) y (Ribbeck-Busch, y otros, 2005). Son bacterias mesófilas cuya morfología es de bacilos Gram negativos, generalmente, se encuentran asociadas a raíces de plantas como: *Brassica napus*, *Astragalus terraccianoii* y *Centaurea horrida* (County, 2017). Se han identificado algunos usos relacionados con la creación de una agricultura sustentable, implementando el uso de este microorganismo para promover el crecimiento de las plantas debido a que las bacterias facilitan la absorción de agua y nutrientes, su aplicación dio buenos resultados al aplicarlos en suelos salinos (Schmidt, Alavi, Cardinale, Müller, & Berg, 2012). Es utilizado como agente contra enfermedades fúngicas de plantas y en biorremediación debido a que produce sustancias capaces de degradar la pared celular de hongos y microorganismos patógenos (Ribbeck-Busch, y otros, 2005).

*Anoxybacillus flavithermus* se aisló a partir de la fuente geotermal Guapán, son bacilos gram positivos que pertenece a una especie facultativa anaerobia, que sobrevive a temperaturas mayores a 60°C, por lo tanto son consideradas como especies termófilas. Han sido aisladas a partir de la fuente geotermal Wairakei en Nueva Zelanda (Saw, y otros, 2008). Deive, 2010 y su grupo de colaboradores estudiaron un consorcio bacteriano termófilico que degradaran un tipo de colorante diacóico reactivo 5 negro. Se aislaron tres cepas

bacterianas con potencial poder de decoloración: *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus kamchatkensis* y *Anoxybacillus flavithermus* con porcentajes de identidad de 99%.

Las microalgas que fueron aisladas en esta investigación fueron: *Scenedesmus sp.* en la fuentes El Riñón y *Leptolyngbya boryana*, *Lyngbya aestuarii*, *Nostoc sp.*, *Cyanobacterium aponinum* y *Fischerella sp.* para Guapán Debido a los bajos porcentajes de identidad obtenidos en el BLASTn (anexo F), no es posible asegurar la identidad de la especie, por lo que las trataremos a las cepas a nivel de filum *Clorofita* y *Cianobacterias* para la primera y segunda fuente geotermal respectivamente.

Microalgas del filum Clorofitas han sido aisladas de un estanque geotérmico ácido en Argentina, Seltun y Hveradalir en Islandia. Pueden crecer a altas temperaturas (> 60°C), esto representaba un reto al momento de ser cultivados en laboratorio, sin embargo los estudios moleculares han evidenciado la adaptabilidad que tienen estos organismos para sobrevivir a cambios de temperatura, esto ha permitido buscar nuevas aplicaciones dentro de la industria (Juárez, y otros, 2011) y (Aguilera, Souza-Egipsy, González-Toril, Rendueles, & Amils, 2010). Son utilizadas como alimentos saludables, suplementos alimenticios o incluso puede funcionar como sustitutos, también han sido usado como aditivos farmacéuticos. Su éxito se debe a la concentración de proteínas, ácidos grasos, fibra, carotenoides, vitaminas, minerales, y otros compuestos bioactivos y aminoácidos esenciales (Priyadarshani & Rath, 2012). Se ha investigado el uso de este tipo de algas en biorreactores para la producción de proteínas recombinantes (Chen, Wang, Sun, Zhang, & Li, 2001).

Miembros del filum de *Cianobacterias* han sido aislados a partir de fuentes geotermales en Oregon, Costa Rica, Iceland. Pueden crecer con facilidad hasta 73°C (Ward & Castenholz, 2000); (Finsinger, y otros, 2008); (Pap, y otros, 2003). Las *Cianobacterias* juegan un papel fundamental en el mantenimiento de suelos fértiles debido a que puede actuar como biofertilizante. Además ayudan a la producción de arroz debido a su capacidad

para fijar nitrógeno (Priyadarshani, 2012). Al igual que las *Clorofitas* son fuente de vitaminas y proteínas, por lo tanto han sido utilizadas como alimentos saludables en América del Norte (Finsinger *et al.*, 2008). Dentro de la industria, pueden ser usadas para la producción de biocombustibles (Lem & Glick, 1985). Se han encontrado compuestos biológicamente activos que poseen actividades antivirales, antibacterianas, antifúngicas y anticancerosas. Pueden acumular Polihidroxicanoatos, que puede ser utilizado como sustituto de plásticos no biodegradables (Abed, Dobretsov, & Sudesh, 2009).

En este estudio se aisló una sola cepa fúngica proveniente de la fuente geotermal Guapán: *Aspergillus fumigatus*, es un hongo que puede crecer a 70°C en aguas de alto contenido de metales pesados y bajos valores de pH. Fue aislado en el Parque de Yellowstone (Rodriguez, Redman, & Henson, 2005). Ha sido utilizado en la remediación de aguas contaminadas con tintes, debido a que es capaz de degradarlos al utilizarlos como única fuente de carbono y nitrógeno. Trabajan en un rango amplio de pH de 3 a 8 de forma eficiente (Jin, Liu, Xu, & Tao, 2007). También se observaron buenos resultados al colocarlos en conjunto con bacterias termófilas para la absorción de colorantes (Deive, *et al.*, 2010). *A. fumigatus* produce endoglucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH) y b-glucosidasas que trabajan sinérgicamente para degradar la fracción de celulosa en la industria del papel. Se determinó que la mejor degradación se dió con un porcentaje de humedad de 50 al 80%, obteniéndose azúcares reductores. Se prevee que la cepa fúngica tiene un gran potencial para la producción de bioetanol (Liu, y otros, 2011).

#### **4.5. Análisis de Secuenciación masiva - Illumina**

Los análisis de Secuenciación masiva - Illumina permiten determinar la comunidad real de muestras ambientales. Para este estudio se analizaron muestras de agua y sedimento, sin embargo la lectura de secuencias se dió únicamente a partir de las muestras de suelo que tenían concentraciones de ADN entre 20 y 30ng/ $\mu$ L (tabla 23).

Se obtuvieron un total de 318 541 secuencias para la fuente geotermal El Riñón y 407 641 para Guapán de las cuales, las bacterias fueron las de mayor

número de lecturas (OTUs), con porcentajes de 26,44% y 31,39% respectivamente (tabla 24). Este es uno de los primeros trabajos en el país, en los que se ha aplicado análisis de Secuenciación masiva - Illumina por lo que se recomienda que se siga realizando investigaciones similares que reconozcan el patrimonio genético nacional (Estrella, Manosalvas, Mariaca, & Rivadeneira, 2005).

#### 4.5.1. Comunidad de Arqueas

Las secuencias detectadas para arqueas representan 78132 para la fuente geotermal El Riñón y 7420 para Guapán (tabla 24), donde el filum Euyyarchaeota tiene mayor predominancia con el 96,39% y 97,80 respectivamente para cada una de las geotermas. Las Arqueas son considerados microorganismos halófilos extremos, capaces de sobrevivir en ambientes de hasta el 32% de sal (Fabia, Battistuzzi, & Blair, 2008). Estudios realizados en el 2009, lograron determinar alrededor de un 40% de Arqueas termófilas, de las cuales 10 de 85 lecturas (OTUs) de arqueas obtenidas, pertenecieron al filum Euryarchaeota, fueron aisladas de geotermas a temperaturas de 30 a 90°C (Kormas, Tamaki, Hanada, & Kamagata, 2009).

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que las especies: *Methanobrevibacter sp.*, *Methanobacterium aarhusense*, *Methanobacterium alcaliphilum*, *Palaeococcus pacificus* y *Candidatus nitrosocaldus yellowstonii* tienen lecturas altas OTUs, algunas de estas especies han sido encontradas en fuentes termales alrededor del mundo, como por ejemplo: *P. pacificus* fue identificada de la profundidad de una fuente termal en las islas de Vulcano en Italia (Rogers & Amend, 2005), *Candidatus nitrosocaldus yellowstonii* se aisló a partir de sedimentos de una fuente termal en el Parque Nacional de Yellowstone (De la Torre, Walker, Ingalls, Könneke, & Stahl, 2008), *M. alcaliphilum* se estudió a partir de sedimentos provenientes de cuatro lagos en Egipto (Worakit, Boone, Mah, Abdel-Samie, & El-Halwagi, 1986).

Sin embargo *Methanosaeta sp.* constituye la especie de arquea que posee mayor número de OTUs para las dos fuentes geotermas (60376 OTUs en El Riñón y 1451 OTUs en Guapán). Es un microorganismo termofílico, acetotrófico y anaerobio que puede crecer a pH de 6,7 (Kamagata & Mikami,

1991). En el 2003, se estudiaron sus características metanogénicas para la degradación de lodos en reactores usados para la descontaminación de aguas residuales (UASB) y se determinó que puede ser usado para procesos que requieren temperaturas mesófilas y termófilas. Se reportó que más del 90% de la población arquea del biorreactor correspondía a *Methanosaeta sp* (McHugh, Carton, Mahony, & O'Flaherty, 2003).

#### **4.5.2. Comunidad Bacteriana**

La comunidad bacteriana se encuentra representada por 84 218 OTUs para la fuente geotermal El Riñón y 127 958 OTUs para Guapán (tabla 20) y se demostró que los filum con mayor número de lecturas fueron: Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias, de los cuales, los dos últimos corresponden a bacterias aisladas en esta investigación (tablas 26 y 28).

Estudios realizados sobre la diversidad microbiana en Nueva Zelanda, determinaron mediante análisis filogenéticos del gen ARNr 16S que las comunidades bacterianas se encontraban compuestas por especies de los filum Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria entre las que fueron cultivables y no cultivables a nivel de laboratorio (Stott, y otros, 2008).

Estudios de la diversidad microbiana en áreas geotermales de Canadá también arrojaron como resultados de Secuenciación masiva - Illumina bacterias pertenecientes a los filum mencionados, lo que nos confirma que son especies de bacterias capaces de desarrollarse a temperaturas extremas (de hasta 99°C) (Sharp, y otros, 2014).

#### ***Principales géneros***

Para el análisis de géneros, se escogieron aquellos que tenían OTUs mayores a 100 y también se conservó los géneros que fueron aislados en el laboratorio por técnicas dependientes de cultivo: Bacillus, Brevibacillus,

*Paenibacillus*, *Anoxybacillus* y *Acinetobacter* (tabla 26) que coinciden con los resultados obtenidos en los análisis de secuenciación masiva - Illumina. Los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* también han sido identificados en estudios de la diversidad de regiones geotermales de Turquía (Cihan, Tekin, Ozcan, & Cokmus, 2012).

Los filum con mayor número de géneros fueron: Bacteroidetes (11), Firmicutes (20) y Proteobacteria (55) como se observó en la tabla 26.

Algunos de los géneros que obtuvieron mayor número de lecturas fueron: *Flavobacterium* (11439 OTUs para El Riñón y 758 para Guapán), *Bacteroides* (548 OTUs para El Riñón y 17841 para Guapán) pertenecientes al filum *Bacteroidetes*, son bacterias gram negativas, que pueden ser de naturaleza anaerobia y aerobia, se encuentran distribuidos en muchos nichos ecológicos debido a que tienen funciones biológicas que se adaptan fácilmente al entorno. Son degradadores de materia orgánica polimérica. Pueden sobrevivir a temperaturas mesófilas y termófilas (Thomas, Hehemann, Rebuffet, Czjzek, & Michel, 2011).

Dentro del filum Firmicutes los géneros con mayor número de lecturas corresponden a *Bacillus* (2880 OTUs para El Riñón y 1779 para Guapán) y *Clostridium* (7426 OTUs para El Riñón y 8742 para Guapán) como se especifica en la tabla 26. Un estudio realizado a los conjuntos metanogénicos bacterianos y arcaicos en suelos geotermales demostró que del 8 al 30% de microorganismos aislados pertenecieron a bacterias de Firmicutes. Los miembros de este filum son Gram positivos, formadores de endoesporas, condición que les permite sobrevivir en condiciones extremas de temperatura o pH (Bhatia, y otros, 2015).

Proteobacteria es el filum que poseen mayor número de géneros, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, frecuentemente están en sedimentos cercanos a zonas termales (Hirayama, y otros, 2005). El género con mayor número de lecturas fue *Thiobacillus* (2113 OTUs para El Riñón y 315 para Guapán) (tabla 26).

### ***Principales especies***

Para el análisis de especies, fue necesario escoger las que tenían lecturas mayores a 100 OTUs, la mayor parte de los resultados obtuvieron un nivel de confiabilidad menor al 97% por lo que la identidad de la mayoría de bacterias ha llegado a género, denominándose con las terminaciones científicas “sp” (certeza del género pero no de la especie en singular) o “spp” (certeza del género pero no de la especie en plural) (Puñales Medel, Monzote López, Torres Amaro, & Hernández Robledo, 2012).

Dentro del filum *Bacteroidetes* las especies con mayor número de lecturas fueron de *Bacteroides spp.* (538 OTUs para El Riñón y 17825 para Guapán), *Flavobacterium spp.* (11208 OTUs para El Riñón y 738 para Guapán) e *Ignavibacterium spp.* (4608 OTUs para El Riñón y 94 para Guapán) (tabla 32). Análisis filogenéticos de la comunidad en fuentes termales realizados en Rupi Basin, Bulgaria, han identificado con un porcentaje de identidad de 93% que las especies pertenecientes a *Bacteroides spp.* y *Flavobacterium spp.* fueron encontrados conformando un 4,2% de la comunidad bacteriana (Tomova, y otros, 2010).

Dentro del filum Firmicutes, el género *Bacillus* contiene 4 especies (tabla 31) de las cuales, la especie *Bacillus sp.* presenta un número de lectura alto 1777 OTUs para El riñón y 1655 OTUs para Guapán (tabla 32). En la isla Decepción del archipiélago de Shetland del Sur, se reportó seis tipos distintos de bacterias termófilas gram positivas, aerobias y formadoras de endoesporas que fueron identificadas como *Bacillus sp.*, dentro de estas se encuentran *B. licheniformis* y *B. megaterium* obtuvieron altos porcentajes de identidad, mientras que las cuatro restantes se presumen sean nuevas especies. Los cultivos crecieron a temperaturas de 45. 55 y 65°C, lo que los clasifica como mesófilos resistentes (Llarch, y otros, 1997).

Para el filum *Proteobacteria*, se determinó que las especies pertenecientes a *Thiobacillus spp.* son las que obtuvieron mayor número de lecturas para las fuentes geotermales 1695 OTUs para El Riñón y 304 para Guapán (tabla 32). Son microorganismos Gram negativas que pueden sobrevivir a temperaturas de 41°C y soportan concentraciones de sal de 1 a

6%. Utilizan minerales sulfídicos, azufre o hierro ferroso como fuentes de energía (Huber & Stetter, 1989).

#### 4.5.3. Comunidad de Algas

De acuerdo con los resultados de secuenciación masiva - Illumina, la comunidad de algas se encuentra representando el 25,24% para la fuente geotermal El Riñón y el 32,84% para Guapán por lo tanto, las algas se encuentran formando parte importante de la diversidad de microorganismos en las fuentes geotermales, muchas de estas especies son capaces de adaptarse rápidamente a los cambio repentinos de temperatura (Juárez, y otros, 2011).

Los principales filum encontrados es estos análisis fue Clorofita y Cianobacteria cuya abundancia fue de 16 y 9 géneros para cada uno y cuyos porcentajes se encuentran en la tabla 33. Bradford, 2013, junto con sus colaboradores determinaron la presencia de estos filum en los análisis realizados en ríos y fuentes naturales del Sur Este de Australia, debido a que tienen abundantes características nutricionales, son usados ampliamente en productos alimenticios (Lem & Glick, 1985).

Las algas aisladas en el laboratorio también perteneces a los filum *Clorofita* y Cianobacterias, sin embargo debido a que se obtuvieron porcentajes bajos de identidad (tabla 20), solo se los ha podido identificar a nivel de familia, por lo que no es posible compararlas con las especies detectadas en este análisis.

Se obtuvieron 27 géneros, de los cuales *Pseudoscourfieldia* que pertenece al filum *Clorofita* tiene el mayor número de lecturas 19987 OTUs para El Riñón y 30900 para Guapán (tabla 34) gracias a su única especie *Pseudoscourfieldia marina* (tabla 35), la especie fue estudiada por los pigmentos fotosintéticos que produce, sin embargo no ha sido reportada en fuente geotermales (Fawley, 1992) y se la relaciona estrechamente con

*Nephroselmis olivacea* debido a la morfología (Moestrup & Throndsen, 1988) (Bradford, y otros, 2013).

#### **4.5.4. Comunidad de Hongos**

Finalmente, la comunidad de hongos se encuentra representada por 23,80% para El Riñón y 33,95% para Guapán.

El filum *Cryptomycota* obtuvo el mayor número de lecturas 70415 OTUs para El Riñón y 133928 para Guapán y se encuentra constituido por un solo género *Paramicrosporidium* y especie del mismo nombre (tabla 36), sin embargo el filum que contiene mayor diversidad fue *Ascomycota* que consta de una abundancia de nueve géneros, entre ellos se encuentra el *Aspergillus*, con 9 lecturas para la fuente geotermal Guapán, que es de donde procede la cepa aislada. Al sur-este de Australia, también se obtuvieron lecturas del filum *Ascomycota*, además de *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Blastocladiomycota* (Bradford *et al.*, 2013).

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

Se han identificado bacterias, hongos y algas mesófilos y termófilos de las fuentes geotermales: El Riñón- provincia del Azuay y Guapán- provincia del Cañar. Se obtuvo un total de 30 cultivos puros: 29 cepas de bacterias, una de microalgas para la primera terma, mientras que para la segunda se encontró un total de 39 cultivos puros: 33 cepas de bacterias, cinco de microalgas y una fúngica, se observa un predominio de bacterias aisladas frente a algas y hongos.

La técnica de biología molecular permitió la identificación de las cepas bacterianas mesófilas como *Paenibacillus tundrae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus glycinifermentans*, *Bacillus circulans*, *Brevibacillus agri*, *Paenibacillus ehimensis* y termófilas como *Paenibacillus barengoltzii*, *Anoxybacillus flavithermus* y *Brevibacillus thermoruber*, que son especies que se han encontrado en otras fuentes geotermales alrededor del mundo. Se identificaron microalgas pertenecientes a los filum *Clorofita* como el género *Scenedesmus* sp. También *Cianobacterias* como las especies *Leptolyngbya boryana*, *Lyngbya aestuarii*, *Cyanobacterium aponinum* y los géneros *Nostoc* sp. y *Fischerella* sp. Finalmente, Se logró aislar una especie fúngica *Aspergillus fumigatus* que llegó hasta nivel de especie

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

Los análisis de secuenciación masiva - Illumina permitieron determinar la diversidad completa de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán a partir de las muestras de sedimento procedente de cada terma.

De acuerdo con estos análisis los filum predominantes fueron Euryarchaeota para Arqueas; Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes para bacterias; Cyanobacteria y Clorofita para algas; y Cryptomycota para hongos.

Las cepas de bacterias aisladas corresponden a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Anoxibacillus* y *Acinetobacter* que fueron identificados mediante los análisis de secuenciación masiva - Illumina, aunque no se encontraron en porcentajes importantes.

Las algas aisladas pertenecen a los filum *Clorofita* y *Cyanobacteria*, sin embargo no se han podido comparar a nivel de especie con las lecturas de secuenciación masiva - Illumina.

La cepa fúngica aislada se encuentra dentro del filum *Ascomycota* que pertenece al género *Aspergillus* que también corresponden a los análisis de secuenciación masiva - Illumina.

## CAPÍTULO 6

### RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar medios de cultivo basados en los análisis de secuenciación masiva - Illumina para posteriores aislamientos bacterianos procedentes de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán, para obtener mayor número de microorganismos.

Es recomendable realizar un tercer muestreo para encontrar especies de de Arqueas, las cuales obtuvieron aproximadamente un 25% de lecturas en los análisis de secuenciación masiva - Illumina y que en esta investigación no fueron tomadas en cuenta. Además, puede confirmarse la presencia de las especies como *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus tundrae*, *Paenibacillus naphthalenovorans*, *Brevibacillus agri* y *Brevibacillus thermoruber*, que se presentan solo a nivel de género.

Se recomienda seguir con la investigación de aplicaciones biotecnológicas de las cepas aisladas de las fuentes geotermales El Riñón y Guapán debido a que son microorganismos que pueden contribuir al desarrollo de las industrias ecuatoriana, permitiendo el cambio de la matriz productiva.

## CAPÍTULO 7

### BIBLIOGRAFÍA

- Abed, R., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 1-12.
- Aguilera, Á., Souza-Egipsy, V., González-Toril, E., Rendueles, O., & Amils, R. (2010). Eukaryotic microbial diversity of phototrophic microbial mats in two Icelandic geothermal hot springs. *International Microbiology*, 21-32.
- Álvarez, E. (2013). Producción y desarrollo de cultivo de algas para la captación de anhídrido carbónico y la producción de biocombustibles. *Instituto español de oceanografía*.
- Amaro, J., Ayçaguer, C., & Carnevia, D. (1999). Organización del Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras y Normas para la presentación de trabajos. *Boletín IIP Nº16. Montevideo*, 33.
- Amaru, R., Miguez, H., Peñaloza, R., Torres, G., Silvestre, J., & Cuevas, H. (2006). DNA-UMSAgen, extracción de DNA genómico para diagnóstico molecular: método rápido y económico. *Cuadernos Hospital de Clínicas*, 11-51.
- Ángeles, T., & Del Rosario, C. (2014). Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del Callejon de Huaylas.
- Arce, G., Quesada, M., Montero, E., & Platero, W. (2007). Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. *Revista medica de la Universidad de Costa Rica*, 10-19.
- Arregui, L., Calvo, P., Pérez-Uz, B., & Serrano, S. (2008). Experiencias para el conocimiento de la diversidad y adaptación de los microorganismos a los ambientes naturales. *Recursos didácticos en Ciencias Naturales*.
- Bais, H., Fall, R., & Vivanco, J. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 307-319.
- Baker, G., Gaffar, S., Cowan, D., & Shuharto, A. (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy*.

- Bautista, R. (2010). Las tres generaciones de la secuenciación. *Encuentros en la Biología*.
- Berenguer, J., & Sanz, J. (2004). *Cuestiones en microbiología*. Hélice.
- Bhatia, S., Batra, N., Pathak, A., Joshi, A., Souza, L., Almeida, P., & Chauhan, A. (2015). Metagenomic analysis of bacterial and archaeal assemblages in the soil-mousse surrounding a geothermal spring. *Genomics data*, 195-200.
- Bradford, T., Morgan, M., Lorenz, Z., Hartley, D., Hardy, C., & Oliver, R. (2013). Microeukaryote community composition assessed by pyrosequencing is associated with light availability and phytoplankton primary production along a lowland river. *Freshwater Biology*, 2401-2413.
- Bradford, T., Morgan, M., Lorenz, Z., Hartley, D., Hardy, C., & Oliver, R. (2013). Microeukaryote community composition assessed by pyrosequencing is associated with light availability and phytoplankton primary production along a lowland...
- Bravo, E. (7 de Febrero de 2014). *Asociación Ecológica*. Obtenido de <http://www.accionecologica.org/editoriales/1738-el-codigo-integral-penal-y-los-recursos-geneticos->
- Brito de Olivera, T., Gómez, E., & Rodríguez, A. (2014). Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy.
- Brock, T. D., & Darlan, G. K. (1970). Limits of microbial existence: Temperature and pH. *Science*, 1316-1318.
- Bruns, D. E., Ashwood, E. R., & Burtis, C. A. (2007). Fundamentals of molecular diagnostics. *Elsevier Health Sciences*.
- Cadena-Zamudio, J. D., Martínez-Peña, M. D., Guzmán-Rodríguez, L., Arteaga-Garibay, R. I., & De Morelos, T. (2016). Aplicación de la secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*, 2.
- Cai, Y. P., & Wolk, C. P. (1990). Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *Journal of Bacteriology*, 3138-3145.
- Castillo Rodríguez, F. (2005). *Biología ambiental*. Madrid: Edit. Tébar.
- Chen, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L., & Li, W. (2001). Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Current genetics*, 365-370.
- ChunLab. (26 de Febrero de 2017). *16S rRNA and 16S rRNA Gene*. Obtenido de <https://chunlab.wordpress.com/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>

- Cihan, A., 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*, 309-324.
- Çolak, F., Atar, N., & Olgun, A. (2009). Biosorption of acidic dyes from aqueous solution by *Paenibacillus macerans*: Kinetic, thermodynamic and equilibrium studies. *Chemical Engineering Journal*, 122-130.
- County, E. (2017). *Documenting the diversity of microbes*. Obtenido de <https://blogs.longwood.edu/pecmicrobes/stenotrophomonas-rhizophila-s11/>
- De Castro, A., Vollú, R., Peixoto, R., Grigorevski-Lima, A., Coelho, R., Bon, E., & Seldin, L. (2011). Cellulolytic potential of a novel strain of *Paenibacillus* sp. isolated from the armored catfish *Parotocinclus maculicauda* gut. *Brazilian Journal of Microbiology*, 810-818.
- De la Torre, J., Walker, C., Ingalls, A., Könneke, M., & Stahl, D. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, 810-818.
- Deive, F. J., Domínguez, A., Barrio, T., Moscoso, F., Morán, P. L., & Sanromán, M. A. (2010). Decolorization of dye Reactive black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). *Journal of hazardour materials*, 735-742.
- Dhillon, A., Gupta, J., Jauhari, B., & Khanna, S. (2000). A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. . *Bioresourse Technology*, 273-277.
- Dickerson, R. (1993). *Principios de química*. Reverté.
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., & Rivadeneira, M. (2005). Biodiversidad y Recursos genéticos. *Abya Yala*.
- Fabia, U., Battistuzzi, S., & Blair, H. (2008). A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Mol Biol Evol.* 335-343.
- Fawley, M. (1992). Photosynthetic pigments of *Pseudosourfieldia marina* and select green flagellates and coccoid ultraphytoplankton: implications for the systematics of the Micromonadophyceae (Chlorophyta). . *Journal of phycology*, 26-31.
- Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe-Lorio, L., Mora, M., & Hess, W. (2008). Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Environmental microbiology*, 460-473.

- Forbes, B. A. (2009). *Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana.*
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. *Salud Pública de México*, 439-446.
- Gómez, D. (2005). Estudio de los sedimentos de la laguna de Limococha. *Universidad Internacional SEK.*
- Gómez, N., Donato, J., Giorgi, A., Padró, H., Mateo, P., & Sabater, S. (2015). La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*, 219-220.
- Gómez-Rodríguez, J. A. (2008). Bioprospección de enzimas de restricción en bacterias de suelos y ambientes volcánicos de Nicaragua. 70-88.
- González Rodríguez, R. J. (2011). Estudio de factibilidad para implementación de una hostería y aguas termales en la parroquia Guapán (Bachelor's thesis).
- GooglrMaps. (26 de Febrero de 2017). *GooglrMaps*. Obtenido de <https://www.google.com.ec/maps/place/GUAP%C3%81N/data=!4m2!3m1!1s0x91cd6fd14288d613:0x49d04925bc465a70?sa=X&ved=0ahUKEWjKppySqpHTAhVH2yYKHUfCAJkQ8gEILDAH>
- Haki, G., & Rakshit, S. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresourse Technology*, 17-34.
- Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). Microbiología Industrial. *EUNED.*
- Herrera, J. (2007). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. *Universidad Autónoma de México.*
- Hirayama, H., Takai, K., Inagaki, F., Yamato, Y., Suzuki, M., Nealson, K., & Horikoshi, K. (2005). Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles*, 169-184.
- Huber, H., & Stetter, K. (1989). *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field. *Archives of Microbiology*, 479-485.
- INAMHI. (2 de Mayo de 2013). *Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología*. Obtenido de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/>
- Islas, S., Velasco, A., Becerra, A., Delaye, L., & Lazcan, A. (2007). *Extremophiles and the origin of life*. Washington, D.C.: Physiology and biochemistry of extremophiles.

- Jiménez, A., Gobernando, I., & Sánchez, A. (2012). Secuenciación del genoma completo: un salto cualitativo en los estudios genéticos. *Rev Neurol*, 8-296.
- Jin, X., Liu, G., Xu, Z., & Tao, W. (2007). Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Applied microbiology and biotechnology*, 239-243.
- Juárez, Á., Vélez, C., Iñiguez, A., Martínez, D., Rodríguez, M., Vigna, M., & De Molina, M. (2011). A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. *Phycological Journal*, 176.
- Kamagata, Y., & Mikami, E. (1991). Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanosaeta* strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 191-196.
- Kim, S., Dunlap, C., Kwon, S., & Rooney, A. (2015). *Bacillus glycinifermentans* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 3586-3590.
- Kongpol, A., Pongtharangkul, T., Kato, J., Honda, K., Ohtake, H., & Vangnai, A. (2009). Characterization of an organic-solvent-tolerant *Brevibacillus agri* strain 13 able to stabilize solvent/water emulsion. *FEMS microbiology letters*, 225-233.
- Kormas, K., Tamaki, H., Hanada, S., & Kamagata, Y. (2009). Apparent richness and community composition of Bacteria and Archaea in geothermal springs. *Aquatic Microbial Ecology*, 113-122.
- Krebs, B., Höding, B., Kübart, S., Workie, M., Junge, H., Schmiedeknecht, G., & Hevesi, M. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains/Anwendung von *Bacillus subtilis* als Mittel.. *Journal of Plant Diseases and Biological Chemistry*, 181-197.
- Lacourt Mora, O. (2010). Análisis de diversas alternativas de generación eléctrica con fuentes geotermales en Chile.
- Lee, A., Hsu, C., & Wu, S. (2004). Functional domains of *Brevibacillus thermoruber* Lon protease for oligomerization and DNA binding role of N-terminal and sensor and substrate discrimination domains. *Journal of Biological Chemistry*, 279.
- Lem, N., & Glick, B. (1985). Biotechnological uses of cyanobacteria. *Biotechnology advances*, 195-208.
- Lessa, E., Tomasco, I., & D'Anatro, A. (2015). Análisis filogenéticos. Desarrollo de un trabajo final en base a secuencias de ADN para un curso de pregrado. *Universidad Pública de Uruguay*.

- Letunic, I. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*.
- Li, J., Beatty, P., Shah, S., & Jensen, S. (2007). Use of PCR-targeted mutagenesis to disrupt production of fusaricidin-type antifungal antibiotics in *Paenibacillus polymyxa*. *Applied and environmental microbiology*, 3480-3489.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., & Shen, Q. (2011). Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration*, 123.
- Llarch, A., Logan, N., Castellví, J., Prieto, M., & Guinea, J. (1997). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial ecology*, 58-65.
- Llarch, A., Logan, N., Castellví, J., Prieto, M., & Guinea, J. (1997). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial ecology*, 58-65.
- Logan, N., Lebbe, L., Hoste, B., Goris, J., Forsyth, G., Heyndrickx, M., & De Vos, P. (2000). Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago.... *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1741-1753.
- Márquez, F. (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.
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Laboratorio de Genética, Bioquímica y Grupos Sanguíneos*.
- McHugh, S., Carton, M., Mahony, T., & O'Flaherty, V. (2003). Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS microbiology letters*, 297-304.
- Melly, E., Genest, P., Gilmore, M., Little, S., Popham, D., Driks, A., & Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of applied microbiology*, 1105-1115.
- Méndez, C., Armenta, M., & Silva, G. (2011). Potencial geotérmico de la República Mexicana. *Geotermia*, 50.

- Mendoza, J. (2012). Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Revista Médica Herediana*, 119-127.
- Mercurio. (20 de Febrero de 2011). *Aguas termales de Guapán aptas para balneario*. Obtenido de <http://www.elmercurio.com.ec/278760-aguas-termales-de-guapan-aptas-para-balneario/>
- MICROKIT. (2 de Mayo de 2015). *Informacion de Medios de cultivo para Microbiología*. Obtenido de <http://www.medioscultivo.com/czapek-dox-agar/> (
- Moestrup, L., & Throndsen, J. (1988). Light and electron microscopical studies on *Pseudosourfieldia marina*, a primitive scaly green flagellate (Prasinophyceae) with posterior flagella. *Canadian Journal of Botany*, 1415-1434.
- Montes Berdasco, M. (2014). Identificación y caracterización morfológica y genética de algas invasoras en Asturias.
- Morozkina, E. V., Slutskaia, E. S., Fedorova, T., Tugay, T., Golubeva, L., & Koroleva, O. (2010). Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). . *Applied biochemistry and microbiology*, 1-14.
- Naranjo, R. E., Maisincho, J., Koch, A., Flores, F., Arias, J., & Izquierdo, A. R. (2016). Isolation and identification of eukaryotic algae and cyanobacteria from five geothermal springs in Ecuador. *Journal of Biotechnology*, 77.
- Narayan, V., Hatha, M., Morgan, H., & Rao, D. (2008). Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the Savusavu hot springs in Fiji. *Microbes and environments*, 350-352.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J., & Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 17-29.
- Nazisa, T., Tourova, T., Poltarau, A., Novikiva, E., Grigorya, A., Ivanova, A., & Ivanov, M. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus...* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 433-446.
- NCBI. (23 de Marzo de 2017). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Nordstrom, D., Ball, J., Donahoe, R., & Whittemore, D. (1989). Groundwater chemistry and water-rock interactions at Stripa. *Geochimica et Cosmochimica*, 1727-1740.
- Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2008). *Genética en medicina*. España: ELSERVIER.
- Panda, M., Sahu, M., & Tayung, K. (2012). Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian Journal of Microbiology*, 159-165.
- Panichi, C., & La Ruffa, G. (2007). *Thermal Springs*. Italia: International Institute of Geothermal Researches.
- Pedroza, A., Álvarez, N., & Poutou, R. (1997). Diseño de un medio definido para cultivo discontinuo de cepas autóctonas de *Thermus* Spp. . *PUJ*.
- Posik, D. M., Ripoli, M. V., Garcia, P. P., & Giovambattista, G. (2007). El veredicto de la genética. *Ciencia hoy*, 51.57.
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., & Trigalet, A. (2000). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region. *Microbiology*, 1679-1692.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *J algal biomass utln*. 89-100.
- Puñales Medel, I., Monzote López, A., Torres Amaro, G., & Hernández Robledo, E. (2012). Etiología bacteriana de la infección urinaria en niños. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 620-629.
- Quaedvlieg, W., Kema, G., Groenewald, J., Seifbarghi, S., Razavi, M., & Crous, P. (2011). *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 57-69.
- Quinche, E., & Velastegui, S. (2014). *Comparación genética entre las aguas termales de Baños de Cuenca y Baños de Agua Santa*. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Ramírez, N., Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos, actinomicetos halófilos en Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 56-71.
- Rampelotto, P. H. (2013). Extremophiles and extreme environments.
- Ratón, T. O. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoamericana Micol*, 15-19.

- Ribbeck-Busch, K., Roder, A., Hasse, D., De Boer, W., Martínez, J., Hagemann, M., & Berg, G. (2005). A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated .
- Ríos, N., Crespo, C. F., Terrazas, L. E., & Alvarez, M. T. (2007). Aislamiento de cepas anaerobias termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas eb la producción de bioetanol mediante técnica de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales. *Biofarbo*, 43.
- Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, D. (2005). *Bacteriología general: principios y prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Universidad Central de Costa Rica.
- Rodriguez, R., Redman, R., & Henson, J. (2005). Symbiotic lifestyle expression by fungal endophytes and the adaptation of plants to stress: unraveling the complexities of intimacy. *Mycology Series*, 23-683.
- Rodríguez, C. (2012). Identificación dela microflora bacteriana ruminal de la alpaca (vicugna pacos) mediante el análisis de 16S rDNA.
- Rogers, K., & Amend, J. (2005). Archaeal diversity and geochemical energy yields in a geothermal well on Vulcano Island, Italy. *Geobiology*, 319-332.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*. 1092-1101.
- Salavert Torres, J. (2011). Alineamiento de secuencias cortas de ADN utilizando la transformada de Burrows-Wheeler . *Doctoral dissertation*.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., & Mabilat, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 669-674.
- Satyanarayana, T., Raghukumar, C., & Shivaji, S. (2005). Extremophilic microbes: diversity and perspectives. Indian Academy of Sciences.
- Saw, J., Mountain, B., Feng, L., Omelchenko, M., Hou, S., Saito, J., & Galperin, M. (2008). Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome biology*, 16.

- Schmidt, C., Alavi, M., Cardinale, M., Müller, H., & Berg, G. (2012). *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and fertility of soils*, 947-960.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., & Miller, A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6241-6246.
- Sen, S., Raut, S., Satpathy, S., Rout, P., Bandyopadhyay, B., & Mohopatra, P. (2014). Characterizing novel thermophilic amylase producing bacteria from Taptapani hot spring. *Jundishapur journal of microbiology*, 7-12.
- Sharp, C., Brady, A., Sharp, G., Grasby, S., Stott, M., & Dunfield, P. (2014). Humboldt's spa: microbial diversity is controlled by temperature in geothermal environments. *The ISME journal*, 1166-1174.
- Shih, I., Van, Y., Yeh, L., Lin, H., & Chang, Y. (2001). Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresource technology*, 267-272.
- Sidney, R. (2004). Kushner, in *Enciclopedia of Biological Chemistry*.
- Solari, A. J. (2004). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Ed. Médica Panamericana.
- Song, Z., Chen, J., Jiang, H.-C. Z.-M., Tang, S.-K., Zhi, X.-Y., Zhang, L.-X., . . . Li, W.-J. (2010). *Diversity of Crenarchaeota in terrestrial hot springs in Tengchong, China*. China: Extremophiles.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16.
- Stott, M., Crowe, M., Mountain, B., Smirnova, A., Hou, S., Alam, M., & Dunfield, P. (2008). Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environmental Microbiology*, 2030-2041.
- Suarez Nunez, C., Alazard, D., Vives Ramirez, F., Monroy Herмосillo, O., & Fernandez Linares, L. (2002). Las enzimas termoestables y sus aplicaciones industriales. *BioTecnología*, 7.
- Suck, J., Se-Yeong, H., Byeong, D., Byong, W., & Myong, H. (1999). Geochemical characteristics of geothermal water and groundwater in the Dongrae hot-springs area. *The Journal of Engineering Geology*, 207-225.

- Thomas, F., Hehemann, J., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. . *Frontiers in microbiology*.
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lyutskanova, D., Pascual, J., Petrov, P., & Kambourova, M. (2010). Phylogenetic analysis of the bacterial community in a geothermal spring, Rupi Basin, Bulgaria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Urbietta, M., Gonzéles-Toril, E., Bazán, A., Giaveno, M., & Donati, E. (2015). Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acid geothermal area of Copahue (Nauquén, Argentina). *Extremophiles*, 437-450.
- Valenzuela-Gonzalez, F., Casillas-Hernandez, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. 41.
- Van der Giessen, J. W., Haring, R. M., & Van der Zeijst, B. A. (1994). Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* .
- Vasek, O., Hebert, E., De Giori, S., Rata, R., & Fusco, A. (2005). Secuencia parcial del gen 16S rRNA de cepas constituyentes de un fermento para la elaboración de queso artesanal de corrientes.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K., Ehrenreich, P., & Ehrenreich, A. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of molecular microbiology*.
- Verma, A., Gupta, M., & Shrikot, P. (2014). Isolation and characterization of thermophilic bacteria in natural hot water springs of Himachal Pradesh (India). *Bioscan*, 947-952.
- Villafañe, H. H. (2008). Microbiología básica. *Universidad de Antioquia*.
- Vinueza, R. (2015). Análisis Microbiológico de las fuentes termales del balneario El TINGO ubicado en Sangolquí en la provincia de Pichincha. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*.
- Vinueza-Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista electrónica de Veterinaria*, 1-13.
- Ward, D., & Castenholz, R. (2000). Cyanobacteria in geothermal habitats in The ecology of Cyanobacteria. *Springer Netherlands.*, 37-59.

- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Meyer, W. (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. USA: CRC Press.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315-322.
- Wilson, E. (2003). The encyclopedia of life. *Trends in Ecology & Evolution*, 77-80.
- Worakit, S., Boone, D., Mah, R., Abdel-Samie, M., & El-Halwagi, M. (1986). *Methanobacterium alcaliphilum* sp. nov., an H<sub>2</sub>-utilizing methanogen that grows at high pH values. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35-36.
- Yildiz, S., Radchenkova, N., Arga, K., Kambourova, M., & Oner, E. (2015). Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 2277-2289.