



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

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

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

AUTOR: MOPOSITA MOLINA FREDDY DAVID

DIRECTOR: IZQUIERDO ANDRÉS, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL “CHACHIMBIRO” MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES..**” realizado por **FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 8 de mayo del 2017

.....
ANDRÉS IZQUIERDO, Ph.D.
DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA**, con cédula de identidad N° 171985326-7, declaro que este trabajo de titulación **“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL “CHACHIMBIRO” MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES.”**, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

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

Sangolquí, 8 de mayo del 2017

FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA

C.C 171985326-7



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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, **“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL “CHACHIMBIRO” MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES.”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad. .

Sangolquí, 8 de mayo del 2017

FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA

C.C 171985326-7

DEDICATORIA

A mis padres Nelson Moposita y Lorena Molina, por brindarme siempre los consejos en los momentos más difíciles de mi vida y permitirme alcanzar las metas que desde niño han venido enseñándome, gracias por seguir confiando en mí a pesar de todo.

A mis hermanos Daysi Moposita, Daniel Moposita, Jordi Moposita y Emily Moposita, quienes son incondicionales en mi vida.

Este éxito es dedicado a ustedes.

Freddy David Moposita Molina

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios por permitirme alcanzar mis metas.

A mis padres Nelson Moposita y Lorena Molina, que han sido el pilar fundamental en mi vida para lograr mis metas, a mis hermanos Daysi, Daniel, Jordi y Emily, por su apoyo constante.

A Andrés Izquierdo, quien fue fundamental, ya que me permitió realizar el proyecto de tesis, por ser un orientador en este proyecto y su constante preocupación al trabajo realizado.

A Alma Koch, por sus opiniones profesionales en ayuda de mi proyecto de tesis y ser una guía en este proyecto.

A Francisco Flores, por sus conocimientos brindados, ya que fueron fundamental para solucionar algunos problemas del proyecto.

A Renato Naranjo, quien fue parte fundamental e importante para la realización de mi proyecto, por su colaboración y ayuda tanto personal como en lo académico.

A mis amigos de laboratorio, quienes estuvieron en los momentos más difíciles del proyecto y por los momentos que compartimos: Roque, Beto, Renato, Caro, Yani, y Berenice.

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

FREDDY DAVID MOPOSITA MOLINA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Certificación.....	ii
Autoría de responsabilidad.....	iii
Autorización.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice de contenidos.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas.....	xi
Índice de anexos.....	xii
Listado de abreviaturas.....	xiii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	1
1.3 Objetivos de la investigación.....	2
1.3.1 Objetivo general.....	2
1.3.2 Objetivos específicos.....	2
1.4 Marco Teórico.....	2
1.4.1 Microorganismos extremófilos.....	2
1.4.2 Características.....	3
1.4.3 Clasificación.....	3
1.4.3.1 Temperatura.....	3
1.4.3.2 pH.....	4
1.4.3.3 Salinidad.....	4
1.4.3.4 Presión.....	5
1.4.4 Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo.....	5
1.4.4.1 Extracción de ADN.....	5
1.4.4.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	6
1.4.4.3 Gen ribosomal 16S.....	6
1.4.4.4 23S rRNA.....	7

1.4.4.5	Gen ITS	7
1.4.4.6	RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)	7
1.4.4.7	Secuenciación Sanger	8
1.4.4.8	Pirosecuenciación	9
1.4.4.9	Alineamiento de Secuencias	9
1.4.4.10	Árboles filogenéticos	10
1.4.5	Aplicaciones	10
1.4.6	Termas Chachimbiro	13
1.5	HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	11
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		12
2.1	Participantes	12
2.2	Zona de Estudio	12
2.2.1	Fase de campo	12
2.2.2	Fase de laboratorio	13
2.3	Periodo de investigación	14
2.4	Procedimientos de aislamiento	14
2.4.1	Preparación de medios de cultivo	14
2.4.2	Toma de muestras	14
2.4.3	Procesamiento de la muestra	16
2.4.4	Obtención de cultivos puros	16
2.4.5	Determinación de las características macroscópicas del cultivo	17
2.4.6	Determinación de las características microscópicas del cultivo	17
2.4.7	Preparación del cepario	17
2.5	Extracción de ADN	18
2.6	Amplificación de gen 16S rRNA mediante PCR	18
2.7	Amplificación de gen 23S	19
2.8	Análisis de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)	19
2.9	Secuenciación	20
2.10	Pirosecuenciación	20
2.11	Análisis de secuencias	21
2.12	Análisis filogenético	21
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		22
3.1	Características de los puntos de muestreo	22
3.2	Análisis físico-químico	22

3.3	Cultivos puros obtenidos	24
3.4	Características microscópicas de los cultivos.....	25
3.5	Extracción de ADN	26
3.6	Amplificación del Gen 16S rRNA	26
3.7	RFLPs en gel de agarosa	27
3.8	Amplificación gen 23 rARN	29
3.9	Identificación molecular de las cepas aisladas	30
3.10	Construcción del árbol filogenético	32
3.11	Análisis de la composición de la comunidad microbiana mediante la técnica pirosecuenciación	35
3.11.1	Comunidad Bacteriana	35
3.11.2	Hongos	51
3.11.3	Arqueas	53
3.11.4	Microalgas.....	55
3.11.5	Bacterias fotosintéticas.....	57
3.12	Cepario	57
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		58
4.1	Características Fisicoquímicas	58
4.2	Aislamiento	62
4.3	Identificación molecular	63
4.3.1	Bacterias	63
4.3.2	Microalgas.....	65
4.3.3	Pirosecuenciación.....	67
4.3.3.1	Comunidad bacteriana	67
4.3.3.2	Hongos.....	70
4.3.3.3	Arqueas.....	70
4.3.3.4	Microalgas	71
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES		72
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		73
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA		74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gen 16S rARN.....	6
Figura 2: Secuenciación Sanger.....	8
Figura 3: Fuente geotermal “Chachimbiro”.....	12
Figura 4: Ojo de la terma del punto P1.....	15
Figura 5: Ojo de la fuente termal del punto P2.....	15
Figura 6: Cultivos puros obtenidos. A: cepa (25) “ <i>Bacillus</i> ”. B: cepa (23) “ <i>Anoxybacillus gonensis</i> ”.....	24
Figura 7: <i>Fischerella</i> , medio BG11.....	24
Figura 8: Tinción Gram. A: cepa (25) “ <i>Bacillus</i> ”. B: cepa (15) “ <i>Bacillus licheniformis</i> ”.....	25
Figura 9: Tinción Gram. cepa (8), bacilos Gram (+), (<i>Fictibacillus gelatini</i>), 100X.....	25
Figura 10: A: cepa (H5) “ <i>Stanieria cyanosphaera</i> ”. B: cepa (H4) “ <i>Fischerella</i> ”.....	26
Figura 11: Amplificación del gen 16S rRNA de las cepas (16, 18, 20, 25, 26, 27 y 28).....	27
Figura 12: Amplificación del gen 16S rRNA de las cepas (3, 8, 9, 10, 11, y 12).....	27
Figura 13: Fragmentos de restricción del gen 16s rRNA.....	28
Figura 14: Fragmentos de restricción del gen 16s rRNA.....	28
Figura 15: Fragmentos de restricción del gen 16s rRNA.....	28
Figura 16: Amplificación del gen 23S rRNA de ADN algae.....	30
Figura 17: Árbol filogenético (Bacterias).....	33
Figura 18: Árbol filogenético (Microalgas).....	34
Figura 19: Abundancia relativa de los filos dominantes.....	36
Figura 20: Especies dominantes (<i>Proteobacterias</i>).....	48
Figura 21: Especies dominantes (<i>Firmicutes</i>).....	49
Figura 22: Especies dominantes (<i>Bacteroidetes</i>).....	50
Figura 23: Cepario de todas las cepas aisladas.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros Físico-Químico de la fuente geotermal Chachimbiro.....	13
Tabla 2: Criterios a evaluarse de las colonias bacterianas aisladas.....	18
Tabla 3: Lista de primers usados en la amplificación del ADN de las cepas aisladas.....	20
Tabla 4: Componentes (RFLPs).....	21
Tabla 5: Lista de primers usados en la pirosecuenciación.....	22
Tabla 6: Datos de cada punto de muestreo.....	23
Tabla 7: Análisis Físico-químico, muestras de Agua Superficial de la fuente geotermal “Chachimbiro”, realizados en (CESAQ-PUCE).....	23
Tabla 8: Análisis Físico-químico, muestras de sedimento de la fuente geotermal “Chachimbiro”, realizados en (CESAQ-PUCE).....	24
Tabla 9: Fragmentos de restricción clasificados por grupos.....	30
Tabla 10: Organismo más próximo, comparación entre la secuencia consenso (Bacterias) con la base de datos “NCBI”.....	32
Tabla 11: Cepas bacterianas aisladas.....	32
Tabla 12: Organismo más próximo, comparación entre la secuencia consenso (Algas) con la base de datos “NCBI”.....	33
Tabla 13: Origen de las muestras.....	36
Tabla 14: Bacterias identificadas mediante la técnica molecular “Pirosecuenciación” presentes en la fuente geotermal Chachimbiro..	39
Tabla 15: Bacterias identificadas mediante la técnica molecular “Pirosecuenciación” presentes en la fuente geotermal Chachimbiro..	44
Tabla 16: Hongos identificados mediante la técnica molecular “Pirosecuenciación”.....	52
Tabla 17: Hongos identificados mediante la técnica molecular “Pirosecuenciación”.....	53
Tabla 18: Arqueas identificadas mediante la técnica molecular “Pirosecuenciación.....	54
Tabla 19: Arqueas identificadas mediante la técnica molecular “Pirosecuenciación”.....	55
Tabla 20: Microalgas identificadas mediante la técnica molecular	

“Pirosecuenciación”.....	56
Tabla 21: Microalgas identificadas mediante la técnica molecular	
“Pirosecuenciación”.....	57
Tabla 22: Bacterias fotosintéticas identificadas mediante la técnica molecular	
“Pirosecuenciación”.....	58

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.....	89
ANEXO B.....	91
ANEXO C.....	93
ANEXO D.....	95
ANEXO E.....	81

LISTADO DE ABREVIATURAS

ANS: Agar Nutriente Salado

LB: Luria-Bertani

pH: Potencial Hidrógeno

°C: Grados Centígrados

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

µm: Micrómetro o micra

ARN: Ácido Ribonucleico

ADN: Acido Desoxirribonucleico

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

NCBI: National Center for Biotechnology Information

Atm: atmósferas

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

%: porcentaje

BLAST: Basic Local alignment Search Tool

µL: microlitros

µM: micromolar

mM: milimolar

ng: nanogramos

SB: Stadtman-Barker

BT: Barker-Taha

pb: pares de bases

T: temperatura m

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

h: horas

mL: mililitros

RESUMEN

El Ecuador está ubicado en una zona volcánica con fallas geológicas, generando roturas a lo largo de las capas subterráneas, originando las fuentes geotermales. Este trabajo se enfocó en el aislamiento e identificación de microorganismos presentes en la fuente geotermal de Chachimbiro, provincia de Imbabura, Ecuador. La temperatura y pH in-situ de la terma fue de aproximadamente de 58°C y 7.5, respectivamente. Las muestras recolectadas se sometieron a análisis fisicoquímicos. Se obtuvo crecimiento in vitro para bacterias y microalgas, no así para hongos. Se amplificó los genes 16S rRNA y 23S rRNA, además se realizó el análisis del polimorfismo de longitud de fragmento (RFLPs). Finalmente, se secuenciaron los productos de PCR. Además se extrajo ADN genómico de muestras de agua y sedimento y se desarrolló la técnica molecular de pirosecuenciación de la comunidad bacteriana, microalgal, arqueas y hongos. Se identificaron seis cepas bacterianas, cinco a nivel de especie *Anoxybacillus gonensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Fictibacillus gelatini* y una cepa a nivel de género: *Bacillus* sp., así como cinco microalgas. Mediante la pirosecuenciación, los filos bacterianos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* fueron predominantes. El filo *Cyanobacteria* fue el grupo con mayor número de OTUs y dentro del dominio arquea, los filos *Euryarchaeota* y *Thaumarchaeota* fueron los más significativos. Se obtuvieron cinco filos *Gomeromycota*, *Cryptomycota*, *Mucoromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota* dentro del reino Fungi.

PALABRAS CLAVE:

- FUENTE GEOTERMAL,
- MICROBIOLOGÍA
- GEN 16S RRNA
- GEN 23S RRNA
- TERMÓFILO

ABSTRACT

Ecuador is located in a volcanic zone with geological faults, generating ruptures along the underground layers, originating the geothermal sources. This project focused on the isolation and identification of the microorganisms present in Chachimbiro geothermal spring, located in the province of Ibarra, Ecuador. Temperature and pH from Chachimbiro geothermal spring were approximately 58 ° C and 7.5, respectively. The collected samples were subjected to physiochemical analysis. Bacteria and microalgae growth in vitro was obtained, whereas not for fungi. There were amplified 16S rRNA and 23S rRNA genes with an additional assay of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Finally, the PCR products were sequenced. Genomic DNA was also extracted from water and sediment samples for molecular pyrosequencing of bacteria, microalga, archaea and fungi. Six bacterial strains were obtained. Five at the species level: *Anoxybacillus gonensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus caldxylosilyticus*, *Fictibacillus gelatini*, and one strain at the genus level: *Bacillus* sp. Also five microalgae were identified. By means of the pyrosequencing, bacterial phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were predominant. Phylum *Cyanobacteria* was the group with the highest number of OTUs and within the archaic domain, the Euryarchaeota and Thaumarchaeota phyla were the most significant. Five phyla Gomeromycota, Cryptomycota, Mucoromycota, Basidiomycota and Ascomycota were obtained within the Fungi kingdom.

KEYWORDS:

- **GEOTHERMAL SPRING**
- **MICROBIOLOGY**
- **16S RRNA GENE**
- **23S RRNA GENE**
- **THERMOPHILE**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Las fuentes geotermales en el Ecuador se deben a que está ubicado en el Cinturón de Fuego del Pacífico. Se han realizado estudios fisicoquímicos de las aguas geotermales; sin embargo, no hay registros de estudios realizados referentes al aislamiento de microorganismos mediante técnicas microbiológicas y moleculares.

En las últimas décadas se ha evidenciado el interés por el estudio de la biodiversidad de ambientes extremos, con el fin de explorar las características que les permite sobrevivir a los microorganismos termófilos (*Solanki & Gupta, 2013*).

La gama de condiciones como la temperatura, concentraciones de minerales, acidez y presión, hace posible el crecimiento de los extremófilos en las fuentes geotermales de Chachimbiro, por lo que en este estudio, se determinará su presencia.

1.2 Justificación del problema

Se han realizado varias investigaciones en el mundo sobre microorganismos termófilos en fuentes geotermales, brindando información de las condiciones extremas donde habitan. Los primeros estudios fueron establecidos por Thomas Brock en el Parque Nacional de Yellowstone desde 1968 a 1978 (*Ward M. , 2005*), pero también se reportaron estudios similares en la misma fecha en países como China, Arabia Saudita, La India, etc (*Yun, 1986*) (*Zhong , Cheng , & Li , 1982*).

El Ecuador está ubicado en una zona volcánica con fallas geológicas, generando roturas a lo largo de las capas subterráneas, donde el agua puede introducirse y al ser calentada asciende a la superficie dando lugar a la formación de fuentes geotermales (*Andrade, Pereira Jr, & Antranikian, 1999*). En el Ecuador se han realizado análisis fisicoquímicos de las aguas geotermales (*Rodríguez & Vallejo , 2007*), sin embargo aún no se han desarrollado estudios microbiológicos y moleculares.

En la actualidad, las industrias necesitan que sus procesos sean más eficientes y rápidos, además de que sean realizados en condiciones extremas, por ello es importante el aislamiento de nuevos microorganismos con el fin de obtener moléculas termoestables, que ayuden a proveer al mercado biotecnológico (*Borja, J. , Zavaleta, A, & Izaguirre, 2013*).

El aislamiento y estudio de los termófilos ha tenido un impacto en las últimas décadas dado a sus potenciales aplicaciones en la industria y el ambiente, por lo que en esta investigación, se analizarán aspectos microbiológicos y moleculares, con el propósito de obtener un registro en el país (*Andrade, Pereira Jr, & Antranikian, 1999*).

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

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

1.3.2 Objetivos específicos

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

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Microorganismos extremófilos

Tienen la capacidad de prosperar en ambientes extremos, tales como las fuentes hidrotermales, dado que viven en ambientes con condiciones de temperatura, acidez, presión y hábitats con altas concentraciones de compuestos, ya que tienen la destreza para absorber iones metálicos o tolerar escenarios hipersalinos (*Duran, y otros, 2009*).

La gama de estas condiciones no hace posible la vida para la gran mayoría de organismos en la tierra (*Rodríguez C. , 2005*).

A los microorganismos extremófilos presentes en las fuentes geotermales se los puede aislar a partir de muestras de agua y sedimento. Las condiciones de incubación deben ser similares a las del sitio de origen, ya que la mayoría de microorganismos ambientales no son cultivables, se estima que solo un porcentaje pueden ser cultivables, por ejemplo solo el 0,25% en agua fresca, 0,001-0,1% en el agua marina, 0,3% en el suelo y 0,25% en sedimentos, son favorables para el crecimiento en cultivos (*Amann, Ludwig, & Schleifer, 1995*).

1.4.2 Características

Las condiciones de temperaturas para el crecimiento de microorganismos termófilos oscilan entre 45°C y 80°C, mientras que para hipertermófilos están por encima de 80°C (*Rodríguez C. , 2005*).

Los extremófilos son de gran interés, ya que sobreviven a hábitats extremos, al igual que los procesos metabólicos que utilizan para obtener energía y estabilidad macromolecular. La tasa de crecimiento de los termófilos es rápida, pero de corta duración dependiendo de los minerales que se encuentren, por ejemplo los microorganismos que se desarrollan en fumarolas, chimeneas hidrotermales y bacterias metanogénicas (*Oliart, Manresa, & Sánchez, 2016*).

La membrana celular de los termófilos es rica en lípidos saturados. En cuanto a las proteínas, poseen mayor estabilidad por la gran cantidad de enlaces covalentes e interacciones hidrofóbicas. Además tienen enzimas termoresistentes, lo que les ayuda a trabajar en condiciones extremas (*Oliart, Manresa, & Sánchez, 2016*).

1.4.3 Clasificación

1.4.3.1 Temperatura

Según (*Rodríguez, Corral, & Linares, 2006*) *Rodríguez et al., 2006*, los microorganismos termófilos presentan un margen de temperaturas en el cual pueden

crecer (Bacteria, Archaea y Eucaria), por ende se los puede clasificar en termófilos entre los 45-80°C y los hipertermófilos, de 80-113°C.

Los procariotas son más tolerantes a las altas temperaturas a diferencia del dominio Eukaria. Según Meheshwari *et al.*, 2000 el dominio Eukaria pueden resistir hasta los 61°C. Se ha observado que la temperatura óptima de algunos hongos como *Myceliophthora heterothallica*, *Thermomyces dupontii*, es de 45°C (de Oliveira, Gomes, & Rodrigues, 2015).

1.4.3.2 pH

Los microorganismos extremófilos crecen en un rango determinado de pH, que dependerán del hábitat y concentraciones de sales. Hay que destacar que el pH en el interior de la célula es aproximadamente neutro (Cárdenas, y otros, 2006).

Los acidófilos crecen en un pH óptimo de 2 a 3, oxidan el azufre del ácido sulfúrico como fuente de energía, por lo que se requiere que el microorganismo pueda adaptarse a pH bajos (Cárdenas, y otros, 2006).

Los alcalófilos se desarrollan en rangos de pH comprendidos entre 8,5 – 11, generalmente los ambientes donde crecen son lugares muy básicos, como lagos sódicos o suelos muy carbonatados. Los alcalófilos obligados y facultativos necesitan un pH elevado para sobrevivir, aunque los facultativos también crecen en ambientes neutros. *Bacillus Spirulina* y arqueas-haloalcalófilos necesitan altas cantidades de sal para subsistir (Cárdenas, y otros, 2006).

1.4.3.3 Salinidad

Las concentraciones de sales en el hábitat afectan directamente al crecimiento de microorganismos termófilos, por lo que se puede clasificarlos por el porcentaje de sales que presentan.

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

Según Islas *et al.*, 2007 se ha demostrado que la salinidad tiene un efecto supresor sobre los mesófilos. Sin embargo, los termófilos extremos parecen ser de carácter halófilo, ya que podrían funcionar eficientemente bajo ciertas condiciones salinas.

1.4.3.4 Presión

Las altas presiones son condiciones que difieren de otros hábitats, como por ejemplo las profundidades del mar, donde la presión es elevada (300 atm). Los microorganismos que se encuentran en estos ambientes se los puede clasificar en barotolerantes (toleran presiones hasta 400 atm) y barófilos (crecen óptimamente a 400 atm) (*Castillo, y otros, 2005*).

1.4.4 Identificación de microorganismos mediante técnicas independientes de cultivo

Las técnicas moleculares se basan en los principios de aislamiento de ADN, así como su visualización, corte de fragmentos o polimorfismos y la amplificación de regiones conservadas y no conservadas. Los métodos moleculares han ayudado a reconocer la mayoría de microorganismos presentes en los ambientes naturales, tomando en cuenta que solo el 1 % de los microorganismos son cultivables (*Jan & Le Borgne, 2001*).

Las herramientas moleculares especialmente la amplificación de regiones del ácido nucleico por la técnica de PCR y la comparación de secuencias en bases de datos, han precisado los estudios en la biodiversidad, taxonomía, evolución y conservación de especies. Cada día sigue implementándose o incorporando nuevos métodos para el estudio del ADN (*Anderson & Cairney, 2004*).

1.4.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN es el primer paso de cualquier técnica molecular, en la actualidad el avance de la tecnología ha permitido que este proceso sea más sencillo. La calidad del ADN genómico depende del método que se utilice, ya que se producen degradaciones parciales de acuerdo al tampón en el que se suspenda el ADN o la duración de los protocolos (*De Armas & Bisset, 2005*).

Según (*Kang & Yang, 2004*) hay parámetros que afectan y mejoran el rendimiento de la extracción del material genético. Por ejemplo, el empleo de nitrógeno líquido como variante de algunos protocolos de extracción, ha aumentado el rendimiento y la calidad del ADN (*De Armas & Bisset, 2005*).

1.4.4.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa PCR es una técnica descubierta por Kary Mullis en el año 1986, que permite amplificar el mayor número de fragmentos de ADN, partiendo de la copia original. Este método tiene diferentes aplicaciones, por ejemplo, posee una alta probabilidad para identificar virus o bacterias causantes de algunas enfermedades (*Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013*).

La PCR se fundamenta en la enzima ADN polimerasa, ya que se encarga de sintetizar la cadena complementaria en sentido 5' → 3' teniendo una cadena molde. Los primers o cebadores se unen a la secuencia complementaria molde y para ello es necesario una serie de cambios repetitivos de la temperatura (*Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013*).

1.4.4.3 Gen ribosomal 16S

El ribosoma bacteriano tiene una subunidad 50S y una subunidad pequeña 30S. La subunidad pequeña codifica el gen 16S ARN ribosomal. La secuencia del gen 16S rARN se utiliza para reconstrucción de las filogenias, debido a las bajas tasas de evolución. Es un gen presente en todos los procariotes que sirve para el estudio de las filogenias bacterianas y la taxonomía, ya que este gen se encuentra a menudo como una familia multigénica. Otra de las razones de estudio es por su tamaño de 1500 pb (pares de bases), lo suficientemente grande para los propósitos informáticos (*Herrera, 2005*). El segmento que codifica el gen 16S rARN posee zonas específicas y son altamente conservadas (**Figura 1**).

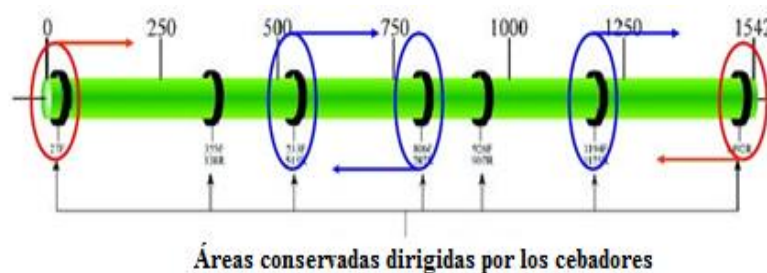


Figura 1. Gen 16S rARN (*Blaschke, y otros, 2007*).

1.4.4.4 23S rRNA

El gen 23S rARN tiene un tamaño aproximado de 2,9 Kb, el doble de tamaño del gen 16S rRNA, el cual puede brindar mayor información de las relaciones filogenéticas. Este gen se ha utilizado en investigaciones para determinar la secuencia completa de una alga azul-verde *Anacystis nidulans* según (*Sallen, y otros, 1996*).

1.4.4.5 Gen ITS

ITS (Internal Transcribed Spacer) se refiere a un segmento del genoma situado entre la pequeña subunidad del ARN ribosomal (rARN) y subunidad grande. En bacterias y arqueas este gen se ubica entre el gen 16S y 23S rARN. Por otro lado, hay dos ITS en eucariotes; ITS1 está situado entre 18S y 5.8S rARN, mientras que el ITS2 se originó como una inserción que interrumpe el gen 23S rARN ancestral y está situado entre 5.8S y 25S (*Schoch, y otros, 2012*).

La comparación de secuencias de la región ITS es ampliamente utilizada en la taxonomía y filogenia molecular, debido a que es fácil amplificar e incluso de pequeñas cantidades de ADN (debido al número elevado de copias de genes de rARN). También se utiliza este segmento genómico, ya que posee regiones menos conservadas y son aprovechadas para estudios comparativos entre especies (*Schoch, y otros, 2012*).

1.4.4.6 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

El análisis del polimorfismo de longitud de fragmento (RFLP) mide secuencias de ADN que contienen fragmentos cortos y específicos que varían de organismo a

organismo. Las enzimas de restricción (endonucleasas) son necesarias para esta técnica molecular, ya que una endonucleasa puede producir un gran número de cortes en puntos específicos. Los fragmentos resultantes se agrupan mediante la detección de fragmentos de ADN o de longitudes diferentes, al realizarse una electroforesis (Colleen , y otros, 2013).

La técnica RFLP ha sido de gran ayuda para el diagnóstico de mutaciones puntuales, causadas por el cambio de un solo nucleótido o por la alteración de un número reducido de bases nitrogenadas (deleciones o inserciones) (Colleen , y otros, 2013).

1.4.4.7 Secuenciación Sanger

El método Sanger consiste en la secuenciación del ácido nucleico, que se fundamenta en la introducción selectiva de dideoxynucleótidos (carecen de grupo hidroxilo del carbono 3'), de manera que cuando se incorporan los dideoxynucleótidos, se bloquea la adición de nucleótidos y la cadena de ADN no puede continuar alongándose. La secuenciación Sanger fue desarrollada por Frederick Sanger y sus colegas en 1977. Desde entonces, este método es utilizado ampliamente para proyectos de menor escala y para la obtención de lecturas de secuencia de ADN contiguas (> 500 nucleótidos) especialmente largas (Margulies, y otros, 2005) (Figura 2).

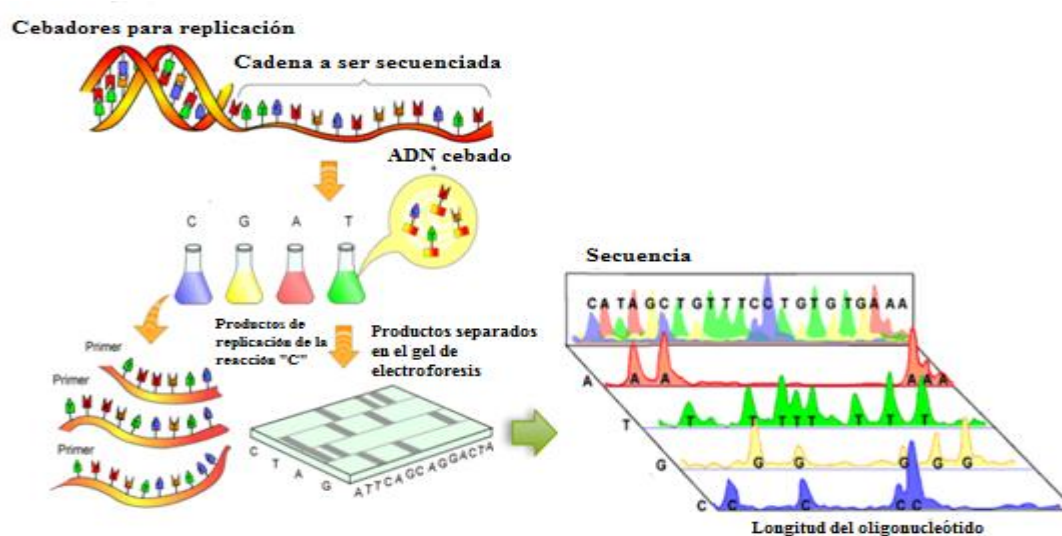


Figura 2. Secuenciación Sanger (Kae, 2003).

1.4.4.8 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método de secuenciación de ADN, en base a la "secuenciación por síntesis" ya que la síntesis de ADN se controla en tiempo real. La técnica fue desarrollada por Mostafa Ronaghi y Pal Nyrén en el Instituto Real de Tecnología en Estocolmo en 1996. Se fundamenta en la detección de la liberación de pirofosfato cuando se incorporan los nucleótidos. Después de que un oligonucleótido se hibrida a la plantilla de ADN a secuenciar, la ADN polimerasa sintetiza el ADN extendiendo el extremo de la hebra naciente utilizando la información codificada en la cadena de plantilla. Cuando se inyecta el dNTP complementario correcto y añadido por la polimerasa, el pirofosfato inorgánico (PPi) es liberado durante la reacción de condensación (*Colleen , y otros, 2013*).

A través de dos reacciones, el pirofosfato se convierte en trifosfato de adenosina (ATP), un cofactor para la enzima luciferasa. Así, la emisión de luz es proporcional a la cantidad de Pirofosfato producido, que es directamente proporcional al número de nucleótidos añadidos. La secuencia de ADN deseada es capaz de ser determinado por la luz emitida tras la incorporación de nucleótidos complementarios (*Colleen , y otros, 2013*).

La pirosecuenciación ha abierto nuevas posibilidades para realizar el análisis del ADN, por lo que se ha empleado para conocer la diversidad de las comunidades bacterianas a través de las huellas moleculares que codifican los genes de regiones conservadas (Nakayama, 2010), por ejemplo se ha utilizado para detectar comunidades bacterianas en suelos de cultivo (*Guerrero L. D., 2012*).

1.4.4.9 Alineamiento de Secuencias

El alineamiento de secuencias consiste en comparar dos o más secuencias de ADN, ARN o proteínas (estructura primaria), para resaltar las similitudes, mediante la búsqueda de patrones o zonas de similitud. Hay diferentes tipos de alineamientos, el alineamiento múltiple de secuencias, para comparar varias secuencias biológicas e identificar las regiones conservadas, ya que hipotéticamente pueden compartir un

linaje y originarse de un ancestro en común. El alineamiento múltiple de secuencias utiliza algoritmos computacionales complejos, debido a que es muy complicado el alineamiento manual (*Duret & Abdeddaim, 2000*).

El método de alineamiento de secuencias más utilizado “Clustalw” se basa en el análisis de técnicas multivariantes para clasificar a un conjunto de sujetos en grupos homogéneos (*Rucci, 2013*).

El BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local) es programa bioinformático que utiliza algoritmos para comparar secuencias biológicas ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El BLAST es un programa de gran utilidad ya que permite comparar una secuencia problema o secuencia “query” con una biblioteca o base de datos (*Nojima, 2005*).

1.4.4.10 Árboles filogenéticos

Un árbol filogenético es un diagrama que indica las relaciones evolutivas inferidas entre diversas especies biológicas, basadas en las similitudes del material genético. De acuerdo a la estructura de un árbol filogenético (arraigado), cada nodo representa el ancestro más común. Cada nodo se llama una unidad taxonómica operativa (OTU), los nodos internos se denominan generalmente unidades taxonómicas hipotéticas, ya que no pueden observarse directamente (*Heller, Purves, & Savada, 2009*).

Los árboles filogenéticos en el campo de la biología y bioinformática han proporcionado información sobre las relaciones evolutivas entre poblaciones (*Heller, Purves, & Savada, 2009*).

1.4.5 Aplicaciones

El aislamiento de microorganismos termófilos ha ido creciendo en las últimas décadas dado a sus potenciales aplicaciones en la industria y en el ambiente. En el campo biotecnológico, el descubrimiento de biomoléculas resistentes a altas temperaturas (enzimas termoestables como Taq polimerasa necesaria para las técnicas de PCR) han sido de gran ayuda para el estudio del material genético. Las enzimas

termoestables son importantes, ya que pueden ser utilizadas en la medicina como biocatalizadores (*Guerrero, Egea, & Martínez, 2013*).

Las enzimas termoestables de los microorganismos termófilos tienen infinitas aplicaciones, por ejemplo han ayudado a cultivos de plantas a soportar condiciones con alto estrés salino, ya que los suelos de hoy en día tienen un exceso de radicales NaCl, lo que ha mejorado su crecimiento (*Abdelkader & Esawy, 2011*). También se ha encontrado que los microorganismos termófilos pueden sintetizar biopolímeros fáciles para su biodegradación, regulando la contaminación medio ambiental (*Reddy, y otros, 2014*).

1.5 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

El agua y sedimentos provenientes de la terma de Chachimbiro contiene bacterias, microalgas y hongos termófilos.

CAPÍTULO: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El proyecto de tesis fue desarrollado por Freddy David Moposita Molina, con la colaboración de Andrés Izquierdo Ph.D. Director del Proyecto y Alma Koch M.Sc, Asesora Científica.

2.2 Zona de Estudio

Los estudios se realizaron en campo y laboratorio:

2.2.1 Fase de campo

La fase de campo se llevó a cabo en el complejo turístico “Chachimbiro”, en la provincia de Imbabura, cantón Urcuquí, al noroeste del Ecuador. Latitud: $0^{\circ}27'37.26''$ S; Longitud: $-78^{\circ}14'14.63''$ O, Altura Media: 3050 m.s.n.m.

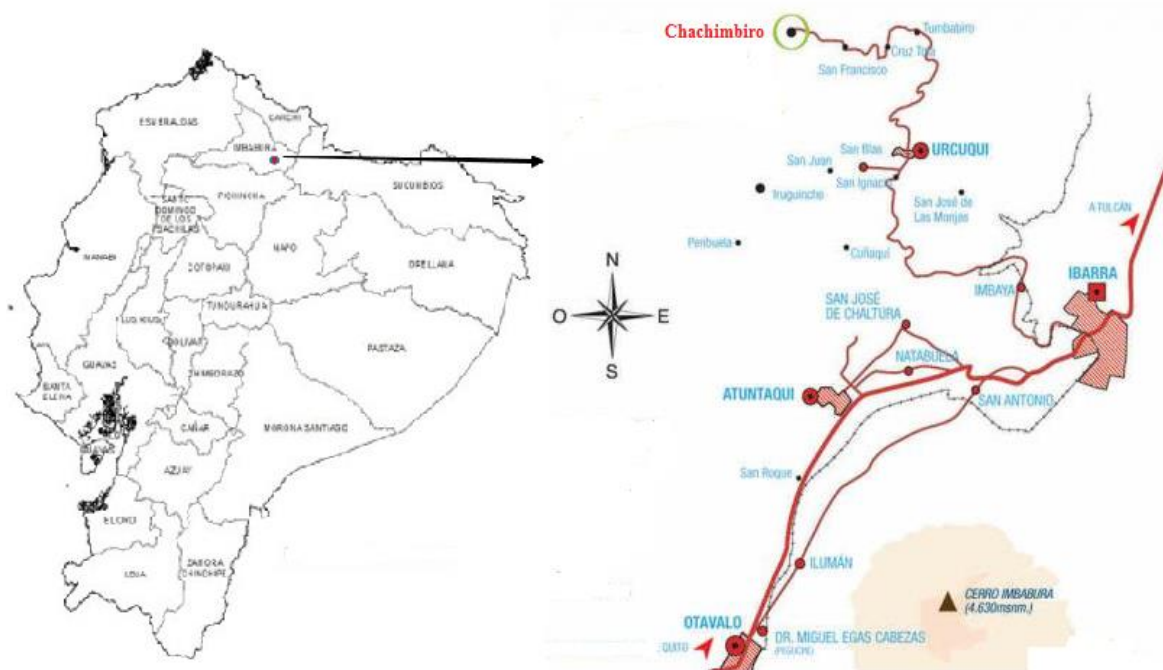


Figura 3. Fuente geotermal “Chachimbiro” (Santagua, 2017).

2.2.2 Termas Chachimbiro

Las Termas Chachimbiro se encuentran ubicadas en la Provincia de Imbabura, cantón Urcuquí, al noroeste del Ecuador. La temperatura varía entre los 45 y 60°C, dependiendo el origen de la fuente geotermal “ojo de la terma”. El complejo turístico “Termas Chachimbiro” es un atractivo nacional conocido por las propiedades medicinales del agua (*Brígida & Vallejo, 2007*).

En estudios realizados en la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE se ha descrito que las aguas termales de Chachimbiro contienen altas concentraciones de arsénico, bicarbonatos, carbonatos y bajas concentraciones de magnesio (**Tabla 1**). El pH del agua oscila entre 7 y 8 (*Brígida & Vallejo, 2007*).

Tabla 1

Parámetros Fisicoquímico de la fuente geotermal Chachimbiro según (*Brígida & Vallejo, 2007*).

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

2.2.3 Fase de laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE ubicado en la Av. El Progreso s/n, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador.

2.3 Periodo de investigación

El proyecto contempló los meses desde abril del 2016 hasta abril del 2017.

2.4 Procedimientos de aislamiento

2.4.1 Preparación de medios de cultivo

Para la toma de muestras, se prepararon diferentes medios de cultivo líquidos dependiendo del microorganismo. Se preparó caldo M9, rico en nutrientes, lo que les permite a las bacterias tener tasas de crecimiento más altas (Setlow & Carrier, 1964), mientras que para hongos se utilizó medio PDB más cloranfenicol. El agar de papa y dextrosa PDA es utilizado para el desarrollo de hongos, además que contiene nutrientes, lo que le permite la esporulación del mismo, por lo general, los medios se utilizan en conjunto con antibióticos (cloranfenicol) para impedir el crecimiento bacteriano (Gonçalves, 2007).

Respecto a las muestras de microalgas, se utilizó el medio BG11, rico en nitratos, fosfatos y carbono, lo que favorece al crecimiento de algas fotoautótrofas y cianobacterias (Gómez, y otros, 2009).

Cada medio líquido preparado se ajustó a un pH de 7, el cual se aproxima a las aguas de Chachimbiro. Los componentes de cada medio de cultivo se presentan en el **Anexo C**.

2.4.2 Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en el “Ojo de la fuente termal de Chachimbiro”, ubicada al noreste de la provincia de Imbabura, cantón Urcuquí. Se analizaron dos puntos de muestreo, en los cuales se localizó el ojo de las fuentes geotermales.

El punto P1 se encuentra a unos 300 metros del complejo turístico de Chachimbiro, donde el ojo de la terma está delimitado por una estructura o caja de concreto, construido por los moradores (**Figura 4**). El ojo de la fuente geotermal del P2 está ubicado en la superficie de una roca, localizada a unos 200 metros del complejo

turístico (**Figura 5**). El pH y la temperatura en el punto P1 fueron aproximadamente de 7.28, 58.8 °C respectivamente, mientras que en el punto P2 fueron de 7.7, 56 °C, respectivamente. Las muestras del punto P1, presentaron mayores cantidades de sedimento a comparación del punto P2, lo que facilitó la toma de muestras.



Figura 4. Ojo de la terma del punto P1. El pH y la temperatura fueron aproximadamente de 7.28, 58.8 °C respectivamente.

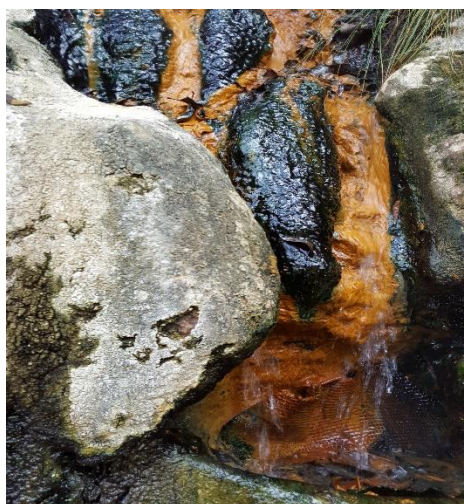


Figura 5. Ojo de la fuente termal del punto P2. El pH y la temperatura fueron aproximadamente de 7.7, 56 °C respectivamente.

Las muestras de agua y sedimento de los puntos P1 y P2 fueron recolectados en tubos falcon de volumen de 50 mL para el análisis microbiológico. Con la ayuda de hisopos estériles se recogió los sedimentos en tubos de 20 mL adicionado con caldo M9, previamente autoclavado. Para hongos se utilizó caldo PDB, mientras que para

algas se recolectó las muestras de agua en frascos de 1000 mL. También se tomó muestras de sedimento en fundas ziplox aproximadamente 2 Kg y tres litros de agua para los análisis físicoquímicos y moleculares. (Setlow & Carrier, 1964). Los análisis físicoquímicos se realizaron en el Centro de Servicios Ambientales y Químicos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador CESAQ-PUCE.

2.4.3 Procesamiento de las muestras

Se tomó 1 mL de las muestras recolectadas y se depositó en medios agar LB y R2A, posteriormente se realizó un extendido en toda la caja Petri con la ayuda de un triángulo de Bigrals. Además los tubos que contenían hisopos más caldo M9, fueron sembrados por estrías en medios LB y R2A y se incubaron a la temperatura de la terma 58°C por 48 horas (*Luna & Fontalvo, 2012*).

El medio R2A se utiliza para bacterias de lento crecimiento o estresadas, ya que los niveles bajos de nutrientes, junto con la adición de piruvato de sodio, mejoran su recuperación (*Latorre, 2007*).

Para el aislamiento de hongos se utilizó cajas Petri con medio agar PDA y cada caja se mantuvo a la temperatura de la terma de 58°C por 96 horas (*Islas, y otros, 2007*).

El aislamiento de algas consistió en agregar tres gotas de inóculo en cajas Petri con medios BG11 y algae, luego se esparció con una varilla de vidrio previamente esterilizada y finalmente se mantuvieron en una cámara artesanal con iluminación entre 20000 – 10000 lux mediante fotoperiodos de 24 h de luz y 24 h de oscuridad (*Soto, y otros, 2009*).

2.4.4 Obtención de cultivos puros

Se procedió a aislar colonias bacterianas mediante el método de siembra por estrías, luego se resembró en un nuevo medio estéril hasta que la cepa se encuentre pura (*Islas, y otros, 2007*). Para la obtención de colonias puras de microalgas, las cajas

Petri se observaron al microscopio óptico y con la ayuda de un asa se seleccionaron las mejores colonias (*Naranjo , 2016*).

2.4.5 Determinación de las características macroscópicas del cultivo

Los criterios a evaluarse para las colonias bacterianas fueron: pigmentación, aspecto, borde, elevación y forma.

Las principales características para la descripción macroscópica de hongos es observar la forma, tamaño y tipo de colonia, así como el aspecto y color del micelio (algodonoso, aterciopelado, veloso, aéreo o pegado al medio) (*Arias et al., 2008*).

Para la determinación de las características macroscópicas de microalgas se tomó en cuenta dos aspectos como: la descripción de la colonia y color del microorganismo (*Bellinger & Sige, 2010*).

2.4.6 Determinación de las características microscópicas del cultivo

A las cepas bacterianas aisladas se les realizó tinción Gram (*Islas, y otros, 2007*). Para la caracterización microscópica de microalgas se analizó el filo, estructura simple (unicelular) o filamentosa con o sin ramificaciones, presencia de vaina y diferenciación de células (presencia de heterocistos y acinetos), mediante claves taxonómicas (*Naranjo, 2016*). Los heterocistos son células especializadas que fijan nitrógeno, mientras los acinetos se originan de células vegetativas en condiciones ambientales no adecuadas (*Nichols & Adams, 1982*).

2.4.7 Preparación del cepario

Aisladas las cepas en medios de cultivo, se procedió a tener un registro. Primero se obtuvo el crecimiento del microorganismo aislado en un medio de cultivo líquido, luego en tubos ependorf (2mL) se colocó unos 800 µL de medio inoculado, con 200 µL de glicerol previamente esterilizado. A cada tubo se le asignó una nomenclatura y finalmente se les mantuvo una temperatura de -20°C por una semana. Transcurrida la semana, se sacaron los tubos y se los guardó a -80°C.

2.5 Extracción de ADN

Se utilizaron diferentes tipos de metodologías para la extracción de ADN, dependiendo del tipo de muestra. Para la extracción de ADN de cultivos bacterianos, se realizó el crecimiento de la cepas en cajas Petri o en medios líquidos, posteriormente se utilizó el protocolo descrito por Moore *et al.*, 2008. Mientras que para la extracción de ADN de microalgas se trabajará con el método basado en la ruptura con perlas de vidrio descrito por (Cai & Wolk, 1990).

Para la extracción de ADN genómico de las muestras de agua y sedimento se utilizó un kit comercial (Power soil y water DNA isolation de la casa comercial “MO BIO”).

Finalmente, se determinó la calidad y concentración de ADN en el NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer.

2.6 Amplificación de gen 16S rRNA mediante PCR

Se realizó la amplificación del gen 16S rARN presente en el ADN bacteriano, utilizando los primers 27F y 1492R Magee, 1993 y Lane, 1991. Para las reacciones de PCR se trabajó con el kit GoTaq® Green Master Mix. La preparación de la master mix constó de los siguientes componentes: 12.5 µL de kit GoTaq® Green Master Mix, 1,25 µL de primer 27F, 1,25 µL de primer 1492R, 7,5 de agua ultrapura y 2,5 µL de ADN bacteriano, dando un volumen total de 25 µL. Las condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S fueron: fase de desnaturalización fue 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, fase de hibridación fue a 55 °C por 1 min, mientras que la fase de extensión fue a 72°C por un 1 min, seguido de 72°C por 7,5 min. Por último se mantuvo a 4°C. Los primers utilizados para la amplificación del AND genómico se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2

Lista de primers usados en la amplificación del ADN de las cepas aisladas.

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5'—3')</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Tamaño del DNA amplificado</i>	<i>Referencia</i>
23S rRNA	<i>p23SrV_f1</i>	GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA	Alga	~410pb	<i>(Sherwood & Presting, 2007)</i>
	<i>p23SrV_r1</i>	TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG	Alga		
16S rRNA	<i>27F</i>	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Bacteria	~1500pb	<i>(Felföldi, y otros, 2009)</i>
	<i>1492R</i>	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	Bacteria		

Realizada la amplificación del gen 16S rARN, se observó el amplicón mediante una corrida de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El marcador molecular utilizado fue Labnet de 250-3000 bp.

2.7 Amplificación de gen 23S

Se realizó la amplificación del gen 23S rRNA para algas utilizando los primers *p23SrV_f1* y *p23SrV_r1* (*Sherwood & Presting, 2007*). La preparación de la master mix constó de 12.5 µL de kit GoTaq® Green Master Mix, 1,25 µL de primer *p23SrV_f1*, 1,25 µL de primer *p23SrV_r1*, 7,5 de agua ultrapura y 2,5 µL de ADN, dando un volumen total de 25 uL. Las condiciones de PCR para la amplificación del gen 23S fueron: fase de desnaturalización 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 20 s a 94°C, fase de hibridación fue a 55°C por 1 min, mientras que la fase de extensión fue a 72°C por un 1 min, seguido de 72°C por 20 min. Por último se mantuvo a 4°C.

2.8 Análisis de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Obtenidos los productos de PCR, se desarrollo el análisis del polimorfismo de longitud de fragmento (RFLPs), utilizando la enzima de restricción *MspI* (BioLabs). Esta enzima realiza cortes mediante el reconocimiento de fragmentos CCGC en la hebra superior y GGCC en la hebra inferior (*Tobler & Benning, 2011*).

De acuerdo al protocolo (*Adley, 2006*), se preparó las soluciones para un volumen total de 20 μL , con los componentes de acuerdo a la **Tabla 3**.

Tabla 3

Componente	Volumen (μL)
10X NE buffer	2,00
BSA 100X	0,20
MspI	0,25
Agua ultra pura	7,55
Producto de PCR	10,00
Volumen final	20,00

Se prepararon las soluciones de acuerdo a la **tabla 3**, luego se los dejó incubar a 37 °C por 2 h. Por último se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 1%, con el propósito de agrupar los fragmentos de acuerdo a la longitud y se observaron los patrones de cada cepa (*Tobler & Benning, 2011*).

2.9 Secuenciación

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados al Centro de Investigaciones “Macrogen” Corea, donde fueron purificados y secuenciados. Se envió 20 μL de cada amplicón con una concentración de 100 ng/ μL , además se envió 25 μL de cada primers (primers para el gen 16s rRNA y el gen 23S) (**Tabla 2**) a una concentración de 10 pmol/ μL .

2.10 Pirosecuenciación

El ADN genómico extraído tanto de las muestras de agua como del sedimento fueron enviados a la compañía “MR DNA- E.E.U.U”, donde se realizó la pirosecuenciación del ADN genómico. Cada muestra enviada contenía un volumen de 20 μL a una concentración entre 15-20 ng/ μL (como mínima). De igual manera, se envió 25 μL de cada primers a una concentración de 10 pmol/ μL . Los primers utilizados se puede observar en la **Tabla 4**

Tabla 4

Lista de primers usados en la pirosecuenciación

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5'—3')</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Tamaño del DNA amplificado</i>	<i>Referencia</i>
23S rRNA	p23SrV_f1	GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA	Alga	~410pb	(Sherwood & Presting, 2007)
	p23SrV_r1	TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG	Alga		
16S rRNA	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Bacteria	~1500pb	(Felföldi, y otros, 2009)
	519R	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	Bacteria		
ITS	ITS1F-Bt1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Hongos	~650pb	(White, Bruns, Lee, & Taylo, 1990)
	ITS1F-Bt1	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Hongos		
Archaeal 16S	Archea349F	GYGCASCAGKCGMGAAW	Arquea	~500pb	(Lane, 1991)
	Archea806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	Arquea		

Y= C ó T; K= G ó T; M= A ó C; N= A ó C ó G ó T

2.11 Análisis de secuencias

Con la ayuda del programa Geneious R9.1 se analizó la calidad de las secuencias de ADN enviadas por la compañía Macrogen Korea, mediante un análisis de electroferogramas (secuencias forward y reverse). Luego se ensamblaron los *contigs* y finalmente se generaron las secuencias consenso.

Obtenidas las secuencias consenso, se compararon con todas las secuencias depositadas en la base de datos (NCBI), mediante un BLASTN. Se tomaron en cuenta el grado de similitud y el porcentaje de cobertura de cada una.

2.12 Análisis filogenético

Posteriormente se utilizó el software “MEGA 7”, con el propósito de realizar un alineamiento múltiple. A cada grupo de secuencias alineadas, se les realizó una exclusión de las secuencias ambiguas mediante el programa online Gblocks (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html). Finalmente se buscaron modelos de evolución para la construcción de los árboles filogenéticos, mediante el algoritmo de máxima verosimilitud del software “MEGA 7”.

CAPÍTULO: RESULTADOS

3.1 Características de los puntos de muestreo

Se ubicaron dos ojos termales en la fuente de Chachimbiro, como puntos de muestreo. Además se midieron la temperatura, pH, altura y las coordenadas geográficas de cada uno, tal como se observa en la **Tabla 5**.

Tabla 5
Datos de cada punto de muestreo.

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

3.2 Análisis fisico-químico

En la **Tabla 6 y 7** se observan los resultados de los análisis fisicoquímicos de las muestras de agua y sedimento de la fuente geotermal Chachimbiro realizadas por CESAQ-PUCE.

Tabla 6
Análisis Fisicoquímico, muestras de agua superficial de la Fuente Geotermal “Chachimbiro”, realizados en (CESAQ-PUCE).

PARÁMETRO	MÉTODO ANALÍTICO	UNIDADES	RESULTADO
AGUAS Y SUELOS			
Arsénico	SM 3112 B /SM 3114C / CP-PEE-A009	mg/L	0,001
Cloruros	SM 4500 CI/CP-PEE-A013	mg/L	4580,7
Cobre	SM 3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	< 0,05
Conductividad Eléctrica	SM 2510 B/CP-PEE-A033	uS/cm	6500
Hierro	SM 3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	1,6
Manganeso	SM 3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	0,2
pH	SM 4500-H+ B/CP-PEE-A042	unid pH	6,5
Sólidos Sedimentables	SM 2540 F CI/CP-PEE-A061	mg/L	< 0,1
Sólidos Totales	SM 2540 B CI/CP-PEE-A063	mg/L	> 2000
Sólidos Volátiles	SM 2540 E CI/CP-PEE-A015	mg/L	220
Sólidos No Volátiles	SM 2540 E CI/CP-PEE-A015	mg/L	3360
Sodio (Subcontratado OAE LE 2C 05-002)	SM 3120 B/PEE/ANNCY/74	mg/L	> 50
Potasio (Subcontratado OAE LE 2C 005-002)	SM 3120 B/PEE/ANNCY/74	mg/L	> 50
Magnesio (Subcontratado OAE LE 2C 05-007)	SM 3111 B/MEAG-13	mg/L	> 100
Calcio (Subcontratado OAE LE 2C 05-007)	SM 3111 B/MEAG-13	mg/L	> 100
Sulfatos (Subcontratado OAE LE 2C 05-005)	EPA 375.4 SO2/PA-17.00	mg/L	44,2
Alcalinidad Total	SM 2320 B/ MEAG-54	mg/L	420

* Resultados proporcionados por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador CESAQ-PUCE.

OBSERVACIONES ANALÍTICAS

El valor se encuentra fuera del rango de acreditación:	Sólidos Totales=3984 mg/L
El valor se encuentra fuera del rango de acreditación del laboratorio:	Sodio=2187 mg/L Potasio=190 mg/L
El valor se encuentra fuera del rango de acreditación del laboratorio:	Magnesio=578,66 mg/L Calcio=122,81 mg/L

* Los valores presentados se encuentran fuera del rango establecido según el laboratorio CESAQ-PUCE.

Tabla 7
Análisis Físicoquímico, muestras de sedimento de la Fuente Geotermal
“Chachimbiro”, realizados en (CESAQ-PUCE)

PARÁMETRO	MÉTODO ANALÍTICO	UNIDADES	RESULTADO
AGUAS Y SUELOS			
Cadmio	EPA 3051/7000A /CP-PEE-S002	mg/kg	3,5
Cloruros	ASTM 1411-09/ SM 4500 CI D /CP-PEE-S009	mg/kg	2170,5
Materia orgánica	ASTM D 2974 / CP-PEE-S008	%	33,99
pH	EPA 9045 D/CP-PEE-S012	unid pH	7,5
Cobre (Subcontratado OAE LE 2C 05-002)	SM 3111 B/ PEE/ANNCY/59	mg/kg	11,7
Conductividad (Subcontratado OAE LE 2C 05-002)	SM 2510 B/ PEE/ANNCY/13	uS/cm	>2500
Potasio (Subcontratado OAE LE 2C 05-002)	SM 3120 B/ PEE/ANNCY/59	mg/kg	>500
Zinc (Subcontratado OAE LE 2C 05-002)	SM 3120 B/ PEE/ANNCY/59	mg/kg	36,8
Calcio (Subcontratado OAE LE 2C 05-007)	SM 3050 B / MESS-01	mg/kg	> 4800
Nitrógeno Total (Subcontratado OAE LE 2C 05-007)	AOAC 955.04 / MESS-03	mg/kg	< 2530
Hierro (Subcontratado OAE LE 2C 05-007)	SM 3120 B, EPA 3050B	mg/kg	>9200
Manganeso (Subcontratado OAE LE 2C 05-002)	SM 3120 B, EPA 3050B	mg/kg	338
Magnesio (Subcontratado OAE LE 2C 05-007)	MESS-01/09 / EPA 3050 B/7450	mg/kg	> 900

* Resultados proporcionados por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador CESAQ-PUCE.

OBSERVACIONES ANALÍTICAS

El valor se encuentra fuera del rango de acreditación del laboratorio:	Ca=7295 mg/kg; Fe:14378 mg/kg
El valor se encuentra fuera del rango de acreditación del laboratorio:	Mg=1764 mg/kg
El valor se encuentra fuera del rango de acreditación del laboratorio:	Conductividad=5000 uS/cm; K=3658 mg/kg

* Los valores presentados se encuentran fuera del rango establecido según el laboratorio CESAQ-PUCE

3.3 Cultivos puros obtenidos

En cuanto al aislamiento de bacterias, se obtuvieron 28 cepas termófilas, de las cuales 18 provinieron de muestras de sedimento y 10 de agua (**Anexo A.1**). La descripción de las colonias bacterianas aisladas se llevó a cabo de acuerdo a parámetros taxonómicos, descritas en el Anexo A.1. En la **figura 6** se puede observar la formación de colonias dependiendo el tipo de cepa.

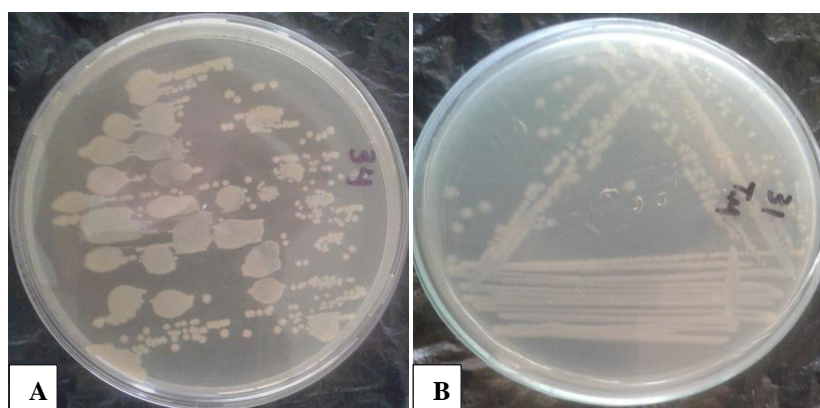


Figura 6: Cultivos puros obtenidos. **A:** Cepa (25) *Bacillus*, medio LB. **B:** Cepa (23) *Anoxybacillus gonensis*, medio LB.

En el aislamiento de microalgas se obtuvieron cinco aislados, identificados de acuerdo a las características morfológicas y moleculares. No se obtuvieron resultados para crecimiento de hongos, probablemente debido a la falta de nutrientes específicos o a la existencia de hongos no cultivables en las muestras. En la **figura 7** se observa una de las cinco cepas aisladas.



Figura 7: Cepa H5 *Fischerella*, medio BG11.

3.4 Características microscópicas de los cultivos

La descripción microscópica de las cepas bacterianas fue obtenida mediante tinción Gram y observada al microscopio óptico (**Figura 8 y 9**). Para microalgas, las cajas Petri fueron observadas directamente al microscopio óptico, realizando una caracterización morfológica, tal como se muestra en el **Anexo A.2**.

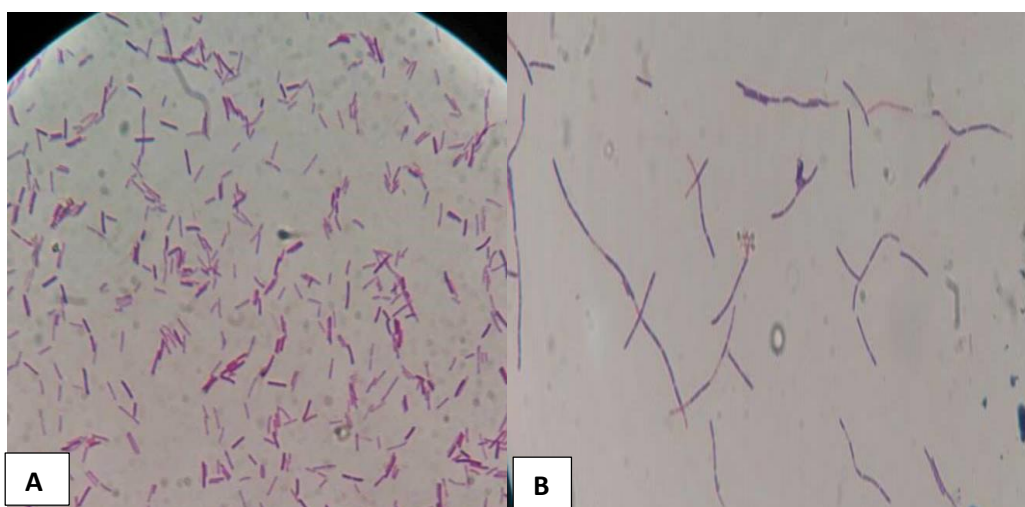


Figura 8. Tinción Gram. **A:** Cepa (25) *Bacillus*, bacilo Gram (+), 100X. **B:** Cepa (27) *Bacillus licheniformis*, bacilo Gram (+), 100X.



Figura 9: Tinción Gram. Cepa (8) *Fictibacillus gelatini*, bacilos Gram (+), 100X.

En la **figura 10** se observan las características microscópicas de las microalgas aisladas (cepa H5 y H4), en donde se consideró claves taxonómicas de microalgas para su identificación (**Anexo A.2**).

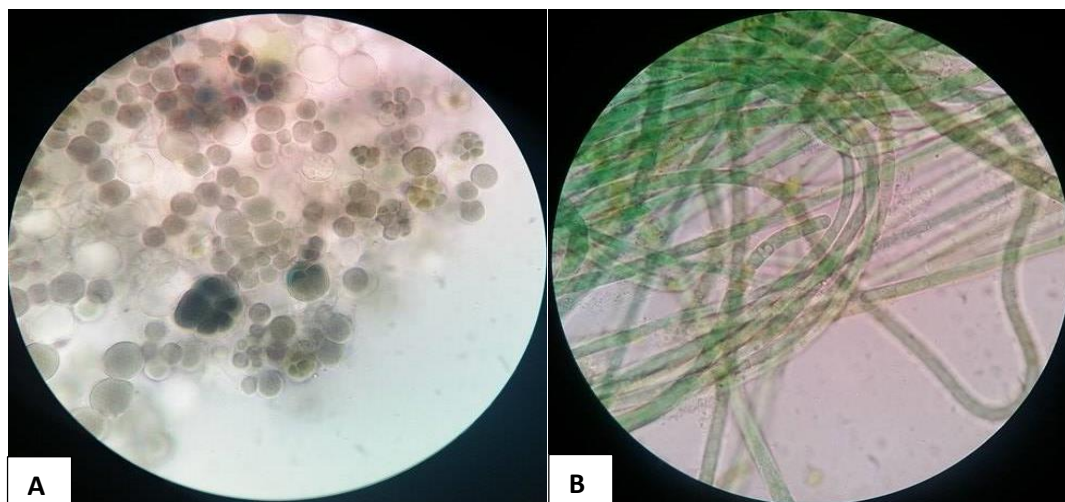


Figura 10. A: Cepa (H5) *Stanieria cyanosphaera*, 100X. B: Cepa (H4) *Fischerella*, 100X.

Los medios utilizados para el aislamiento de las cepas bacterianas y microalgas, se detallan en el **Anexo C**.

3.5 Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico de las cepas aisladas de bacterias y microalgas, al igual que de las muestras de agua y sedimento. Los datos de la concentración y pureza del ADN, se pueden observar en el **Anexo B**, así como los protocolos de extracción (**Anexo D**).

3.6 Amplificación del Gen 16S rRNA

Se amplificó el ADN de las cepas bacterianas aisladas utilizando los primers 27F y 1492R (**Tabla 2**). Se observó el fragmento amplificado mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%. Las bandas obtenidas presentaron un tamaño aproximado de 1500 pb, (**Figura 11 y 12**). Se utilizó como control positivo ADN genómico extraído de una cepa bacteriana en el Laboratorio de Microbiología Ambiental-ESPE. El marcador molecular fue Labnet de 250-3000 bp.

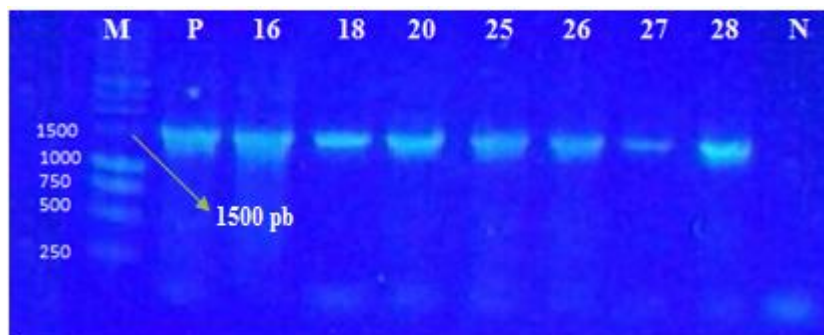


Figura 11: Amplificación del gen 16S rRNA de las cepas (16, 18, 20, 25, 26, 27 y 28). (N= control negativo, P= control positivo, M= marcador molecular)

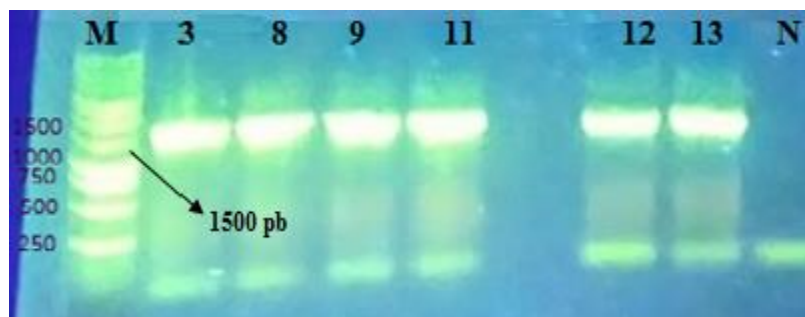


Figura 12: Amplificación del gen 16S rRNA de las cepas (3, 8, 9, 10, 11, y 12). (N= control negativo, M= marcador molecular)

3.7 RFLPs en gel de agarosa

Después de obtener los productos de PCR de las 28 cepas bacterianas aisladas, se desarrolló el análisis del polimorfismo de longitud de fragmento (RFLPs) de acuerdo a las condiciones de la **Tabla 3**. Los resultados se observaron en un gel de agarosa al 1% (**Figura 13, 14 y 15**). Los fragmentos obtenidos fueron agrupados en base a los patrones de restricción que presentaba cada cepa bacteriana.

Todos los gels se corrieron con un marcador molecular Labnet de 250-3000 bp. Los análisis de RFLPs fueron realizados solo para los productos de PCR de bacterias.

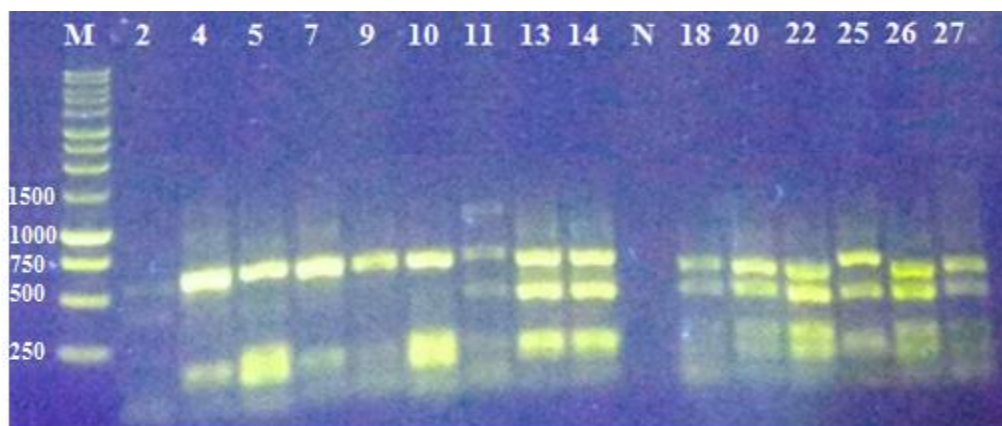


Figura 13: Fragmentos de restricción del gen 16s rRNA de las cepas bacterianas aisladas (N= control negativo, M= marcador molecular).

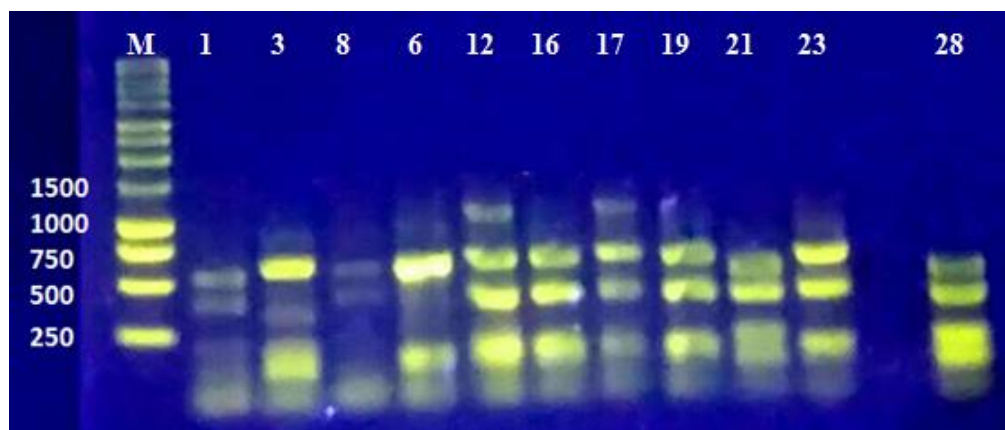


Figura 14: Fragmentos de restricción del gen 16s rRNA de las cepas bacterianas aisladas (N= control negativo, M= marcador molecular).

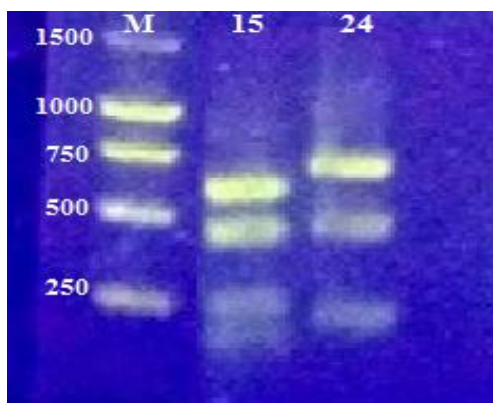


Figura 15: Fragmentos de restricción del gen 16s rRNA de las cepas bacterianas aisladas (N= control negativo, M= marcador molecular).

Como se observa en la **Tabla 8**, se clasificó en nueve grupos, de acuerdo a los patrones de restricción que presentaba cada amplicón, con el propósito de verificar las cepas con el mismo patrón. Posteriormente se escogieron las cepas de cada grupo, en base a los resultados de las **Figuras 13, 14 y 15**.

De las 28 cepas bacterianas se enviaron 22 para su respectiva secuenciación a la compañía MacroGen-Korea, tal como se muestra en la **Tabla 8**. No se realizó la secuenciación de los productos de PCR para las cepas 1, 7, 10, 13, 18, y 20, ya que presentaron patrones de restricción similares al de su grupo (**Tabla 8 y figuras 13, 14 y 15**).

Tabla 8

Fragmentos de restricción clasificados por grupos

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

* Cepas bacterianas enviadas a secuenciar a la compañía MacroGen-Korea

3.8 Amplificación del gen 23S rARN

Se obtuvieron cinco microalgas aisladas. Se realizó la amplificación del gen 23S rARN del ADN genómico, utilizando los primers p23SrV_f1 y p23SrV_r1 (**Tabla 2**). Los fragmentos obtenidos se observaron mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%. Las bandas obtenidas presentaron un peso aproximado de 500 pb (**Figura 16**). El marcador molecular utilizado fue Labnet de 250-3000 bp. Los amplicones de microalgas fueron enviados para su respectiva secuenciación.

Se utilizó como control positivo ADN genómico extraído de una microalga, de una investigación anterior del Laboratorio de Microbiología Ambiental-ESPE.

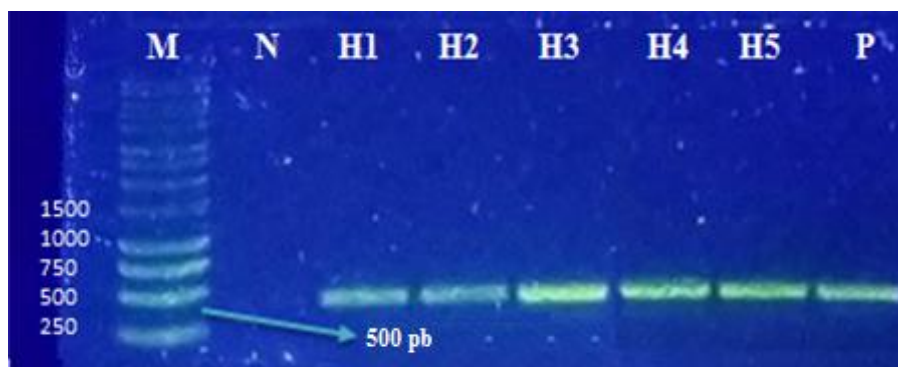


Figura 16: Amplificación del gen 23S rRNA de ADN algas: colonias aisladas (H1, H2, H3, H4 y H5) (N= control negativo, P= control positivo, M= marcador molecular).

3.9 Identificación molecular de las cepas aisladas

Los resultados enviados por la compañía MacroGen fueron analizados por el software Geneious 9.1. Se obtuvo una secuencia consenso de todos los amplicones enviados y se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos (NCBI), obteniendo la secuencia del organismo más próximo, además de su cobertura, identidad y número de acceso al GenBank (**Tablas 9 y 11**).

De las 28 cepas bacterianas aisladas, se enviaron a secuenciar 22 amplicones de acuerdo a los resultados de RFLPs, aunque algunos patrones de restricción no coincidieron con los amplicones secuenciados, por ejemplo, se observaron nueve patrones de corte (**Tabla 8**), pero de acuerdo a los resultados moleculares, solo se obtuvo cinco patrones o cinco especies diferentes (**Tabla 10**). En la **tabla 9** se observan los 22 amplicones secuenciados por Compañía MacroGen-Korea.

Las cepas 5, 6, 24 y 26 presentaron porcentajes bajos tanto para cobertura e identidad, por lo que no se puede afirmar su identificación, mientras que de la cepa 17 no se logró obtener una secuencia consenso, probablemente porque el ADN presentó baja calidad (**Tabla 9**).

Tabla 9
Organismo más próximo, comparación entre la secuencia consenso (Bacterias) con la base de datos “NCBI”.

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

* Organismo más próximo a la base de datos GenBank.

** Clasificación según el NCBI.

De los 22 amplicones secuenciados, se identificaron cinco especies bacterianas y una a nivel de género (Tabla 10).

Tabla 10
Cepas bacterianas aisladas.

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

* Organismo más próximo a la base de datos GenBank.

** Cepas iguales entre los organismos más próximos (Tabla 9).

Se identificaron cinco productos de PCR de microalgas (**Tabla 11**). Las cepas H3 y H4, a nivel de género con porcentajes de identidad mayores a 97 %, mientras que H5 *Stanieria cyanosphaera* hasta especie, con un porcentaje de identidad del 99 %. Los resultados moleculares de los aislados H1 y H2 fueron identificados a nivel de orden y familia respectivamente, ya que presentaron porcentajes de identidad menores a 97 %.

En el **Anexo A.2** se describen morfológicamente las cinco colonias de microalgas aisladas, así como la comparación morfológica y molecular. En el caso de los aislados H1, H2, H3 y H4 se identificó a nivel de género, mientras que H1 no coincidió con los resultados morfológicos y moleculares, por lo que se llegó a nivel de familia.

Tabla 11
Organismo más próximo, comparación entre la secuencia consenso (Algas) con la base de datos “NCBI”.

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

* Organismo más próximo a la base de datos GenBank.

** Clasificación según el NCBI.

3.10 Construcción del árbol filogenético

A partir de las secuencias analizadas de los genes 16S y 23S y comparadas con los organismos más próximos en la base de datos NCBI, se procedió a la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método de Neighbor-joining de máxima verosimilitud, con un *bootstrap* de 1000 y con un modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano.

El análisis filogenético permitió ratificar la taxonomía de las secuencias bacterianas analizadas (**Figura 17**). Se observó que la topología del árbol filogenético presenta un grupo taxonómico a nivel de la familia *Bacillaceae* y cuatro grupos taxonómicos a nivel de género.

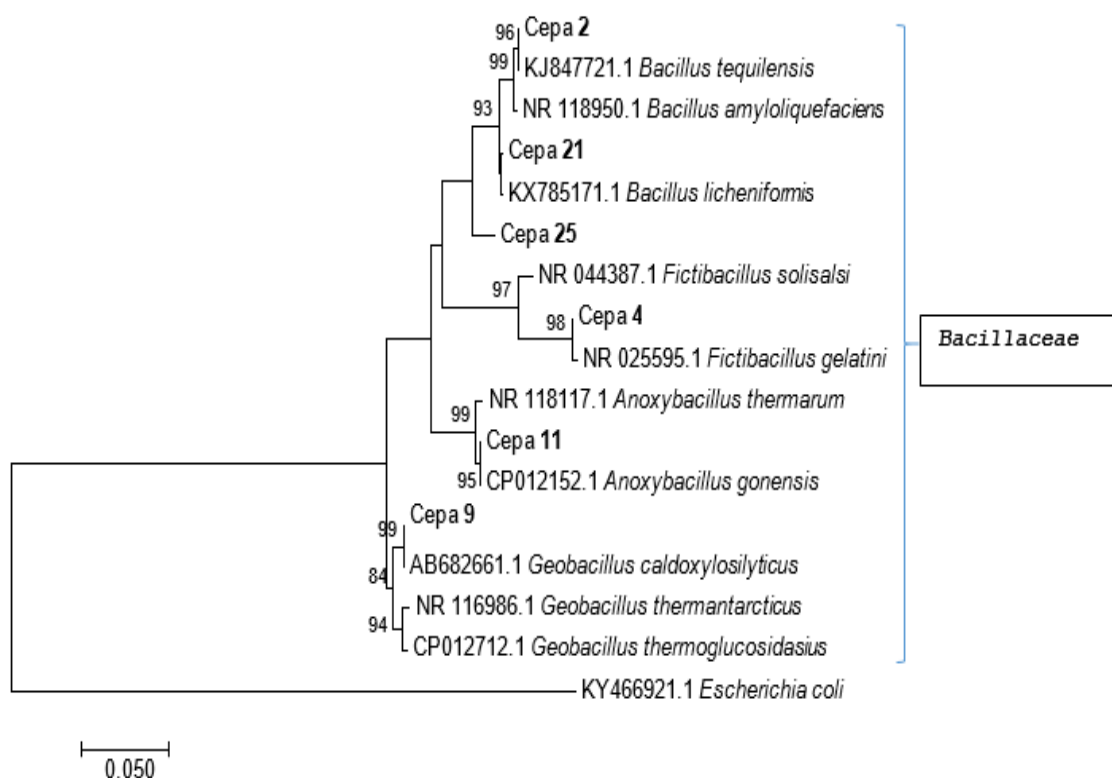


Figura 17:

Árbol filogenético construido mediante el método Neighbor-joining de máxima verosimilitud, con *bootstrap* de 1000 y modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano. Se comprobó la identificación taxonómica: cepa 2 (*Bacillus tequilensis*), cepa 4 (*Fictibacillus gelatini*), cepa 10 (*Geobacillus caldoxylosilyticus*), cepa 11 (*Anoxybacillus gonensis*), cepa 21 (*Bacillus licheniformis*) y cepa 25 (*Bacillus*). Los valores de probabilidad *bootstrap* > 75 % indican mayor fiabilidad. Los valores < 75% no se muestran en el árbol.

Las secuencias de microalgas también se sometieron al análisis filogenético, se observa la distribución de las secuencias en dos grupos diferentes de acuerdo al filo al que pertenecen (*Cyanobacteria* y *Bacillariophyta*) (**Figura 18**).

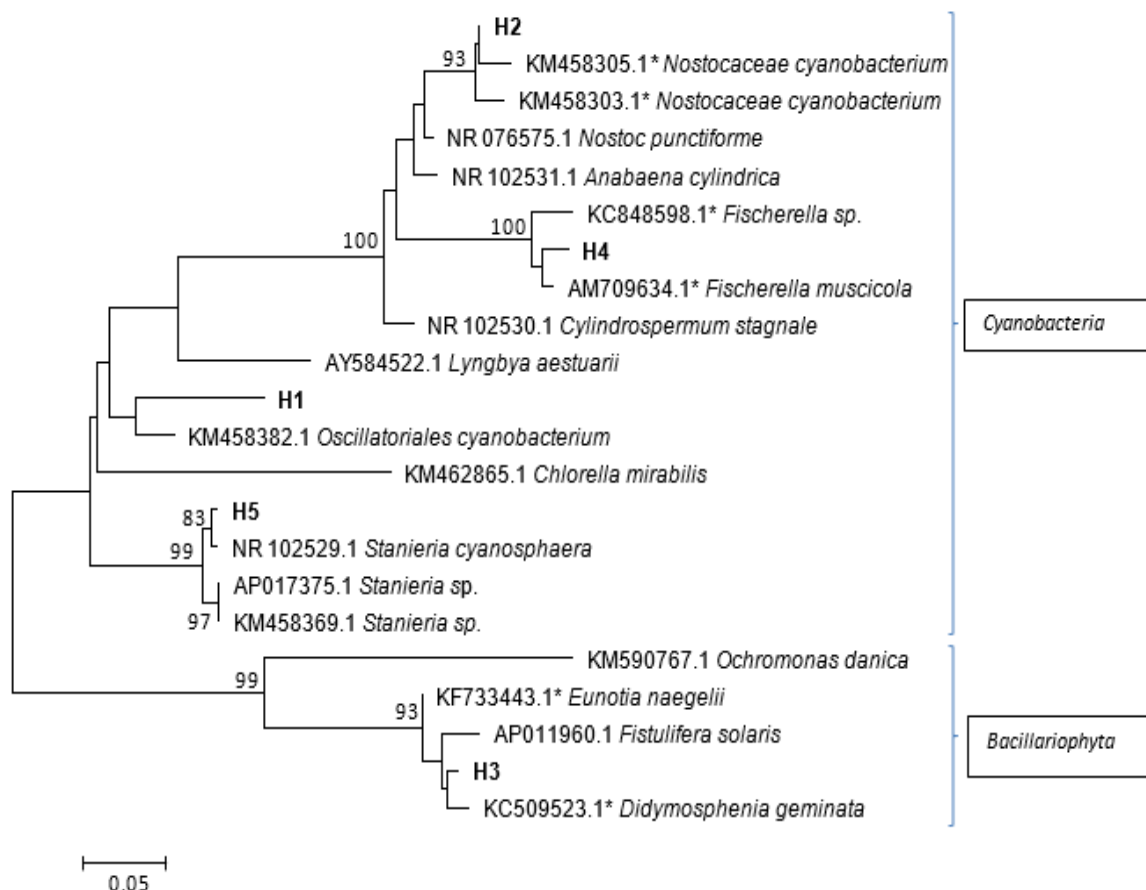


Figura 18:

Árbol filogenético construido mediante el método Neighbor-joining de máxima verosimilitud, bootstrap de 1000 y modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano. Los nombres en los recuadros pertenecen al filo (*Cyanobacteria* y *Bacillariophyta*). H1-H5 representan las colonias de microalgas aisladas. Los valores de probabilidad bootstrap > 75 % indican mayor fiabilidad. Los valores < 75% no se muestran en el árbol.

3.11 Análisis de la composición de la comunidad microbiana mediante la técnica pirosecuenciación

Para obtener información precisa de la comunidad microbiana en hábitats o muestras ambientales, se utilizaron técnicas de secuenciación masiva (pirosecuenciación). Los primers utilizados se pueden observar en la **Tabla 4**. Para el análisis se utilizó el ADN total, extraído de muestras de agua y sedimento de la fuente geotermal de Chachimbiro.

Tabla 12
Origen de las muestras

<i>Muestra</i>	<i>Punto de muestreo</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Concentración [ng/μL]</i>
M1	P2	Sedimento	28,74
M2	P2	Sedimento	18
M1*	P2	Agua	10,11
M2*	P2	Agua	6,35
M3	P1	Agua	16,59
M4	P1	Agua	34,15
M3*	P1	Sedimento	8,3
M4*	P1	Sedimento	10

Las muestras que presentan un (), no se utilizaron ya que presentaban bajas concentraciones de ADN.*

Para los análisis de pirosecuenciación se tomaron en cuenta las muestras con concentraciones de ADN entre 15 y 40 ng/μL, las cuales fueron M1, M2, M3 y M4.

3.11.1 Comunidad bacteriana

Se realizó el análisis de la comunidad bacteriana en las muestras de agua y sedimento. Las secuencias genómicas obtenidas mediante la técnica de pirosecuenciación se clasificaron en unidades taxonómicas operativas (OTUs) con un umbral de similitud del 97%. Se obtuvieron en cada muestra: M1=220707, M2=117491 y M3=30798 OTUs.

Las OTUs de alta calidad y no quiméricas representaron un total de 368996 secuencias, con una longitud media de 500 pb, distribuidas en las tres muestras M1, M2 y M3.

En la **Figura 19** se pueden observar los filos obtenidos mediante la pirosecuenciación, de la fuente geotermal Chachimbiro. Los filos *Fibrobacteres*, *Lentisphaerae*, *Tenericutes* y *Deferribacteres* presentaron (OTUs) < 100 y no se muestran en las **Tablas 13 y 14**.

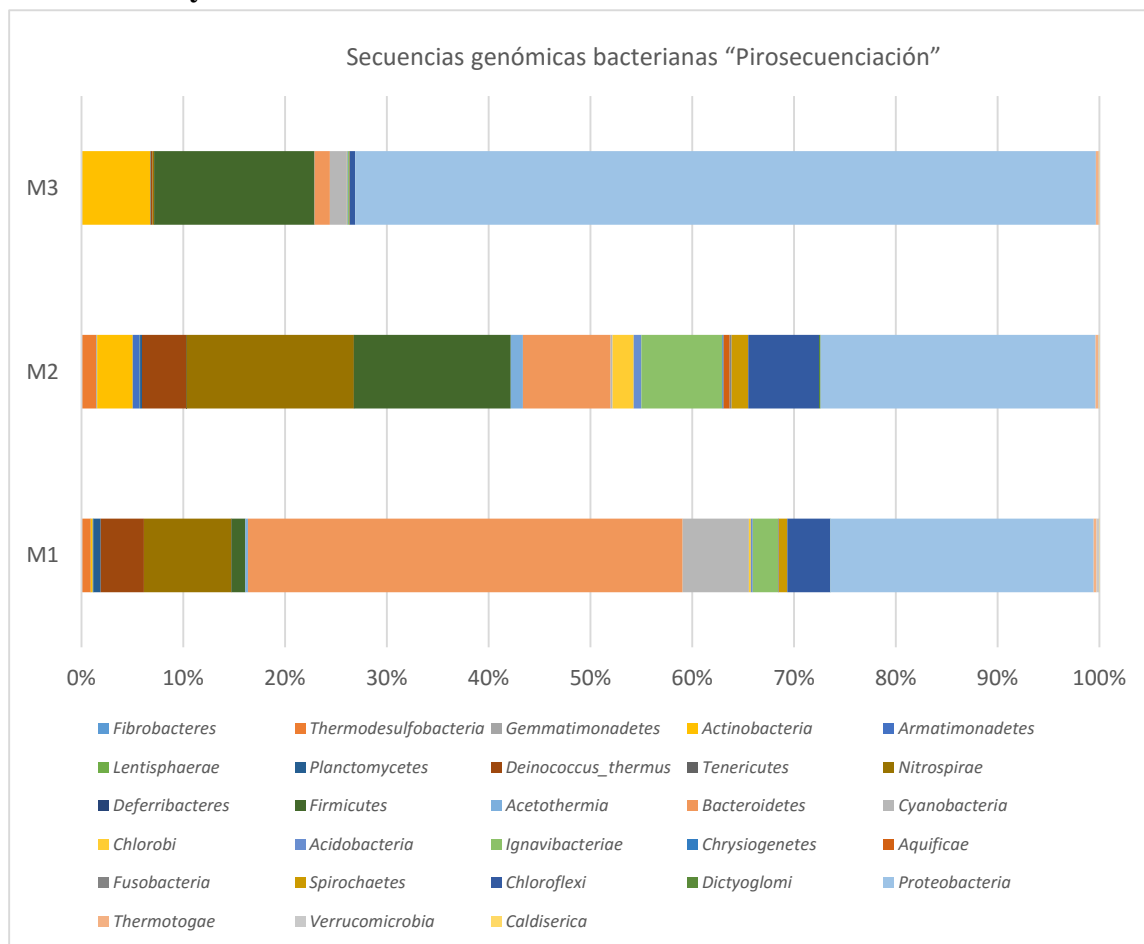


Figura 19. Filos identificados en la fuente geotermal Chachimbiro mediante la pirosecuenciación. Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 del ojo de la fuente geotermal, mientras que M3 proviene de muestras de agua del punto P1 de la terma.

De acuerdo a la **Figura 19**, en la fuente geotermal de Chachimbiro los filos que mayor número de OTUs fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. La presencia del filo *Proteobacteria* en las muestras M1, M2 y M3 fue mayor, a la de todos filos encontrados.

Géneros principales identificados en aguas termales de Chachimbiro mediante la pirosecuenciación

Con los resultados obtenidos sobre la composición de las comunidades bacterianas mediante la técnica de pirosecuenciación, se realizó un análisis a nivel de género y especie, tal como se observa en las **tablas 13 y 14**. En la **tabla 13** se muestra los géneros más destacados presentes en las muestras de agua y sedimento de la fuente geotermal de Chachimbiro.

Se escogió las (OTUs) > 100, aunque para el filo *Firmicutes* se tomó en cuenta las (OTUs) < 100 (**Tabla 13**), ya que las cepas aisladas e identificadas pertenecen a este filo (**Tabla 10**).

El filo *Firmicutes* presentó tres clases *Clostridia* y *Bacilli* y *Thermolithobacteria*. La clase *Thermolithobacteria* obtuvo un género *Thermolithobacter*, aunque fue el género que mayor número de OTUs consiguió dentro de este filo (**Tabla 13**).

Derxia y *nitrosomonas* son los géneros que más OTUs presentaron dentro del filo *Proteobacteria*, también se puede destacar otros géneros significativos como *Gemmobacter*, *Pseudomonas* y *Sideroxydans*, ya que obtuvieron altos OTUs dentro del filo *Proteobacteria*.

Como ya se mencionó anteriormente, el filo *Bacteroidetes* es el tercer grupo representativo, ya que se identificaron siete géneros, donde *Sphingobacterium* y *Ohtaekwangia* sobresalen de los demás por presentar el mayor número de OTUs, tal como se observa en la (**Tabla 13**).

Al analizar la **Tabla 13** se observa que los géneros *Nitrospira*, *Thermus*, *Thermodesulfovibrio*, *Ignavibacterium* y *Meiothermus* también fueron significativos.

TABLA 13
BACTERIAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR PIROSECUENCIACIÓN PRESENTES EN LA FUENTE
GEOTERMAL CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE GÉNERO).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	M1	M2	M3	Aislados
Proteobacteria	Alpha Proteobacteria	Rhizobiales	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Rhodoplanes</i>	213	37	10	
			<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	674	56	3	
			<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Aminobacter</i>	4	2	306	
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Gemmobacter</i>	1138	7	5	
				<i>Rhodovulum</i>	828	10	6	
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Paracraurococcus</i>	3	226	0	
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingopyxis</i>	34	133	0		
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Thiobacter</i>	10	10	1322	
				<i>Burkholderia</i>	9	693	1	
			Alcaligenaceae	<i>Derxia</i>	245	125	16659	
		Comamonadaceae	<i>Schlegelella</i>	154	5	0		
		Gallionellales	Gallionellaceae	<i>Sideroxydans</i>	908	7485	17	
		Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Denitratisoma</i>	1780	12	36	
	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>	41314	233	206		
	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	<i>Desulfomicrobiaceae</i>	<i>Desulfomicrobium</i>	19	400	2	
			<i>Desulfobalobiaceae</i>	<i>Desulfovermiculus</i>	117	55	16	
		Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Syntrophus</i>	21	557	0	
				<i>Smithella</i>	3	710	0	
			Syntrophobacteraceae	<i>Desulfatimicrobium</i>	6	137	0	
		Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	<i>Desulforegula</i>	801	42	6	
		Myxococcales	Cystobacteraceae	<i>Cystobacter</i>	414	8	0	
Myxococcaceae	<i>Anaeromyxobacter</i>		868	548	0			

CONTINUACIÓN DE LA TABLA 13. (TABLA A NIVEL DE GÉNERO).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	M1	M2	M3	Aislados
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	Desulfuromonas	143	219	9	
			Geobacteraceae	Geobacter	145	126	1	
		Desulfurellales	Desulfurellaceae	Desulfurella	359	219	48	
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	2356	230	2830	
			Methylococcales	Methylothermaceae	Methylothermus	679	28	2
Xanthomonadales			Xanthomonadaceae	Thermomonas	97	1	402	
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacteriales	Thermoanaerobacterales Family III	Caldicellulosiruptor	2	126	0	
				Thermovenabulum	1072	5	1	
			Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacter	61	255	1	
		Clostridiales	Peptococcaceae	Desulfotomaculum	477	52	0	
			Clostridiaceae	Caloramator	7	544	1	
				Clostridium	148	112	18	
				Thermaerobacter	19	1854	1	
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Geobacillus	15	11	914	x
				Anoxybacillus	35	8	0	x
				Bacillus	149	76	2226	x
				Fictibacillus	9	6	1	x
				Exiguobacterium	101	13	3	
Staphylococcaceae				Staphylococcus	19	2	1654	
Thermolithobacteria	Thermolithobacteriales	Thermolithobacteraceae	Thermolithobacter	309	14756	21		
Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteriales	Thermodesulfobacteriaceae	Thermodesulfobacterium	1996	1697	5	
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	19	142	1	

CONTINUACIÓN DE LA TABLA 13. (TABLA A NIVEL DE GÉNERO).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	M1	M2	M3	Aislados
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	11	4	576	
			<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	16	7	1461	
		<i>Rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>	<i>Thermoleophilum</i>	5	105	0	
		<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Candidatus rhodoluna</i>	0	134	0	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	11	4	576	
			<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	16	7	1461	
		<i>Rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>	<i>Thermoleophilum</i>	5	105	0	
		<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Candidatus rhodoluna</i>	0	134	0	
<i>Armatimonadetes</i>	<i>Chthonomonadetes</i>	<i>Chthonomonadales</i>	<i>Chthonomonadaceae</i>	<i>Chthonomonas</i>	110	792	2	
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Pirellula</i>	220	7	1	
				<i>Planctomyces</i>	648	28	1	
				<i>Blastopirellula</i>	98	178	1	
			<i>Gemmataceae</i>	<i>Gemmata</i>	131	18	0	
	<i>Phycisphaerae</i>	<i>Phycisphaerales</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>	<i>Phycisphaera</i>	391	5	2	
<i>Deinococcus_thermus</i>	<i>Deinococci</i>	<i>Thermales</i>	<i>Thermaceae</i>	<i>Thermus</i>	8731	121	41	
				<i>Meiothermus</i>	590	4927	10	
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i>	1072	5	1	
				<i>Nitrospira</i>	18819	5538	33	
<i>Acetothermia</i>				<i>Candidatus acetothermum</i>	606	1373	2	

CONTINUACIÓN DE LA TABLA 13. (TABLA A NIVEL DE GÉNERO).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	M1	M2	M3	Aislados
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium</i>	18581	3071	214	
			<i>Cytophagaceae</i>	<i>Adhaeribacter</i>	365	12	0	
			<i>Saprosiraceae</i>	<i>Haliscomenobacter</i>	113	48	0	
	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	702	3021	20	
	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Ohtaekwangia	73079	205	165	
	Bacteroidetes	Bacteroidetes Order II	Rhodothermaceae	Rhodothermus	64	254	3	
Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	254	3229	20		
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	Chlorobiaceae	Chlorobium	460	2426	5	
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	337	164	12	
				Thermoanaerobaculum	4	425	0	
	Holophagae	Holophagales	Holophagaceae	Holophaga	35	267	7	
Ignavibacteriae	Ignavibacteriae	Ignavibacteriales	Melioribacteraceae	Melioribacter	8	860	0	
			Ignavibacteriaceae	Ignavibacterium	5572	8517	41	
Chrysiogenetes	Chrysiogenetes	Chrysiogenales	Chrysiogenaceae	Chrysiogenes	41	128	0	
Aquificae	Aquificae	Aquificales	Hydrogenothermaceae	Persephonella	5	688	3	
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	44	227	1	
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Spirochaeta	17	181	4	
		Leptospirales	Leptospiraceae	Turneriella	1720	8	3	
Chloroflexi	Chloroflexia	Chloroflexales	Chloroflexaceae	Chloroflexus	5756	2116	16	
	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Anaerolinea	131	771	6	
				Bellilinea	2550	1368	116	
				Longilinea	379	3615	7	
				Thermanaerotherix	157	48	1	
Dehalococcoidia	Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae	Dehalococcoides	87	138	2		
Dictyoglomi	Dictyoglomi	Dictyoglomales	Dictyoglomaceae	Dictyoglomus	3	157	0	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales		Pedosphaera	482	31	4	

Los números significan las unidades taxonómicas operativas (OTUs) en cada muestra (M1, M2 y M3). Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 de la fuente geotermal Chachimbiro, mientras que M3 proviene de muestras de agua del punto P1 de la terma. Se incluyen solo secuencias > 100 (OTUs) de acuerdo al género, aunque los géneros del filo *Firmicutes* son los únicos (OTUs) < 100. El número total de (OTUs) en cada muestra (M1=220707, M2=117491 y M3=30798).

Especies principales identificadas en aguas termales de Chachimbiro mediante la pirosecuenciación.

Al igual que la **Tabla 13** (géneros principales), en la **tabla 14**, se observan las especies principales identificadas mediante la técnica de pirosecuenciación. Se procedió a escoger las (OTUs) > 100, aunque también se tomó en cuenta las (OTUs) < 100 de las especies pertenecientes al filo *firmicutes* (**Tabla 14**), ya que las cepas aisladas e identificadas corresponden a este filo. Se compararon ambos resultados obtenidos, donde las cepas aisladas e identificadas *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Anoxybacillus genensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus tequilensis* y *Fictibacillus gelatini*, coinciden con los resultados de la técnica de pirosecuenciación (**Tabla 14**).

El filo *firmicutes* presentó dos clases *Clostridia* y *Bacilli*, los cuales mostraron una variedad de géneros, en donde *Bacillus licheniformis* es la especie con mayor predominancia. Las especies *Staphylococcus epidermidis*, *Caloramator proteoclasticus*, *Thermovenabulum spp.*, *Thermaerobacter sp.* y *Thermolithobacter spp.*, también obtuvieron un número de OTUs significativos dentro del filo *firmicutes* (**Tabla 14**).

El filo *Proteobacteria* es el grupo con mayor presencia de especies, en el cual se pueden destacar *Gemmobacter megaterium*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Rhodovulum euryhalinum*, *Sideroxydans paludícola*, *Sideroxydans spp.*, *Anaeromyxobacter spp.*, *Nitrosomonas spp.* y *Pseudomonas sp.*

Además de *Firmicutes* y *Proteobacteria*, hay otros filios que presentaron especies con número de OTUs altos como: *Thermodesulfobacterium spp.*, *Propionibacterium acnés*, *Thermus spp.*, *Meiothermus sp.*, *Thermodesulfovibrio spp.*, *Candidatus acetothermum Acetothermus autotrophicum*, *Sphingobacterium spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Ignavibacterium álbum*, *Chloroflexus aurantiacus* y *Bellilinea spp.*

TABLA 14
BACTERIAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR “PIROSECUENCIACIÓN” PRESENTES EN LA FUENTE GEOTERMAL CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	M1	M2	M3	Aislados
Proteobacteria	Alpha Proteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	Rhodoplanes spp.	213	37	10	
			Rhizobiaceae	Rhizobium	Rhizobium spp.	670	23	3	
			Phyllobacteriaceae	Aminobacter	Aminobacter niigataensis	4	2	306	
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Gemmobacter	Gemmobacter megaterium	1066	6	5	
				Rhodovulum	Rhodovulum euryhalinum	826	10	6	
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Paracraurococcus	Paracraurococcus spp.	3	226	0	
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis	Sphingopyxis spp.	10	10	1322	
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Thiobacter	Thiobacter subterraneus	9	693	1	
				Burkholderia	Burkholderia pyrocinia	229	94	16630	
			Alcaligenaceae	Derxia	Derxia sp.	131	4	0	
			Comamonadaceae	Schlegelella	Schlegelella spp.	107	1	0	
		Gallionellales	Gallionellaceae	Sideroxydans	Sideroxydans spp.	787	6681	13	
					Sideroxydans paludicola	121	804	4	
		Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Denitratisoma	Denitratisoma sp.	1780	12	36	
		Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	Nitrosomonas spp.	39289	200	203	
					Nitrosomonas halophila	358	10	0	
					Nitrosomonas sp.	1651	11	3	
	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfomicrobiaceae	Desulfomicrobium	Desulfomicrobium spp.	17	395	0	
			Desulfahalobiaceae	Desulfovermiculus	Desulfovermiculus halophilus	117	55	16	
		Syntrophobacterales	Syntrophaceae	Syntrophus	Syntrophus spp.	18	553	0	
				Smithella	Smithella spp.	3	710	0	
			Syntrophobacteraceae	Desulfatimicrobium	Desulfatimicrobium mahresensis	6	137	0	
		Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulforegula	Desulforegula spp.	801	42	6	
		Myxococcales	Cystobacteraceae	Cystobacter	Cystobacter spp.	408	2	0	
Myxococcaceae	Anaeromyxobacter		Anaeromyxobacter spp.	868	548	0			

CONTINUACIÓN DE LA TABLA 14. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	M1	M2	M3	Aislados
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	Desulfuromonas	Desulfuromonas spp.	143	219	9	
			Geobacteraceae	Geobacter	Geobacter spp.	145	117	1	
		Desulfurellales	Desulfurellaceae	Desulfurella	Desulfurella spp.	358	218	48	
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas luteola	2	1	243	
					Pseudomonas synxantha	194	94	93	
					Pseudomonas sp.	145	78	2483	
		Methylococcales	Methylothermaceae	Methylothermus	Methylothermus spp.	677	2	2	
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Thermomonas	Thermomonas sp.	97	1	402		
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacteriales	Thermoanaerobacterales	Caldicellulosiruptor	Caldicellulosiruptor sp.	0	68	0	
			Family III	Thermovenabulum	Thermovenabulum spp.	1072	5	1	
			Thermoanaerobacteraceae	Thermoanaerobacter	Thermoanaerobacter spp.	61	238	1	
		Clostridiales	Peptococcaceae	Desulfotomaculum	Desulfotomaculum spp.	477	14	0	
			Clostridiaceae	Caloramator	Caloramator proteoclasticus	7	517	1	
				Clostridium	Clostridium spp.	109	80	12	
	Thermaerobacter			Thermaerobacter sp.	18	1806	1		
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus caldoxylosilyticus	0	1	0	x
					Geobacillus stearothermophilus	9	9	913	
				Anoxybacillus	Anoxybacillus sp.	28	6	0	x
Bacillus				Bacillus subtilis	0	1	3		
				Bacillus licheniformis	27	15	2048	x	
				Bacillus tequilensis	2	0	1	x	
				Bacillus smithii	2	0	116		
Fictibacillus				Fictibacillus gelatini	9	6	1	x	
Exiguobacterium				Exiguobacterium sp.	90	7	2		
Staphylococcaceae				Staphylococcus	Staphylococcus haemolyticus	1	0	103	
	Staphylococcus epidermidis	18	2		1551				
Thermolithobacteria	Thermolithobacterales	Thermolithobacteraceae	Thermolithobacter	Thermolithobacter spp.	309	14756	21		

CONTINUACIÓN DE LA TABLA 14. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	M1	M2	M3	Aislados
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Thermodesulfobacteriales</i>	<i>Thermodesulfobacteriaceae</i>	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>Thermodesulfobacterium spp.</i>	1996	1697	5	
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadales</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Gemmatimonas</i>	<i>Gemmatimonas spp.</i>	19	142	1	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium spp.</i>	10	3	432	
					<i>Gorynebacterium tuberculostearicum</i>	0	0	144	
		<i>Rubrobacterales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	16	7	1461	
			<i>Rubrobacteraceae</i>	<i>Thermoleophilum</i>	<i>Thermoleophilum album</i>	5	105	0	
<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Candidatus rhodoluna</i>	<i>Candidatus rhodoluna ladicola</i>	0	134	0			
<i>Armatimonadetes</i>	<i>Chthonomonadetes</i>	<i>Chthonomonadales</i>	<i>Chthonomonadaceae</i>	<i>Chthonomonas</i>	<i>Chthonomonas calidirosea</i>	110	792	2	
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Pirellula spp.</i>	220	7	1	
				<i>Planctomyces</i>	<i>Planctomyces spp.</i>	615	28	1	
				<i>Blastopirellula</i>	<i>Blastopirellula spp.</i>	98	178	1	
				<i>Gemmataceae</i>	<i>Gemmata</i>	<i>Gemmata spp.</i>	131	18	0
	<i>Phycisphaerae</i>	<i>Phycisphaerales</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>	<i>Phycisphaera</i>	<i>Phycisphaera spp.</i>	266	5	2	
					<i>Phycisphaera mikurensis</i>	125	0	0	
<i>Deinococcus_thermus</i>	<i>Deinococci</i>	<i>Thermales</i>	<i>Thermaceae</i>	<i>Thermus</i>	<i>Thermus spp.</i>	8729	31	41	
				<i>Meiothermus</i>	<i>Meiothermus timidus</i>	30	228	2	
					<i>Meiothermus sp.</i>	560	4699	8	
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i>	<i>Thermodesulfovibrio spp.</i>	170	13719	17	
				<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira spp.</i>	18773	5538	33	
<i>Acetothermia</i>				<i>Candidatus acetothermum</i>	<i>Candidatus acetothermum Acetothermus autotrophicum</i>	606	1373	2	

CONTINUACIÓN DE LA TABLA 14. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	M1	M2	M3	Aislados
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium spp.</i>	18581	3071	214	
			<i>Cytophagaceae</i>	<i>Adhaeribacter</i>	<i>Adhaeribacter spp.</i>	364	12	0	
			<i>Saprospiraceae</i>	<i>Haliscomenobacter</i>	<i>Candidatus haliscomenobacter calcifugiens</i>	45	39	0	
	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	<i>Flavobacterium spp.</i>	685	2992	20	
	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Ohtaekwangia	<i>Ohtaekwangia spp.</i>	73077	205	165	
	Bacteroidetes	Bacteroidetes Order II	Rhodothermaceae	Rhodothermus	<i>Rhodothermus spp.</i>	56	245	2	
	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	<i>Bacteroides spp.</i>	179	68	19	
				<i>Bacteroides sp.</i>	75	3161	1		
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	Chlorobiaceae	Chlorobium	<i>Chlorobium spp.</i>	460	2426	5	
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	<i>Acidobacterium spp.</i>	337	164	12	
				<i>Thermoanaerobaculum</i>	<i>Thermoanaerobaculum aquaticum</i>	4	425	0	
	Holophagae	Holophagales	Holophagaceae	Holophaga	<i>Holophaga spp.</i>	35	267	7	
Ignavibacteriae	Ignavibacteriae	Ignavibacteriales	<i>Melioribacteraceae</i>	<i>Melioribacter</i>	<i>Melioribacter roseus</i>	8	860	0	
			<i>Ignavibacteriaceae</i>	<i>Ignavibacterium</i>	<i>Ignavibacterium album</i>	1399	4766	13	
					<i>Ignavibacterium sp.</i>	4098	3628	24	
Chrysiogenetes	Chrysiogenetes	Chrysiogenales	Chrysiogenaceae	Chrysiogenes	<i>Chrysiogenes spp.</i>	41	128	0	
Aquificae	Aquificae	Aquificales	Hydrogenothermaceae	Persephonella	<i>Persephonella spp.</i>	5	688	3	
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	<i>Fusobacterium spp.</i>	44	227	1	
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Spirochaeta	<i>Spirochaeta sp.</i>	12	160	3	
		Leptospirales	Leptospiraceae	Turneriella	<i>Turneriella parva</i>	1709	8	3	

CONTINUACION DE LA TABLA 14. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	M1	M2	M3	Aislados
Chloroflexi	Chloroflexia	Chloroflexales	Chloroflexaceae	Chloroflexus	<i>Chloroflexus spp.</i>	2048	112	3	
					<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	3717	1990	13	
	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Anaerolinea	<i>Anaerolinea spp.</i>	103	618	6	
					<i>Anaerolinea thermophila</i>	9	108	0	
				Bellilinea	<i>Bellilinea spp.</i>	2543	1366	116	
				Longilinea	<i>Longilinea spp.</i>	379	3615	7	
				Thermanaerotherix	<i>Thermanaerotherix spp.</i>	146	3	0	
	Dehalococcoidia	Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae	Dehalococcoides	<i>Dehalococcoides spp.</i>	75	121	2	
Dictyoglomi	Dictyoglomi	Dictyoglomales	Dictyoglomaceae	Dictyoglomus	<i>Dictyoglomus turgidum</i>	3	157	0	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales		Pedosphaera	<i>Pedosphaera spp.</i>	482	31	3	

Los números significan una unidades taxonómica operativa (OTU) en cada muestra (M1, M2 y M3). Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 de la fuente geotermal de Chachimbiro, mientras que M3 proviene de muestras de agua del punto P1 de la fuente geotermal. Se incluyen solo las secuencias > 100 (OTU) de acuerdo a la especie, aunque las especies del filo *firmicutes* son los únicos (OTUs) < 100. El número total de (OTUs) en cada muestra es (M1=220707, M2=117491 y M3=30798).

En la **Figura 20** se observa al filo *Proteobacteria*, el cual representa el mayor porcentaje dentro de la comunidad bacteriana en las muestras de agua y sedimento. Las clases más predominantes dentro de este filo fueron *Alfa-*, *Beta-*, *Delta-* y *Gammaproteobacteria*.

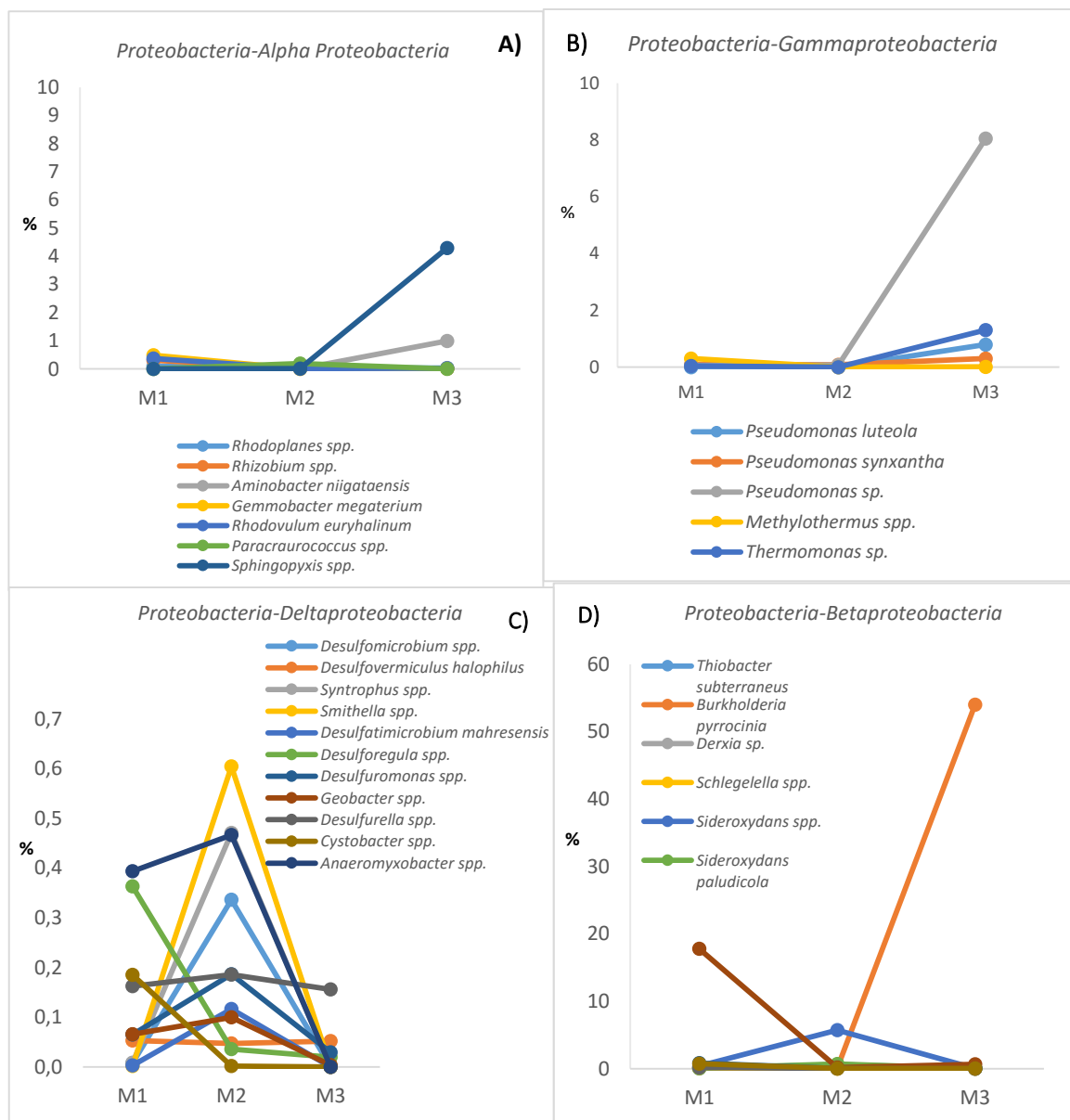


Figura 20. Abundancia relativa de especies del filo *Proteobacteria*. Se encuentran representadas en los gráficos las especies con más de 100 (OTU). **A)** *Alphaproteobacteria*. **B)** *Gammaproteobacteria*. **C)** *Deltaproteobacteria*. **D)** *Betaproteobacteria*. Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, mientras que M3 proviene de muestras de agua. El 100% representa el número total de OTUs (M1=220707, M2=117491 y M3=30798).

El filo *Firmicutes* es otro de los grupos con mayor presencia encontrados en las muestras de agua y sedimento de la terma “Chachimbiro”. Las clases *Bacilli* y *Clostridia* obtuvieron entre siete y once especies respectivamente, aunque la especie *Thermolithobacter spp.* (**Figura 21.B**) mostró el mayor porcentaje dentro del filo *Firmicutes* (**Figura 21**).

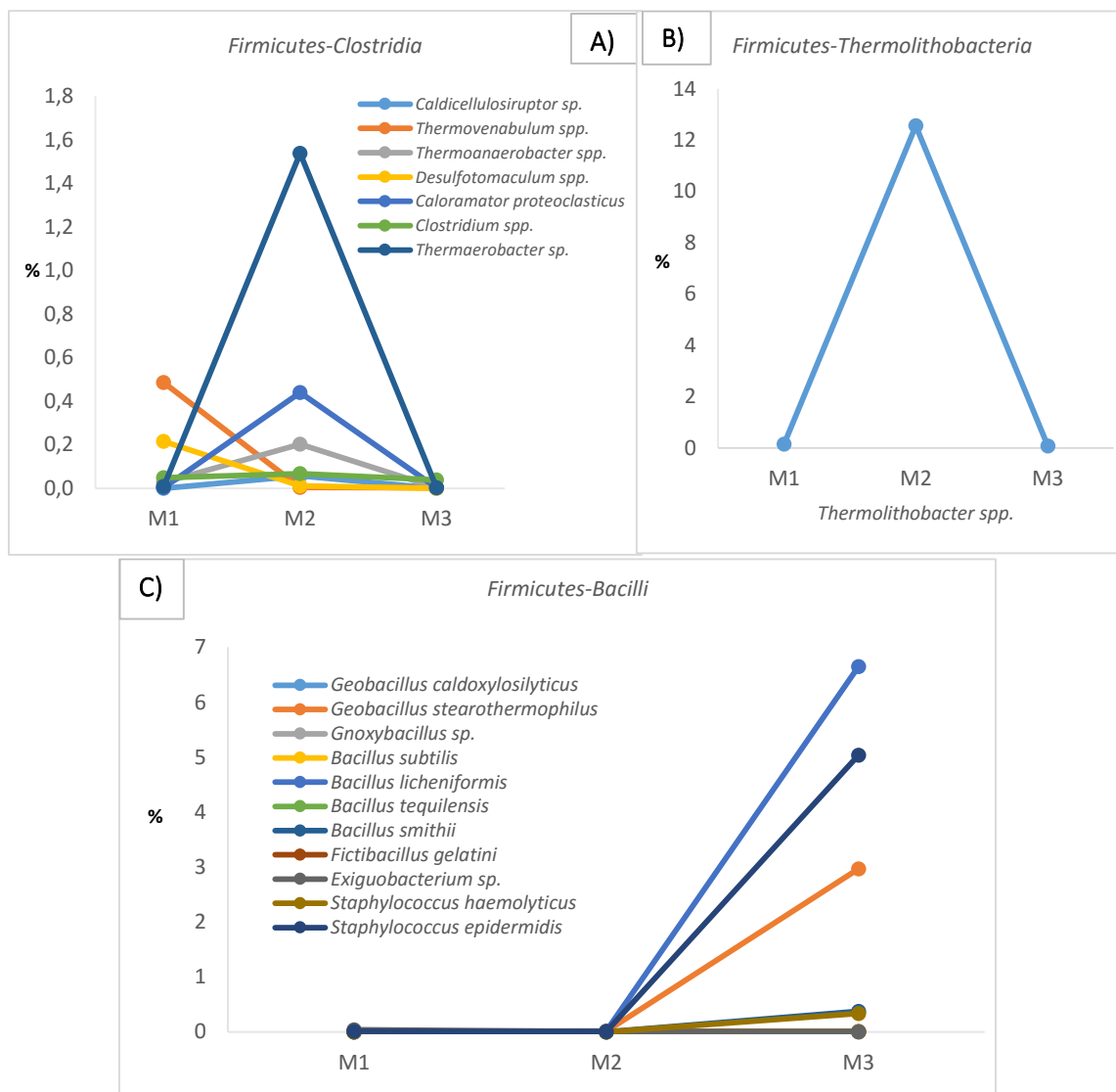


Figura 21. Abundancia relativa de especies del filo *Firmicutes*. Se encuentran representadas en los gráficos las especies con más de 100 OTUs. A) *Clostridia* B) *Thermolithobacteria*. C) *Bacilli*. Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, mientras que M3 proviene de muestras de agua. El 100% representa el número total de OTUs (M1=220707, M2=117491 y M3=30798).

El filo *Bacteroidetes* también es significativo por el número de OTUs obtenidos, donde la especie *Ohtaekwangia spp.* consiguió en la muestra M1= 73077 OTUs alcanzando casi el 35 % del total de OTUs (**Figura 22**).

Aunque hay otros filos como *Ignavibacteriae*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae*, *Deinococcus_thermus* y *Chloroflexi* que también alcanzaron números significativos de OTUs dentro de las muestras analizadas, tal como se observa en la **tabla 13**.

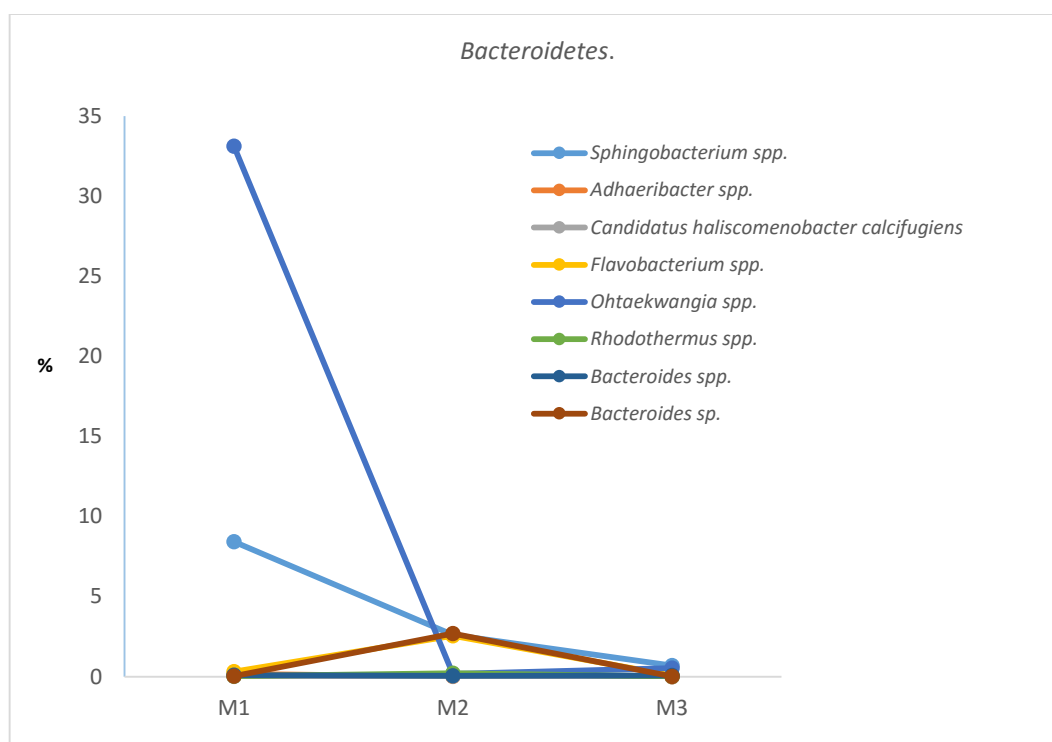


Figura 22. Abundancia realtiva de especies del filo *Bacteroidetes*. Se encuentran representadas en los gráficos las especies con más de 100 (OTUs). Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, mientras que M3 proviene de muestras de agua. El 100% representa el número total de OTUs (M1=220707, M2=117491 y M3=30798).

3.11.2 Hongos

De igual manera, se observaron las OTUs obtenidos para hongos mediante la técnica de pirosecuenciación. Las secuencias obtenidas se clasifican en unidades taxonómicas operativas (OTUs) usando un umbral de similitud del 97%, obteniendo un total de (OTUs) en cada muestra M1=8500 y M2=3520.

Cryptomycota es el filo predominante, aunque obtuvo un género, en cambio el filo *Ascomycota* contó con varios géneros representantes. *Paramicrosporidium*, *hygrocybe* y *hydnotryopsis* son los géneros más significativos (**Tablas 15**).

TABLA 15
HONGOS IDENTIFICADOS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR “PIROSECUENCIACIÓN”, PRESENTES EN LA FUENTE GEOTERMAL DE CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE GÉNERO).

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	M1	M2	
Gomeromycota	Glomeromycetes	Diversisporales	Acaulosporaceae	Acaulospora	14	2	
Cryptomycota				Paramicrosporidium	4975	359	
Mucoromycota	Mucoromycotina	Mucorales	Mucoraceae	Actinomucor	787	4	
Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Cryptococcaceae	Cryptococcus	123	605	
			Tremellaceae	Tremella	147	747	
				Hannaella	0	786	
			Bulleribasidiaceae	Bulleribasidium	0	326	
			Agaricomycetes	Agaricales	Hygrophoraceae	Hygrocybe	1017
Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Pezizaceae	Hydnotryopsis	1156	4	
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	Candida	10	7	
			Magnaporthales	Magnaporthaceae	Mycocleptodiscus	0	50
	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora	1	18	
			Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	7	116
			Pleosporales	Didymellaceae	Phoma	0	21
		Epicoccum		0	13		
	Phaeosphaeriaceae	Sclerostagonospora		3	12		
	Didymosphaeriaceae	Deniquelata		0	21		
	Cucurbitariaceae	Pyrenochaeta		0	48		
	Capnodiales	Mycosphaerellales	Cladosporiaceae	Cladosporium	151	132	
Mycosphaerellaceae			Pseudocercospora	19	89		
Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	Spencermartinsia	1	49		

Los números significan las unidades taxonómicas operativas (OTUs) en cada muestra (M1, M2).

Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 de la fuente geotermal. Se incluyen solo las secuencias > 10 (OTUs) de acuerdo al género. El número total de (OTUs) en cada muestra es (M1=8500 y M2=3520).

En la **tabla 16** se observa las especies más representativas, en donde *Paramicrosporidium fungal sp.*, *Tremella encephala*, *Hannaella sp.*, *Hygrocybe persistens*, *Actinomucor elegans* y *Hydnotryopsis setchellii* obtuvieron el mayor número de OTUs.

TABLA 16
HONGOS IDENTIFICADOS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR PIROSECUENCIACIÓN, PRESENTES EN LA FUENTE
GEOTERMAL CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	M1	M2
<i>Gomeromycota</i>	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Diversisporales</i>	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora punctata</i>	14	2
<i>Cryptomycota</i>				<i>Paramicrosporidium</i>	<i>Paramicrosporidium fungal sp.</i>	4975	359
<i>Basidiomycota</i>	<i>Tremellomycetes</i>	<i>Tremellales</i>	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus tephrensensis</i>	0	57
					<i>Cryptococcus podzolicus</i>	0	213
					<i>Cryptococcus sp.</i>	113	15
					<i>Cryptococcus amylolyticus</i>	0	39
					<i>Cryptococcus dimenae</i>	0	168
					<i>Cryptococcus foliicola</i>	8	107
		<i>Tremellaceae</i>	<i>Tremella</i>	<i>Tremella encephala</i>	147	747	
		<i>Bulleribasidiaceae</i>	<i>Hannaella</i>	<i>Hannaella sp.</i>	0	786	
<i>Bulleribasidium</i>	<i>Bulleribasidium oberjochense</i>		0	326			
	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Hygrophoraceae</i>	<i>Hygrocybe</i>	<i>Hygrocybe persistens</i>	1017	4
<i>Mucoromycota</i>	<i>Mucoromycotina</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Actinomucor</i>	<i>Actinomucor elegans</i>	787	4
	<i>Pezizomycetes</i>	<i>Pezizales</i>	<i>Pezizaceae</i>	<i>Hydnotryopsis</i>	<i>Hydnotryopsis setchellii</i>	1155	4
	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Debaryomycetaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>Candida catenulata</i>	5	3
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Magnaporthales</i>	<i>Magnaporthaceae</i>	<i>Mycocleptodiscus</i>	<i>Mycocleptodiscus sp.</i>	0	50
		<i>Trichosphaeriales</i>	<i>Trichosphaeriaceae</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora sp.</i>	1	17
		<i>Hypocreales</i>	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium sp.</i>	1	67
	<i>Fusarium equiseti</i>			0	40		
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Didymellaceae</i>	<i>Phoma</i>	<i>Phoma proteae</i>	0	20
				<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	0	13
			<i>Phaeosphaeriaceae</i>	<i>Sclerostagonospora</i>	<i>Sclerostagonospora sp.</i>	3	12
			<i>Didymosphaeriaceae</i>	<i>Deniquelata</i>	<i>Deniquelata montagnulaceae sp.</i>	0	21
		<i>Cucurbitariaceae</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>Pyrenochaeta sp.</i>	0	48	
		<i>Capnodiales</i>	<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	141	128
			<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Pseudocercospora</i>	<i>Pseudocercospora sp.</i>	19	89
	<i>Botryosphaeriales</i>	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Spencermartinsia</i>	<i>Spencermartinsia viticola</i>	1	49	

3.11.3 Arqueas

En las **tablas 17 y 18** se observan las unidades taxonómicas operativas (OTUs) obtenidas para arqueas mediante la técnica de pirosecuenciación. Se obtuvo un total de OTUs de 132521 distribuidas en las muestras M1=92734 y M2=39787.

Los resultados de la pirosecuenciación indican la presencia cuatro filos: *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Thaumarchaeota*. La especie *Candidatus nitrososphaera gargensis* obtuvo el mayor número de OTUs en las muestras analizadas (**Tablas 17 y 18**), ya que se encuentra en ambientes con temperaturas mayores a los 46°C, concordando con la temperatura de la fuente geotermal de Chamchimbiro de 58°C (*Hatzenpichler, y otros, A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring., 2008*).

TABLA 17
ARQUEAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR
PIROSECUENCIACIÓN PRESENTES EN LA FUENTE GEOTERMAL DE
CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE GÉNERO).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	M1	M2
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thermoprotei</i>	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Desulfurococcaceae</i>	<i>Thermosphaera</i>	2	251
		<i>Thermoproteales</i>	<i>Thermofilaceae</i>	<i>Thermofilum</i>	111	84
<i>Korarchaeota</i>				<i>Candidatus Korarchaeum</i>	0	31
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanococci</i>	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanothermococcus</i>	338	82
				<i>Methanococcus</i>	1381	26
	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	64	16
				<i>Methanobrevibacter</i>	72	0
	<i>Thermoplasmata</i>	<i>Methanomassiliicoccales</i>	<i>Methanomassiliicoccaceae</i>	<i>Methanomassiliicoccus</i>	46	26
				<i>Thermogymnomonas</i>	14345	5923
		<i>Thermoplasmatales</i>	<i>Thermoplasmataceae</i>	<i>Thermoplasma</i>	303	82
	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	45	29514
			<i>Methanosetaeaceae</i>	<i>Methanoseta</i>	59	51
	<i>Thermococci</i>	<i>Thermococcales</i>	<i>Thermococcaceae</i>	<i>Thermococcus</i>	0	66
	<i>Euryarchaeota</i>				<i>Aciduliprofundum</i>	316
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrososphaeria</i>	<i>Nitrososphaerales</i>	<i>Nitrososphaeraeaceae</i>	<i>Nitrososphaera</i>	75496	2904
				<i>Candidatus nitrososphaera</i>	61	6
				<i>Candidatus Nitrosocaldus</i>	2	379
	<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Cenarchaeales</i>	<i>Cenarchaeaceae</i>	<i>Cenarchaeum</i>	45	7
				<i>Candidatus Nitrosotalea</i>	9	1
				<i>Candidatus Micrarchaeum</i>	18	14

Los números significan las unidades taxonómicas operativas (OTUs) en cada muestra (M1, M2). Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 del ojo de la terma “Chachimbiro”. Se incluyen las secuencias > 10 (OTU) de acuerdo al género. El número total de (OTUs) en cada muestra es (M1=92734 y M2=39787).

TABLA 18. ARQUEAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR PIROSECUENCIACIÓN PRESENTES EN LA FUENTE GEOTERMAL DE CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	M1	M2
Crenarchaeota	Thermoprotei	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Desulfurococcaceae</i>	<i>Thermosphaera</i>	<i>Thermosphaera aggregans</i>	2	251
		<i>Thermoproteales</i>	<i>Thermofilaceae</i>	<i>Thermofilum</i>	<i>Thermofilum sp.</i>	111	66
Korarchaeota				<i>Candidatus Korarchaeum</i>	<i>Candidatus korarchaeum cryptofilum</i>	0	31
Euryarchaeota	Methanococci	Methanococcales	Methanococcaceae	<i>Methanothermococcus</i>	<i>Methanothermococcus sp.</i>	334	2
				Methanococcus	<i>Methanococcus spp.</i>	1340	3
					<i>Methanococcus sp.</i>	41	23
	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobacterium	<i>Methanobacterium bryantii</i>	43	0
					<i>Methanobacterium sp.</i>	6	11
					<i>Methanobacterium formicum</i>	14	0
				<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobrevibacter sp.</i>	72	0
	Thermoplasmata	<i>Methanomassiliococcales</i>	<i>Methanomassiliococcaceae</i>	<i>Methanomassiliococcus</i>	<i>Methanomassiliococcus luminyensis</i>	45	26
		<i>Thermoplasmatales</i>	<i>Thermoplasmataceae</i>	<i>Thermogymnomonas</i>	<i>Thermogymnomonas sp.</i>	14345	5923
				<i>Thermoplasma</i>	<i>Thermoplasma sp.</i>	303	82
	Methanomicrobia	Methanosarcinales	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanosarcina sp.</i>	45	29514
			<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanosaeta sp.</i>	59	51
Thermococci	Thermococcales	Thermococcaceae	Thermococcus	<i>Thermococcus sp.</i>	0	65	
				<i>Aciduliprofundum</i>	<i>Aciduliprofundum sp.</i>	316	314
Thaumarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	<i>Nitrososphaera</i>	<i>Nitrososphaera sp.</i>	1623	174
				Candidatu nitrososphaera	<i>Candidatus nitrososphaera sp. thuaoa</i>	54	141
					<i>Candidatus nitrososphaera gargensis</i>	73819	2589
					<i>Candidatus nitrososphaera</i>	61	6
				Candidatus Nitrosocaldus.	<i>Candidatus nitrosocaldus yellowstonii</i>	0	349
					<i>Candidatus nitrosocaldus sp.</i>	2	30
	Thaumarchaeota	Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	Cenarchaeum	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	45	7
					<i>Candidatus Nitrosotalea</i>	<i>Candidatus nitrosotalea</i>	10
				<i>Candidatus Micrarchaeum</i>	<i>Candidatus micrarchaeum acidiphilum</i>	18	14

Los números significan una unidad taxonómica operativa (OTU) en cada muestra (M1, M2). Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 de la fuente geotermal de Chachimbiro. Se escogió las secuencias > 10 (OTU) de acuerdo a la especie. El número total de (OTUs) en cada muestra es (M1=92734 y M2=39787).

3.11.4 Microalgas

Los resultados de la técnica pirosecuenciación el número total de (OTUs) en cada muestra es de M1=86428 y M2=6125. Se observa en la **tabla 19** que el filo *Chlorophyta* representa el grupo con mayor número de géneros, aunque los filios *Cyanobacteria* y *Streptophyta* presentaron un solo género *Stigonema* y *Mesostigma* respectivamente, dichos géneros son los más abundantes dentro de los cuatro filios encontrados en la fuente geotermal de Chachimbiro.

TABLA 19

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	M1	M2	Aislados	
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocaceae</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Stigonemataceae</i>	<i>Stigonema</i>	61980	4025		
<i>Chlorophyta</i>	<i>Mamiellophyceae</i>	<i>Mamiellales</i>	<i>Mamiellaceae</i>	<i>Micromonas</i>	27	2		
			<i>Chlorellales</i>	<i>Chlorellaceae</i>	<i>Chlorella</i>	0	16	
	<i>Trebouxiophyceae</i>	<i>Microthamniales</i>		<i>Friedmannia</i>	1	71		
				<i>Trebouxia</i>	56	206		
				<i>Microthamnion</i>	502	147		
				<i>Nephroselmis</i>	20	18		
	<i>Prasinophyceae</i>	<i>Pseudoscourfieldiales</i>	<i>Pycnococcaceae</i>	<i>Pseudoscourfieldia</i>	2436	413		
	<i>Pedinophyceae</i>	<i>Pedinomonadales</i>	<i>Scourfieldiales</i>	<i>Scourfieldiaceae</i>	<i>Scourfieldia</i>	129	88	
			<i>Pedinomonadales</i>	<i>Pedinomonadaceae</i>	<i>Pedinomonas</i>	54	3	
	<i>Chlorodendrophyceae</i>	<i>Chlorodendrales</i>	<i>Chlorodendraceae</i>	<i>scherrfelia</i>	9	47		
	<i>Chlorophyceae</i>	<i>Chlamydomonadales</i>	<i>Chlorococcaceae</i>	<i>Ettlia</i>	1	67		
	<i>Ulvophyceae</i>	<i>Ulotrichales</i>		<i>Gloeotilopsis</i>	139	82		
			<i>chamaetrichon</i>	32	15			
<i>Streptophyta</i>	<i>Mesostigmatophyceae</i>	<i>Mesostigmatales</i>	<i>Mesostigmataceae</i>	<i>Mesostigma</i>	14740	372		
<i>Euglenida</i>	<i>Euglenoidea</i>	<i>Euglenales</i>	<i>Phacaceae</i>	<i>Phacus</i>	340	7		
			<i>Euglenaceae</i>	<i>Euglena</i>	23	61		
				<i>Strombomonas</i>	57	0		
				<i>Trachelomonas</i>	5138	39		

MICROALGAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR PIROSECUENCIACIÓN EN LA FUENTE GEOTERMAL DE CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE GÉNERO).

Los números significan las unidades taxonómicas operativas (OTUs) en cada muestra (M1, M2). Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 de la fuente geotermal de Chachimbiro. Se escogió las secuencias > 10 (OTU) de acuerdo al género. El número total de (OTUs) en cada muestra es de M1=86428 y M2=6125.

También se puede destacar que las especies más representativas dentro de los cuatro filios son *Stigonema spp.*, *Pseudoscourfieldia marina*, *Mesostigma viride* y *Trachelomonas cingulata*, tal como se observa en la **tabla 20**.

TABLA 20
MICROALGAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR PIROSECUENCIACIÓN PRESENTES EN LA FUENTE GEOTERMAL CHACHIMBIRO. (TABLA A NIVEL DE ESPECIE).

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

Los números significan las unidades taxonómicas operativas (OTUs) en cada muestra (M1, M2). Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 de la fuente geotermal de Chachimbiro. Se incluyen las secuencias > 10 (OTU) de acuerdo a la especie.

El número total de (OTUs) en cada muestra es de M1=86428 y M2=6125.

3.11.5 Bacterias fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas son microorganismos capaces de producir energía a través de la fotosíntesis. Poseen pigmentos de bacterioclorofila, junto con varios carotenoides (Núñez, 2003). Se encontraron dos bacterias fotosintéticas *Chlorobium limicola* y *Litorilinea aerophila* dentro de los filos *Chlorobi* y *Chloroflexi* respectivamente (Tabla 21).

TABLA 21
BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR PIROSECUENCIACIÓN PRESENTES EN LA FUENTE GEOTERMAL CHACHIMBIRO.

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	M1	M2
<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiales</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium</i>	<i>Chlorobium limicola</i>	251	2
<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldilineae</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineaceae</i>	<i>Litorilinea</i>	<i>Litorilinea aerophila</i>	6094	312

Los números significan las unidades taxonómicas operativas (OTUs) en cada muestra (M1, M2).

Las letras M1 y M2 provienen de muestras de sedimento, ubicadas en el punto P2 de la fuente geotermal de Chachimbiro. El número total de (OTUs) en cada muestra es de M1=6345 y M2=314

3.12 Cepario

Se realizó un listado de las cepas aisladas y se les asignó un código en una base de datos del laboratorio de microbiología - ESPE. A todos los tubos ependorf (2mL) con las cepas aisladas se los almacenó a -80°C (Figura 23).



Figura 23. Cepario de todas las cepas aisladas.

CAPÍTULO: DISCUSIÓN

4.1 Características Físicoquímicas

El trabajo se enfocó en la identificación de microorganismos presentes en la fuente geotermal Chachimbiro, por lo que es necesario realizar análisis físicoquímicos de las muestras estudiadas, con el propósito de examinar la composición química natural, donde se desarrolla la comunidad microbiana. El pH y la temperatura en los puntos 1 y 2 fueron de 7.28, 58.8 °C y 7.7, 56 °C respectivamente, temperatura correspondiente a microorganismos termófilos.

En las muestras analizadas de agua y sedimento, el pH osciló entre 6.5 y 7.5, de acuerdo a los resultados físicoquímicos de las **tablas 6 y 7**, lo que indica que la fuente geotermal presentó un pH neutro. La mayoría de fuentes geotermales tienden a ser alcalinas, aunque también pueden ser ácidas, por ejemplo las termas que contienen altas concentraciones de azufre (*Lesmes, y otros, 2004*). La concentración del ion sulfato según la **tabla 6**, muestra que es baja (44.2 mg/L), ya que el valor máximo admisible para aguas naturales es de 250 mg/L según (*Severiche & González, 2012*).

De acuerdo a las **tablas 6 y 7**, los análisis físicoquímicos en las muestras de agua de la fuente geotermal Chachimbiro presentan concentraciones altas de sodio (2187 mg/L), potasio (190 mg/L), magnesio (578,66 mg/L) y calcio (122,81 mg/L), mientras que los resultados en las muestras de sedimento muestran altas concentraciones de calcio (7295 mg/kg), hierro (14378 mg/kg), magnesio (1764 mg/kg) y potasio (3658 mg/kg). Además los análisis señalan que en las muestras de sedimento, la conductividad es alta, con un valor de 5000 uS/cm.

Estudios realizados en la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE en el año 2007, sobre el análisis físicoquímico en muestras de agua y sedimento en vertientes geotermales de Chachimbiro, mencionan altas concentraciones de bicarbonatos, carbonatos, hierro,

calcio, sodio y arsénico (**Tabla 1**). Las elevadas cantidades de arsénico estarían asociadas con los altos porcentajes de bicarbonatos y carbonatos, por lo que el arsénico forma complejos solubles según (*Brígida & Vallejo, 2007*). Al comparar estos resultados, se observa que la concentración de hierro, calcio y sodio fue alta para ambos estudios (**Tabla 1, 6 y 7**).

Se observa en la **tabla 6**, que la concentración de hierro (Fe) en muestras de agua, es de 1,60 mg/L y según Gray, 1996 las concentraciones de (Fe) para aguas subterráneas generalmente se encuentran entre los 0,5 – 10 mg/L, observándose que el valor de 1,60 mg/L se ubica en un rango normal.

La concentración de magnesio (Mg) supera el rango de acreditación según CESAQ-PUCE, con un valor de 578,66 mg/L de acuerdo a la **tabla 6**, por lo que era de esperarse, dado que el Mg es un mineral esencial y juega un papel importante como cofactor y activador de reacciones enzimáticas, además que desempeña un factor importante para el transporte de elementos tales como Na, K y Ca a través de las membranas de los microorganismos (*Uribe, 2007*).

Las concentraciones de calcio (Ca) fueron altas tanto para las muestras de agua como de sedimento, con valores que superaban los 100 mg/L y 4800 mg/Kg respectivamente (**Tablas 6 y 7**), ya que es un mineral importante para el crecimiento de microorganismos (*Uribe, 2007*). Estudios realizados por Michele *et al.*, 2008 reportan que en aguas termales la presencia de Ca se encontraba en altas concentraciones, superiores a los 443.29 mg/L, debido a que este elemento es muy abundante en la corteza terrestre.

La presencia de Fe y Mn (**Tablas 6 y 7**) sobresale en la fuente geotermal por el desarrollo de incrustaciones anaranjadas o negruzcas (*Uribe, 2007*), puesto que al momento del muestreo fueron evidentes en los puntos (P1 y P2) de la fuente geotermal de Chachimbiro (**Figura 4 y 5**).

La concentración de potasio (K) detectada en la fuente geotermal de Chachimbiro en el año 2007, presentaba una concentración de 133,25 mg/L (*Brígida & Vallejo, 2007*), valor inferior a (190 mg/L) registrada en esta investigación (**Tabla 6**). La existencia del ión K⁺ se relaciona con la disolución de potasio proveniente de feldespatos o mica, minerales que se hallan dentro de rocas (Suck et al., 1999).

La conductividad eléctrica (CE) en el agua es de 6500 uS/cm. La CE es un indicador de la concentración de especies iónicas en el agua (*Moreno et al., 2007*). Estudios realizados en Venezuela mencionan que la conductividad eléctrica en aguas termales aumenta conforme se incrementan los sólidos totales (*Moreno, y otros, 2007*), lo que se justificó con los resultados físicoquímicos descritos en la (**Tabla 6**), donde la CE (6500 uS/cm) y los sólidos totales (>2000 mg/L) fueron altos, según Moreno y CESAQ-PUCE.

Estudios realizados en los manantiales La Paz y María Grande en Argentina, sobre los análisis físicoquímicos, indicaron que las concentraciones de cloruros eran altas, ya que presentaban concentraciones de 37252.1 mg/L y 54831 mg/L respectivamente (*Michele, y otros, 2008*), valores superiores a la registrada en la fuente geotermal de Chachimbiro (4580.7 mg/L) (**Tabla 6**).

Temperatura

La temperatura de las fuentes geotermales depende de la distancia de infiltración que posee el agua a lo largo de las fallas geológicas. El Ecuador está rodeado de fallas donde se forman hábitats extremos con abundante biodiversidad, sin embargo estos hábitats dependen de múltiples factores como la concentración de compuestos o por factores físicos (*Bernal, 2015*).

La cepa bacteriana que presentó mayor presencia en las termas de Chachimbiro fue *Bacillus licheniformis*, debido al rango de temperatura de crecimiento (30-60°C) (*García, y otros, 2016*), por ejemplo en la fuente geotermal de la India se aisló *B. licheniformis* a rangos de temperatura de 40-55°C (*Acharya & Chaudhary, 2012*), aunque en otros

estudios se ha encontrado que puede crecer favorablemente a temperaturas mayores (García, y otros, 2016). *B. licheniformis* es una bacteria Gram-positiva, formadora de esporas, lo que le permite soportar a altas temperaturas.

Los resultados descritos corroboran con otros estudios realizados en el mundo, donde se ha descrito que el género *Bacillus* se encuentra ampliamente en la naturaleza, son bacterias formadoras de esporas, Gram-positivas y han sido aisladas a temperaturas entre los 45 y 70 °C (Nazina, y otros, 2001). Por ejemplo *B. licheniformis* se ha aislado de suelos y plantas de todo mundo, aunque también se ha registrado en fuentes geotermales o marinas (Arena, y otros, 2006) y (Acharya & Chaudhary, 2012).

Otra de las cepas con mayor prevalencia fue *Anoxybacillus gonensis*, es un bacilo alargado, formador de esporas, Gram positivo. Según (Belduz, Dulger, & Demirbag, 2003), *A. genensis* se halla en ambientes con temperaturas desde los 50°C hasta los 70°C, por lo que concuerda con la temperatura de la fuente geotermal de Chamchimbiro de 58°C.

Geobacillus caldoxylosilyticus es un bacilo que se ha encontrado regularmente en la tierra volcánica a rangos de temperaturas entre los 40 y 70°C, con pH cercanos a 6,5 y 7. *G. caldoxylosilyticus* es una bacteria aeróbica facultativa, estudiada en la última década por su tolerancia a hábitats extremos, incluso se la encontrado a temperaturas de 80°C y concentraciones 3,5% de NaCl, lo que demuestra que son muy tolerantes al estrés salino (Abdelkader & Esawy, 2011).

Bacillus tequilensis fue aislado en el año 2000, es un bacilo Gram positivo formador de endoesporas (Gatson, y otros, 2006), desde entonces se lo ha venido estudiando por su gran resistencia a temperaturas muy altas, según (Sondhi, y otros, 2014) pueden soportar temperaturas hasta los 85 ° C. En dicho estudio se menciona que fue aislado a partir de lodos activados de una planta de tratamiento.

Hay reportes de que los géneros de microalgas *Oscillatoria* y *Lyngbia* se encuentran presentes en manantiales de España, donde las temperaturas se registran entre los 60 y 67

°C, cabe recalcar que estos manantiales tienen concentraciones altas de bicarbonato de sodio (*Meijide , y otros, 2015 Rodríguez, M. C. L., & Carballeira, R.*). Otro de los géneros presentes en aguas termales, con temperaturas por encima de los 60 °C, es el género *Didymosphenia*, el cual fue encontrado en aguas termales de Rusia en la isla Kuriles (*Nikulina & Kociolek, 2011*).

Las cianobacterias son conocidas por su presencia en varios entornos, incluyendo sedimentos costeros, manantiales salinos, estanques, lagos hipersalinos y manantiales termales, con temperaturas hasta los 74 °C y pH que comprenden entre los 4 y 8 (*Ward D. M., World Foundation for Environment and Development-WFED., 2005*).

El presente estudio indica la predominancia del filo *Cianobacteria*, conocidas por su diversidad en hábitats (*Meijide , y otros, 2015 Rodríguez, M. C. L., & Carballeira, R.*). En manantiales calientes de España se reportó la presencia del filo *Cianobacteria*, donde los géneros *Oscillatoria* y *Lynbia* eran los más abundantes, además de que las temperaturas eran entre los 60 y 67°C (*Meijide , y otros, 2015 Rodríguez, M. C. L., & Carballeira, R.*). También hay registros de que el género *Didymosphenia* fue encontrado en aguas termales de Rusia en la isla Kuriles, a temperaturas desde los 24°C hasta los 71°C (*Nikulina & Kociolek, 2011*), similares a la temperatura de la fuente geotermal de Chachimbiro (58°C).

4.2 Aislamiento

El aislamiento de bacterias, microalgas y hongos se realizó a partir de muestras de agua y sedimento de la fuente geotermal Chachimbiro. Se escogió medios de cultivo ricos en nutrientes y minerales como LB (Luria Bertani), M9 (mineral médium), PDB (Agar de papa – dextrosa) y medio BG11, debido a que la terma de Chachimbiro contiene algunos minerales según (*Rodríguez & Vallejo , 2007*). También se empleó medio R2A, dicho medio se utiliza para bacterias de lento crecimiento, ya que los niveles bajos de nutrientes,

junto con la adición de piruvato de sodio, mejora la recuperación de muchas bacterias estresadas (*Latorre , 2007*).

Las bacterias tuvieron buen crecimiento en medio LB, debido a la cantidad de nutrientes y minerales que contiene este medio. En el **Anexo A.1** se puede observar el medio de cultivo en el que crece cada bacteria. El medio BG11 fue necesario para el crecimiento de microalgas ya que es rico en nitratos, fosfatos y carbono, lo que favorece al crecimiento de algas fotoautótrofas y cianobacterias (*Gómez, y otros, 2009*).

El pH en los puntos 1 y 2 fueron de 7.28 y 7.7 respectivamente, por esta razón se prepararon los medios de cultivo a un pH de 7. Al igual que el pH, para la incubación se tomó en cuenta la temperatura de ambos puntos de muestreo (58.8°C y 56°C respectivamente) (**Tabla 6**).

4.3 Identificación molecular

Se identificaron molecularmente 28 cepas bacterianas, cinco microalgas y no se obtuvo resultado para crecimiento de hongos, esto podría haberse dado a la falta de nutrientes específicos o a la existencia de hongos no cultivables presentes en las muestras tomadas.

La identificación de cepas bacterianas se realizó mediante la amplificación del gen 16S rRNA, mientras que para microalgas se utilizó el gen 23S rRNA.

4.3.1 Bacterias

Con la ayuda de la técnica de PCR y el uso de primers universales se amplificó los fragmentos de las cepas aisladas. De las 28 cepas bacterianas aisladas, se secuenciaron 22 productos de PCR, de acuerdo a los resultados del análisis de polimorfismo de longitud de fragmento (RFLP). Después de realizarse los análisis de RFLPs, se agruparon los

patrones de restricción de cada amplicón mediante una corrida electroforética y se tomó en cuenta los patrones similares (**Figura 13, 14 y 15**) (Colleen , y otros, 2013).

Se observaron nueve patrones de corte (**Tabla 8**), donde los grupos (A, B, C y D) obtuvieron como resultado más cepas representantes, sin embargo de los grupos A, C y D se escogieron entre cuatro y cinco cepas bacterianas por cada grupo, mientras que del grupo B, se escogió tres cepas. En total se enviaron 22 productos de PCR del gen 16S rARN a la empresa “Macrogen” Korea para su secuenciación Sanger (**Tabla 8**).

De acuerdo a los resultados de RFLPs, algunos patrones de restricción no coincidieron con los amplicones secuenciados. Según los análisis de RFLPs se observaron nueve patrones de corte (**Tabla 8**), pero de acuerdo a los resultados moleculares, se obtuvieron cinco patrones de corte o cinco cepas diferentes (**Tabla 10**). Los análisis de RFLPs indican que las cepas 9, 14 y 25 del grupo B, no correspondieron con los resultados moleculares, ya que cada cepa era diferente; de igual manera en el grupo C, la cepa 24 *Bacillus licheniformis* fue diferente con las cepas 3 y 5 *Geobacillus caldoxylosilyticus* (**Tabla 10**).

Se obtuvieron las secuencias consenso de los aislados y se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos (NCBI), mediante un BLASTN. Se tomó en cuenta el grado de similitud y los porcentajes de cobertura. Como resultado de este análisis, se identificaron las secuencias entregadas por la compañía “Macrogen”. Como se observa en la **Tabla 9**, cada cepa bacteriana fue identificada con el organismo más cercano, obteniéndose cinco especies diferentes: *Bacillus licheniformis* con un (99%, 96% y 96%) de identidad, *Geobacillus caldoxylosilyticus* (99%), *Fictibacillus gelatini* (99%), *Anoxybacillus gonensis* (100% y 99%) y *Bacillus tequilensis* (99%).

Se conto con un solo aislado de la cepa 2 (**Tabla 10**), identificado con el organismo más cercano *Bacillus tequilensis*, con un porcentaje de identidad del 99%, está relacionado estrechamente con *Bacillus subtilis* (Gatson, y otros, 2006). Al realizarse un Blast-N de la secuencia (cepa 2) en la base de datos NCBI, se obtuvieron dos microorganismos

cercanos, *Bacillus tequilensis* (99%) y *Bacillus subtilis* (99%), por lo que se debería realizar la amplificación de otros genes para corroborar la especie de la cepa 2.

La cepa 25 de acuerdo a la **Tabla 9**, se identificó a nivel de género (*Bacillus*), ya que presentó porcentajes de identidad del 96 % y cobertura del 100%. De acuerdo a estos porcentajes de cobertura e identidad se pensaría en una nueva especie, aunque se debería realizar la amplificación de otros genes como rpoB (subunidad β de la ARN polimerasa) y gyrB (subunidad β de la ADN girasa) (Olmos, y otros, 2010).

Las cepas 5, 6 y 24 presentaron porcentajes bajos tanto para cobertura e identidad, por lo que no se puede afirmar su identificación en su totalidad, debido a que el ADN mostró mala calidad, mientras que para la cepa 17 no se pudo obtener una secuencia consenso, probablemente por la baja concentración del ADN o mala calidad (**Tabla 9**). La cepa 26 también presentó porcentajes bajos de cobertura (91%), pero el porcentaje de identidad fue alto (99%), lo cual se le atribuye a una baja calidad del ADN genómico, ya que al momento de obtener la secuencia consenso solo se observó un pequeño fragmento de 200 pb aproximadamente. Los primers utilizados (27F y 1492R) amplifican aproximadamente unos 1500 pb del gen 16S rRNA, por lo que este pequeño fragmento consiguió una similitud o identidad con la secuencia *Fictibacillus gelatini* depositada en la base de datos NCBI.

Se construyeron árboles filogenéticos para corroborar la taxonomía de las secuencias identificadas. El método utilizado fue el de Neighbor-joining de máxima verosimilitud (Chim & Antonio, 2013), con un bootstrap de 1000 y con un modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano. Al observar la topología de los árboles filogenéticos, se puede decir que las cepas bacterianas 2, 4, 9, 11 y 21 corresponden a las secuencias comparadas en la base de datos NCBI, mientras que la cepa 25 se logró identificar hasta género, por falta de información en la base de datos NCBI o a que sea una nueva especie (**Figura 17**).

4.3.2 Microalgas

Con la ayuda de la técnica de PCR y el uso de primers universales se amplificaron los fragmentos de las colonias aisladas para microalgas. Los cinco productos de PCR del gen 23S rRNA fueron enviados para su respectiva secuenciación a la empresa “Macrogen” (**Figura 16**).

Las secuencias consenso obtenidas del gen 23S rRNA también se sometieron a un análisis de similitud en la base de datos NCBI y como resultado se identificaron cinco especies de microalgas: H1= *Lyngbya aestuarii* con un 91% de identidad, H2= *Nostoc punctiforme* (96%), H3= *Didymosphenia geminata* (97%), H4= *Fischerella muscicola* (98%) y H5= *Stanieria cyanosphaera* (99%).

En el árbol filogenético (**Figura 18**) se observa que las cepas H3 y H4 se logró identificar a nivel de género con porcentajes de identidad mayores a 97 %, mientras que los aislados H1 y H2 a nivel de orden y familia respectivamente, ya que presentaban porcentajes de identidad menores a 97 %. No existen registro de secuencias del gen 23S rRNA en la base de datos NCBI que correspondan a dicho taxón, ya que este gen recientemente se lo está utilizando para la identificación de especies. De acuerdo a los resultados moleculares, la cepa H5 (*Stanieria cyanosphaera*) se llegó hasta especie, con un porcentaje de identidad del 99 %.

Comparando los resultados morfológicos y moleculares en el caso de los aislados H1, H2, H3 y H4 se identificó a nivel de género en ambos resultados, mientras que los resultados morfológicos y moleculares para la cepa H1, no coinciden, por lo que solo se llegó a nivel de familia.

En aguas termales de Indonesia se encontraron cepas del género *Stanieria*, en donde se menciona que es difícil la identificación morfológica, por lo que se consideró hacerlo mediante la amplificación del gen 16S rRNA, donde se obtuvo que todas las cepas aisladas presentaban un grado de similitud a *S. cyanosphaera*, con porcentajes entre el 95 % y 99 % (*Prihantin, Sjamsuridzal, & Yokota, 2016*). Comparando los resultados descritos por este estudio, la cepa H5 (*stanieria*) también obtuvo un grado de similitud a *S.*

cyanosphaera con porcentajes de identidad del 99%, mediante la amplificación del gen 23S rARN.

4.3.3 Pirosecuenciación.

La técnica molecular pirosecuenciación es un método usado para el estudio de la biodiversidad de microorganismos presentes en muestras ambientales. Mediante esta técnica, se realizó análisis para muestras de agua y sedimento de la fuente geotermal de Chachimbiro. Los primers utilizados se pueden observar en la **Tabla 5**. Todas las secuencias obtenidas se clasificaron en unidades taxonómicas operativas (OTUs), usando umbrales de similitud de acuerdo a la empresa “MR DNA- E.E.U.U” donde se realizó los análisis: Especie (>97%), Género (95-97%), Familia (90-95%), Orden (85-90%) y Filo (80-85%). Por debajo del 80 % se consideraron como no clasificadas.

4.3.3.1 Comunidad bacteriana

De acuerdo a los resultados de la **tabla 14**, en la fuente geotermal Chachimbiro los filos predominantes fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, aunque se puede destacar que el filo *Proteobacteria* es el grupo con mayor presencia en las muestras de agua y sedimento de la fuente geotermal. Las clases más predominantes dentro del filo *Proteobacteria* fueron *Alfa-*, *Beta-*, *Delta-* y *Gammaproteobacteria*.

Los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* tuvieron mayor número de OTUs, con varios géneros representantes, aunque también se puede observar otros filos que alcanzaron un número significativo de (OTUs) como *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Deinococcus thermus*, *Ignavibacteriae* y *Nitrospirae*.

Estudios indican que las *Proteobacterias* proliferan favorablemente en ambientes acuáticos y suelos (*Park, 2011*), por lo que en las muestras de agua y sedimento de la fuente geotermal de Chachimbiro este filo obtuvo el mayor número de OTUs.

Géneros principales

Se escogieron las (OTUs) > 100 y se tomó en cuenta las (OTUs) < 100 de los géneros pertenecientes al filo *firmicutes* (**Tabla 13**), ya que los géneros aislados e identificados pertenecen al filo *firmicutes* (**Tabla 10**). Los géneros aislados *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus* y *Fictibacillus* coincidieron con los resultados de la pirosecueciación.

Muchos de los *Firmicutes* producen endosporas, haciéndolos resistentes a ambientes extremos, como las fuentes geotermales. Dentro de este filo se observan los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (**Tabla 13**), considerados como bacterias termófilas esporuladas (Gorgoroso, 2012). Hay otros géneros como: *Caldicellulosiruptor*, *Thermovenabulum*, *Thermoanaerobacter*, *Thermaerobacter*, *Anoxybacillus* y *Geobacillus* conocidos como termófilos dentro del filo *firmicutes* (Satyanarayana, Littlechild, & Kawarabayasi, 2013) y (Ogg, Greene, & Patel, 2010).

Thermolithobacter fue el género que mayor presencia obtuvo dentro del filo *Firmicutes*, aunque fue el único género presente, dentro de la clase *Thermolithobacteria* (**Tabla 13**). Este género es conocido como bacterias termófilas, ya que por lo general se los encuentra a temperaturas entre los 50 y 75°C, son bacilos anaerobios Gram positivos (Sokolova, y otros, 2007., Banta, A., Geyer, R. J. M. G., ... & Wiegel, J.).

En la fuente geotermal de Chachimbiro, los géneros que obtuvieron el mayor número de OTUs dentro del filo *Proteobacteria* fueron *Derxia* y *Nitrosomonas*, debido a que estos géneros se los encuentra con frecuencia en ambientes de agua dulce o sedimentos (Bock, Schmidt, Stüven, & Zart, 1995) y (Chen, Huang, & Sheu, 2013).

Al igual que los *Firmicutes* hay otros filos como: *Actinobacteria*, *Chloroflexi* y *Bacteroidetes* considerados por tener géneros termófilos (Tang, 2012), por ejemplo el género *Rhodothermus* se lo ha encontrado en ambientes con temperaturas superiores a los 60 °C (Alfredsson, Kristjansson, Hjorleifsdotir, & Stertter, 1998).

Al observar la **tabla 13**, se puede destacar también que los géneros *Nitrospira*, *Thermus*, *Thermodesulfovibrio*, *Ignavibacterium* y *Meiothermus* fueron significativos en las muestras analizadas de la fuente geotermal de Chachimbiro. Sobresale género *Thermus*, conocido por la bacteria *Thermus aquaticus*, ya que esta bacteria ha demostrado ser útil en el campo biotecnológico por la enzima Taq polimerasa.

Especies principales

Para el análisis de la comunidad bacteriana se escogió las (OTUs) > 100 y se tomó en cuenta las especies del filo *firmicutes* < 100 (OTUs) (**Tabla 14**), ya que las cepas aisladas e identificadas pertenecen a este filo (**Tabla 10**). Se escogió los OTUs < 100 con el propósito de comparar con los resultados de pirosecuenciación, donde las cepas aisladas e identificadas *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Anoxybacillus genensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus tequilensis* y *Fictibacillus gelatini*, coincidieron con los resultados de la técnica de pirosecuenciación (**Tabla 14**).

Como ya se ha mencionado anteriormente el filo *Firmicutes* presentó dos grandes clases *Clostridia* y *Bacilli*, en donde *Bacillus licheniformis* es la especie con mayor número de OTUs dentro de este filo. La bacteria *B. licheniformis* es la especie que más aislados presentó en comparación de las otras cepas aisladas e identificadas (**Tabla 10**). Las especies *Staphylococcus epidermidis*, *Caloramator proteoclasticus*, *Thermovenabulum spp.*, *Thermaerobacter sp.* y *Thermolithobacter spp.*, también fueron significativos dentro del filo *firmicutes* (**Tabla 14**).

Al analizar el filo *Proteobacteria* en la **tabla 14**, se observaron que las especies *Gemmobacter megaterium*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Rhodovulum euryhalinum*, *Sideroxydans paludicola*, *Sideroxydans spp.*, *Anaeromyxobacter spp.*, *Nitrosomonas spp.* y *Pseudomonas sp.*, obtuvieron el mayor número de OTUs dentro de este filo, aunque *Burkholderia pyrrocinia* y *Nitrosomonas spp.* fueron las especies mas representativas.

Aparte de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria*, hay otros filos que presentaron especies con mayor número de OTUs como: *Thermodesulfobacterium spp.*, *Propionibacterium acnés*, *Thermus spp.*, *Meiothermus sp.*, *Thermodesulfovibrio spp.*, *Candidatus acetothermum* *Acetothermus autotrophicum*, *Sphingobacterium spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Ignavibacterium álbum*, *Chloroflexus aurantiacus* y *Bellilinea spp.* y en su mayoría se los considera como microorganismos termófilos. Por ejemplo la especie *Acetothermus autotrophicum* se lo aisló en ambientes termófilos, aunque recientemente se está estudiando su genoma (Takami, y otros, 2012).

4.3.3.2 Hongos

Se observan las OTUs para hongos, en donde el filo *Ascomycota* sobresale de los cinco filos encontrados (*Gomeromycota*, *Cryptomycota*, *Mucoromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota*), ya que presentó varios géneros, aunque el filo *Cryptomycota* fue el grupo que mayor número de OTUs obtuvo (Tabla 16). Los géneros *Paramicrosporidium*, *Hygrocybe* y *Hydnotryopsis* son los más representativos de todos los géneros encontrados.

Al igual que los géneros ya mencionados, las especies *Paramicrosporidium fungal sp.*, *Hygrocybe persistens* y *Hydnotryopsis setchellii* son las especies más representativas (Tabla 16). *Paramicrosporidium fungal sp* es la única especie microscópica formadora de esporas o esporas aflageladas (Corsaro, y otros, 2014).

4.3.3.3 Arqueas

Las OTUs obtenidos para arqueas, representaron un total de 132521 OTUs (Tabla 17), en donde los filos *Euryarchaeota* y *Thaumarchaeota* obtuvieron mayor presencia. Se puede destacar dentro de estos dos filos los géneros *Thermogymnomonas* y *Nitrososphaera*, ya que presentaron el mayor número de OTUs.

Nitrososphaera gargensis fue descubierta en fuentes geotermales de Garga-Siberia, se desarrolla en presencia de amoníaco y nitrógeno con temperaturas mayores a los 46°C

(*Hatzenpichler et al., 2008*). Esta especie fue la más predominante en las muestras analizadas mediante la pirosecuenciación (**Tabla 18**).

Thermogymnomonas es un género que soporta pH muy bajos entre los 2 y 4, pero al observar el pH de la fuente geotermal de Chachimbiro de 7 aproximadamente (**Tabla 6**), indica que este género también podría adaptarse a un pH neutro, además del pH, la temperatura óptima de las *Thermogymnomonas* son superiores a los 60°C (*Itoh, Yoshikawa, & Takashina, 2007*), es el segundo género en presentar un número de OTUs significativos dentro del reino arquea (**Tabla 18**).

4.3.3.4 Microalgas

El filo *Cyanobacteria* es el más representativo, aunque el filo *Chlorophyta* obtuvo mayor número de géneros y especies de acuerdo a las **tablas 19 y 20**.

El filo *cyanobacteria* es diverso en ambientes costeros, manantiales termales, estanques y lagos hipersalinos, con temperaturas muy bajas hasta los 74 °C y pH que comprenden entre los 4 y (*Ward et al., 1998*). De acuerdo a estas condiciones las *Cyanobacterias* presentaron el mayor número de OTUs en la fuente geotermal de Chachimbiro.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron seis cepas bacterianas, cinco a nivel de especie *Anoxybacillus gonensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus caldxylosilyticus*, *Fictibacillus gelatini* y una a nivel de género *Bacillus*.

Se aislaron e identificaron cinco microalgas. El filo *Cyanobacteria* (microalgas procariotas) fue el grupo dominante.

Mediante la técnica de pirosecuenciación se identificaron cinco filos (*Gomeromycota*, *Cryptomycota*, *Mucoromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota*), pertenecientes al reino Fungi.

Además de la identificación de bacterias, hongos y microalgas, se identificaron cuatro filos (*Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thaumarchaeota* y *Crenarchaeota*) dentro del reino Arquea, mediante la técnica de pirosecuenciación.

Las cepas aisladas poseen aplicaciones biotecnológicas descritas en investigaciones científicas en todo el mundo, principalmente por sus moléculas termoestables, como es el caso de la bacteria *Geobacillus caldxylosilyticus*, recientemente descubierta y estudiada por su relación al control de enfermedades patógenas, ya que puede regular la expresión de genes virulentos.

Con las cepas identificadas se realizó un cepario, se les asignó un código y se los archivó en una base de datos, con el propósito de obtener una colección de todas las cepas termófilas aisladas de la fuente geotermal Chachimbiro, para futuras investigaciones.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Es necesario realizar la identificación molecular de las cepas bacterianas, con la ayuda de otros genes, como la amplificación de los genes rpoB (subunidad β de la ARN polimerasa) y gyrB (subunidad β de la ADN girasa).

Se recomienda secuenciar los seis productos de PCR bacterianos restantes (1, 7, 10, 13, 18 y 20).

Se deja establecido que esta investigación abre posibles estudios, como la extracción de nuevas enzimas termoestables, para emplearlas en el campo biotecnológico.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Mejjide , R., Leira, M., Vaamonde, J. T., Rodríguez, M. C., Carballeira, R., & . (2015 Rodríguez, M. C. L., & Carballeira, R.). *Estudio del componente biológico de las aguas mineromedicinales y termales de Ourense: Burgas y Outariz.*
- Abdelkader, A. F., & Esawy, M. A. (2011). *Case study of a biological control: Geobacillus caldxylosilyticus (IRD) contributes to alleviate salt stress in maize (Zea mays L.) plants.* Acta Physiologiae Plantarum, 33(6), 2289.
- Acharya, S., & Chaudhary, A. (2012). *Optimization of fermentation conditions for cellulases production by Bacillus licheniformis MVS1 and Bacillus sp. MVS3 isolated from Indian hot spring.* Brazilian archives of biology and technology, 55(4), 497-503.
- Adley, C. (2006). *Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols.* New Jersey. EEUU: Humana Press.
- Alfredsson, G. S., Kristjansson, J. K., Hjorleifsdotir, S., & Stertter, K. O. (1998). *Rhodothermus marinus, gen. nov., sp. nov., a thermophilic, halophilic bacterium from submarine hot springs in Iceland.* Microbiology, 134(2), 299-306.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.* Microbiological reviews, 59(1), 143-169.
- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2004). *Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques.* Environmental Microbiology, 6(8), 769-779.
- Andrade, C., Pereira Jr, N., & Antranikian, G. (1999). *Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hidrolytic enzymes.* Revista de Microbiologia, 30(4), 287-298.
- Arena, A., Maugeri, T. L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., & Bisignano, G. (2006). *Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant Bacillus licheniformis.* International immunopharmacology, 6(1), 8-13.
- Belduz, A. O., Dulger, S., & Demirbag, Z. (2003). *Anoxybacillus gonensis sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(5), 1315-1320.

- Bellinger, G. E., & Sigeo, D. C. (2010). *Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators*. A John Wiley & Sons, Ltd, 101.
- Bernal, G. (2015). *La microbiología de suelo en el Ecuador: situación actual de la investigación*. Quito, Ecuador. X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. La-Microbiologia-de-Suelos.pdf.
- Blaschke, A. J., Bender, J., Byington, C. L., Korgenski, k., Daly, J., Petti, C. A., & Ampofo, k. (2007). *Gordonia species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing*. *Clinical infectious diseases*, 45(4),483-486.
- Bock, E., Schmidt, I., Stüven, R., & Zart, D. (1995). *Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor*. *Archives of Microbiology*, 163(1), 16-20.
- Borja, J. , E., Zavaleta, A, I., & Izaguirre, V. (2013). *Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto*. *Ciencia e Investigación*, 15(2), 66-70.
- Brígida, R., & Vallejo, C. (2007). *Distribución, especiación y movilización del arsénico en las aguas geotermales de la zona centro-norte de los andes ecuatorianos*. Tesis de Licenciatura. SANGOLQUI/ESPE/2007.
- Cai, Y., & Wolk, C. O. (1990). *Use of a conditionally lethal gene in Anabaena sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences*. *Journal of Bacteriology*, 172(6), 3138-3145.
- Cárdenas, M., Conde, E., Escamil, M., Luna, M., ., ., & . (2006). *The impact of microbial communities for agriculture*. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Research Signpost, Celeya Guanajuato, México, 135-174.
- Castillo, F., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C., & Luque, M. (2005). *Microorganismos extremófilos*. En F. Castillo (coord.). *Biología ambiental*, (pp. 385). Madrid: España: Tébar.
- Chen, W. M., Huang, W. C., & Sheu, S. Y. (2013). *Dexia lacustris sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a freshwater lake*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(3), 965-970.
- Chim, C., & Antonio, W. (2013). *Análisis filogenético de Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid*.
- Colleen , T., Elaine, I., Matthew , T., James , R., ., & . (2013). *Fundamentals of Pyrosequencing*. *Arch Pathol Lab Med*, —Vol 137.

- Corsaro, D., Walochnik, J., Venditti, D., Steinman, J., Muller, K. D., Michel, R., & . (2014). Corsaro, D., Walochnik, J., *Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota*. *Parasitology research*, 113(5), 1909-1918.
- De Armas, L., & Bisset, L. (2005). *Modification of a method to extract genomic DNA from Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2), 203-206.
- de Oliveira, T. B., Gomes, E., & Rodrigues, A. (2015). *Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy*. *Extremophiles*, 19(1), 31-37.
- Duran, C., Bulut, N., Gundogdu, A., Soylak, M., Belduz, A., Beris, s., . . . , .. (2009). *Biosorption of heavy metals by Anoxybacillus gonensis immobilized on Diaion HP-2MG*. *Separation Science and Technology*, 44(2), 335-358.
- Duret, L., & Abdeddaim, S. (2000). *Multiple alignment for structural, functional, or phylogenetic analyses of homologous sequences*. *Bioinformatics: Sequence, Structure, and Databanks*, 51-76.
- Felföldi, T., Somogyi, B., Marialigeti, K., VÖRÖ, ., & . (2009). *Characterization of photoautotrophic picoplankton assemblages in turbid, alkaline lakes of the Carpathian Basin (Central Europe)*. *Journal of Limnology*, 68(2), 385-395.
- García, J. A., Maqueda, A. P., Téllez, A., Hernández, R., LizarARDI, M. A., & . (2016). *Maya Crude-Oil Degradation by a Bacillus licheniformis Consortium Isolated from a Mexican Thermal Source Using a Bubble Column Bioreactor*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(11), 413.
- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C. S., Satomi, M., Venkateswaran, K., & Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to Bacillus subtilis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7), 1475-1484.
- Gómez, N. O., Donato, J., Giorgi, A. D., Guasch, H., Mateo, P. I., & Sabater, S. E. (2009). *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*.
- Gonçalves, A. B. (2007). *Aplicaciones biotecnológicas del gen" afp"(Antifungal Protein) de" Aspergillus giganteus" para la protección de plantas frente a infección por patógenos*. (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- Gorgoroso, F. (2012). *Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos pertenecientes al grupo Bacillus subtilis*. (No. 577.12 GOR). UR. FC.

- Guerrero, J., Egea, F., & Martínez, E. (2013). *Interdisciplinaria en Biotecnología. En Jornadas Internacionales sobre Agricultura Intensiva (pp. 101). España: Universidad de Almería.*
- Guerrero, L. D. (2012). *Comunidades bacterianas en suelos bajo siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Influencia del manejo y propuesta de nuevos indicadores biológicos (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).*
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E. V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., & Wagner, M. (2008). *A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(6), 2134-2139.*
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E. V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., & Wagner, M. (2008). *A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(6), 2134-2139.*
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E. V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., . . . (2008). *A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring.*
- Heller, O., Purves, H., & Savada, D. (2009). *Reconstrucción y uso de filogenias. En S. Fernández (Ed), Vida: La ciencia de la biología (pp. 1226). Madrid. España: Médica Panamericana.*
- Herrera, J. M. (2005). *Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S (Doctoral dissertation, Tesis Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México 186pp).*
- Islas, S., Velasco, A., Becerra, A., Delaye, L., Lazcano, A., & . (2007). *Extremophile and the origin of life. ASMscience, 10 (1), 3-10.*
- Itoh, T., Yoshikawa, N., & Takashina, T. (2007). *Thermogymnomonas acidicola gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 57(11), 2557.*
- Jan, J., & Le Borgne, S. (2001). *Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad.*
- Kae, H. (2003). *Genome projects: uncovering the blueprints of biology. The Science Creative Quarterly, [en línea],(3).*
- Kang, T. J., & Yang, M. S. (2004). *Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. BMC biotechnology, 4(1), 20.*

- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.
- Latorre, N. E. (2007). *Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los andes*. (Bachelor's thesis).
- Lesmes, L. E., Bobadilla, L. I., Hernandez, M. L., Cañon, Y., Mojica, J. I., & Garzón, G. L. (2004). MINERALOGÍA Y FISICOQUÍMICA DE LAS FUENTES TERMALES DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO. *BOLETÍN DE GEOLOGÍA*, 26(1).
- Luna, F. J., & Fontalvo, J. L. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio: microbiología general y aplicada*. (No. Doc. 26935) CO-BAC, Bogotá).
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., & Dewell, S. B. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.
- Michele, D., Giacomino, M., Belderrain, A., Armijo, F., Corvillo, I., & Maraver, F. (2008). Análisis de las aguas minerales de la provincia de Entre Ríos, Argentina. In *Anales de Hidrología Médica*, (No. 4, pp. 55-84).
- Moreno, C., Díaz, J., Caraballo, H., Chacón, K., Baptista, J., & . (2007). Caracterización Hidrogeoquímica de las fuentes de aguas termales del Estado Trujillo-Venezuela. *Academia*, 6(12), 92-105.
- Naranjo, R. (2016). *Identificación y caracterización de microalgas presentes en las fuentes geotermales de Baños de Agua Santa, Guapán, Papallacta, Chachimbiro y Aguas Hediondas*.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. N., Novikona, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.
- Nichols, J. M., & Adams, D. G. (1982). Akinetes. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs. 387- 412. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Nikulina, T. V., & Kociolek, J. P. (2011). Diatoms from hot springs from Kuril and Sakhalin Islands (Far East, Russia). In *The diatom world*. (pp. 333-363). Springer Netherlands.

- Nojima, H. (2005). *A group of genes which is differentially expressed in peripheral*. Patent: JP 2005102694-A 175 21-APR-2005.
- Núñez, M. A. (2003). *islamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la laguna de Tampamachoco, Veracruz*. *Hidrobiológica*, 13(3), 171-176.
- Ogg, C. V., Greene, A. C., & Patel, B. K. (2010). *Thermovenabulum gondwanense sp. nov., a thermophilic anaerobic Fe (III)-reducing bacterium isolated from microbial mats thriving in a Great Artesian Basin bore runoff channel*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(5), 1079-1084.
- Oliart, R. M., Manresa, Á., & Sánchez, O. (2016). *Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico*. *CienciaUAT*, 11(1), 79-90.
- Olmos, A. F., de la Fuente, C. G., Nieto, A. S., Ramos, S. V., ., & . (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*.
- Park, S. (2011). *Phylogenetic studies on marine bacteria within the phylum Proteobacteria and Bacteroidetes*. (Doctoral dissertation).
- Prihantin, N. B., Sjamsuridzal, W., & Yokota, A. (2016). *Description of Stanieria strain of cyanobacteria isolated from hot spring in Indonesia*. In T. Mart, & D. Triyono (Eds.). *AIP Conference Proceedings*, (Vol. 1729, No. 1, p. 020066).
- Reddy, M. V., Amulya, K., Rohit, M. V., Sarma, P., ., & . (2014). *Valorization of fatty acid waste for bioplastics production using Bacillus tequilensis: integration with dark-fermentative hydrogen production process*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(14), 7616-7626.
- Rodríguez, A. R., Corral, O. L., & Linares, L. (2006). *AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TERMOFILOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR HIDROCARBUROS*.
- Rodríguez, B., & Vallejo , P. (2007). *Distribución, especiación y movilización del arsénico en las aguas geotermales de la zona Centro-Norte de los Andes Ecuatorianos*.
- Rodríguez, C. (2005). *Biotecnología ambiental*. Editorial Tebar.
- Rucci, E. (2013). *Computación eficiente del alineamiento de secuencias de adn sobre cluster de multicoros* (Doctoral dissertation, Facultad de Informática).

- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., Mabilat, C., & . (1996). .Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3), 669-674.
- Satyanarayana, T., Littlechild, J., & Kawarabayasi, Y. (2013). *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology*. In *biotechnology of thermophiles*.. Springer.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Miller, A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Severiche, C. A., & González, H. (2012). Evaluación analítica para la determinación de sulfatos en aguas por método turbidimétrico modificado. *Ingenierías USBmed*, 3(2), 6-11.
- Sherwood, A. R., & Presting, G. G. (2007). Universal Primers Amplify a 23s Rdna Plastid Marker in Eukaryotic Algae and Cyanobacteria1. *Journal of phycology*, 43(3), 605-608.
- Sokolova, T., Hanel, J., Onyenwoke, R. Y., Reysenbach, A. Ñ., Banta, A., Geyer, J. M., & Wiegel, J. (2007 ., Banta, A., Geyer, R. J. M. G., ... & Wiegel, J.). Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov. and *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. *Extremophiles*, 11(1), 145-157.
- Solanki, A., & Gupta, D. (2013). Studies on Adaptations of Thermophilic Bacteria at Molecular Level. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 1(2), 29-31.
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., Gupta, N., & . (2014). Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *PloS one*, 9(5), e96951.
- Soto, S., Carolina, J., Filgueira, D., José, J., ., & . (2009). Effect of photoperiod and light intensity on the sporulation of *Peronospora sparsa* Berkeley under controlled environmental conditions. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 245-251.
- Takami, H., Noguchi, H., Takaki, Y., Uchiyama, I., Toyoda, A., Nishi, S., & Hattori, M. (2012). A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem. *PloS one*, 7(1), e30559.
- Tamay , D., Ibarra, C., & Velasquillo. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

- Tang, K. H. (2012). *Functional Genomics of Anoxygenic Green Bacteria Chloroflexi Species and Evolution of Photosynthesis*. INTECH Open Access Publisher.
- Tobler, D. J., & Benning, L. G. (2011). *Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects*. *Extremophiles*, 15 (4), 473-485.
- Uribe, M. P. (2007). *DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA (Ca, Mg, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Al, Cr, Cd, Pb, As y Hg) EN EL RÍO CRUCES, VALDIVIA*. (Doctoral dissertation, Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico, UACH).
- Ward, D. M. (2005). *World Foundation for Environment and Development-WFED*. *Microbiology*, 4, 11.
- Ward, D. M. (2005). *World Foundation for Environment and Development-WFED*. *Microbiology*, 4, 11.
- Ward, D. M. (2005). *World Foundation for Environment and Development-WFED*. *En Microbiology (págs. 4, 11.)*.
- Ward, M. (2005). *Ward, D. World Foundation for Environment and Development-WFED*. *Microbiology*, 4, 11.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J., & Taylor. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Yun, Z. (1986). Yun, Z. (1986). *Thermophilic microorganisms in the hot springs of Tengchong geothermal area*. West Yunnan, China. *Geothermics*, 15(3), 347-358.
- Zhong, H., Cheng, H., & Li, Y. (1982). *Zhong Huifang, Cheng A new genus of thermo- and acidophilic bacteria--Sulfosphaerellus*. *Acta microbiol, sin*, 22, 1-7 (in Chinese).

