

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR PCR  
MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA 16S  
rDNA PARA LA DETECCIÓN DE *Thiobacillus thiooparus* E  
IDENTIFICACIÓN DE DOS BACTERIAS  
DEGRADADORAS DE TIOSULFATO DE PLATA  
AISLADAS DEL VOLCÁN TUNGURAHUA Y DE LA  
CALERA – MACHACHI, ECUADOR, 2007

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

DIANA MARICELA FLORES GARCÉS

SANGOLQUÍ, Octubre del 2008.

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Diana Maricela Flores Garcés

**DIRECTOR DE LA CARRERA**

---

Ing. Rafael Vargas

**SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Ab. Vinicio Zabala

Sangolquí, 22 de Octubre del 2008.

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. DIANA MARICELA FLORES GARCÉS como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí, 22 de Octubre del 2008.

---

Dr. Ángel Guevara  
DIRECTOR

---

Ing. Luis Cumbal  
CODIRECTOR

REVISADO POR

---

Ing. Rafael Vargas  
DIRECTOR DE LA CARRERA

## **DEDICATORIA**

A Dios porque junto a Él he recorrido un largo camino que me ha dado muchos momentos de alegrías como también de penurias, que al final han sido valiosas enseñanzas y lecciones de vida, que me han llevado al lugar donde estoy y a ser la personas quien soy.

También a mis padres porque con su infinito amor y apoyo incondicional en cada una de mis etapas estudiantiles, me han ayudado a escalar un peldaño más en mi vida profesional y personal.

Y finalmente a Mi porque de una u otra manera he aprovechado lo aprendido y superado cualquier obstáculo para alcanzar una más de mis tantas metas en la vida.

**Diana M. Flores Garcés.**

## AGRADECIMIENTO

La culminación de este trabajo se logró gracias a la invaluable colaboración de mucha gente e instituciones...

Al Dr. Luis Cumbal, por haberme brindado el honor de integrarme a su equipo de investigación y, apoyarme incondicionalmente en todo el tiempo que duró este trabajo.

Al Dr. Ángel Guevara, por haberme orientado de manera acertada en cada paso dado, durante la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Marcelo Grijalva, por haberme permitido utilizar las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y ayudarme con cualquier inquietud o necesidad que hubiere tenido.

A Ricardo Oliva y Francisco Jarrín del Centro Internacional de la Papa (CIP) por su colaboración de manera desinteresada con el procesamiento de muestras.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología, especialmente a Jéssica Maisincho por su eficiente desenvolvimiento y ayuda durante mi estancia en los Laboratorios de Biotecnología.

A Diego Villafuerte porque con su constancia y esfuerzo en todas las actividades que exitosamente desempeña, me inspira cada día de mi vida para crecer personal y profesionalmente. Junto a ti he vivido y aprendido tantas cosas muy especiales y maravillosas... Gracias por llegar a mi vida.

A mis amigas "las Nubias"; Gabriela Castillo, Nubia Grijalva y Karla Sandoval por todos esos años de sincera amistad y experiencias vividas que

han enriquecido mi corazón, mi mente... mi vida. Mis hermanitas del alma quiero decirles GRACIAS porque sus palabras y su presencia han hecho de mi un mejor ser humano.

A mis queridas Gabi Oleas, Vero Aguirre, Ceci Cruz y Taty Paredes, por todo su apoyo y cariño, por estar siempre pendientes de todo y brindarme su sincera amistad durante todos estos años.

A Marlene Tacuri, Daniela Santander y Vinicio Armijos porque de cierta manera gracias a ellas y él fue posible que se realizara este sueño; hoy hecho realidad.

A los chicos del Laboratorio de Biotecnología, especialmente a Santiago Zárate y Paulina Quijía por su apoyo moral durante la fase experimental de mi tesis.

A todos los “chicos CEINCI”; Miguel Zúñiga, María José Vizcaíno, María Dolores Mosquera, Gabriela Abadiano, Ana Villaroel, y mi “profe” Erika Murgüeitio; mis compañeritos de laboratorio que siempre estuvieron conmigo en todo momento para acolitarme y sacarme una sonrisa. A mi querida Majito Anrango un agradecimiento especial y profundo, de corazón por sus ocurrencias, apoyo incondicional, palabras de aliento y esperanza en tiempos difíciles.

**Diana M. Flores Garcés**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

|  |             |
|--|-------------|
| HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....   | ii          |
| CERTIFICACIÓN .....  | iii         |
| DEDICATORIA.....   | iv          |
| AGRADECIMIENTO .....   | v           |
| LISTADO DE TABLAS .....  | x           |
| LISTADO DE FIGURAS.....  | xi          |
| LISTADO DE ANEXOS .....  | xii         |
| RESUMEN .....  | xiii        |
| ABSTRACT .....   | xiv         |
| <b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>-1-</b>  |
| 1.1    Formulación del problema .....  | -1-         |
| 1.2    Justificación del problema.....   | -3-         |
| 1.3    Objetivos de la investigación .....   | -5-         |
| 1.3.1    Objetivo general del proyecto .....   | -5-         |
| 1.3.2    Objetivos específicos.....  | -5-         |
| 1.4    Marco Teórico.....  | -6-         |
| 1.4.1    Características del género <i>Thiobacillus</i> .....                                      | -6-         |
| 1.4.2    Características de <i>Thiobacillus thioparus</i> .....                                    | -7-         |
| 1.4.3    Otros microorganismos degradadores de tiosulfato .....                                    | -8-         |
| 1.4.4    Extracción de ADN genómico .....  | -8-         |
| 1.4.5    Cuantificación de ADN.....  | -10-        |
| 1.4.6    Polymerase Chain Reaction (PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa).....                | -12-        |
| 1.4.7    El ribosoma bacteriano y el rADN 16S .....  | -16-        |
| 1.4.8    La secuencia 16S rDNA como herramienta para la identificación y filogenia bacteriana..... | -18-        |
| 1.4.9    Árboles filogenéticos basados en la secuencia 16S rDNA .....                              | -19-        |
| 1.4.10    La secuenciación.....  | -19-        |
| <b>CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>-21-</b> |
| 2.1    Participantes.....  | -21-        |

|                                     |   |             |
|-------------------------------------|---|-------------|
| 2.2                                 | Zona de estudio .....   | -21-        |
| 2.3                                 | Período de tiempo de investigación .....  | -21-        |
| 2.4                                 | Diseño.....   | -21-        |
| 2.5                                 | Materiales y Metodología.....   | -22-        |
| 2.5.1                               | Cultivo de tres bacterias .....   | -22-        |
| 2.5.2                               | Aislamiento de ADN genómico de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645, CALERA y TUNGURAHUA 1 .....  | -24-        |
| 2.5.3                               | Cuantificación de ADN genómico obtenido .....   | -26-        |
| 2.5.4                               | PCR .....   | -26-        |
| 2.5.5                               | Electroforesis del ADN y productos de PCR.....  | -27-        |
| 2.5.6                               | Secuenciación de la región 16S rDNA.....  | -29-        |
| 2.5.7                               | Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas .....  | -29-        |
| <b>CAPITULO 3: RESULTADOS .....</b> |   | <b>-31-</b> |
| 3.1                                 | Cultivo de tres bacterias .....   | -31-        |
| 3.2                                 | Aislamiento y electroforesis de ADN genómico de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645, CALERA y TUNGURAHUA 1.....                                    | -33-        |
| 3.3                                 | Cuantificación de ADN genómico obtenido.....  | -34-        |
| 3.4                                 | Ensayos de PCR .....  | -34-        |
| 3.4.1                               | Estandarización del protocolo de amplificación .....  | -34-        |
| 3.4.2                               | Amplificación de la secuencia 16S rDNA para las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA.....  | -37-        |
| 3.5                                 | Electroforesis de productos de PCR.....   | -38-        |
| 3.6                                 | Secuencias nucleotídicas de la región 16S rDNA de las bacterias CALERA y TUNGURAGUA 1.....  | -41-        |
| 3.7                                 | Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas .....  | -43-        |
| 3.7.1                               | Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante aplicaciones en línea .....   | -43-        |
| 3.7.2                               | Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante programas bioinformáticos.....  | -53-        |
| <b>CAPITULO 4: DISCUSIÓN .....</b>  |   | <b>-63-</b> |
| 4.1                                 | Crecimiento en medios selectivos para <i>Thiobacillus</i> .....   | -63-        |
| 4.2                                 | Aislamiento, cuantificación y electroforesis de ADN genómico de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645 y de las bacterias CALERA y TUNGURAHUA 1 ..... | -64-        |

|  |   |             |
|--|---|-------------|
| 4.3                                      | PCR .....   | -64-        |
| 4.3.1                                    | Estandarización del protocolo de amplificación .....  | -64-        |
| 4.3.2                                    | Amplificación de la secuencia 16S rDNA para las tres bacterias y electroforesis de los productos de PCR .....           | -65-        |
| 4.4                                      | Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante aplicaciones en línea y programas bioinformáticos ..... | -66-        |
| <b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....</b>    |   | <b>-68-</b> |
| <b>CAPITULO 6: RECOMENDACIONES .....</b> |   | <b>-71-</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>                |   | <b>-73-</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                      |   | <b>-86-</b> |

## LISTADO DE TABLAS

|  |       |
|--|-------|
| <b>Tabla 1.1.</b> Inhibidores de la PCR. ....  | -8-   |
| <b>Tabla 2.1.</b> Componentes del buffer de lisis.....   | -24-  |
| <b>Tabla 2.2.</b> Reactivos usados en la PCR. ....   | -27-  |
| <b>Tabla 2.3.</b> Componentes de Buffer TBE 5X.....  | -28-  |
| <b>Tabla 3.1.</b> Concentración de ADN de las tres bacterias. ....   | -34-  |
| <b>Tabla 3.2.</b> Características de los primers. ....   | -35-  |
| <b>Tabla 3.3.</b> Combinación de primers para la amplificación de la secuencia 16S rDNA en <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645. ....                            | -35-  |
| <b>Tabla 3.4.</b> Programa de temperatura para el termociclador. ....  | -36-  |
| <b>Tabla 3.5.</b> Reactivos usados en la PCR. ....   | -37-  |
| <b>Tabla 3.6.</b> Secuencias consenso de la región 16S rDNA para las bacterias nativas CALERA y TUNGURAHUA 1. ....   | -41-  |
| <b>Tabla 3.7.</b> Secuencias que producen alineamientos significantes con la bacteria CALERA según BLASTN 2.2.18+. ....  | -44-  |
| <b>Tabla 3.8.</b> Secuencias que producen alineamientos significantes con la bacteria TUNGURAHUA 1 según BLASTN 2.2.18+. ....  | -48-  |
| <b>Tabla 3.9.</b> Semejanza de la secuencia 16S rDNA de la bacteria CALERA con las secuencias obtenidas en BLASTN 2.2.18+ según Sequence Identity Matrix. ....       | -53-  |
| <b>Tabla 3.10.</b> Semejanza de la secuencia 16S rDNA de la bacteria TUNGURAHUA 1 con las secuencias obtenidas en BLASTN 2.2.18+ según Sequence Identity Matrix..... | -56-  |
| <b>Tabla A.</b> Diferencias entre los % de semejanza proporcionados por BLASTN 2.2.18+ y BioEdit v7.0.8.0 para la bacteria CALERA. ....                              | -101- |
| <b>Tabla B.</b> Diferencias entre los % de semejanza proporcionados por BLASTN 2.2.18+ y BioEdit v7.0.8.0 para la bacteria TUNGURAHUA 1. ....                        | -107- |

## LISTADO DE FIGURAS

|  |      |
|--|------|
| <b>Figura 1.1.</b> Pasos para cada uno de los ciclos de la PCR.....  | -13- |
| <b>Figura 1.2.</b> Secuenciación por el método de Sanger.....  | -20- |
| <b>Figura 3.1.</b> Medio líquido para <i>Thiobacillus</i> con bacterias TUNGURAHUA 1, CALERA y <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645.....                             | -31- |
| <b>Figura 3.2.</b> Medio líquido para <i>Thiobacillus</i> ATCC 290 S6 inoculado con <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645.....  | -32- |
| <b>Figura 3.3.</b> Medio sólido para <i>Thiobacillus</i> ATCC 290 S6 con bacteria (A) TUNGURAHUA 1, (B) CALERA, (C) <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645.....        | -32- |
| <b>Figura 3.4.</b> Electroforesis de muestras de ADN bacteriano.....   | -33- |
| <b>Figura 3.5.</b> Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645 combinando primers Ttp223f - Ttp833r y Ttp223f - Ttp240r..... | -38- |
| <b>Figura 3.6.</b> Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645 combinando primers Ttp194f - Ttp833r y Ttp194f - Ttp240r..... | -39- |
| <b>Figura 3.7.</b> Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de las tres bacterias usando primers Ttp194f - Ttp833r. ....  | -40- |
| <b>Figura 3.8.</b> Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de las tres bacterias usando primers Ttp223f - Ttp833r. ....  | -41- |
| <b>Figura 3.9.</b> Árbol filogenético de la bacteria CALERA usando el método Neighbor Joining de BLASTN 2.2.18+. ....  | -51- |
| <b>Figura 3.10.</b> Árbol filogenético de la bacteria TUNGURAHUA1 usando el método Neighbor Joining de BLASTN 2.2.18+. ....  | -52- |
| <b>Figura 3.11.</b> Árbol filogenético para la bacteria CALERA mediante Neighbor Joining de MEGA v4.0. ....  | -60- |
| <b>Figura 3.12.</b> Árbol filogenético para la bacteria TUNGURAHUA 1 mediante Neighbor Joining de MEGA v4.0. ....  | -61- |
| <b>Figura 3.13.</b> Árbol filogenético para ambas bacterias nativas mediante Neighbor Joining de MEGA v4.0. ....   | -62- |

## LISTADO DE ANEXOS

|   |       |
|---|-------|
| <b>Anexo A:</b> Certificado de análisis de la cepa bacteriana <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645. ....                                    | -86-  |
| <b>Anexo B:</b> Instructivo para la reconstitución del cultivo liofilizado de la cepa bacteriana <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645. .... | -88-  |
| <b>Anexo C:</b> Cromatogramas de la secuencia 16S rDNA para la bacteria TUNGURAHUA 1 .....  | -91-  |
| <b>Anexo D:</b> Cromatogramas de la secuencia 16S rDNA para la bacteria CALERA.....   | -96-  |
| <b>Anexo E:</b> Diferencias entre los % de semejanza proporcionados por BLASTN 2.2.18+ y BioEdit v7.0.8.0 para la bacteria CALERA.....          | -101- |
| <b>Anexo F:</b> Diferencias entre los % de semejanza proporcionados por BLASTN 2.2.18+ y BioEdit v7.0.8.0 para la bacteria TUNGURAHUA 1. ....   | -107- |

## RESUMEN

En las florícolas del Ecuador para conservar las flores cosechadas se utiliza el tiosulfato de plata (STS:  $\text{AgS}_2\text{O}_3^-$ ), agente químico que retarda su envejecimiento al inhibir la formación de etileno. Sin embargo, el STS es un potente productor de daños ambientales, pero al ser inevitable el uso de STS en la industria ecuatoriana de las flores, se buscó un tratamiento biológico para la eliminación del STS proveniente de las aguas de post-cosecha de flores sensibles al etileno. El tratamiento biológico consiste de: i) oxidación del STS usando bacterias ii) bioadsorción del catión plata con hongos pelletizados *Cladosporium cladosporioides* y iii) recuperación del metal bioadsorbido. En la oxidación del tiosulfato fueron utilizadas varias bacterias nativas; sin embargo, solo dos bacterias aisladas de aguas sulfurosas del volcán Tungurahua y de La Calera, Machachi metabolizaron eficazmente el tiosulfato comparadas con *Thiobacillus thioparus* (bacteria que degrada STS). Para la identificación de las dos bacterias usadas en el tratamiento biológico, se emplearon pruebas bioquímicas y métodos moleculares. Las pruebas bioquímicas proporcionaron muchas ambigüedades e inconsistencias impidiendo decidir si las bacterias nativas pertenecían o no a la especie *Thiobacillus thioparus*. De los métodos moleculares, se seleccionó la amplificación de la secuencia 16S rDNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés), secuenciación y análisis de secuencias, usando como control positivo la cepa bacteriana *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645. Los ensayos de amplificación con primers específicos para la secuencia 16S rDNA de *Thiobacillus thioparus* demostraron que las dos bacterias nativas no eran *Thiobacillus thioparus*. Sin embargo, al secuenciar y analizar la región 16S rDNA en las dos bacterias nativas, se pudo conocer que estos dos microorganismos aislados de ambientes ecuatorianos podrían pertenecer al género *Pseudomonas*, al presentar un 99% de semejanza con algunas secuencias 16S rDNA de varias cepas de *Pseudomonas*.

## ABSTRACT

In order to preserve harvested flowers in Ecuadorian industry, silver thiosulphate (STS:  $\text{AgS}_2\text{O}_3^-$ ) is used, this chemical agent induce longer aging process of flowers due to inhibition of ethylene formation. Silverthiosulfate induces environmental damage, however, the use of STS can not be avoided, and a biological treatment for the removal of STS from wastewater of post-harvest treatment of flowers sensitive to ethylene production was assessed. Biological treatment follows three phases: i) oxidation of STS using bacteria, ii) bioadsorption of silver cation with fungi pellets and, iii) recovery of bioadsorbed metal. For thiosulphate oxidation several native bacteria were used, but only two isolates from sulphur waters, Tungurahua volcano and La Calera in Machachi, metabolized effectively thiosulphate compared to a reference bacterial strain *Thiobacillus thioparus* (bacterium that degrades STS). Biochemical tests and molecular methods were used for identifying the two native bacteria used in biological treatment but biochemical tests provided uncertainties and inconsistencies to confirm if the native bacteria are related or not to the *Thiobacillus thioparus* specie. From molecular methods, the DNA amplification of the 16S rDNA sequence by polymerase chain reaction (PCR), nucleotide sequencing and analysis of sequences were performed, using the bacterial strain *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 as a positive control. Amplification tests with specific primers for the 16S rDNA sequence of *Thiobacillus thioparus* showed that two native bacteria were not *Thiobacillus thioparus*. However, when the 16S rDNA region of two native bacteria was sequenced and analyzed, it was possible to find out that these two isolated microorganisms from the Ecuadorian environment belonged to the genus *Pseudomonas*, with 99 % of similarity compared to some 16S rDNA sequences of several strains of *Pseudomonas*.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

El tratamiento biológico de las aguas residuales tiene diversos fines, los más modernos se fundamentan en el hecho de evitar la contaminación que pueda dañar flora y/o fauna, no deteriorar los escenarios en donde se disponen finalmente las aguas, y, desde un punto de vista de desarrollo sustentable, recuperar el valor de las aguas para su posible reutilización. Este sistema ha venido siendo instalado desde hace algunos años, en el Ecuador, en las diversas industrias, en este caso las florícolas, en donde se realizan actividades que implican la contaminación de las aguas con compuestos que son potencialmente nocivos para el ambiente en general, como es el caso del tiosulfato de plata (STS siglas en inglés) que se usa en el agua de post cosecha para flores sensibles al etileno (Verdugo, Araneda & Riffo, 2003).

Dentro del proceso de postcosecha, en algunos casos, se hace necesario la utilización de sustancias químicas preservantes como el STS para prolongar la vida de la flor y garantizar la calidad de la misma al consumidor. Este proceso genera residuos líquidos con metales pesados (plata), que son tóxicos para el medio ambiente. Estos residuos deben ser minimizados y tratados adecuadamente garantizando las concentraciones máximas de plata exigidas, previos al vertimiento (Ministerio del Ambiente Colombiano (MAVDT), Sociedad de Agricultores de Colombia (SAC) & Asociación Colombiana de Exportadores de Flores (ASOCOLFLORES), 2005).

El catión plata, presente en el STS, es considerado un eficaz inhibidor de la producción autocatalítica del etileno, una hormona vegetal gaseosa producida por todos los órganos de la planta, responsable del proceso de marchites (Verdugo *et al.*, 2003). Sin embargo, pese a la excelente acción anti-etileno, el efecto que tiene el STS sobre el medio ambiente ha sido criticada, tanto por grupos ambientalistas como por autoridades fitosanitarias, principalmente por la permanencia del catión plata en el suelo y en las aguas

subterráneas por períodos prolongados, llegando a ser finalmente absorbidos por seres vivos (Nell, 1992).

Un tratamiento biológico implica el uso e identificación de el o los de microorganismos que intervendrán en el tratamiento biológico metabolizando al contaminante a formas químicas que sean inocuas para el ambiente. Para la degradación del STS durante un adecuado proceso de biorremediación han sido utilizadas bacterias *Thiobacillus thioparus*, microorganismos aerobios que usan como sustrato y fuente de energía al STS, bioxidándolo a sulfato e iones de plata (Hernández, 2000; Schreiber & Pavlostathis, 1998). En cuanto a la identificación de microorganismos, la microbiología ha evolucionado tanto a lo largo de los últimos años, en especial para la microbiología ambiental gracias a la gran información que se encuentra a la hora de utilizar métodos de biología molecular para caracterizar a los diferentes microorganismos, usando como herramienta la comparación de secuencias de algunas macromoléculas, permitiendo que la identificación de un microorganismo sea más precisa y confiable que los métodos tradicionales microbiológicos (morfológicos y bioquímicos). Actualmente se utilizan los estudios del 16S rDNA, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución (Herrera, 1998).

Existen varios estudios de identificación bacteriana y relación filogenética utilizando la secuencia 16S rDNA para cepas *Thiobacillus thioparus* en varios países como Rumania (Vlasceanu, Popa & Kinkle, 1997), Estados Unidos de América (Engel, Porter, Kinkle & Kane, 2001), Canadá (Gibson, 2001; Gibson, Trevors & Otten, 2006), entre otros (Campos *et al.*, 2001; Lane *et al.*, 1985, 1992; Moreira & Amils, 1997; Peccia, Marchand, Silverstein & Hernández, 2000; Selenska-Pobell, Otto & Kutschke, 1998; Shooner, Bousquet & Tyagi, 1996); así como estudios en base a la secuencia 5S (Gutell, Larsen & Woese, 1994; Lane, Stahl, Olsen, Heller & Pace, 1985).

## 1.2 Justificación del problema

Uno de los principales problemas para la conservación de las flores es la producción de etileno. Estas flores deben ser tratadas con productos que inhiben la formación del mismo, la mayoría basados en derivados de la plata. En las florícolas del Ecuador para conservar las flores se utiliza el STS, el cual retarda su envejecimiento al inhibir la formación de etileno. De esta forma las flores son tratadas antes de ser comercializadas para retrasar la senescencia con tratamientos de pulsación con STS. Sin embargo, el STS es un potente productor de daños ambientales y muchos países han prohibido su uso recientemente (Figuerola, Colinas, Mejía & Ramírez, 2005; Verdugo *et al.*, 2003).

La utilización de este producto químico es indispensable debido a que las exportaciones de flores han crecido en un 87.27% desde el año 1996 hasta el año 2005 (Ecuadorexporta, 2008), lo cual indica un aumento que se basa en el mantenimiento de las mismas para que sean competitivas en el mercado internacional. La exportación de flores sensibles al etileno como claveles, gypsofilias entre otras constituyen el 24.73% (Expoflores & Banco Central del Ecuador, 2005) de las flores exportadas, la mayor parte corresponde al mercado de rosas. Se exportan principalmente a países como EEUU, Rusia, Canadá, España y Alemania (Ecuadorexporta, 2005).

En el Ecuador existen muy pocas alternativas para remover el STS. Las empresas que comercializan el químico están experimentando la precipitación como una opción para remover la plata de las aguas residuales de florícolas y complementan la separación pasando el sobrenadante del proceso de precipitación por filtros de vehículos a diesel hasta saturarlos. Esta técnica no resuelve el problema ambiental porque la plata solamente es trasladada de la fase líquida a la fase sólida (MAVDT, *et al.*, 2005).

Para que el tratamiento de las aguas contaminadas con STS sea óptimo, es importante el empleo de microorganismos propios del sitio, no así la introducción de especies microbianas utilizadas en otras partes del mundo con este mismo fin. De esta manera se evita afectar la microfauna existente, a más

del desarrollo de posibles antagonismos o incluso pérdidas de especies endémicas, que constituyen el Patrimonio Natural de un país, en este caso del Ecuador. Es por esta razón que para eliminar el STS de las aguas residuales provenientes del tratamiento de post cosecha de flores sensibles al etileno fueron utilizadas varias bacterias nativas; sin embargo, solo dos bacterias aisladas desde aguas sulfurosas del volcán Tungurahua y de La Calera en Machachi, metabolizaron eficazmente el tiosulfato. En la identificación de las bacterias nativas utilizadas en el tratamiento biológico, se emplearon pruebas bioquímicas (Holt, Krieg & Stalez, 1994) y métodos moleculares. Las pruebas bioquímicas proporcionaron muchas ambigüedades e inconsistencias al momento de decidir si las bacterias pertenecían o no a la especie *Thiobacillus thioparus*, por lo tanto, la identificación de los dos microorganismos degradadores de STS a través de la secuencia 16S rDNA fue fundamental, ya que los métodos moleculares utilizados actualmente, como el análisis de la secuencia 16S rDNA, permiten una identificación bacteriana mucho más certera que los métodos microbiológicos tradicionales (Herrera, 1998).

Se debe resaltar que conocer la conformación nucleotídica de la secuencia 16s rDNA brinda una poderosa herramienta para la deducción de la relación filogenética y evolutiva que existen entre los diversos organismos, ya que esta macromolécula pertenece a un grupo selecto de moléculas altamente conservadas a través de los años en el genoma y que son empleadas como cronómetros evolutivos (Srivastava S. & Srivastava P., 2003), motivo por el cual ha sido usada extensamente en los análisis de filogenia molecular; puesto que el análisis del rDNA es un método que permite determinar relaciones taxonómicas altas, inclusive sobre el nivel de género, debido a que en la molécula de rDNA existen regiones o segmentos nucleotídicos de 20 a 30 bases aproximadamente, que son completamente exclusivos de una sola especie de bacterias (Herrera, 1998; Olsen & Woese, 1993).

El presente proyecto propuso el empleo de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés) para amplificación de la secuencia 16S rDNA, secuenciación y análisis de secuencias, tomando como referencia o control positivo a la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC

23645, con el propósito de identificar las dos bacterias encontradas en la serranía ecuatoriana (presuntamente *Thiobacillus thioparus*) que, ofrecen la posibilidad de un tratamiento biológico debido a que oxidan al STS a sulfato e iones de plata, promoviendo de esta manera la conservación y mejora del entorno natural.

Finalmente, es importante recalcar que la caracterización molecular contribuirá al conocimiento de la biodiversidad microbiana ecuatoriana, de la cual tenemos poca información y, alentará al desarrollo de nuevos estudios moleculares dentro del campo de la biotecnología ambiental.

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

#### **1.3.1 Objetivo general del proyecto**

Estandarizar la técnica molecular PCR mediante la amplificación de la secuencia 16S rDNA para la detección de *Thiobacillus thioparus* e identificar dos bacterias degradadoras de tiosulfato de plata aisladas del volcán Tungurahua y de La Calera – Machachi.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

1.3.2.1 Obtener ADN de alta pureza y concentración de la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 y de las dos bacterias a ser identificadas, aisladas del volcán Tungurahua y de La Calera.

1.3.2.2 Evaluar los primer específicos Ttp194f, Ttp223f, Ttp240r y Ttp833r para la amplificación de la secuencia 16S rDNA de *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645.

1.3.2.3 Optimizar la metodología de PCR para la amplificación de la secuencia 16S rDNA de la bacteria *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645.

1.3.2.4 Amplificar la secuencia 16S rDNA de las dos bacteria degradadoras de tiosulfato de plata, presumiblemente *Thiobacillus thioparus*

con la técnica de PCR estandarizada para la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645.

1.3.2.5 Obtener la secuencia nucleotídica del 16S rDNA de las dos bacterias degradadoras de tiosulfato de plata a ser identificadas, aisladas de ambientes ecuatorianos.

1.3.2.6 Realizar un análisis comparativo entre la base de datos de secuencias del National Center for Biotechnology Information y las secuencias nucleotídicas de las dos bacterias aisladas de ambientes ecuatorianos, para la obtención del porcentaje de similitud entre éstas.

1.3.2.7 Identificar el género bacteriano al que pertenecen las dos bacterias aisladas de ambientes ecuatorianos a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

1.3.2.8 Construir árboles filogenéticos para las dos bacterias nativas con la ayuda de software bioinformático.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Características del género *Thiobacillus***

El género incluye aerobios obligatorios y pueden existir algunos tipos definidos de aerobios facultativos. Son bacilos cortos de 0.5 x 1.0 – 4.0 µm, gram negativos, no esporulados, móviles por flagelación peritrica y algunas especies inmóviles. El pH óptimo de crecimiento oscila entre 2 a 8, con temperaturas de 20 °C a 43 °C. Estos microorganismos son bacterias de vida libre en aguas dulces o marinas y otras asociadas a animales de sangre caliente, en especial al sistema digestivo, otras viven en aguas residuales, aguas negras y ambientes sólidos donde la oxidación de sulfuros es abundante (Holt *et al.*, 1994).

Muchas especies pueden ser patógenas para el hombre, animales o vegetales y algunas especies son de importancia industrial (Dajoz □ & Leiva, 2003; García & González, 2000; Zamora, 2006).

Su fuente de energía se deriva de la oxidación de uno o más compuestos sulfurados, incluyendo sulfitos, sulfuros, tiosulfatos, policianatos y tiocianatos. El sulfato es el producto final de la oxidación de los compuestos sulfurados. Algunas especies también obtienen energía de la oxidación del hierro ferroso al hierro férrico (Castillo *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2001; Schreiber & Pavlostathis, 1998).

El porcentaje de bases en el ADN de diferentes especies de *Thiobacillus* presenta una significativa heterogeneidad (50% al 68% G+C), lo que implica una marcada diversidad genética, hecho que también puede observarse, por ejemplo con la obligatoriedad del metabolismo quimiolitotrófico en este grupo; mientras algunos de ellos son quimiolitótrofos obligados y dependientes de la fijación del CO<sub>2</sub> por el ciclo de Calvin (*T. thioparus*, *T. thiooxidans*, *T. denitrificans*), otros presentan crecimiento mixto (*T. novellus*, *T. intermedius*), entendiéndose por mixto a la capacidad de utilizar compuesto orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono y energía (Holt *et al.*, 1994; Ljungdahl, Adams, Barton, Ferry & □ Johnson, 2003; Parés & Juárez, 1997).

#### **1.4.2 Características de *Thiobacillus thioparus***

Son pequeños, gram negativos, forma de bastones, cortos y finos de 0.5 a 3 µm. Son monoflagelados, con indicación polar por lo tanto móviles. En cultivo en medio líquido presentan una película consistente en la superficie constituidos por células y azufre libre; para el cultivo en medio sólido, se utiliza como sustrato el tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Las colonias en medio sólido son pequeñas, circulares, de color amarillo blanquecinas y con una precipitación notoria de azufre. El pH final en medio líquido es de 3.5 a 4.5. Son microorganismos estrictamente autotróficos, tienen la particularidad de oxidar los tiosulfatos, tiocianatos y sulfuros, extrayendo su energía de este proceso metabólico; pueden reducir nitratos a nitritos sobre condiciones

anaerobias. Se les ha identificado en aguas dulces, mares, ríos, desagües, suelos y aguas sulfurosas. (Holt *et al.*, 1994; Parés & Juárez, 1997).

### 1.4.3 Otros microorganismos degradadores de tiosulfato

Existen diferentes grupos de bacterias aerobias o anaerobias que son capaces de crecer al metabolizar compuestos reducidos del azufre como el tiosulfato; la mayoría de estos microorganismos pertenecen al género de los *Thiobacillus*. Sin embargo, también se ha encontrado esta propiedad en otros microorganismos, pertenecientes a los géneros *Beggiatoa*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthro bacter*, *Sulfolobus*, *Sulfurospirillum*, *Thiomicrospira*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfobulbus*, *Desulfosarcina* (Castillo *et al.*, 2005; Parés & Juárez, 1997; Sorokin, Teske, Robertson & Kuenen, 1999; Stanier, Villanueva & Guerrero, 1996).

### 1.4.4 Extracción de ADN genómico

La primera etapa, en la mayoría de los estudios de biología molecular, empieza en la extracción y purificación de un ácido nucleico. La elevada calidad y pureza del ácido nucleico, son dos de los requisitos más importantes para este tipo de estudios, ya que la presencia de contaminantes en la muestra, algunos de los cuales se citan en la Tabla 1.1, podrían actuar como inhibidores de la PCR, dando origen a los falsos negativos (Somma, 2006).

**Tabla 1.1.** Inhibidores de la PCR.

| INHIBIDOR             | CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN |
|-----------------------|-----------------------------|
| Dodecilsulfato sódico | > 0,005 %                   |
| Fenol                 | > 0,2 %                     |
| Etanol                | > 1 %                       |
| Isopropanol           | > 1 %                       |
| Acetato de sodio      | > 5 mM                      |
| Cloruro de sodio      | > 25 mM                     |
| EDTA                  | > 0,5 mM                    |
| Hemoglobina           | > 1 GM/ml                   |
| Heparina              | > 0,15 UI/ml                |

La elección de la técnica más idónea, dada la gran variedad de métodos de extracción y purificación de ácidos nucleicos, depende de los siguientes criterios:

- ✓ Ácido nucleico diana.
- ✓ Organismo fuente.
- ✓ Material inicial (hojas, semillas, tejidos, etc).
- ✓ Resultados deseados (rendimiento, pureza, tiempo que se requiere para la purificación).
- ✓ Uso posterior (PCR, clonación, transferencia, RT-PCR, síntesis de ADNc, etc).

La mayoría de los protocolos de aislamiento del ácido nucleico implican un paso del lisis de la célula, tratamientos enzimáticos, solubilidad diferenciada y precipitación (Castellanos & Say, 2005).

#### **1.4.4.1 Lisis Celular**

Este proceso debe ser lo suficientemente fuerte como para romper las membranas de las células, pero suficientemente suave como para preservar el ácido nucleico diana (Somma, 2006). Esta lisis celular se realiza generalmente bajo condiciones como por ejemplo: SDS, álcali, hervir la muestra o agentes caotrópicos. Además, este tipo de proceso, promueven el retiro de proteínas durante los pasos subsecuentes e inhiben la actividad de las nucleasas que degradarán los ácidos nucleicos (Castellanos & Say, 2005).

#### **1.4.4.2 Tratamiento enzimático**

Otro acercamiento en el aislamiento de ácidos nucleicos es degradar componentes indeseados. Para este fin se utilizan proteinasas, generalmente

la Proteinasa K, que en el lisado promoverá el retiro de proteínas. La proteinasa K sigue siendo activa a 55° en presencia de 0.5% SDS. La temperatura elevada y el SDS mejoran solubilidad e inhiben cualquier actividad del ADNsa que pueda estar presente en el lisado. Las nucleasas se pueden también utilizar para quitar los ácidos nucleicos indeseados. Por ejemplo, muchos protocolos de la extracción del ADN incluyen un paso de tratamiento del ARNsa, y viceversa. Es importante que el ARNsa esté libre de actividad del ADNsa. El ARNsa libre es preparada hirviendo fácilmente el ARNsa comercial por 10 minutos (Castellanos & Say, 2005).

#### **1.4.4.3 Extracción**

Solventes orgánicos se utilizan generalmente para separar las proteínas de los ácidos nucleicos. Las proteínas son hidrofóbicas y se encuentran en la fase orgánica. Los ácidos nucleicos están altamente cargados y se encuentran en la fase acuosa. La extracción con fenol se utiliza extensamente para el aislamiento del ADN genómico de alto peso molecular (Castellanos & Say, 2005).

#### **1.4.4.4 Precipitación**

Para concentrar los ácidos nucleicos, suele realizarse una precipitación con isopropanol o etanol, en diferentes concentraciones, ya que los ácidos nucleicos son insolubles en alcoholes (Parra, 2002). También puede realizarse una precipitación selectiva de los ácidos nucleicos con concentraciones salinas (Somma, 2006).

#### **1.4.4.5 Resuspensión y conservación**

Finalmente los ácidos nucleicos, después de haber retirado el alcohol por secado, son resuspendidos en agua o buffers, que generalmente es Tris-EDTA (TE), y la muestra es conservada por congelamiento a -20 °C (Arroyo & Sánchez, 2003).

### **1.4.5 Cuantificación de ADN**

Existen varias técnicas para la cuantificación de ácidos nucleicos, entre las que se menciona:

#### **1.4.5.1 Por espectrofotometría**

Este método es utilizado gracias a la propiedad de absorber la radiación ultravioleta, que presentan las purinas y pirimidinas (Parra, 2002). La concentración de los ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un coeficiente de pureza. Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el coeficiente  $A_{260}/A_{280}$  para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Una absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El coeficiente  $A_{260}/A_{230}$  de muestras puras es de 2,2 aproximadamente (Somma, 2006).

#### **1.4.5.2 Por electroforesis**

Cuando la cantidad de ácidos nucleicos es escasa, puede emplearse el método de placa de agarosa con bromuro de etidio. Permite calcular la cantidad de ácidos nucleicos a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio irradiado con luz UV, comparándola con patrones de concentración conocidos (Somma, 2006).

La estructura del fosfato de ácidos nucleicos cargado negativamente da una proporción de carga y masa uniforme. Por lo tanto la migración en geles es inversamente proporcional al tamaño del ácido nucleico. La estructura del ácido nucleico (lineal, circular, doble hélice, o hélice simple) también afecta la migración en geles (Castellanos & Say, 2005).

#### **1.4.5.3 Por fluorometría**

La fluorometría hace uso tintes fluorescentes específicos para ácidos nucleicos, los cuales se ligan a las moléculas de ADN o el ARN. Se requiere de un control negativo para calibrar el fluorómetro y un estándar de concentración conocida. La fluorometría es una técnica muchísimo más sensible y exacta en comparación con la espectrofotometría (medida de  $A_{260}$ ) y menos susceptible a la contaminación con ARN y proteínas. Sin embargo esta técnica no nos

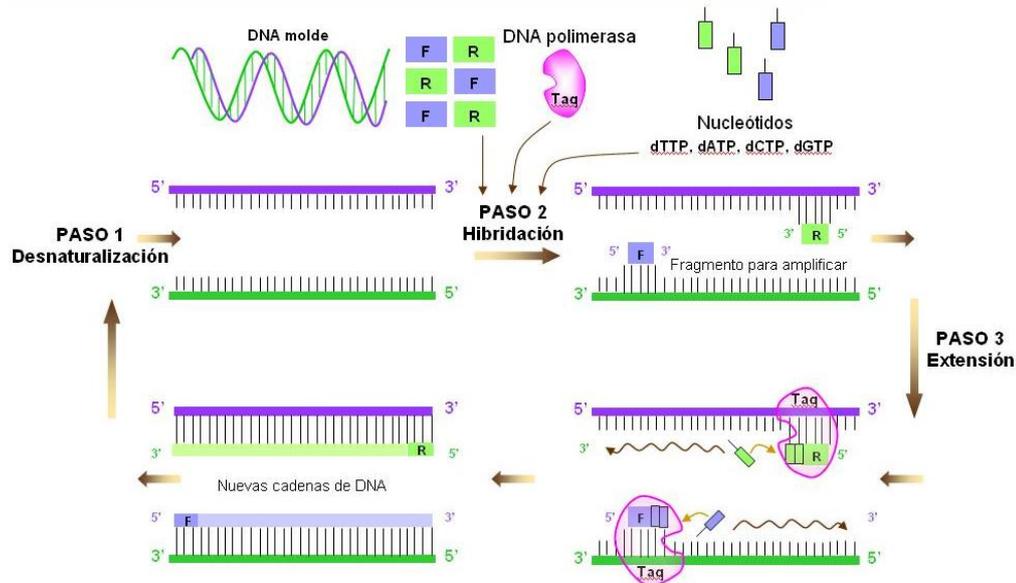
proporciona una medida de pureza (como una proporción  $A_{260}/A_{280}$ ) tampoco esto asegura que el ADN o el ARN no están degradados (determinación de tamaño por electroforesis en gel) (Fero, 2005).

#### **1.4.6 Polymerase Chain Reaction (PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Es una técnica in vitro que imita la habilidad natural para replicar ADN. Es una tecnología patentada que genera múltiples copias de una secuencia de nucleótidos específica de un organismo deseado. La tecnología concebida por Kary Mullis y desarrollada por un equipo de científicos de CETUS Corporation, fue publicada inicialmente en 1985 en *Science* (230: 1350 – 1354) por R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, C. Horn, H. Erlich y N. Arnheim, en el artículo “Amplificación enzimática de secuencias genómicas de  $\beta$ -globina y análisis de los sitios de restricción en anemia de células falciformes”, y es hoy en día una de las más poderosas herramientas de biología molecular. Por este revolucionario descubrimiento el Dr. Mullis compartió en 1993 el Premio Nobel de Química (Étienne & Pérez, 2001; Oliva & Vidal, 2006).

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15 a 20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos o iniciadores (conocidos por su nombre en inglés, primers) actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada Taq polimerasa (Anaya, Shoenfeld, Cervera, Correa & García, 2005). Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C) (Cooper & Yamaguchi, 2004). La enzima exhibe la máxima actividad a temperaturas entre 70 °C a 80 °C manteniendo una extensión de 35 a 100 nucleótidos por segundo a 72 °C, y es estable a temperaturas de 95 °C (Greene & Rao, 1998; Maldonado, 2002).

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos (Figura 1.1):



**Figura 1.1.** Pasos para cada uno de los ciclos de la PCR (Anaya *et al.*, 2005).

#### 1.4.6.1 Desnaturalización

Para que comience la reacción en cadena de la polimerasa es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando por unos minutos temperaturas de 92 a 98° C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas (Tresguerres, 2003).

#### 1.4.6.2 Hibridación

Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 °C y los 70 °C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar (Bartlett & Stirling, 2003).

La temperatura de fusión o annealing ( $T_m$ , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de annealing específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa (Bartlett & Stirling, 2003).

### **1.4.6.3 Extensión**

Durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72 °C ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. Una extensión dura de 30 a 120 segundos, dependiendo de la longitud de la secuencia a amplificar. Aproximadamente, en un minuto se generan 1000 pb (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007; González, 2004; Puerta & Ureña, 2005).

### **1.4.6.4 Componentes de la PCR**

#### **1.4.6.4.1 Buffer de PCR**

Los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris-HCl y MgCl<sub>2</sub>. La concentración final de KCl y de Tris-HCl que optimiza la tasa de síntesis de ADN es de 50 mM, y de 10mM respectivamente (Bartlett & Stirling, 2003; Crocker & Burnett, 1999).

#### **1.4.6.4.2 Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>)**

El MgCl<sub>2</sub> es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg<sup>2+</sup> son necesarios para la actividad de la Taq polimerasa, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa. La concentración final de MgCl<sub>2</sub> que generalmente se usa es de 1.5 mM. El exceso de MgCl<sub>2</sub> incrementa la unión no específica de los primers al ADN molde en la reacción. (Bartlett & Stirling, 2003; Day, 2002; Siwach & Singh, 1997)

#### **1.4.6.4.3 Cebadores (Primers)**

Llamados también oligonucleótidos o iniciadores. La concentración óptima de primers está entre los 0,1 μM a 0,6 μM. Las altas concentraciones de primers pueden promover la síntesis de productos no específicos, mientras que las bajas concentraciones de los mismos resultarían en una baja producción del amplicón deseado (Siwach & Singh, 1997; Wilson & Droby, 2000)

A la hora de elegir unos primers para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

✓ La **longitud** de cada uno de los primers debe estar comprendida entre 18 y 30 bases máximo, ya que se ha comprobado que primers de mayor longitud no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad (Dieffenbach & Dveksler, 2003).

✓ Ambos primers deben tener una **T<sub>m</sub>** similar, como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5°C. Las elevadas temperaturas de melting confieren una gran especificidad de amplificación (Day, 2002).

✓ Un contenido de guanina citosina (GC) de 40% a 60% en el primer asegura una elevada temperatura de melting, incrementando la especificidad (Bartlett & Stirling, 2003; Siwach & Singh, 1997).

✓ El **extremo 3'** del primer debe incluir un residuo guanina (G) o citosina (C), puesto que se incrementa la eficiencia de la hibridación, suministra mejor especificidad. Los primers que terminan en un residuo timina (T) tienden a tener una baja especificidad (Dieffenbach & Dveksler, 2003).

✓ Para evitar la formación de **dímeros de primers** es necesario comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre sí (Day, 2002).

#### **1.4.6.4.4 Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs)**

Las concentraciones finales de cada dNTP que suelen usarse están en torno a 50 a 500 µM para cada uno de ellos. La concentración de dNTPs y de MgCl<sub>2</sub> son directamente proporcionales ya que el Mg<sup>2+</sup> se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la *Taq polimerasa* suficiente Mg<sup>2+</sup> como para incorporar dNTPs. Para una concentración de 200 µM de cada dNTP se suele añadir MgCl<sub>2</sub> a una

concentración de 1.5 mM (Bartlett & Stirling, 2003; Dieffenbach & Dveksler, 2003; Siwach & Singh, 1997).

#### **1.4.6.4.5 Taq polimerasa**

Las cantidades óptimas de Taq polimerasa necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 0,5 a 2,5 unidades por 50 µl de volumen final de reacción. La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg<sup>2+</sup> y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad. La temperatura óptima a la que actúa la Taq polimerasa permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN (Anaya *et al.*, 2005; Bartlett & Stirling, 2003; Siwach & Singh, 1997).

#### **1.4.6.4.6 ADN molde (template)**

Es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, el ADN que la Taq polimerasa utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas, que debe estar libre de impurezas, pues éstas podrían actuar como inhibidores de la polimerasa. Las cantidades recomendadas de ADN genómico bacteriano para una PCR están entre 1 a 10 ng. El exceso de ADN molde puede contribuir a la formación de productos no específicos (Day, 2002; Siwach & Singh, 1997).

#### **1.4.7 El ribosoma bacteriano y el rADN 16S**

Los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados, que utilizan los organismos para el complicado proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoprotéico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas que se las identifica de la S1 a S21 (S procede de small), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas que se

las conoce como L1 a L34 (L procede de large) (Teijón *et al.*, 2006; Tresguerres, 2003).

El rADN 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Devlin, 2004; Florez, Armijo & Mediavilla, 2004; Müller, 2003; Neefs, van de Peer, Hendriks & de Wachter, 1990; Ramos, 2004).

En procariontes, los ARNr se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (McNamara, 2006; Müller, 2003; Woese, Stackebrandt, Macke & Fox, 1985).

Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación (Stackebrandt *et al.*, 2002).

La identificación basada en el análisis de esta secuencia en los laboratorios se centra principalmente en cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, incluyendo los siguientes casos (Rodicio & Mendoza, 2004):

a) Bacterias no cultivables presentes en muestras, hecho que en ocasiones ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos.

b) Bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida. Esta situación puede presentarse cuando se trata de patógenos nuevos, patógenos infrecuentes o también cepas de especies comunes que exhiben un perfil bioquímico ambiguo.

c) Bacterias para las cuales la caracterización fenotípica sea sustancialmente deficiente.

d) Bacterias fastidiosas, a consecuencia de sus requerimientos nutricionales.

e) Bacterias de crecimiento lento, que retrasa considerablemente la identificación convencional.

#### ***1.4.8 La secuencia 16S rDNA como herramienta para la identificación y filogenia bacteriana***

Los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas. Se estima que un 1% de disimilaridad al comparar las secuencias 16S rDNA entre dos microorganismos, corresponde a una separación evolutiva de alrededor de 50 millones de años (Battaglia, Valencia & Walton, 1997; Rodicio & Mendoza, 2004; Srivastava S. & Srivastava P., 2003).

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década

de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: *Eubacteria* y *Archaeobacteria* (Margulis, 2002; Olsen & Woese, 1993).

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S a través de alineamientos múltiples con otras secuencias, almacenadas en bases de datos en línea como el European Molecular Biology Laboratory (EMBL, 2008), o el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2008), permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas, debido a que existen regiones hipervariables en sus secuencias, hecho que sirve para estimar la relación de distancia evolutiva que presentan. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (McNamara, 2006; Ramos, 2004).

#### **1.4.9 Árboles filogenéticos basados en la secuencia 16S rDNA**

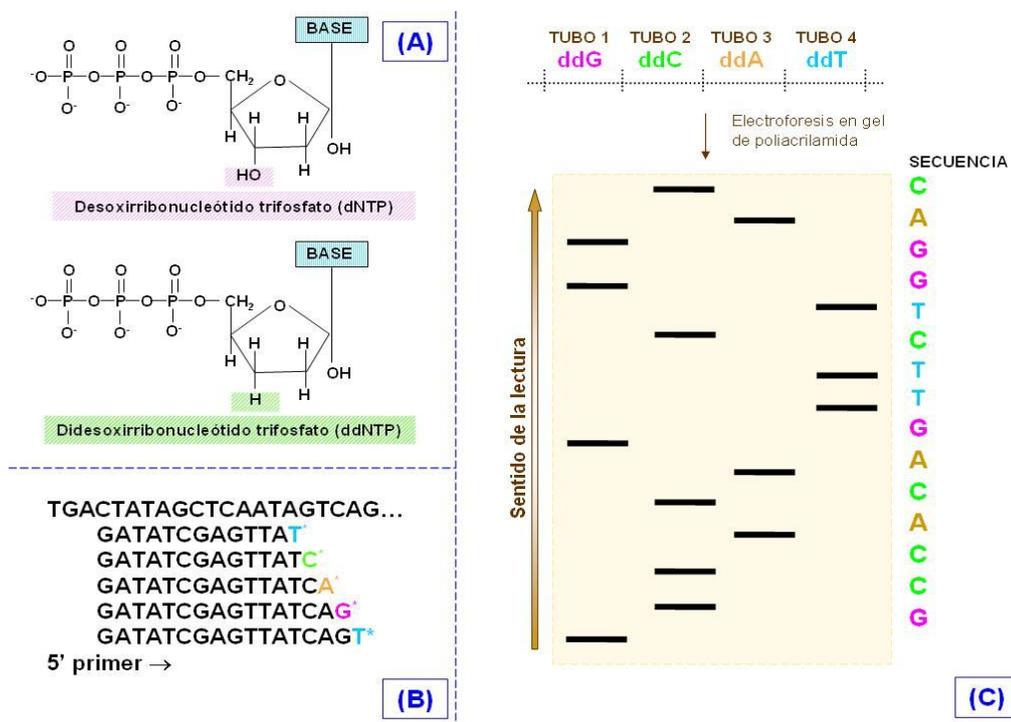
Varios modelos matemático han sido diseñados para graficar los árboles basados en la secuencia 16S rDNA y comprobar la fiabilidad de los mismos. Entre ellos, los más extensamente usados son el método de matriz de distancia, el análisis de máxima parsimonia y el análisis cluster (McNamara, 2006).

#### **1.4.10 La secuenciación**

El alineamiento de secuencias, la construcción de árboles filogenéticos y en general, cualquier tipo de análisis molecular parte de hecho de conocer la conformación nucleotídica de una determinada secuencia.

Los métodos de secuenciación fueron desarrollados a finales de la década de los 70. Existen dos métodos de secuenciación: el método de **Maxam & Gilbert** y el método de **Sanger** y colaboradores. El método de Maxam & Gilbert esta basado en la degradación química parcial de la molécula de ADN. La secuenciación del ADN por el método de Sanger se basa en dos aspectos básicos para la síntesis del ADN: primers para la ADN polimerasa y la adición de nucleótidos (dNTPs o ddNTPs) a una cadena de ADN en

crecimiento. La síntesis de cadenas de ADN es catalizada por la ADN polimerasa en presencia de los cuatro dNTPs más un ddNTP. Todos los fragmentos empiezan en el extremo 5' del primer y terminan al añadir un ddNTP; cada uno marcado con un colorante fluorescente distinto. Los ddNTPs se incorporan a la cadena en crecimiento como cualquier dNTP normal, pero al carecer de un 3' – OH no puede añadirse otro nucleótido al extremo de la cadena, produciendo la terminación de la elongación (Figura 1.2 (A)). Se usa una mezcla de ddNTPs y dNTPs, cuya proporción dé lugar a una incorporación de ddNTPs con una probabilidad del 0,5 % en cada sitio. El resultado es un conjunto de fragmentos que comparten el mismo extremo 5' mientras que el extremo 3' es específico de base (Figura 1.2 (B)). Los fragmentos de ADN sintetizados se separan por electroforesis (Figura 1.3 (C)) y la señal emitida por los diferentes marcadores fluorescentes al ser excitados por un láser es captada por unos detectores y analizada con soporte informático mediante instrumentos que permiten la lectura automática de la secuencia (Devlin, 2004; High & Ross, 1995; Oliva & Vidal; 2006).



**Figura 1.2.** Secuenciación por el método de Sanger. (A) Estructura de un dNTP y un ddNTP. (B) Fragmentos de ADN. (C) Electroforesis de los fragmentos sintetizados (Devlin, 2004).

## **CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

El desarrollo del presente proyecto fue posible gracias a la asistencia científico – técnica del Ing. Luis Cumbal y del Dr. Ángel Guevara asignados Codirector y Director respectivamente, así como también gracias a la colaboración proporcionada por el Dr. Marcelo Grijalva del Laboratorio de Biotecnología (ESPE), de Ricardo Oliva y Francisco Jarrín del Centro Internacional de la Papa (CIP), durante la ejecución de este trabajo.

### **2.2 Zona de estudio**

La fase microbiológica del proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) y, la fase molecular en los Laboratorios de Biotecnología Humana de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ambos laboratorios ubicados en la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), Sangolquí, Avenida El Progreso s/n.

### **2.3 Período de tiempo de investigación**

Este proyecto tuvo una duración de 8 meses; iniciando en Agosto del 2007 y culminando en Abril del 2008.

### **2.4 Diseño**

Los ensayos realizados durante la estandarización de la PCR para la amplificación de una región de la secuencia 16S rDNA en *Thiobacillus thioparus* fueron sometidos a una estadística descriptiva ensayo-error.

### **2.5 Materiales y Metodología**

### **2.5.1 Cultivo de tres bacterias**

El cultivo de las bacterias fue realizado en los laboratorios de Microbiología del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la ESPE.

#### **2.5.1.1 Preparación de los medios de cultivo**

Se utilizó tres medios de cultivo para la propagación de las tres bacterias empleadas en este proyecto; dos de los cuales dos fueron líquidos y otro fue sólido.

##### **2.5.1.1.1 Medio líquido para *Thiobacillus ATCC 290 S6***

Este medio fue preparado a base de los siguientes reactivos (American Type Culture Collection (ATCC), 2007):

|   |        |
|---|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                | 1.2 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                 | 1.8 g  |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....           | 0.1 g  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 0.1 g  |
| CaCl <sub>2</sub> .....                               | 0.03 g |
| FeCl <sub>3</sub> .....                               | 0.02 g |
| MnSO <sub>4</sub> .....                               | 0.02 g |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....   | 10.0 g |
| Agua destilada.....                                   | 1.0 L  |

##### **2.5.1.1.2 Medio sólido para *Thiobacillus ATCC 290 S6***

El medio fue preparado a base de los mismos componentes usados en el medio líquido para *Thiobacillus ATCC 290 S6*, adicionando 15.0 g de agar (ATCC, 2007).

##### **2.5.1.1.3 Medio líquido para *Thiobacillus thioparus***

El medio fue preparado usando los siguientes reactivos (Carter & Gregorich, 2007):

|   |       |
|---|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....       | 4.0 g |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O ..... | 0.5 g |

|   |         |
|---|---------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 0.4 g   |
| CaCl <sub>2</sub> .....                               | 0.25 g  |
| FeCl <sub>3</sub> .....                               | 0.01 g  |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....   | 5.0 g   |
| Azul de bromotimol ...                                | 0.005 g |
| Agua destilada.....                                   | 1.0 L   |

Para la preparación de los tres medios de cultivo, los reactivos fueron disueltos por separado dependiendo de su grupo químico ya sea en sulfatos, fosfatos y cloruros. El agar y el azul de bromotimol fueron disueltos en el grupo de los fosfatos. El pH de los fosfatos fue ajustado a 7.0 y se procedió a autoclavar cada grupo químico por separado a 121 °C, una atmósfera de presión por 15 minutos. Una vez esterilizados los grupos químicos, se los dejó enfriar hasta temperatura ambiente, para después mezclarlos asépticamente. Finalmente, se dispensó asépticamente 50 mL del medio líquido en erlenmeyers de 125 mL que tenían un tapón de algodón, y 20 mL del medio sólido en cajas petri. Cabe destacar que, previamente los erlenmeyers y las cajas petri empacadas en papel fueron esterilizados en una estufa Equatherm a 110 °C, por una hora.

#### **2.5.1.2 Propagación de la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645**

La bacteria fue comprada a la empresa American Type Culture Collection (ATCC), e importada desde los Estados Unidos de América. El paquete consistía de un vial de vidrio sellado al vacío, el cual contenía 0.11 g del microorganismo liofilizado, el mismo que fue reconstituido con el instructivo proporcionado por ATCC (How to Open Freeze – Dried Vials) en su página web [www.atcc.org/HowtoReviveCultures/tabid/695/Default.aspx](http://www.atcc.org/HowtoReviveCultures/tabid/695/Default.aspx) (Véanse Anexos A y B).

#### **2.5.1.3 Propagación de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA**

Las dos bacterias fueron aisladas de distintos lugares de la serranía ecuatoriana, una de éstas fue recuperada de las aguas sulfurosas del volcán Tungurahua (TUNGURAHUA 1), y la otra del sector denominado La Calera, en Machachi (CALERA). Los microorganismos inoculados, en el medio de cultivo

sólido para *Thiobacillus*, fueron propagados en una incubadora Barnstead® Modelo 100 a 30 °C, durante seis días. Los dos medios líquidos inoculados con las bacterias, permanecieron en agitación a 150 rpm a temperatura ambiente por seis día, en un agitador orbital Heidolph® Modelo 1010.

### **2.5.2 Aislamiento de ADN genómico de *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, CALERA y TUNGURAHUA 1**

Para extraer el ADN bacteriano se utilizó un protocolo modificado del usado en el Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay, 2007. Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Humana de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la ESPE, en una cabina de seguridad Biológica C4 Modelo CSB120, se usó guantes de nitrilo, puntas con filtro para micropipeta de diferente graduación, y micropipetas Biopette® de diferente volumen; todo previamente esterilizado en luz UV por 15 minutos.

Durante el proceso de extracción de ADN genómico, se utilizaron las siguientes soluciones y reactivos:

✓ Buffer de lisis, 100 mL, esterilizado por 15 minutos a 121 °C y 1 atm de presión; elaborado en base a la mezcla de los componentes que se detallan en la tabla 2.1:

**Tabla 2.1.** Componentes del buffer de lisis.

| REACTIVO  | CONCENTRACIÓN | PESO (g) | VOLUMEN FINAL |
|-----------|---------------|----------|---------------|
| Tris HCl  | 50 mM         | 0.7882   | 100 mL        |
| EDTA pH 8 | 50 mM         | 1.861    |               |
| SDS       | 1%            | 1.00     |               |
| NaCl      | 50 mM         | 0.29     |               |

✓ Proteinasa K (20 mg/ml),  
 ✓ NaCl (5 M), 100 mL, para la cual se disolvieron 29.22 g de NaCl en 100 mL de agua desionizada y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C y 1 atm de presión.

✓ TE 1X, 100 mL, para lo cual se disolvieron 0.1211 g de Tris base y 0.0372 g de EDTA, se ajustó el pH a 8 con una solución de NaOH 2N, y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C y 1 atm. de presión.

✓ Etanol absoluto a -20 °C, el cual fue esterilizado con radiación UV por 15 minutos y,

✓ RNasa A (20 mg/ml).

Una vez preparadas las soluciones que se usarían durante este proceso, se siguió con la extracción misma que se explica a continuación:

En un tubo Eppendorf de 2 mL se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf Modelo 0029008 a 6000 rpm por 20 minutos 2000 µL del cultivo bacteriano, transcurrido este tiempo se descartó cuidadosamente el sobrenadante, evitando disgregar el sedimento, el cual fue resuspendido agregando 500 µL del buffer de lisis y 5 µL de proteinasa K, aspirando y expulsando el líquido varias veces. El tubo con el sedimento resuspendido fue incubado en un termobloque Daigger Modelo 2911B a 55 °C, durante dos horas, dando seis toques con el Vortex Mixer Labnet Modelo S0100 por 10 segundos cada 20 minutos y una hora antes de finalizar la incubación se agregó 2.5 µL de RNasa A. Posteriormente, el tubo fue centrifugado a 14300 rpm por 20 minutos, 500 µL del sobrenadante fueron llevados a un tubo limpio, evitando acarrear la fracción sólida del fondo, se agregó 300 µL de NaCl 5M, agitó brevemente y centrifugó a 14300 rpm por 20 minutos. Después se pipeteó 650 µL del sobrenadante a un tubo limpio, agregó el doble de volumen de etanol absoluto, agitó lentamente y centrifugó a 14300 por 20 minutos, descartando todo el sobrenadante, evitando tirar el pellet. El pellet fue lavado, evitando disgregarlo, por dos veces breve y cuidadosamente con 750 µL de etanol 70 %. El pellet se secó a 37°C por dos horas en el termobloque orbital Termomixer Eppendorf Modelo 5350 – 27058 a 300 rpm, para finalmente resuspenderlo hasta disolverlo en 100 µL de TE 1X y conservar este producto a -20 °C.

### **2.5.3 Cuantificación de ADN genómico obtenido**

La cuantificación de la cantidad de ADN extraído de los cultivos puros de la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 y las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA se realizó usando el método fluorométrico (Fero, 2005). En el ensayo se utilizó el fluorómetro Qubit™ Invitrogen Modelo Q32857, el kit de cuantificación Quant-iT™ dsDNA HS (Q32851), tubos eppendorf, guantes de nitrilo, puntas para micropipeta y micropipetas de volumen variable, siguiendo el procedimiento propuesto (Catálogo No. Q32851) en el inserto adjunto al kit de cuantificación (Invitrogen, 2007).

### **2.5.4 PCR**

La estandarización de esta técnica para la amplificación de la secuencia 16S ADNr en *Thiobacillus thioparus* mediante PCR fue llevada a cabo utilizando primers específicos para especie Ttp194f, Ttp223f, Ttp240r y Ttp833r, los cuales fueron diseñados en la investigación titulada: **“BIOFILTRATION OF DIMETHYL DISULPHIDE AND AMMONIA: INVESTIGATION OF THE UNDERLYING MICROBIAL ACTIVITIES”**, realizada por Michael John Gibson, 2001, y muestras de ADN de la cepa bacteriana *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, que fue usada como control positivo.

El volumen de reacción fue de 25  $\mu$ L, la cual contenía 5  $\mu$ L de la muestra, 1.5 U de Taq polimerasa, 2.5  $\mu$ L de Buffer 10X,  $MgCl_2$  1.5 mM (concentración final), 10 pmol de cada primer (forward - reverse), dNTPs 0.3 mM (concentración final mezcla) y agua grado PCR hasta completar el volumen final (Tabla 2.2).

Se ensamblaron PCRs en tubos eppendorf de 200  $\mu$ L; dispensando 20  $\mu$ L de la Master Mix y 5  $\mu$ L de la muestra de ADN, para la amplificación de la secuencia 16S rDNA de la cepa bacteriana *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, con la cual se estandarizó el protocolo de PCR que se aplicó en muestras de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA.

**Tabla 2.2.** Reactivos usados en la PCR.

| REACTIVO                | [C <sub>i</sub> ] | [C <sub>f</sub> ] | Volumen x 1 tubo (ul) |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Agua                    |                   |                   | 13.70                 |
| Buffer 10X              | 10X               | 1X                | 2.50                  |
| MgCl <sub>2</sub>       | 50 mM             | 1.5 mM            | 0.75                  |
| DNTPs (mezcla de los 4) | 10 mM             | 0.3 mM            | 0.75                  |
| Primer FW               | 10 μM             | 0.4 μM            | 1.00                  |
| Primer RV               | 10 μM             | 0.4 μM            | 1.00                  |
| Taq polimerasa          | 5 U/μL            | 1.5 U/μL          | 0.30                  |
| ADN                     | A determinar      | A determinar      | 5.00                  |
|                         |                   | VOL. TOTAL        | 25.00                 |

MASTER MIX

Cabe anotar que existió un control negativo, que consiste de un tubo Eppendorf en el que se colocó la master mix, y en lugar de la muestra de ADN se añadió el equivalente en volumen de agua grado molecular.

El programa de temperatura que se usó para el termociclador Techne TC - 512 Modelo FTC51H2D, en la amplificación del 16S rDNA estuvo sujeto a modificaciones, hasta que se obtuvo una buena amplificación de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645.

### 2.5.5 Electroforesis del ADN y productos de PCR

Para visualizar los productos se corrieron geles de agarosa al 0.8% para ADN y al 1% para productos de PCR, a 120 V, durante una hora, en TBE 1x (Muyzer, De Waal & Uitierlinden, 1993), usando una cámara electroforética CBS Scientific CO Modelo SGE-020-02.

#### 2.5.5.1 Preparación de Buffer TBE 1x

El buffer TBE 1x fue preparado a partir de TBE 5x, el mismo que fue elaborado en base a la mezcla de los siguientes reactivos (Tabla 2.3):

**Tabla 2.3.** Componentes de Buffer TBE 5X.

| REACTIVO     | CONCENTRACIÓN | PESO (g)         | VOLUMEN FINAL |
|--------------|---------------|------------------|---------------|
| Tris base    | 0.45 M        | 54.51            | 1000 mL       |
| Ácido bórico | 0.45 M        | 27.83            |               |
| EDTA         | 10 mM         | 20 mL stock EDTA |               |

La solución stock de EDTA 0.5 M, 100 mL, fue preparada al disolver 18.61 g de EDTA en 100 mL de agua bidestilada y ajustar el pH a 8 con pellets de NaOH.

Todos los componentes de buffer TBE 5X fueron disueltos en 1000 mL de agua bidestilada y a la solución resultante se ajustó el pH a 8.3.

Se tomó 200 mL de TBE 5x y se aforó a 1000 mL con agua desionizada, la solución resultante fue TBE 1x.

#### **2.5.5.2 Preparación del gel de agarosa 1%**

El gel de agarosa fue preparado en TBE 1x, pesando la cantidad adecuada de agarosa en una balanza analítica Mettler Toledo Modelo AL – 204, para disolverla en 55 mL de TBE 1x al fundirla en un microondas General Electric. La solución se dejó enfriar hasta 45 °C aproximadamente, para posteriormente añadir 1 µL de bromuro de etidio por cada 10 mL de TBE 1x (5.5 µL de bromuro de etidio), mezclando continuamente la solución con la ayuda de un agitador magnético, en una placa de agitación Thermolyne Cimarec<sup>®</sup> 2 Modelo SP46925. La agarosa fundida fue vertida en un molde rectangular previamente sellado sus extremos abiertos con cinta adhesiva, y se colocó el peine, evitando tocar el fondo del molde, para formar los posillos, dejándola enfriar hasta que se solidifique totalmente durante 30 minutos, para de aquí empezar con la parte de electroforesis.

#### **2.5.5.3 Electroforesis**

Una vez solidificada la agarosa, se procedió a retirar el peine y la cinta adhesiva del molde, colocando el gel con los posillos cerca del cátodo (polo negativo) en la cámara de electroforesis y añadiendo buffer TBE 1X; hasta que

el gel quedó totalmente cubierto por el buffer TBE 1X. Posteriormente, sobre una tira de parafilm se mezcló 2 µL del buffer de carga BlueJuice™ Gel Loading Buffer con 8 µL del producto de PCR o de la muestra de ADN, se aplicó la muestra preparada en un posillo del gel, y en otro de los posillos del gel se colocó 5 µL del marcador de peso molecular Trackit™ 1 Kb DNA Ladder. Después, la cámara de electroforesis fue sellada y se conectó los electrodos a la fuente de poder Thermo Electron Corporation Modelo EC570 - 90 –115, se encendió dicha fuente y se programó a 120 voltios por una hora. Transcurrida la hora, los productos de PCR o el ADN fueron visualizados mediante luz UV en un transiluminador UVP BioDoc – It™ System, y finalmente se tomó una foto de la imagen proyectada en este equipo.

### **2.5.6 Secuenciación de la región 16S rDNA**

Varias muestras fueron enviadas a la empresa MACROGEN INC., en Korea, para la obtención de la secuencia nucleotídica de la región 16S rDNA de las bacterias CALERA y TUNGURAHUA 1.

### **2.5.7 Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas**

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas de la región 16S rDNA de las bacterias CALERA y TUNGURAHUA 1 se utilizaron aplicaciones en línea y software o programas bioinformáticos.

#### **2.5.7.1 Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante aplicaciones en línea**

Una vez obtenidas las secuencias de la región 16S rDNA, se procedió a compararlas con el banco de datos de secuencias del NCBI mediante la aplicación en línea Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) que ofrece la página de internet del NCBI, y posteriormente se obtuvo los árboles filogenéticos de las bacterias CALERA y TUNGURAHUA 1 utilizando el método Neighbor Joining, que ofrece NCBI (NCBI, 2008).

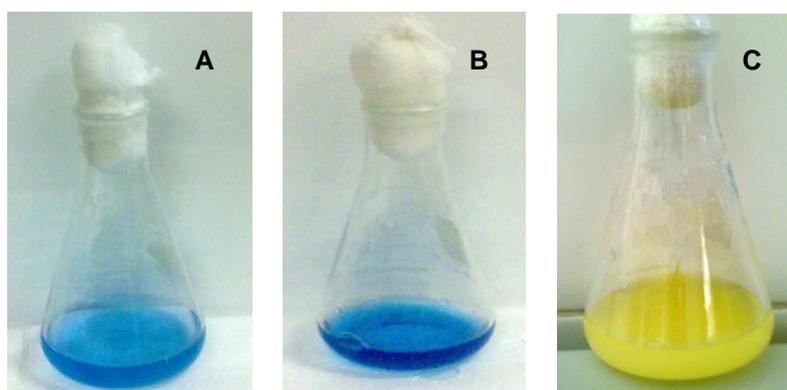
### **2.5.7.2 Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante programas bioinformáticos**

Con las secuencias nucleotídicas de la región 16S rDNA de las dos bacterias nativas CALERA y TUNGURAHUA 1 y de las cepas bacterianas que más se asemejaban a las dos nativas según el BLAST, se procedió a alinear las secuencias usando la aplicación ClustalW Multiple Alignment del software bioinformático BioEdit v7.0.8.0 (Hall, 1999). Posteriormente, las secuencias alineadas fueron utilizadas en la construcción de los árboles filogenéticos individuales para las bacterias nativas CALERA y TUNGURAHUA 1 y, adicionalmente, un árbol filogenético general en el que se incluye a las dos bacterias nativas con ayuda del software bioinformático Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v4.0, utilizando el método Neighbor Joining (Tamura, Dudley, Nei & Kumar, 2007).

## CAPITULO 3: RESULTADOS

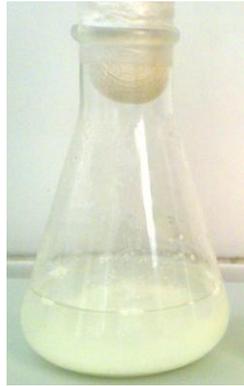
### 3.1 Cultivo de tres bacterias

Después de seis días de cultivo, a temperatura ambiente y 150 rpm en el agitador orbital Heidolph® Modelo 1010, hubo cambios de coloración y presencia de turbidez en los medios de cultivo líquidos para *Thiobacillus*. El cambio de coloración del medio para *Thiobacillus thioparus* en los erlenmeyers inoculados con las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA fue de verde a azul (Figuras 3.1(A) y 3.1(B)), y para la cepa ATCC 23645 fue de verde a amarillo (Figura 3.1(C)).



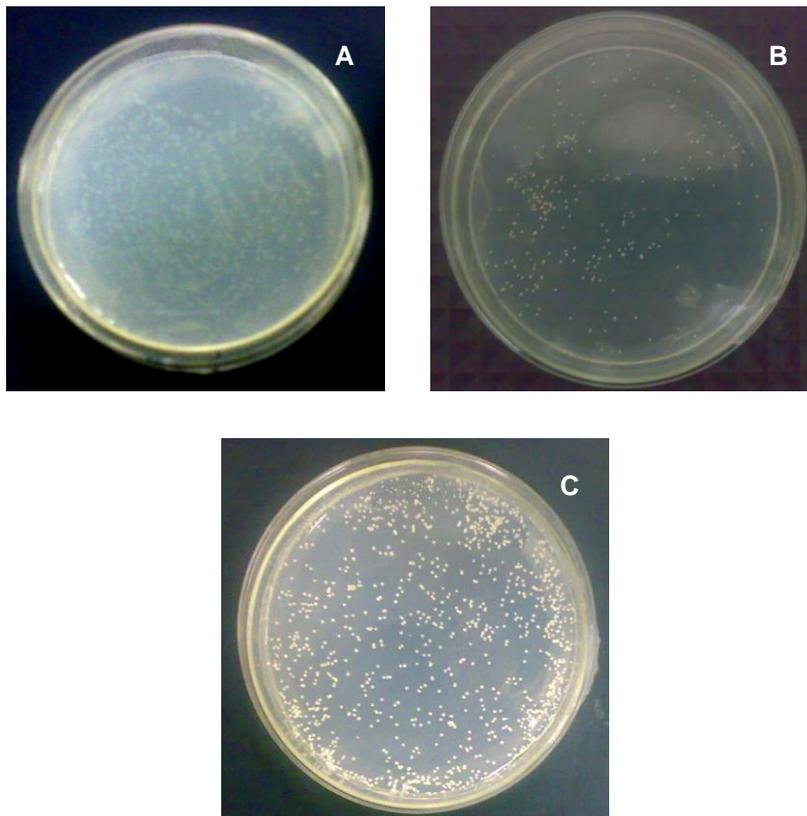
**Figura 3.1.** Medio líquido para *Thiobacillus thioparus* con bacterias (A) TUNGURAHUA 1, (B) CALERA, (C) *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645.

El medio líquido para *Thiobacillus* ATCC 290 S6 se tornó turbio, lo que provocó que el medio presente una coloración blanquecina (Figura 3.2). Cabe destacar que la turbidez que se observó para ambos medios líquidos fue mucho menor para la bacteria TUNGURAHUA 1, en comparación con las otras dos bacterias, y que entre los dos medios líquidos la turbidez fue más notoria para el medio *Thiobacillus thioparus* que para el medio *Thiobacillus* ATCC 290 S6.



**Figura 3.2.** Medio líquido para *Thiobacillus* ATCC 290 S6 inoculado con *Thiobacillus thiooparus* ATCC 23645.

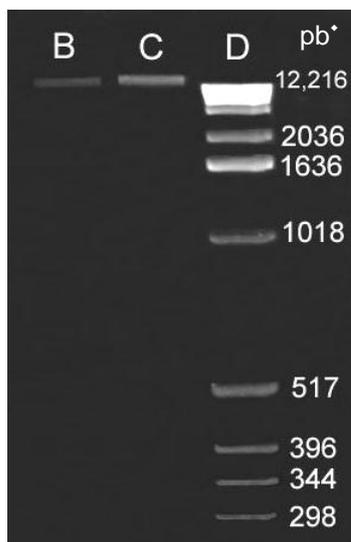
El medio de cultivo sólido para *Thiobacillus* presentó crecimiento masivo de las bacterias (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Medio sólido para *Thiobacillus* ATCC 290 S6 con bacteria (A) TUNGURAHUA 1, (B) CALERA, (C) *Thiobacillus thiooparus* ATCC 23645.

### 3.2 Aislamiento y electroforesis de ADN genómico de *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, CALERA y TUNGURAHUA 1.

Varios ensayos de aislamiento de ADN fueron realizados a partir de cultivos puros en medio líquido y sólido, sin embargo ADN de buena calidad y libre de impurezas fue obtenido a partir de cultivos líquidos, lo que se evidenció al visualizar las muestras en el transiluminador después de una electroforesis en TBE 1x, en gel de agarosa al 0.8 % usando el marcador de peso molecular Trackit™ 1 Kb DNA Ladder como dato referencial; adicionalmente, con la cuantificación por fluorometría se pudo poner de manifiesto que la concentración aproximada mínima a la cual se podía visualizar la banda de ADN en el gel de agarosa era de 3.00 ng/μL, y que bajo esta concentración era imposible observar dicha banda en el transiluminador, a pesar de que en la muestra existía ADN, como se muestra en la figura 3.4 donde las columnas B y C, que corresponden a ADN extraído de las bacterias CALERA y *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 respectivamente, que muestran la presencia de una banda pero la intensidad en la tonalidad varía entre estas dos columnas puesto que la concentración de ADN para la muestra de la columna B fue de 3.31 ng/μL y para la muestra de la columna C fue de 9.86 ng/μL.



**Figura 3.4.** Electroforesis de muestras de ADN bacteriano. (B) CALERA, (C) *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645. ♦ pares de bases.

### 3.3 Cuantificación de ADN genómico obtenido

La cuantificación por fluorimetría proporcionó concentraciones de ADN que iban desde los 0.03 ng/μL hasta los 9.86 ng/μL (Tabla 3.1). Muchas de las extracciones de ADN cuyas concentraciones fueron muy bajas no pudieron ser visualizadas por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

En la tabla 3.1 se observan concentraciones que van desde los 0.03 a 0.66 ng/μL para la bacteria TUNGURAHUA 1, que son cantidades relativamente bajas en comparación con las concentraciones de ADN obtenidas a partir de cultivos puros de las bacterias CALERA (0.11 a 3.65 ng/μL) y *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 (0.13 a 9.86 ng/μL), lo que proporcionó un indicativo de la relación directa que existió entre la concentración de ADN y la cantidad de masa bacteriana obtenida después de seis días de cultivo.

**Tabla 3.1.** Concentración de ADN de las tres bacterias.

| [ ADN] (ng/ μL) |              |   |      |
|-----------------|--------------|---|------|
| CALERA          | TUNGURAHUA 1 | <i>Thiobacillus thioparus</i><br>ATCC 23645 |      |
| 3,65            | 0,66         | 9,86  | 0,18 |
| 3,51            | 0,42         | 5,80  | 0,17 |
| 3,31            | 0,27         | 4,47  | 0,16 |
| 0,32            | 0,06         | 0,32  | 0,14 |
| 0,11            | 0,03         | 0,30  | 0,13 |

### 3.4 Ensayos de PCR

#### 3.4.1 Estandarización del protocolo de amplificación

Se realizaron varios ensayos para establecer un protocolo estandarizado tanto para el ensamblaje de la PCR, como para el programa del termociclador, que se detallan en las tablas 3.4 y 3.5, usando como control positivo la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, y con los cuales se pudo amplificar la región 16S rDNA de dicha bacteria. Se tomaron en cuenta varios

factores como las combinaciones entre los primers forward con los reverse, la concentración mínima de ADN y la temperatura de annealing, criterios con los cuales se pudo obtener el amplicón deseado.

### 3.4.1.1 Combinación de primers

En la estandarización de la técnica de PCR se probaron los primers específicos para *Thiobacillus thioeparus* Ttp194f, Ttp223f, Ttp240r y Ttp833r, los cuales se detallan en la tabla 3.2:

**Tabla 3.2.** Características de los primers.

| PRIMER  | SECUENCIA                           | %GC   | T <sub>m</sub> 2.2 |
|---------|-------------------------------------|-------|--------------------|
| Ttp194f | 5' TCG AGC GGC CGA CGT CTG AT 3'    | 65    | 58                 |
| Ttp223f | 5' CGA GCG GCC GAC GTC TGA T 3'     | 68.42 | 58                 |
| Ttp240r | 5' ATC AGA CGT CGG CCG CTC GA 3'    | 65    | 58                 |
| Ttp833r | 5' GCT TCG TTA CTA AGG GAT TTC A 3' | 40.91 | 51                 |

Las combinaciones de primers que amplificaron la secuencia 16S rDNA en el control positivo (*Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645) fueron Ttp194f con Ttp833r y Ttp223f con Ttp833r, mientras que las combinaciones Ttp194f con Ttp240r y Ttp223f con Ttp240r no presentaron amplificación alguna para la secuencia de interés en dicho control positivo (véase Tabla 3.3, Figuras 3.5 y 3.6).

**Tabla 3.3.** Combinación de primers para la amplificación de la secuencia 16S rDNA en *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645.

| COMBINACIÓN<br>PRIMERS | CONTROL<br>POSITIVO | CONTROL<br>NEGATIVO |
|------------------------|---------------------|---------------------|
| Ttp194f - Ttp833r      | +                   | -                   |
| Ttp223f - Ttp833r      | +                   | -                   |
| Ttp194f - Ttp240r      | -                   | -                   |
| Ttp223f - Ttp240r      | -                   | -                   |

### 3.4.1.2 Concentración mínima de ADN molde

Para el ensamblaje de la PCR se utilizaron diferentes muestras de ADN proveniente de la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, cuyas concentraciones estaban en el rango de 0.32 a 0.13 ng/μL. La amplificación de la secuencia 16S rDNA se presentó con concentraciones que iban desde los 0.16 ng/μL hasta los 0.32 ng/μL; las concentraciones inferiores a este rango no presentaron amplificación alguna, por lo que se estableció que la concentración mínima de ADN molde a la cual se podía obtener el amplicón de la región 16S rDNA fue de 0.16 ng/μL.

### 3.4.1.3 Temperatura de annealing

El programa para el termociclador (Véase Tabla 3.4) consistía de 30 ciclos. Se usaron gradientes para la temperatura de annealing que iban desde los 48 °C a los 62 °C, con incrementos de dos grados. El rango de temperatura que mostró amplificación de la secuencia 16S rDNA, para la combinación Ttp194f con Ttp833r, fue desde los 48 °C hasta los 62 °C, mientras que para la combinación Ttp223f con Ttp833r, fue desde los 48 °C hasta los 58 °C. Finalmente, se puso en evidencia que a los 58 °C la temperatura de annealing, para la combinación Ttp 194f con Ttp833r, y a los 50 °C para la combinación Ttp 223f con Ttp833r, fueron las más óptimas, puesto que la banda del amplicón presentó mayor intensidad en la tonalidad al ser observada en el transiluminador luego de haber realizado una electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%.

**Tabla 3.4.** Programa de temperatura para el termociclador.

| CICLO     | PROCESO         | TIEMPO     | T °C        |             |
|-----------|-----------------|------------|-------------|-------------|
|           |                 |            | 194f + 833r | 223f + 833r |
| 1 Ciclo   | Denaturación    | 10 minutos | 94°C        | 94°C        |
|           | Annealing       | 2 minutos  | 58 °C       | 50 °C       |
|           | Extension       | 2 minutos  | 72°C        | 72°C        |
| 29 Ciclos | Denaturación    | 1 minuto   | 93°C        | 93°C        |
|           | Annealing       | 1 minuto   | 58 °C       | 50 °C       |
|           | Extensión       | 1 minuto   | 72°C        | 72°C        |
|           | Extensión final | 10 minutos | 72°C        | 72°C        |

Una vez determinados los parámetros idóneos de combinación de primers, concentración mínima de ADN y temperaturas de annealing; con los cuales se obtuvo el protocolo estandarizado para la amplificación de una región de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioeparus*, en la Tabla 3.5 se puede visualizar un condensado de dicho protocolo de amplificación.

**Tabla 3.5.** Reactivos usados en la PCR.

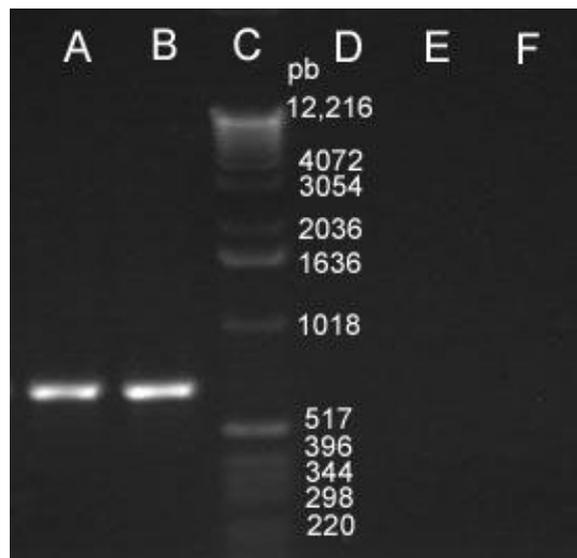
| REACTIVO                | [C <sub>i</sub> ] | Volumen x 1 tubo (ul) |
|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| Agua                    |                   | 13.70                 |
| Buffer 10X              | 10X               | 2.50                  |
| MgCl <sub>2</sub>       | 50 mM             | 0.75                  |
| DNTPs (mezcla de los 4) | 10 mM             | 0.75                  |
| Primer FW               | 10 μM             | 1.00                  |
| Primer RV               | 10 μM             | 1.00                  |
| Taq polimerasa          | 5 U/μL            | 0.30                  |
| ADN                     | 0.16 ng/μL        | 5.00                  |
|                         | <b>VOL. TOTAL</b> | 25.00                 |

### **3.4.2 Amplificación de la secuencia 16S rDNA para las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA**

Una vez estandarizado el protocolo de amplificación, se procedió a ensamblar PCRs con las muestras de ADN de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA, y después de haber realizado una electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%, se pudo apreciar que ninguna de las combinaciones de primers específicos para *Thiobacillus thioeparus* (Ttp194f con Ttp833r y Ttp223f con Ttp833r) amplificaron la secuencia 16S rDNA de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA, como se puede observar en las figuras 3.7 y 3.8, y por lo tanto se descartó que las dos bacterias nativas aisladas de aguas sulfurosas tanto del volcán Tungurahua como de La Calera fuesen *Thiobacillus thioeparus*.

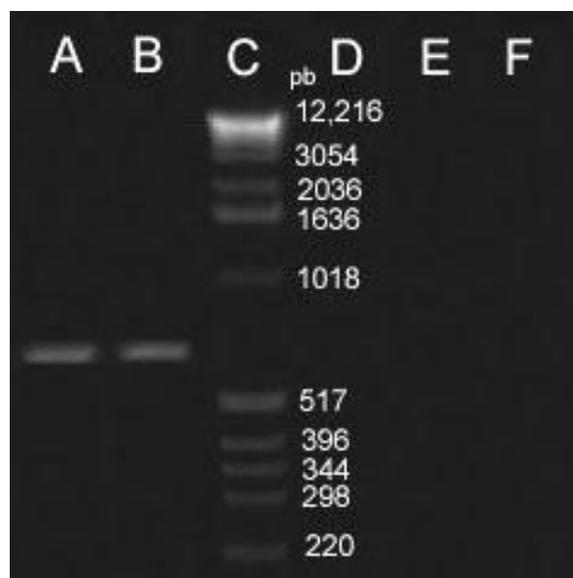
### 3.5 Electroforesis de productos de PCR

En la Figura 3.5 se puede observar que tanto la columna A como la B presentan una banda que corresponde al amplicón de una región de 639 pb de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioparus*, el cual fue obtenido con la combinación de primers Ttp223f - Ttp833r; mientras que en las columnas E y F no se obtuvo amplificación alguna con la combinación de primers Ttp223f - Ttp240r. La columna D corresponde al control negativo y la columna C al marcador de peso molecular Trackit™ 1 Kb DNA Ladder.



**Figura 3.5.** Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 combinando primers Ttp223f - Ttp833r (columnas A y B) y Ttp223f - Ttp240r (columnas E y F).

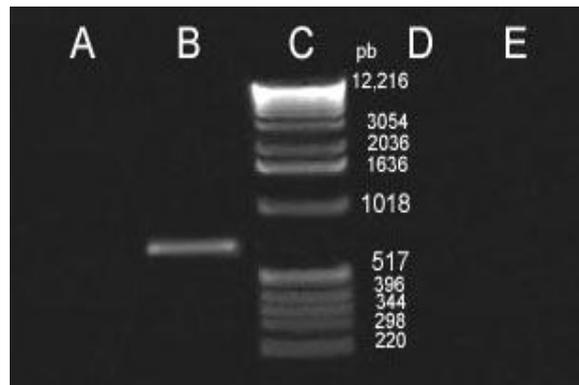
En la Figura 3.6 las columnas A y B corresponden a amplicones de 640 pb obtenidos con la combinación de primers Ttp194f – Ttp833r, mientras que en las columnas E y F no se obtuvo amplificación alguna con la combinación de primers Ttp194f – Ttp240r. La columna D corresponde al control negativo y la columna C representa al marcador de peso molecular Trackit™ 1 Kb DNA Ladder.



**Figura 3.6.** Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645 combinando primers Ttp194f - Ttp833r (columnas A y B) y Ttp194f - Ttp240r (columnas E y F).

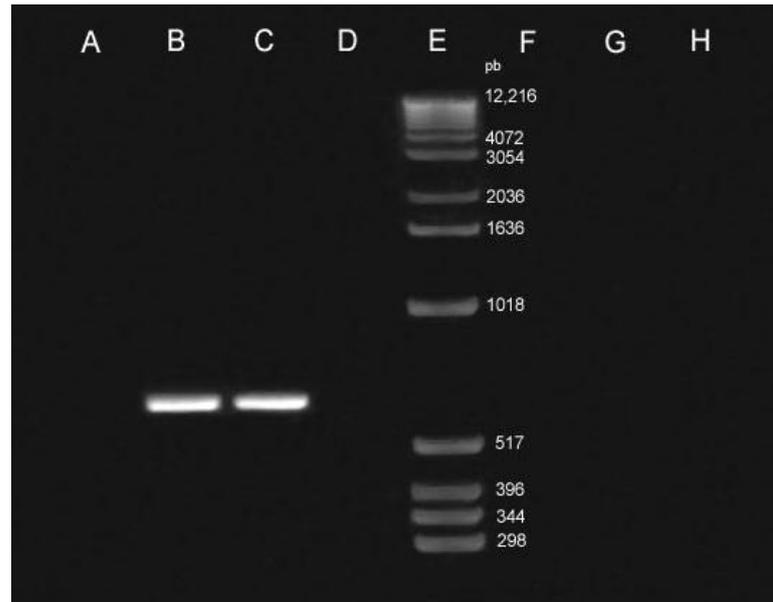
La Figura 3.7 corresponde a la amplificación de una sección de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioeparus* usando la combinación de primers Ttp194f – Ttp833r, en donde la columna A pertenece al control negativo, la columna B muestra el amplicón obtenido con la muestra de ADN de *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645, de 640 pb al compararlo con la

columna C que corresponde al marcador de peso molecular Trackit™ 1 Kb DNA Ladder usado como dato referencial y, las columnas D y E no muestran amplificación alguna y corresponden a los ensayos realizados utilizando muestras de ADN de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA respectivamente.



**Figura 3.7.** Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de las tres bacterias usando primers Ttp194f - Ttp833r.

La Figura 3.8 corresponde a la amplificación de una sección de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioparus* usando la combinación de primers Ttp223f – Ttp833r, en donde la columna A pertenece al control negativo, las columnas B y C muestran el amplicón obtenido con la muestra de ADN de *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, de 639 pb al contrastarlo con la columna C que pertenece al marcador de peso molecular usado como dato referencial; los ensayos realizados utilizando muestras de ADN tanto de la bacteria TUNGURAHUA 1 (columnas D y F) como de la bacteria CALERA (columnas G y H) no muestran amplificación alguna .



**Figura 3.8.** Amplicones de la secuencia 16S rDNA con ADN de las tres bacterias usando primers Ttp223f - Ttp833r.

### 3.6 Secuencias nucleotídicas de la región 16S rDNA de las bacterias CALERA y TUNGURAGUA 1.

En la Tabla 3.6 se puede visualizar a detalle la estructura nucleotídica de la región 16S rDNA, en formato FASTA para las bacterias CALERA, que consta de 1472 pb; y TUNGURAHUA 1, cuya secuencia tiene 1469 pb, según los resultados obtenidos por la empresa coreana MACROGEN INC., que realizó la secuenciación completa de las bacterias nativas (Véanse también Anexos C y D).

**Tabla 3.6.** Secuencias consenso de la región 16S rDNA para las bacterias nativas CALERA y TUNGURAHUA 1.

---

**SECUENCIAS CONSENSO DE LA REGIÓN 16S rDNA EN FORMATO FASTA**

---

**>CALERA**

```
ATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAGG
AGCTTGCTCCTTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT
```

---

---

GGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG  
GGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA  
ATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC  
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGA  
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAG  
TTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC  
CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAAC  
CTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGA  
CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTTCTTGAGAACTTAGTGGCGCAGCTA  
ACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGAC  
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC  
CTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACA  
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACG  
AGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCG  
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGG  
CTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATC  
CCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCCGAATC  
GCTAGTAATCGTGAATCAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC  
CGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGGACGGT  
TACACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAGTCT

---

**>TUNGURAHUA 1**

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGAGGGC  
TTGCTCTCTGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGG  
GGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC  
CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGG  
CTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAG  
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGC  
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGG  
GAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG  
CTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGT  
GGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTG  
GGAACCTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCT  
AATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
CACGCCGTAAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAA  
CGCATTAAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACG

---

GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC  
AGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACAC  
AGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGA  
GCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG  
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCC  
ATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGC  
TAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCC  
TCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGGACGGTTAC  
CACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAGTCT

### **3.7 Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas**

Al realizar la comparación por alineamiento de secuencias utilizando el BLASTN 2.2.18+ y las aplicaciones ClustalW Multiple Alignment con Sequence Identity Matrix del programa BioEdit v7.0.8.0, se aprecian algunas diferencias en cuanto a los porcentajes de semejanza entre secuencias.

Por otra parte al realizar una comparación de los árboles filogenéticos obtenidos utilizando el método Neighbor Joining, tanto con el BLASTN 2.2.18+, como con el software MEGA v4.0, se pudo encontrar que existieron algunas diferencias entre dichos árboles para cada bacteria nativa, pues los dos programas son modelos aproximados y consecuentemente proporcionaron respuestas aproximadas.

#### ***3.7.1 Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante aplicaciones en línea***

Como se puede apreciar en la Tabla 3.7, después de realizar los análisis de comparación de secuencias utilizando el BLASTN 2.2.18+ se encontró que las secuencias 16S rDNA de las bacterias CALERA y *Pseudomonas sp.* MACL14 tienen un 99% de semejanza.

**Tabla 3.7.** Secuencias que producen alineamientos significantes con la bacteria CALERA según BLASTN 2.2.18+.

| <b>CÓDIGO<br/>ACCESO</b> | <b>CEPA BACTERIANA</b>   | <b>SEMEJANZA<br/>(%)</b> |
|--------------------------|--|--------------------------|
| EF198250.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. MACL14 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 99                       |
| AF232713.1               | <i>Pseudomonas mendocina</i> gen 16S rDNA, sec. parcial                    | 98                       |
| EF198249.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. MACL12A gen 16S rDNA, sec. parcial                  | 98                       |
| DQ200852.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-9 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 98                       |
| DQ178224.1               | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC10 gen 16S rDNA, sec. Completa              | 98                       |
| DQ178220.1               | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC4 gen 16S rDNA, sec. completa               | 98                       |
| DQ314536.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-11 gen 16S rDNA, sec. parcial                  | 98                       |
| DQ314532.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-46 gen 16S rDNA, sec. parcial                  | 98                       |
| DQ178221.1               | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC5 gen 16S rDNA, sec. completa               | 98                       |
| EU841536.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. 204 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 98                       |
| DQ219371.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-26 gen 16S rDNA, sec. parcial                  | 98                       |
| EU735713.1               | Uncultured bacterium clone 2As4 gen 16S rDNA, sec. parcial                 | 98                       |
| EU841537.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. 218 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 98                       |
| EU735721.1               | Uncultured bacterium 2As17 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 98                       |
| DQ178225.1               | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC12 gen 16S rDNA, sec. Completa              | 98                       |
| EU180220.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. NF-2 gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 98                       |
| DQ916277.2               | <i>Pseudomonas lindanilytica</i> IPL-1 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 98                       |
| EF175872.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. CLSD gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 98                       |
| EF675623.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. RM12W gen 16S rDNA, sec. parcial                    | 98                       |
| AM231055.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. R-24261 partial gen 16S rDNA, R-24261               | 98                       |
| AB109888.1               | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF710 gene for 16S rRNA, sec. parcial | 98                       |
| EU395787.1               | <i>Pseudomonas mendocina</i> JY4 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98                       |
| EU815635.1               | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KS-1 gen 16S rDNA, sec. parcial       | 98                       |
| AF286035.1               | Saltmarsh LCP-79 gen 16S rDNA, sec. parcial                                | 98                       |
| AM402949.1               | <i>Pseudomonas</i> sp. GC8 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 98                       |
| Z76666.1                 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> LMG 1225T gen 16S                     | 98                       |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | rDNA  |    |
| AF181570.1 | <i>Pseudomonas cf. pseudoalcaligenes</i> gen 16S rDNA, sec. parcial     | 98 |
| AM990825.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> MOLA 50 gen 16S rDNA, sec. parcial               | 98 |
| EF628000.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> P16 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 98 |
| EU071492.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> EHFS1_S08b gen 16S rDNA, sec. Parcial | 98 |
| DQ304810.1 | Uncultured bacterium C3r1 gen 16S rDNA, sec. parcial                    | 98 |
| DQ192044.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> 101-5 gen 16S rDNA, sec. parcial                 | 98 |
| DQ192041.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> I91-7 gen 16S rDNA, sec. parcial                 | 98 |
| AF336311.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> SMCC D0715 gen 16S rDNA, sec. parcial            | 98 |
| AF094735.1 | <i>Pseudomonas oleovorans</i> gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| AF494091.1 | <i>Pseudomonas nitroreducens</i> 0802 gen 16S rDNA, sec. parcial        | 98 |
| AB196245.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> IC017 gene for gen 16S rDNA, sec. completa       | 98 |
| EU305599.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> 5-D gen 16S rDNA, sec. parcial        | 98 |
| DQ983422.1 | Gamma proteobacterium JAUIB78 gen 16S rDNA, sec. completa               | 98 |
| EU305595.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> clone 4-D gen 16S rDNA, sec. parcial  | 98 |
| AB030583.1 | <i>Pseudomonas alcalophila</i> gen 16S rDNA, sec. parcial               | 98 |
| AJ007004.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> LE1 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 98 |
| AF238494.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> gen 16S rDNA, sec. parcial         | 98 |
| DQ178223.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC7 gen 16S rDNA, sec. completa            | 98 |
| DQ178222.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC6 gen 16S rDNA, sec. completa            | 98 |
| Z76675.1   | <i>P.pseudoalcaligenes</i> DSM 50018T gen 16S rDNA                      | 98 |
| DQ340188.1 | Uncultured gamma proteobacterium C4 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 98 |
| AB294274.1 | Uncultured bacterium YWB05 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 98 |
| EU216597.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> ZW27 gen 16S rDNA, sec. parcial            | 98 |
| AY188940.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> P_wp0231 gen 16S rDNA, sec. parcial              | 98 |
| AY221597.1 | Uncultured gamma proteobacterium HN1-14 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| EU305576.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 2-B gen 16S rDNA, sec. parcial            | 98 |
| EF627998.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. P14 gen 16S rDNA, sec. parcial                       | 98 |
| AY221609.1 | Uncultured gamma proteobacterium HS9-26 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 98 |
| EU805112.1 | Uncultured bacterium 6C233099 gen 16S rDNA, sec. parcial                    | 98 |
| EU804406.1 | Uncultured bacterium 6C232322 gen 16S rDNA, sec. parcial                    | 98 |
| EF574437.1 | Uncultured bacterium S25_781 gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 98 |
| AB096260.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. K50 gene for 16S rRNA, sec. parcial                  | 98 |
| DQ178226.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC19 gen 16S rDNA, sec. completa               | 98 |
| DQ192040.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-4 gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 98 |
| EF586016.1 | Uncultured bacterium M35_D20_H_B_B02 gen 16S rDNA, sec. parcial             | 98 |
| DQ641475.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 98 |
| EU636659.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. AD39 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 98 |
| AY221605.1 | Uncultured gamma proteobacterium HN4-26 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 98 |
| AY758371.1 | Uncultured bacterium y-OTU3 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 98 |
| DQ213044.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-42 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 98 |
| AY486387.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> AU4510 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |
| EU440977.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> PR51-16 gen 16S rDNA, sec. parcial     | 98 |
| AB276371.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 14 gene for gen 16S rDNA, sec. parcial | 98 |
| DQ192042.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-8 gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 98 |
| DQ192043.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-9 gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 98 |
| AY880303.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> M5-4 gen 16S rDNA, sec. parcial        | 98 |
| AY758379.1 | Uncultured bacterium m-OTU4 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 98 |
| EF095716.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> S130 gen 16S rDNA, sec. parcial        | 98 |
| AJ550466.1 | <i>Pseudomonas alcalophila</i> gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 98 |
| AF500277.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. SMCC B0205 gen 16S rDNA, sec. Parcial                | 98 |
| AF140013.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-A09 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| AF140008.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-A01 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |
| EU921258.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. YJ1 gen 16S rDNA, sec. parcial            | 97 |
| AF140012.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-A08 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 97 |
| AF139995.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-052 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 97 |
| DQ890432.1 | Uncultured bacterium pt48 gen 16S rDNA, sec. parcial                        | 97 |
| EU636657.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. AD35 gen 16S rDNA, sec. parcial                      | 97 |
| AB276372.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 15 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 97 |
| EU804954.1 | Uncultured bacterium 6C232932 gen 16S rDNA, sec. parcial                    | 97 |
| DQ234150.2 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. DS066 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 97 |
| CP000680.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> ymp, genoma completo                           | 97 |
| DQ416805.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. G1DM-23 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 97 |
| AB021379.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JCM 5968T gen 16S rRNA                 | 97 |
| DQ129591.1 | Uncultured bacterium AKIW1032 gen 16S rDNA, sec. parcial                    | 97 |
| AY082368.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. DGG18 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 97 |
| EU723817.1 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> HDDMG01 gen 16S rDNA, sec. parcial         | 97 |
| EU037285.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. G3DM-64 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 97 |
| AY435123.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. phDV1 gen 16S rDNA, sec. parcial                     | 97 |
| AY344382.1 | Unidentified bacterium K2-4-13 gen 16S rDNA, sec. parcial                   | 97 |
| DQ336991.1 | Uncultured bacterium EV818CFSSAHH41 gen 16S rDNA, sec. parcial              | 97 |
| D84022.1   | <i>Pseudomonas nitroreducens</i> gen 16S rDNA, sec. completa                | 97 |
| D84016.1   | <i>Pseudomonas mendocina</i> gen 16S rDNA, sec. completa                    | 97 |
| DQ256328.1 | Uncultured bacterium EV818BHEB5102502DRLWq27f024 gen 16S rDNA, sec. parcial | 97 |
| EU723826.1 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> HDDMM04 gen 16S rDNA, sec. Parcial         | 97 |

Por otra lado, se observa en la Tabla 3.8 que después de haber realizado el alineamiento y comparación con la secuencia de la bacteria

TUNGURAHUA 1, según BLASTN se encontró que 67 secuencias 16S rDNA de cepas de *Pseudomonas* fueron 99% compatibles con la secuencia de esta bacteria nativa.

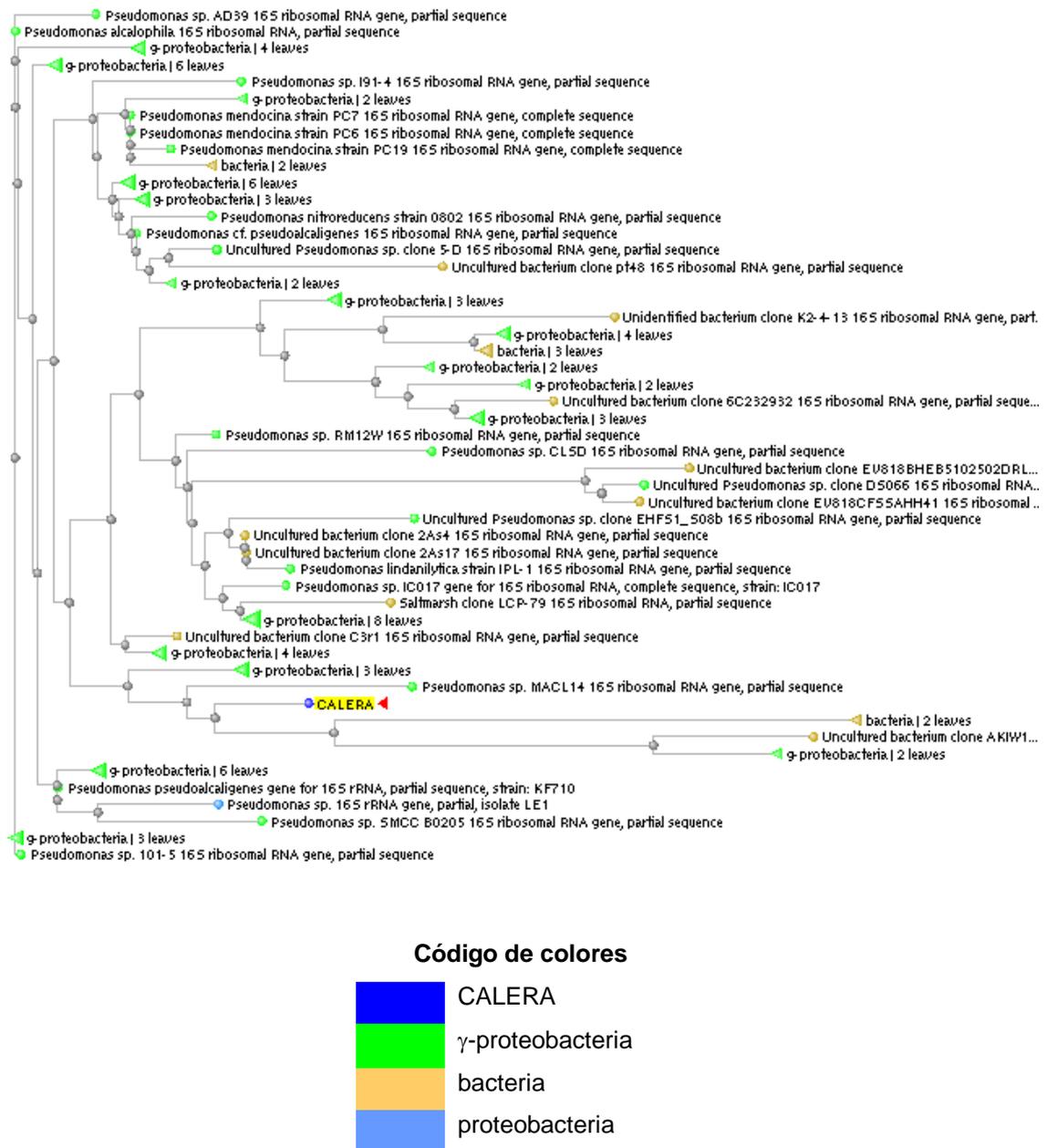
**Tabla 3.8.** Secuencias que producen alineamientos significantes con la bacteria TUNGURAHUA 1 según BLASTN 2.2.18+.

| CÓDIGO DE ACCESO | CEPA BACTERIANA  | SEMEJANZA (%) |
|------------------|--|---------------|
| EU600211.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. AMD4 gen 16S rDNA, sec. parcial             | 99            |
| EU362177.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. C4 gen 16S rDNA, sec. Parcial               | 99            |
| AM905943.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. Rs87 gen 16S rDNA, sec. Parcial             | 99            |
| AM905942.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. Rs85 gen 16S rDNA, sec. Parcial             | 99            |
| AM905941.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. Rs81 gen 16S rDNA, sec. Parcial             | 99            |
| AB284047.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. SCT gen 16S rDNA, sec. Parcial              | 99            |
| DQ354724.1       | Uncultured bacterium DR550SWSAEE29 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 99            |
| AY570597.1       | Uncultured bacterium PL-10B8 gen 16S rDNA, sec. parcial            | 99            |
| DQ192039.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-2 gen 16S rDNA, sec. Parcial            | 99            |
| AF411854.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. 5A gen 16S rDNA, sec. Parcial               | 99            |
| U25431.1         | <i>Pseudomonas stutzeri</i> gen 16S rDNA, sec. Completa            | 99            |
| AY570580.1       | Uncultured bacterium PL-10B7 gen 16S rDNA, sec. parcial            | 99            |
| EU603456.1       | <i>Pseudomonas stutzeri</i> PTG4-15 gen 16S rDNA, sec. parcial     | 99            |
| AF063219.1       | <i>Pseudomonas stutzeri</i> gen 16S rDNA, sec. completa            | 99            |
| AJ270451.1       | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a13 gen 16S rDNA, sec. parcial       | 99            |
| EF639384.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20614 gen 16S rDNA, sec. parcial         | 99            |
| EF198405.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. Bsi20449 gen 16S rDNA, sec. parcial         | 99            |
| EF198404.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. Bsi20368 gen 16S rDNA, sec. parcial         | 99            |
| EF198401.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. Bsi20378 gen 16S rDNA, sec. parcial         | 99            |
| AM990895.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. MOLA 121 gen 16S rDNA, sec. partial         | 99            |
| AB237681.1       | Uncultured bacterium HDBW-WB18 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 99            |
| AF067960.1       | <i>Pseudomonas stutzeri</i> KC gen 16S rDNA, sec. parcial          | 99            |
| DQ492750.1       | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20329 gen 16S rDNA, sec. parcial         | 99            |
| U26419.1         | <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ST27MN3 gen 16S rDNA            | 99            |
| U22426.1         | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 19smn4 gen 16S rDNA, sec. completa     | 99            |
| U26420.1         | <i>Pseudomonas stutzeri</i> ZoBell gen 16S rDNA                    | 99            |
| U26261.1         | <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17591 gen 16S rDNA, sec. completa | 99            |

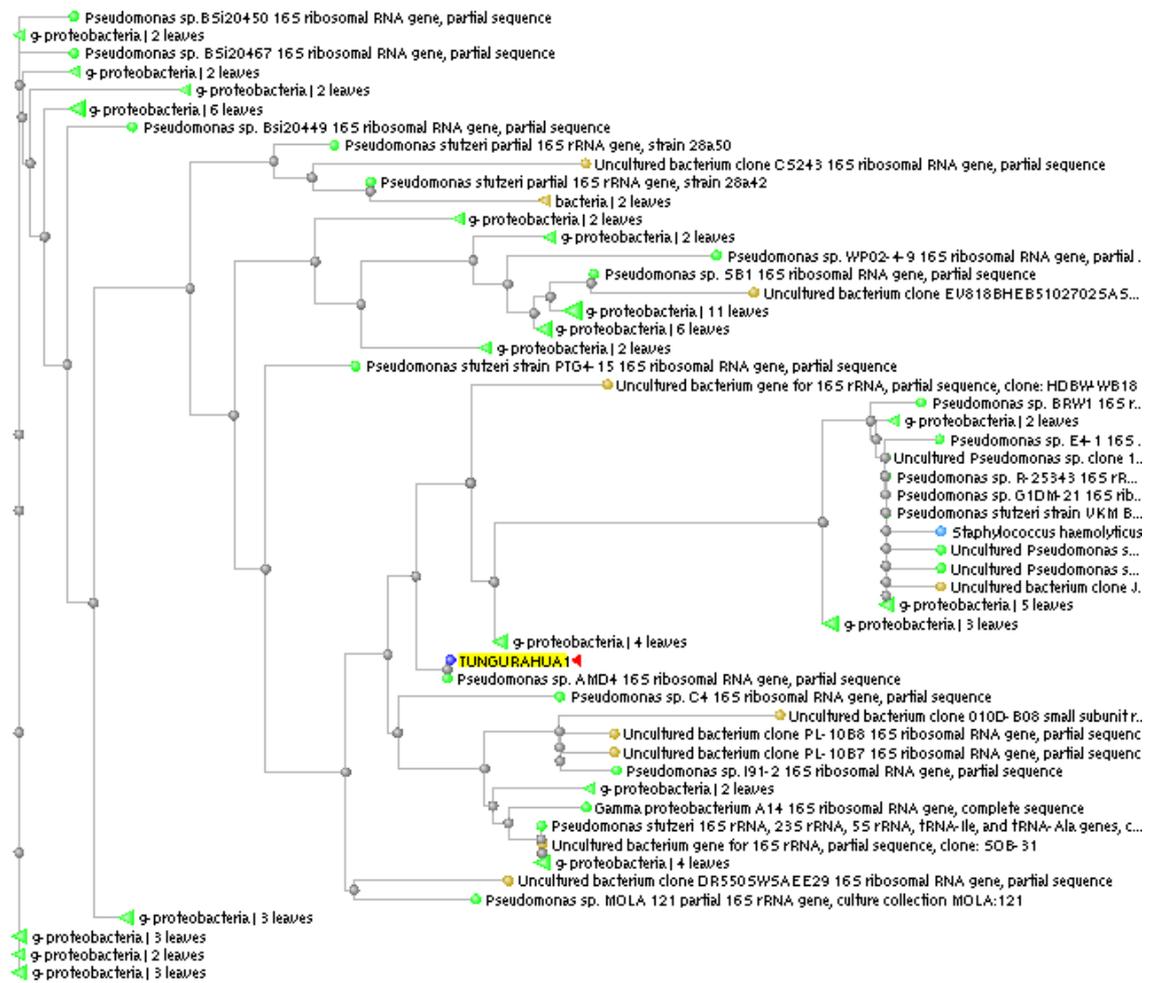
|            |  |    |
|------------|--|----|
| U65012.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i> gen 16S rDNA, 23S rRNA, 5S rRNA, tRNA-Ile, y tRNA-Ala, sec. completa | 99 |
| EU330373.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20360 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| CP000304.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, genoma completo   | 99 |
| EF198403.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> Bsi20442 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| EU330371.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20432 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| EU330330.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20359 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| EF382724.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20450 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| DQ537505.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> BSi20417 gen 16S rDNA, sec. parcial                                  | 99 |
| EF599309.1 | Gamma proteobacterium A14 gen 16S rDNA, sec. completa  | 99 |
| EU330374.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20387 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| EF382725.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20562 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| EF198402.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> Bsi20416 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| AJ704788.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> es8 gen 16S rDNA, sec. parcial  | 99 |
| EF673293.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20452 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| AJ704793.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> ws15 gen 16S rDNA, sec. parcial   | 99 |
| EU330372.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20467 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| EU652047.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> aa-28 gen 16S rDNA, sec. parcial                                     | 99 |
| AF038653.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> gen 16S rDNA, sec. Parcial   | 99 |
| U26415.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 50227 gen 16S rDNA   | 99 |
| AJ312162.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 28a50 gen 16S rDNA, sec. parcial                                     | 99 |
| AJ312165.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 28a42 gen 16S rDNA, sec. parcial                                     | 99 |
| AJ312174.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a112 gen 16S rDNA, sec. parcial                                    | 99 |
| DQ981492.2 | <i>Pseudomonas sp.</i> MG-1 gen 16S rDNA, sec. parcial   | 99 |
| EU330332.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20377 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| AB126364.1 | Uncultured bacterium SOB-31 gen 16S rDNA, sec. parcial   | 99 |
| EF673294.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20369 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| AY683884.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> SN1 gen 16S rDNA, sec. parcial  | 99 |
| EF599310.1 | Gamma proteobacterium B12 gen 16S rDNA, sec. completa  | 99 |
| EU330331.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20355 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| EF157162.1 | Uncultured bacterium 91-101 gen 16S rDNA, sec. parcial   | 99 |
| EF157157.1 | Uncultured bacterium 91-25 gen 16S rDNA, sec. parcial  | 99 |
| EF025737.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> ORNaP2a gen 16S rDNA, sec. parcial  | 99 |
| EF559249.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> sw1 gen 16S rDNA, sec. parcial  | 99 |
| AY683883.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> SB1 gen 16S rDNA, sec. parcial  | 99 |
| DQ227347.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> E1-4 gen 16S rDNA, sec. parcial   | 99 |
| AY277620.1 | <i>Pseudomonas putida</i> ASK-1 gen 16S rDNA, sec. parcial                                       | 99 |
| AY017341.1 | <i>Pseudomonas chloritidismutans</i> gen 16S rDNA, sec. parcial                                  | 99 |
| EU330376.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20391 gen 16S rDNA, sec. Parcial                                       | 99 |
| AJ312172.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a97gen 16S rDNA, sec. parcial                                      | 99 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| AY321589.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> gen 16S rDNA, sec. parcial                | 99 |
| EU305565.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 1-C gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |
| AM084028.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. R-25343 gen 16S rDNA                           | 98 |
| AF482684.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. BU gen 16S rDNA, sec. parcial                  | 98 |
| AJ312156.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 20G gen 16S rDNA, sec. parcial            | 98 |
| EU855213.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> CTSP36 gen 16S rDNA, sec. parcial         | 98 |
| AJ270453.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 3C59 gen 16S rDNA, sec. parcial           | 98 |
| AJ270452.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 11C2 gen 16S rDNA, sec. parcial           | 98 |
| AB126690.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| AM111048.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. 7189 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| AJ704794.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. ws14 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| AY661988.1 | Uncultured bacterium 010D-B08 SSR RNA gene, sec. parcial              | 98 |
| AJ312173.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a63 gen 16S rDNA, sec. parcial          | 98 |
| AM111049.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. 7193 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| EU652064.1 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> me-13 gen 16S rDNA, sec. parcial   | 98 |
| EU305596.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 5-A gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |
| EU305575.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 2-A gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |
| DQ532187.1 | Uncultured bacterium JSC2-C6 gen 16S rDNA, sec. parcial               | 98 |
| DQ227349.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. E4-1 gen 16S rDNA, sec. Parcial                | 98 |
| DQ227348.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. E2-4 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| DQ227346.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. A7-1 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| DQ416798.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. G1DM-21 gen 16S rDNA, sec. parcial             | 98 |
| AJ312158.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 3C83 gen 16S rDNA, sec. parcial           | 98 |
| AF025349.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. BRW1 gen 16S rDNA, sec. completa               | 98 |
| EU883663.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> VKM B-975 gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |
| EU305582.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 3-A gen 16S rDNA, sec. parcial      | 98 |
| AY905607.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATTC 17594 gen 16S rDNA, sec. parcial     | 98 |
| EU330375.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20397 gen 16S rDNA, sec. parcial            | 98 |
| EU652056.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. me-3 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| DQ462181.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. FD41 gen 16S rDNA, sec. parcial                | 98 |
| AY382612.1 | Uncultured bacterium CS243 gen 16S rDNA, sec. parcial                 | 98 |
| AF467304.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 349_11 gen 16S rDNA, sec. parcial   | 98 |
| DQ256362.1 | Uncultured bacterium EV818BHEB5102702SAS83 gen 16S rDNA, sec. parcial | 98 |
| EF179614.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. WP02-4-9 gen 16S rDNA, sec. parcial            | 98 |

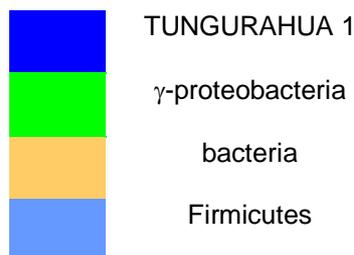
Finalmente, a partir de los alineamientos entre secuencias proporcionados por el BLASTN 2.2.18+ del NCBI se obtuvieron árboles filogenéticos que proporcionaron un gráfico estimado de la forma en que están emparentadas las bacterias nativas CALERA y TUNGURAHUA 1 con otras especies bacterianas (Figuras 3.9 y 3.10).



**Figura 3.9.** Árbol filogenético de la bacteria CALERA usando el método Neighbor Joining de BLASTN 2.2.18+.



### Código de colores



Firmicutes: Taxón o grupo de bacterias Gram positivas con bajo %G-C. Tienen forma de coco o bacilo.

**Figura 3.10.** Árbol filogenético de la bacteria TUNGURAHUA1 usando el método Neighbor Joining de BLASTN 2.2.18+.

### 3.7.2 Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante programas bioinformáticos

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de la Tabla 3.7, que proporcionó el BLASTN 2.2.18+, se procedió al alineamiento de las misma junto con la secuencia 16S rDNA de la bacteria CALERA en la aplicación ClustalW Multiple Alignment del software bioinformático BioEdit v7.0.8.0, y posteriormente se obtuvo la matriz de identidad entre secuencias con la aplicación Sequence Identity Matrix, en donde se pudo apreciar la semejanza que tenía la bacteria nativa CALERA con respecto a las otras cepas bacterianas; teniendo una semejanza significativa del 99% con la cepa *Pseudomonas sp.* MACL14, como se detalla en la Tabla 3.9.

**Tabla 3.9.** Semejanza de la secuencia 16S rDNA de la bacteria CALERA con las secuencias obtenidas en BLASTN 2.2.18+ según Sequence Identity Matrix.

| CÓDIGO DE ACCESO | CEPA BACTERIANA                                | SEMEJANZA (%) |
|------------------|--|---------------|
| EF198250.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> MACL14                  | 99            |
| EF198249.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> MACL12A                 | 97,8          |
| DQ200852.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> BWDY-9                  | 97,8          |
| DQ178224.1       | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC10              | 97,8          |
| DQ178220.1       | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC4               | 97,8          |
| DQ314536.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> BWDY-11                 | 97,7          |
| DQ314532.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> BWDY-46                 | 97,7          |
| DQ178221.1       | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC5               | 97,7          |
| DQ219371.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> BWDY-26                 | 97,6          |
| EU735713.1       | Uncultured bacterium clone 2As4                | 97,6          |
| EU735721.1       | Uncultured bacterium clone 2As17               | 97,5          |
| DQ178225.1       | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC12              | 97,5          |
| EF675623.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> RM12W                   | 97,4          |
| AM231055.1       | <i>Pseudomonas sp.</i> R-24261                 | 97,4          |
| AF286035.1       | Saltmarsh clone LCP-79                         | 97,4          |
| Z76666.1         | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> LMG 1225T | 97,4          |
| EU305599.1       | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> 5-D          | 97,4          |
| DQ129591.1       | Uncultured bacterium AKIW1032                  | 97,4          |
| AB109888.1       | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF710     | 97,3          |

|            |   |      |
|------------|---|------|
| AF181570.1 | <i>Pseudomonas</i> cf. <i>pseudoalcaligenes</i> | 97,3 |
| EF628000.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. P16                      | 97,3 |
| EU071492.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. EHFS1_S08b    | 97,3 |
| DQ304810.1 | Uncultured bacterium C3r1                       | 97,3 |
| AB294274.1 | Uncultured bacterium YWB05                      | 97,3 |
| EU723817.1 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> HDDMG01        | 97,3 |
| EU180220.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. NF-2                     | 97,2 |
| AM990825.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. MOLA 50                  | 97,2 |
| DQ192044.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. 101-5                    | 97,2 |
| DQ192041.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-7                    | 97,2 |
| AF494091.1 | <i>Pseudomonas nitroreducens</i> 0802           | 97,2 |
| AB196245.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. IC017                    | 97,2 |
| DQ983422.1 | Gamma proteobacterium JAUIB78                   | 97,2 |
| EU305595.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 4-D           | 97,2 |
| AB030583.1 | <i>Pseudomonas alcalophila</i>                  | 97,2 |
| DQ178223.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC7                | 97,2 |
| DQ178222.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC6                | 97,2 |
| Z76675.1   | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> DSM 50018T | 97,2 |
| EU723826.1 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> HDDMM04        | 97,2 |
| AM402949.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. GC8                      | 97,1 |
| AY188940.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. P_wp0231                 | 97,1 |
| AY221597.1 | Uncultured gamma proteobacterium HN1-14         | 97,1 |
| EU305576.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 2-B           | 97,1 |
| EF627998.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. P14                      | 97,1 |
| AY221609.1 | Uncultured gamma proteobacterium HS9-26         | 97,1 |
| DQ178226.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> PC19               | 97,1 |
| AF336311.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. SMCC D0715               | 97   |
| AF238494.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>            | 97   |
| DQ340188.1 | Uncultured gamma proteobacterium C4             | 97   |
| EU805112.1 | Uncultured bacterium 6C233099                   | 97   |
| EU804406.1 | Uncultured bacterium 6C232322                   | 97   |
| EF574437.1 | Uncultured bacterium S25_781                    | 97   |
| AB096260.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. K50                      | 97   |
| EU636659.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. AD39                     | 97   |
| AY221605.1 | Uncultured gamma proteobacterium HN4-26         | 97   |
| EU815635.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KS-1       | 96,9 |
| AJ007004.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. LE1                      | 96,9 |
| DQ192040.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-4                    | 96,9 |
| AY758371.1 | Uncultured bacterium y-OTU3                     | 96,9 |
| DQ213044.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-42                  | 96,9 |

|            |   |      |
|------------|---|------|
| AY880303.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> M5-4           | 96,9 |
| EF586016.1 | Uncultured bacterium M35_D20_H_B_B02                | 96,8 |
| EU440977.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> PR51-16        | 96,8 |
| AB276371.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 14             | 96,8 |
| DQ192042.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-8                        | 96,8 |
| DQ192043.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. I91-9                        | 96,8 |
| AY758379.1 | Uncultured bacterium m-OTU4                         | 96,8 |
| AJ550466.1 | <i>Pseudomonas alcalophila</i>                      | 96,8 |
| AF500277.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. SMCC B0205                   | 96,8 |
| AB021379.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JCM 5968T      | 96,8 |
| EU395787.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> JY4                    | 96,7 |
| AF140013.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-A09         | 96,7 |
| AF140008.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-A01         | 96,7 |
| EU921258.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. YJ1               | 96,7 |
| EU636657.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. AD35                         | 96,7 |
| AB276372.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 15             | 96,7 |
| AY486387.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> AU4510         | 96,6 |
| EF095716.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> S130           | 96,6 |
| AF140012.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-A08         | 96,6 |
| AF139995.1 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ML-052         | 96,6 |
| DQ890432.1 | Uncultured bacterium pt48                           | 96,6 |
| EU804954.1 | Uncultured bacterium 6C232932                       | 96,6 |
| DQ234150.2 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. DS066             | 96,6 |
| DQ416805.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. G1DM-23                      | 96,6 |
| AY435123.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. phDV1                        | 96,6 |
| AY344382.1 | Unidentified bacterium K2-4-13                      | 96,6 |
| DQ336991.1 | Uncultured bacterium EV818CFSSAHH41                 | 96,6 |
| AF232713.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i>                        | 96,5 |
| AY082368.1 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. DGG18             | 96,5 |
| EU037285.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. G3DM-64                      | 96,5 |
| D84022.1   | <i>Pseudomonas nitroreducens</i>                    | 96,4 |
| D84016.1   | <i>Pseudomonas mendocina</i>                        | 96,4 |
| DQ256328.1 | Uncultured bacterium<br>EV818BHEB5102502DRLWq27f024 | 96,4 |
| EU841537.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. 218                          | 96,1 |
| AF094735.1 | <i>Pseudomonas oleovorans</i>                       | 96,1 |
| EU841536.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. 204                          | 95,9 |
| DQ641475.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i>                        | 95,7 |
| EF175872.1 | <i>Pseudomonas</i> sp. CLSD                         | 95,5 |
| EU216597.1 | <i>Pseudomonas mendocina</i> ZW27                   | 95,1 |

Además, a partir de las secuencias nucleotídicas de la Tabla 3.8, que proporcionó el BLASTN 2.2.18+, se procedió al alineamiento de las misma junto con la secuencia 16S rDNA de la bacteria TUNGURAHUA 1 en la aplicación ClustalW Multiple Alignment del programa BioEdit v7.0.8.0, y posteriormente se obtuvo la matriz de identidad entre secuencias con la aplicación Sequence Identity Matrix, en donde se pudo observar que 18 secuencias tenían entre 99 a 99,3 % de semejanza respecto a la secuencia 16S rDNA de la bacteria nativa TUNGURAHUA 1, como se aprecia en la Tabla 3.10.

**Tabla 3.10.** Semejanza de la secuencia 16S rDNA de la bacteria TUNGURAHUA 1 con las secuencias obtenidas en BLASTN 2.2.18+ según Sequence Identity Matrix.

| <b>CÓDIGO DE ACCESO</b> | <b>CEPA BACTERIANA</b>              | <b>SEMEJANZA (%)</b> |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| EU600211.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. AMD4         | 99,3                 |
| EU362177.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. C4           | 99,3                 |
| AY570597.1              | Uncultured bacterium PL-10B8        | 99,1                 |
| AY570580.1              | Uncultured bacterium PL-10B7        | 99,1                 |
| EU603456.1              | <i>Pseudomonas stutzeri</i> PTG4-15 | 99,1                 |
| AF063219.1              | <i>Pseudomonas stutzeri</i>         | 99,1                 |
| AJ270451.1              | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a13   | 99,1                 |
| EF639384.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20614     | 99,1                 |
| EF198405.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. Bsi20449     | 99,1                 |
| EF198404.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. Bsi20368     | 99,1                 |
| EF198401.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. Bsi20378     | 99,1                 |
| AB284047.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. SCT          | 99                   |
| EU330373.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20360     | 99                   |
| EF198403.1              | <i>Pseudomonas</i> sp.              | 99                   |
| EU330371.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20432     | 99                   |
| EU330330.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20359     | 99                   |
| EF382724.1              | <i>Pseudomonas</i> sp. BSi20450     | 99                   |
| DQ537505.1              | <i>Pseudomonas stutzeri</i> BSi2041 | 99                   |
| DQ354724.1              | Uncultured bacterium DR550SWSAEE29  | 98,9                 |

|            |                                       |      |
|------------|---------------------------------------|------|
| AM990895.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> MOLA 121       | 98,9 |
| EF599309.1 | Gamma proteobacterium A14             | 98,9 |
| EU330374.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20387       | 98,9 |
| EF382725.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20562       | 98,9 |
| EF198402.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> Bsi20416       | 98,9 |
| AJ704788.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> es8            | 98,9 |
| EF673293.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20452       | 98,9 |
| AJ704793.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> ws15           | 98,9 |
| EU330372.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20467       | 98,9 |
| AJ312174.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a112    | 98,9 |
| DQ981492.2 | <i>Pseudomonas sp.</i> MG-1           | 98,9 |
| EU330332.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20377       | 98,9 |
| AB126364.1 | Uncultured bacterium SOB-31           | 98,9 |
| EF673294.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20369       | 98,9 |
| EU652047.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> aa-28     | 98,8 |
| AJ312165.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 28a42     | 98,8 |
| AY683884.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> SN1            | 98,8 |
| EF025737.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> ORNaP2a        | 98,8 |
| AY683883.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> SB1            | 98,8 |
| AY277620.1 | <i>Pseudomonas putida</i> ASK-1       | 98,8 |
| AY017341.1 | <i>Pseudomonas chloritidismutans</i>  | 98,8 |
| EU330376.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20391       | 98,8 |
| AJ312172.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a97     | 98,8 |
| AY321589.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i>           | 98,8 |
| EF599310.1 | Gamma proteobacterium B12             | 98,7 |
| EF559249.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> sw1            | 98,7 |
| DQ227347.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> E1-4           | 98,7 |
| EU305565.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> 1-C | 98,7 |
| AM084028.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> R-25343        | 98,7 |
| AF482684.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BU             | 98,7 |
| AJ312156.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 20G       | 98,7 |
| EU855213.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> CTSP36    | 98,7 |
| AJ270453.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 3C59      | 98,7 |
| AJ270452.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 11C2      | 98,7 |
| AB126690.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i>           | 98,7 |
| AM111048.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> 7189           | 98,7 |
| AJ704794.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> ws14           | 98,7 |
| AY661988.1 | Uncultured bacterium 010D-B08         | 98,7 |
| AJ312173.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a63     | 98,7 |
| AM111049.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> 7193           | 98,7 |

|            |  |      |
|------------|--|------|
| AM905943.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> Rs87                | 98,6 |
| AM905942.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> Rs85                | 98,6 |
| AM905941.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> Rs81                | 98,6 |
| DQ192039.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> I91-2               | 98,6 |
| EU652064.1 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> me-13   | 98,6 |
| EU305596.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> 5-A      | 98,6 |
| EU305575.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> 2-A      | 98,6 |
| DQ532187.1 | Uncultured bacterium JSC2-C6               | 98,6 |
| DQ227349.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> E4-1                | 98,6 |
| DQ227348.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> E2-4                | 98,6 |
| DQ416798.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> G1DM-21             | 98,6 |
| EU330375.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20397            | 98,6 |
| DQ256362.1 | Uncultured bacterium EV818BHEB5102702SAS83 | 98,6 |
| EF179614.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> WP02-4-9            | 98,6 |
| AB237681.1 | Uncultured bacterium HDBW-WB18             | 98,5 |
| AF067960.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> KC             | 98,5 |
| DQ492750.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20329            | 98,5 |
| AF038653.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i>                | 98,5 |
| EU330331.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BSi20355            | 98,5 |
| DQ227346.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> A7-1                | 98,5 |
| AJ312158.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 3C83           | 98,5 |
| EU883663.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> VKM B-975      | 98,5 |
| EU305582.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> 3-A      | 98,5 |
| AY905607.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATTC 17594     | 98,5 |
| EU652056.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> me-3                | 98,5 |
| DQ462181.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> FD41                | 98,5 |
| AY382612.1 | Uncultured bacterium CS243                 | 98,5 |
| AF467304.1 | Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i> 349_11   | 98,5 |
| U25431.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i>                | 98,4 |
| AF411854.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> 5 <sup>a</sup>      | 98,3 |
| U26419.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i> ST27MN3        | 98,3 |
| U22426.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 19smn4         | 98,3 |
| U26420.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i> ZoBell         | 98,3 |
| U26261.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 1759      | 98,3 |
| EF157162.1 | Uncultured bacterium 91-101                | 98,3 |
| EF157157.1 | Uncultured bacterium 91-25                 | 98,3 |
| U26415.1   | <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 50227      | 98,2 |
| AF025349.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> BRW1                | 98,2 |
| AJ312162.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> 28a50          | 97,9 |

Cabe destacar que los porcentajes de semejanzas con la mayoría de las cepas bacterianas de la Tabla 3.9 no coincidieron con los de la Tabla 3.7 (Véase Anexo E) y, que los porcentajes de semejanzas de la Tabla 3.10 tampoco coincidieron con los de la Tabla 3.8 (Véase Anexo F) poniendo en evidencia que los algoritmos de cálculo para este parámetro en BLASTN 2.2.18+ y BioEdit v7.0.8.0 son diferentes.

Finalmente, con cada grupo de secuencias nucleotídicas 16S rDNA (Tablas 3.7 y 3.8) alineadas en BioEdit v7.0.8.0, para las dos bacterias nativas se crearon los respectivos árboles filogenéticos en MEGA v4.0 utilizando el método Neighbor Joining (Figuras 3.11 y 3.12).

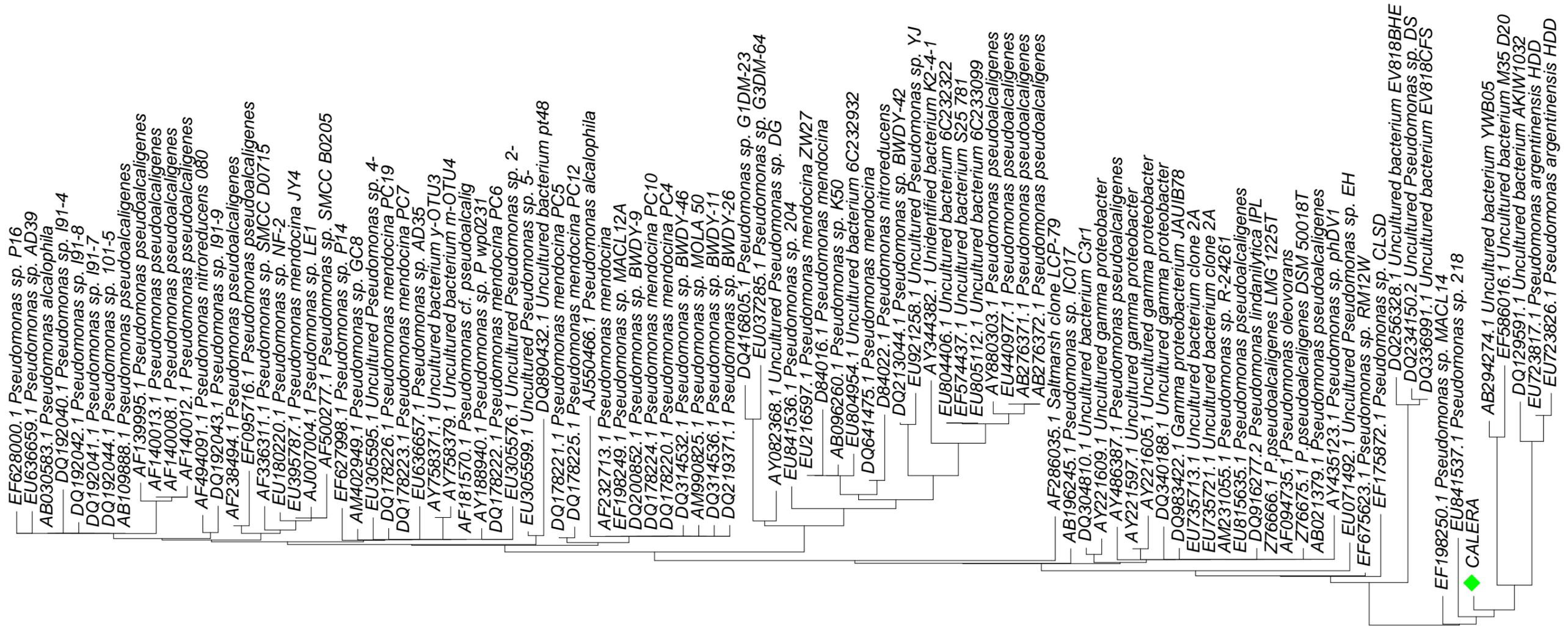
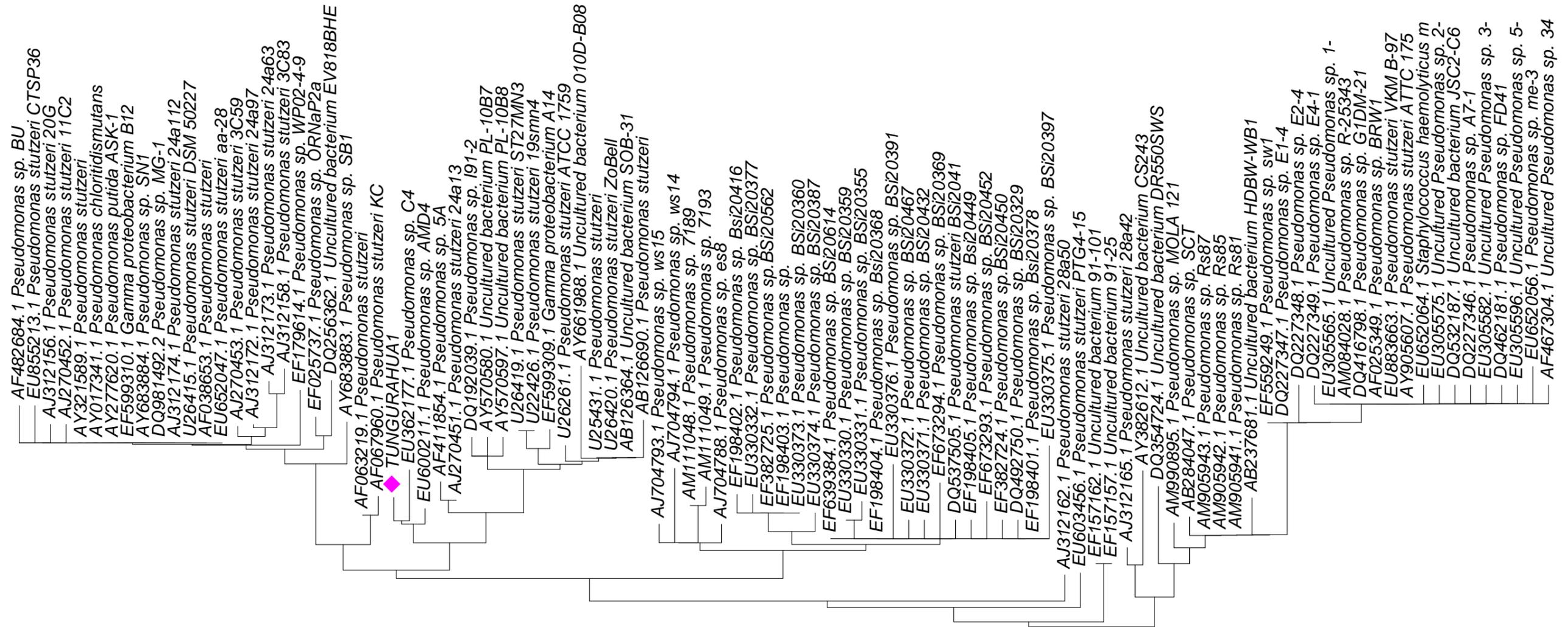


Figura 3.11. Árbol filogenético para la bacteria CALERA mediante Neighbor Joining de MEGA v4.0.



**Figura 3.12.** Árbol filogenético para la bacteria TUNGURAHUA 1 mediante Neighbor Joining de MEGA v4.0.

Adicionalmente, se alinearon en BioEdit v7.0.8.0 las secuencias de las tabla 3.7 con las de la Tabla 3.8 y con las secuencias de las dos bacterias nativas, con lo que se obtuvo un árbol filogenético general (Figura 3.13), y además se pudo constatar que las secuencias de las bacterias nativas tiene entre ellas un 97 % de semejanza según Sequence Identity Matrix.



con la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645; tanto en la coloración como en la turbidez. En cuanto a la coloración del medio; las bacterias nativas lo transformaron a azul, lo que indica que los productos obtenidos de la degradación del sustrato presente en el medio, provocarían el incremento de pH en el mismo (ver Ecuación 4.1), y serían diferentes a los de la cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, cuyos productos de degradación como se presentan en la Ecuación 4.2, provocan la acidificación del medio (Madigan, Martinko & Parker, 2004; Schreiber & Pavlostathis, 1998) y por esta razón su coloración amarilla.



Respecto a la turbidez, en ambos medios líquidos la presencia de esta propiedad es un indicativo de que hubo crecimiento bacteriano en los medios, el que fue mucho más evidente en la cepa ATCC 23645; es decir, que estas bacterias crecieron en mayor cantidad ( $2 \times 10^6$  UFC/mL, véase Anexo A), en comparación con las dos bacterias nativas ( $3 \times 10^5$  UFC/mL aproximadamente, Cumbal, Koch & Tacuri, 2008); esta particularidad puede atribuirse a la fuente de energía usada para su metabolismo. En el caso de *Thiobacillus thioparus*, el tiosulfato es usado como fuente principal de energía, mientras que en las dos bacterias nativas la transformación de tiosulfato sería incidental, es decir un mecanismo alternativo utilizado para su nutrición y no sería de vital importancia como una fuente de energía en su metabolismo (Starkey, 1934).

## **4.2 Aislamiento, cuantificación y electroforesis de ADN genómico de *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 y de las bacterias CALERA y TUNGURAHUA 1**

Al existir poco crecimiento bacteriano de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA en el medio líquido, se dificulta la obtención de una buena cantidad de ADN, puesto que de la cantidad de bacteria que se use durante el aislamiento de ADN, se obtiene una cantidad determinada del material genético. Las concentraciones de ADN obtenidas estuvieron en el rango de

0.03 a los 0.66 ng/ $\mu$ L para la bacteria TUNGURAHUA 1 y de 0.11 a 3.65 ng/ $\mu$ L para la bacteria CALERA. Debido a que la concentración de ADN en las muestras de de la bacteria TUNGURAHUA 1 fue baja, las bandas no pudieron ser observadas en el transiluminador luego de una electroforesis en gel de agarosa, y la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado entre las moléculas de ADN no fue la suficiente, ya que de la masa de ADN presente en la muestra depende la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro (Tresguerres, 2003). Sin embargo, para las bacterias CALERA y ATCC 23645, las concentraciones de ADN fueron suficientes como para ser observadas en el transiluminador.

### 4.3 PCR

#### 4.3.1 Estandarización del protocolo de amplificación

Durante la estandarización del protocolo para la amplificación de la secuencia 16S rDNA de *Thiobacillus thioparus*, dos de las cuatro combinaciones de primers usados, cuyas combinaciones incluyen al primer Ttp240r (5' ATC AGA CGT CGG CCG CTC GA 3') no presentaron amplificación alguna; esto se debería esencialmente a la formación de dímeros de primers (Anaya *et al.*, 2005; Persing, Smith, Tenover & White, 1993), ya que el primer Ttp240r es complementario a los primers Ttp194f (5' TCG AGC GGC CGA CGT CTG AT 3') y Ttp223f (5' CGA GCG GCC GAC GTC TGA T 3'), y consecuentemente actuando como un competidor (Chen & Janes, 2002) en la amplificación de una región de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioparus*, impidiendo así el proceso de hibridación de la secuencia objeto de amplificación.

Se buscó la concentración inicial mínima de ADN (0.16 ng/ $\mu$ L) a la cual la amplificación una sección de la secuencia 16S rDNA pudiera darse, ya que cantidades de ADN, que sobrepasen los valores recomendados (10 ng ADN molde) durante el proceso de amplificación podrían contribuir a la acumulación de productos no específicos (Anaya *et al.*, 2005; Chen & Janes, 2002; Day, 2002; Siwach & Singh, 1997).

La temperatura de annealing para cada una de las dos combinaciones de primers que presentaron amplificación fue determinada empíricamente (Chen & Janes, 2002), manejando como criterio principal la obtención grandes cantidades del amplicón de interés, libre de otros productos no deseados (Vanden Heuvel, 1998) y cuya banda fuese intensa al ser observada en el transiluminador luego de la electroforesis de los productos de PCR. Las temperaturas que permitieron la amplificación deseada fueron: 50 °C para la combinación Ttp223f con Ttp833r y de 58 °C para la combinación Ttp194f con Ttp833r.

#### **4.3.2 Amplificación de la secuencia 16S rDNA para las tres bacterias y electroforesis de los productos de PCR**

Después de realizada la PCR y visualizados los productos en un gel de agarosa al 1%, se puso en evidencia la presencia de un amplicón con un tamaño de 640 pb usando la combinación de primers Ttp194f – Ttp833r, y otro amplicón con un tamaño de 639 pb usando la combinación de primers Ttp223f - Ttp833r con muestras de ADN del control positivo, poniendo de manifiesto que estos tres primers serían específicos para el reconocimiento de una región de la secuencia 16S rDNA en *Thiobacillus thioparus*, ya que identifican un grupo específico de nucleótidos en el ADN del control positivo para posteriormente hibridizarse a su secuencia complementaria en el ADN molde y empezar así con la amplificación del 16S rDNA (Maldonado, 2002). Sin embargo, para los ensayos realizados con las muestras de ADN de las dos bacterias nativas TUNGURAHUA 1 y CALERA, no se detectó ningún producto de PCR al no existir la secuencia específica a la cual los primers pudieran hibridizarse (Gibson *et al.*, 2006), y como consecuencia no se observaron las bandas de amplicones después de la electroforesis en gel de agarosa.

#### **4.4 Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas mediante aplicaciones en línea y programas bioinformáticos**

Las secuencias 16S rDNA de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA, aisladas de localidades ecuatorianas, presentaron un 99% de

semejanza con varias secuencias 16S rDNA de diferentes cepas de *Pseudomonas*, hecho que plantea la posibilidad de que estas dos bacterias nativas degradadoras de tiosulfato de plata (Cumbal, Koch & Tacuri, 2008), puedan pertenecer a este género bacteriano, ya que además de la información proporcionada por las secuencias 16S rDNA, algunos estudios e información científica documentan la existencia de varias especies de *Pseudomonas* que son capaces de crecer al metabolizar el STS (Castillo *et al.*, 2005; Parés & Juárez, 1997; Sorokin, Teske, Robertson & Kuenen, 1999; Stanier, Villanueva & Guerrero, 1996).

En cuanto a la semejanza entre secuencias de la bacteria CALERA respecto a las secuencias de la base de datos del NCBI, BLASTN 2.2.18+ y BioEdit v7.0.8.0 coinciden en que esta bacteria nativa se asemeja a la cepa bacteriana *Pseudomonas sp.* MACL14 (EF198250.1) en un 99%. Sin embargo, para otras secuencias (Véase Anexo E), el porcentaje de semejanza varía, por ejemplo la cepa *Pseudomonas mendocina* (AF232713.1) según BLASTN 2.2.18+ presenta un 98% de similitud y con el Sequence Identity Matrix de BioEdit v7.0.8.0 muestra un 96.5 % de afinidad respecto a la bacteria nativa CALERA. En el caso del análisis comparativo de secuencias entre la obtenida con la bacteria TUNGURAHUA 1 y las secuencias proporcionadas por la base de datos del NCBI, también se pudo constatar algunas diferencias utilizando BLASTN 2.2.18+ y BioEdit v7.0.8.0. Mientras que para BLASTN 2.2.18+ existieron 67 secuencias con el 99% de similitud a la secuencia de la bacteria TUNGURAHUA 1, BioEdit indicó que solamente 18 secuencias coinciden entre 99,3% a 99% con la secuencia de la bacteria nativa y, consecuentemente el resto de porcentajes varían en las demás casos (Véase Anexo F). Estas aparentes discrepancias pueden ser atribuidas básicamente a que BLASTN presenta y calcula la semejanza solamente de la región que se alinea o empata con toda o con una parte de la secuencia problema, es decir, procesa a la región como una pieza separada de un todo (Prade & Bohnert, 2003); mientras que Sequence Identity Matrix de BioEdit v7.0.8.0, calcula la identidad entre secuencias tomando en cuenta los vacíos (gaps) que genera ClustalW Multiple Alignment, hasta que las secuencias se alineen entre sí; haciendo que esta corrección por inserción de gaps en las regiones que no empaten entre

secuencias genere ciertos conflictos o efectos para cálculos posteriores (Brown, 2007). De igual manera, como los árboles filogenéticos obtenidos fueron construidos a partir de los alineamientos de cada aplicación (BLASTN o BioEdit) para cada bacteria nativa, en consecuencia las estructuras de dichos árboles también difieren para las dos bacterias aisladas de ambientes ecuatorianos (Brown, 2007).

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La ejecución de este trabajo presentó varias etapas. Se inició con el cultivo en medio selectivo para *Thiobacillus* de las tres bacterias usadas en esta investigación. Luego, con estos cultivos puros se obtuvo el ADN genómico de dichos microorganismos para los ensayos de estandarización de un protocolo de PCR que permitió la amplificación de la secuencia 16S rDNA en el control positivo. Posteriormente, dicho protocolo estandarizado fue aplicado en muestras de ADN de las dos bacterias nativas, y al no obtener amplificación alguna con las muestras de las dos bacterias nativas, se envió a secuenciar la región 16S rDNA de estas dos bacterias. Después, se realizó una comparación de secuencias entre las de la base de datos del NCBI y las dos secuencias de las dos bacterias aisladas de ambientes ecuatorianos, para finalmente dilucidar el género al que pertenecían estos dos microorganismos. A continuación se expone a detalle las conclusiones de esta investigación:

☑ Características evidentemente opuestas fueron encontradas entre las dos bacterias nativas (TUNGURAHUA 1 y CALERA) y las cepa *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645; por ejemplo el crecimiento de las bacterias nativas en menor cantidad y el incremento de pH en el medio de cultivo. Por lo que se supone que el mecanismo de degradación del tiosulfato presente en el medio, es solamente una vía alterna para mantener sus requerimientos mínimos de sobrevivencia, no siendo en consecuencia el mecanismo principal de obtención de energía para el metabolismo de las bacterias aisladas desde aguas sulfurosas en diferentes localidades en Ecuador.

☑ Debido al poco crecimiento bacteriano de las bacterias nativas TUNGURAHUA 1 y CALERA en medio líquido, se dificultó la obtención de una buena cantidad de ADN para los ensayos de electroforesis. En la cuantificación de ADN se obtuvieron concentraciones en el rango de 0.03 a 0.66 ng/μL para la bacteria TUNGURAHUA 1 y de 0.11 a 3.65 ng/μL para la bacteria CALERA.

☑ El protocolo de extracción de ADN proporcionó muestras de ADN de buena calidad, al ser observadas en el transiluminador después de una electroforesis en gel de agarosa, con bandas visibles a partir de una concentración de ADN de 3.00 ng/μL.

☑ Las combinaciones de primers que no amplificaron una región de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioparus*, usando como control positivo muestras de ADN perteneciente a *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645 fueron Ttp194f con Ttp240r y Ttp223f con Ttp240r, ya que el primer reverse Ttp240r es complementario a los primers forward Ttp194f y Ttp223f, provocando la formación de dímeros de primer, evitando la hibridización de los primers con la secuencia objeto de amplificación.

☑ Las combinaciones de primers Ttp194f con Ttp833r y Ttp223f con Ttp833r permitieron la amplificación una región de la secuencia 16S rDNA para *Thiobacillus thioparus*, usando como control positivo muestras de ADN perteneciente a *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, puesto que se obtuvieron amplicones de 640 y 639 pares de bases respectivamente.

☑ La concentración mínima de ADN con la cual se puede llevar a cabo la correcta ejecución del protocolo para la amplificación de una región de la secuencia 16S rDNA en *Thiobacillus thioparus* es de 0.16 ng/μL.

☑ La temperatura de annealing durante la reacción en cadena de la polimerasa, para la obtención de un buen amplicón de la secuencia 16S rDNA en *Thiobacillus thioparus*, fue de 58 °C para la combinación de primers Ttp194f con Ttp833r y de 50 °C para la combinación de primers Ttp223f con Ttp833r.

☑ Las combinaciones de primers Ttp194f con Ttp833r y Ttp223f con Ttp833r con las cuales se obtuvieron amplicones de la secuencia 16S rDNA en el control positivo, no permitieron la obtención de amplicón alguno con las muestras de ADN pertenecientes tanto a la bacteria TUNGURAHUA 1 como a la bacteria CALERA.

☑ Los primers forward Ttp194f y Ttp223f y el primer reverse Ttp833r son primers específicos para *Thiobacillus thioparus*; concretamente para el gen que codifica la secuencia 16s rDNA de esta bacteria.

☑ Al no existir amplificación alguna, después de visualizar los productos de PCR en gel de agarosa, utilizando las muestras de ADN de ambas bacterias nativas y, con el análisis comparativo de las secuencias 16S rDNA de las bacterias TUNGURAHUA 1 y CALERA respecto a la base de datos de NCBI, se descarta la posibilidad de que ambas bacterias nativas sean *Thiobacillus thioparus*

☑ Al analizar las secuencias de la región 16S rDNA tanto de la bacteria CALERA como de la bacteria TUNGURAHUA 1 se pudo constatar que ambas bacterias presentaron 97% de semejanza entre ellas.

☑ Con el análisis comparativo entre las secuencias de las dos bacterias nativas y las secuencias de la base de datos de NCBI se presume que las bacterias TUNGURAHUA 1 Y CALERA podrían pertenecer al género bacteriano *Pseudomonas*, puesto que presentan un 99% de semejanza con varias cepas de *Pseudomonas*.

## CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

✓ La conservación de una muestra proveniente de la primera regeneración del cultivo ATCC en condiciones ambientales adecuadas, es de vital importancia para posteriores réplicas del cultivo, puesto que durante el desarrollo de este trabajo se pudo constatar que esta cepa certificada proporcionó un número limitado de réplicas.

✓ La modificación del protocolo de extracción de ADN, en cuanto al incremento de volumen de cultivo puro y el conocimiento del peso ya sea seco o húmedo de la masa bacteriana para la extracción del ADN, proporcionaría un dato estadístico confiable para saber la cantidad de ADN que se podría obtener con este protocolo de extracción a partir de una determinada masa de bacterias.

✓ La realización de un nuevo estudio molecular en las bacterias nativas TUNGURAHUA 1 y CALERA para que, a más de permitir la confirmación del género obtenido con el análisis de las secuencias 16S rDNA en el presente trabajo, también permita ubicarlas dentro de una especie bacteriana determinada.

✓ Para una identificación bacteriana, en base a la experiencia obtenida en este trabajo, se sugiere conocer en primera instancia la secuencia 16S rDNA de dicha bacteria, lo que permitiría obtener información valedera, libre de ambigüedades, y de esa manera continuar con otras pruebas (bioquímicas) que faciliten y optimicen recursos durante una caracterización bacteriana.

✓ La manipulación de no más de 10 muestras de una sola bacteria para la extracción de ADN es lo aconsejable porque a más de evitar algún tipo de contaminación por cruce de muestras, se respeta los tiempos del protocolo en las diferentes fases de la extracción.

✓ El envío de muestras, si se envían cultivos puros, es conveniente realizarlo en cajas petri de plástico con agar, adecuadamente selladas y embaladas. Esta práctica evitaría su rotura durante el transporte del paquete. Por otro lado, si se envían muestras de ADN genómico, es conveniente aislar el ADN con la ayuda de kits de aislamiento de ácidos nucleicos, con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación y obtener la mayor cantidad posible de ADN.

✓ El precalentamiento del termociclador 30 minutos antes de iniciar la reacción en cadena de la polimerasa optimiza este proceso.

✓ El uso de una mascarilla nasal y demás implementos de protección personal durante la manipulación del bromuro de etidio, ya que permite evitar el deterioro de las vías respiratorias y la contaminación del personal, ya sea por inhalación de los vapores que genera este reactivo o por contacto con el mismo durante la preparación del gel de agarosa.

✓ La limpieza del área de PRE – PCR con etanol al 70% y luz UV antes de empezar con el proceso de ensamblaje de las PCRs, además del uso de material nuevo y esterilizado, permite evitar la contaminación en la reacción por agentes externos como esporas o remanentes de reacciones anteriores.

## BIBLIOGRAFÍA

American Type Culture Collection (ATCC). (2007). ATCC medium: 290 S6 medium for *Thiobacillus*. Extraído el 14 de marzo, 2007, del sitio web de la empresa American Type Culture Collection: <http://www.atcc.org/Attachments/3616.pdf>.

Anaya, J., Shoenfeld, Y., Cervera, R., Correa, P., & García M. (2005). Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. Madrid: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). pp. 516 - 520.

Arroyo, A., & Sánchez, J. (2003). Técnicas avanzadas en Biología. Extraído el 03 de septiembre, 2007, del sitio web de la Universidad Pablo de Olavide en Sevilla: <http://www.upo.es/depa/webdex/biocel/Documentos/TAB/Tema 5.pdf>.

Barbosa, L., Atkins, D., Barbosa, P., Burgess, E., Stuetz, M. (2006). Characterization of *Thiobacillus thioparus* isolated from an activated sludge bioreactor used for hydrogen sulfide treatment. Journal of Applied Microbiology, 101(6), 1269–1281.

Bartlett, J., & Stirling, D. (2003). PCR Protocols. Totowa, N.J.: Humana Press. (2nd ed.). pp. 91- 97.

Battaglia, B., Valencia, J., & Walton, D. (1997). Antarctic Communities: Species, Structure, and Survival. Cambridge: Cambridge University. pp. 53.

Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer L. (2007). Bioquímica. Barcelona: Reverté. (6th ed.). pp. 141 - 142.

Brown, J. (2007). Comparative Genomics: Basic and Applied Research. New York: CRC Press. pp. 65, 66.

Campos, L., Faria, R., De Mello, M., García, O., Manfio, G., & Ottoboni, L. (2001). Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. Thiooxidans* strains isolated from a mine wastes in Brazil. Antonie van Leeuwenhoek, 80(1), 65 - 75.

Carter, M., & Gregorich, E. (Eds.). (2007). Soil Sampling and Methods of Analysis. Canadá: CRC Press. (2nd ed.). pp. 351.

Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno-Vivián, C., & Martínez, M. (2005). Biotecnología ambiental. Madrid: Editorial Tébar. pp. 194 - 199, 206, 242.

Castellanos, T., & Say, N. (2005). Métodos químicos y bioquímicos: Estudio de ácidos nucleicos. Extraído el 04 de septiembre, 2007, del sitio web: <http://sacweb.tripod.com/>.

Chen, B., & Janes, H. (2002). PCR Cloning Protocol. Totowa: Humana Press. pp. 20, 21, 47.

Cooper, E., & Yamaguchi, N. (2004). Complementary and alternative approaches to biomedicine. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp. 392.

Crocker, J., & Burnett, D. (1999). The Science of Laboratory Diagnosis. New York: Informa HealthCare. (1st ed.). pp. 519.

Cumbal, L., Koch, A., & Tacuri, M. (2008). Biorremoción del tiosulfato de plata (STS) presente en el agua residual proveniente del tratamiento en post-cosecha para flores sensibles al etileno. Memoria: Tercer Congreso de Ciencia y Tecnología, Junio.

Dajoz, R., & Leiva M. (Eds.). (2003). Tratado de Ecología. Madrid: Mundi-Prensa Libros. (2nd ed.). pp. 440.

Day, I. (2002). Molecular genetic epidemiology: a laboratory perspective. New York: Springer. (3rd ed.). pp. 109 - 115.

Devlin, T. (2004). Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. México: Reverté. (4th ed.). pp. 78, 83, 184, 284 - 286.

Dieffenbach, C., & Dveksler, G. (2003). PCR Primer: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL). (2nd ed.). pp. 61 - 63.

Duncan, K., Sublette, K., Rider, P., Stepp, A., Beitle, R., Conner, J., & Kolhatkar, R. (2001). Analysis of a microbial community oxidizing inorganic sulfide and mercaptans. Biotechnology progress, 17(4), 768 - 774.

Ecuadorexporta. (2005, Abril/Junio). Reporte de productos no tradicionales. Noticias y análisis, 1(32), 1-5. Extraído el 15 de enero, 2007 del sitio web de la CORPEI: [http://www.ecuadorexporta.org/productos\\_down/reporte\\_no\\_tradicionales\\_abril\\_-\\_junio\\_2005740.pdf](http://www.ecuadorexporta.org/productos_down/reporte_no_tradicionales_abril_-_junio_2005740.pdf).

Ecuadorexporta. (2008). Exportaciones ecuatorianas. Extraído el 26 de junio, 2008, del sitio web de la Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones del Ecuador (CORPEI), en el Sistema de Inteligencia de Mercados (SIM): <http://www.ecuadorexporta.org/productos/index.htm>.

Engel, A., Porter, M., Kinkle, B., & Kane, T. (2001). Ecological Assessment and Geological Significance of Microbial Communities from Cesspool Cave, Virginia. Geomicrobiology Journal, 18, 259 - 274.

Étienne, J., & Pérez, E. (2001). Bioquímica genética : biología molecular. Barcelona: Masson. pp. 364.

European Molecular Biology Laboratory (EMBL). (2008). Sitio web: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>.

Expoflores, & Banco Central del Ecuador. (2005). Exportaciones por tipo de flor. Extraído el 26 de junio, 2008, del sitio web del Servicio de Información y Censo Agropecuario (SICA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador (MAG): [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/flores/export\\_tipo.htm](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/flores/export_tipo.htm).

Fero, M. (2005). Fluorometric Quantitation of RNA or DNA. Extraído el 13 de octubre, 2008, del sitio web del Fred Hutchinson Cancer Research Center: <http://labs.fhcrc.org/fero/Protocols/Fluorometer.html>.

Figuerola, I., Colinas, M., Mejía, J., & Ramírez, F. (2005). Cambios fisiológicos en postcosecha de dos cultivares de rosa con diferente duración en florero. Cien. Inv. Agr., 32(3), 209 - 219.

Florez, J., Armijo, J., & Mediavilla, A. (2004). Farmacología humana. Pamplona: Elsevier. pp. 1189.

García, C., & González, A. (Eds.). (2000). Tratado de Pediatría Social. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. (2nd ed.). pp. 210.

Gibson, M. (2001). Biofiltration of Dimethyl disulphide and Ammonia: Investigation of the Underlying Microbial Activities. Extraído el 04 de marzo, 2007, del sitio web de la Universidad de Guelph: <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk3/ftp05/NQ65821.pdf>.

Gibson, M., Trevors, J., & Otten, L. (2006). Population estimates of *Thiobacillus thioparus* in composting biofilters by PCR analysis. Journal of Microbiological Methods, 65, 346 - 349.

González, J. (2004). Técnicas y métodos de laboratorio clínico. España: Masson. (2nd ed.). pp. 253, 254.

Greene, J., & Rao, V. (1998). Recombinant DNA Principles and Methodologies. New York: CRC Press. pp. 143.

Gutell, R., Larsen, N., & Woese, C. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. Microbiol Mol Biol Rev., 58(1), 10 - 26.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., 41, 95 - 98.

Hernández, O. (2000). Uso de Métodos Químico-Biológicos como Mejoradores de la Conductividad Hidráulica de un Suelo Salino-Sódico. Extraído el 10 de octubre, 2008, del sitio web de la Universidad de Colima en México: [http://digeset.ucol.mx/tesis\\_posgrado/Pdf/Oneyda%20Hernandez%20Lara.PDF](http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Oneyda%20Hernandez%20Lara.PDF)

Herrera, M. (1998). Filogenia bacteriana mediante el análisis del 16s rDNA. Extraído el 20 de enero, 2007, del sitio web: [http://www.arareko.net/biology/bacterial\\_phylogeny/](http://www.arareko.net/biology/bacterial_phylogeny/).

High, K., & Ross H. (1995). Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York: Informa Health Care. pp. 26 - 28.

Holt, J., Krieg, N., & Stalez, J. (Eds.). (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Williams & Wilkins, Trans.).

Invitrogen. (2007). Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kits. Extraído el 18 de mayo, 2007, del sitio web de la Corporación Invitrogen: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp32851.pdf>.

Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Uruguay. (2007). Extracción de ADN. Extraído el 22 de agosto, 2007, del sitio web de la Universidad de la República en Montevideo: <http://evolucion.fcien.edu.uy/Protocolosbasicos.pdf>.

Lane, D., Harrison, A., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S., Olsen, G., & Pace, R. (1992). Evolutionary Relationships among Sulfur and Iron Oxidizing Eubacteria. Journal of Bacteriology, 174, 269 - 278.

Lane, D., Pace, B., Olsen, G., Stahl, D., Sogin, M., & Pace, N. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(20), 6955 - 6959.

Lane, D., Stahl, D., Olsen, G., Heller, D., & Pace, N. (1985). Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. Journal of Bacteriology, 7, 75 - 81.

Ljungdahl, L., Adams, M., Barton, L., Ferry, J., & Johnson, M. (2003). Biochemistry and Physiology of Anaerobic Bacteria. New York: Springer. pp. 205.

Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). Biología de los microorganismos. Madrid: Pearson. (10th ed).

Maldonado, E. (2002). Biología Molecular en Medicina. México: Editorial LIMUSA. (1st ed.). pp. 50.

Margulis, L. (2002). Una revolución en la evolución. Valencia: Universitat de València. pp. 188.

McNamara, P. (2006). Trends in RNA Research. New York: Nova Science Publishers. pp. 254 - 256.

Ministerio del Ambiente Colombiano (MAVDT), Sociedad de Agricultores de Colombia (SAC), Asociación Colombiana de Exportadores de Flores (ASOCOLFLORES). (2005). Guía Ambiental para la floricultura. Extraído el 09 de octubre, 2008, del sitio web del Sistema de Información Ambiental Minero Energético de Colombia (SIAME): <http://www.siame.gov.co/Default.aspx?tabid=55>.

Moreira, D., & Amils, R. (1997) Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and Other Mixotrophic *Thiobacilli*: Proposal for *Thiomonas* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 522 - 528.

Müller, W. (2003). Sponges (Porifera). New York: Springer. pp. 67.

Muyzer, G., De Waal, E., & Uitierlinden, A. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59, 695 - 700.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2008). Sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Neefs, J., van de Peer, Y., Hendriks, L., & de Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucl. Acids. Res., 18, 2237 - 2330.

Nell, T. (1992). Taking silver safely out of the longevity picture. Grower Talks Magazine, June, 35, 37, 39, 41 - 42.

Oliva, R., & Vidal, J. (2006). Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento. Barcelona: Publicacions i Edicions, Universitat de Barcelona. (3rd ed.). pp. 43 – 47.

Olsen, G., & Woese, C. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J, 7, 113 - 123.

Parés, R., & Juárez, A. (1997). Bioquímica de los microorganismos. Barcelona: Reverté. pp. 282, 285.

Parra, R. (2002). Ácidos nucleicos. Extraído el 03 de septiembre, 2007, del sitio web: <http://www.biologia-en-internet.com/default.asp?Id=3&Fs=2>.

Peccia, J., Marchand, E., Silverstein, J., & Hernández, M. (2000). Development and Application of Small-Subunit rRNA Probes for Assessment of Selected *Thiobacillus* Species and Members of the Genus *Acidiphilium*. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3065 - 3072.

Persing, D., Smith, T., Tenover, F., & White, T. (1993) Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington: American Society for Microbiology (ASM) Press. pp. 96.

Prade, R., & Bohnert, H. (2003). Genomics of Plants and Fungi. New York: CRC Press. pp. 169.

Puerta, C., & Ureña, C. (2005). Prácticas de biología molecular. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. pp. 66.

Ramos, J. (2004). Pseudomonas. Boston: Kluwer Academic/Plenum. (5th ed.). pp. 22 - 24.

Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, Metodología y Aplicaciones en Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin., 22(4), 238 - 245.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, C., Erlich, H., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230, 1350 - 1354.

Schreiber, D., & Pavlostathis, S. (1998). Biological oxidation of thiosulfate in mixed heterotrophic/autotrophic cultures. Wat. Rev., 32(5), 1363 - 1372.

Selenska-Pobell, S., Otto, A., & Kutschke, S. (1998) Identification and discrimination of thiobacilli using ARDREA, RAPD and rep-APD Journal of Applied Microbiology, 84(6), 1085 - 1091.

Shooner, F., Bousquet, J., & Tyagi, R. (1996). Isolation, Phenotypic Characterization, and Phylogenetic Position of a Novel, Facultatively Autotrophic, Moderately Thermophilic Bacterium, *Thiobacillus thermosulfatus* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 409 - 415.

Siwach, P., & Singh, N. (1997). Molecular Biology: Principles and Practices. Moscow: MAIK Nauka/Interperiodica Publ. pp. 204, 205.

Somma, M. (2006). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos: Extracción y purificación de ADN. Extraído el 10 de octubre, 2008, del sitio web de Biotechnology & GMOs: <http://bgmo.jrc.ec.europa.eu/home/documents/Manual ES/Sesion4.pdf>.

Sorokin, D., Teske, A., Robertson, L., & Kuenen, J. (1999). Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. FEMS Microbiology Ecology, 30(2), 113 - 123.

Srivastava, S., Srivastava, P. (2003). Understanding Bacteria. New York: Springer-Verlag. pp. 52.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G., Grimont, P., Kämpfer, P., Maiden, M., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H., Vauterin, L., Ward, A., & Whitman, W. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-

evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1043 - 1047.

Stanier, R., Villanueva, J., & Guerrero, R. (1996). Microbiología. Barcelona: Reverté. (2nd ed.). pp. 491 - 494.

Starkey, R. 1934. Products of the oxidation of thiosulfate by bacteria in mineral media. Journal of General Physiology 18, 325 - 349.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24, 1596 - 1599. (Publicación en formato PDF en el sitio web: <http://www.kumarlab.net/publications>).

Teijón, J., Garrido, A., Blanco, M., Villaverde, C., Mendoza, C., & Ramírez, J. (2006). Fundamentos de bioquímica metabólica. Madrid: Editorial Tébar. (2nd ed.). pp. 322.

Tresguerres, J. (2003). Biotechnología aplicada a la Medicina. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. pp. 168, 178.

Vanden Heuvel, J. (1998). PCR Protocols in Molecular Toxicology. New York: CRS Press. pp. 33.

Verdugo, G., Araneda, L., & Riffo, M. (2003). Efecto de inhibidores de etileno en postcosecha de flores cortadas de *Lilium*. Ciencia e investigación Agraria, 30(2), 89 - 95.

Vlasceanu, L., Popa, R., & Kinkle, B. (1997). Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3123 - 3127.

Wilson, C., & Droby, S. (2000). Microbial Food Contamination. New York: CRC Press. (1st ed.). pp. 98.

Woese, C., Stackebrandt, E., Macke, T., & Fox, G. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Syst. Appl. Microbiol., 6, 143 - 151.

Zamora, G. (2006). Tratamiento físico químico de drenajes ácidos de mina: manejo ambiental de lodos de alta densidad - estabilidad - deposición final o aplicaciones. *Tecnologías limpias en las industrias extractivas minero-metalúrgica y petrolera*, Junio, 245 - 258.