



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TERMÓFILAS
PROVENIENTES DE LA FUENTE GEOTERMAL PAPALLACTA
UBICADA EN LA PROVINCIA DE NAPO.

Autora

Valeria Jessenia Faz Tapia

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS TERMÓFILAS
PROVENIENTES DE LA FUENTE GEOTERMAL PAPALLACTA UBICADA EN
LA PROVINCIA DE NAPO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Carlos Andrés Bastidas Caldés

Autora

Valeria Jessenia Faz Tapia

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Aislamiento e identificación de bacterias termófilas provenientes de la fuente geotermal Papallacta ubicada en la provincia de Napo, a través de reuniones periódicas con el estudiante Valeria Jessenia Faz Tapia, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Carlos Andrés Bastidas Caldés
Máster en Microbiología Ambiental
C. I. 0201619806

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Aislamiento e identificación de bacterias termófilas provenientes de la fuente geotermal Papallacta ubicada en la provincia de Napo, de la estudiante Valeria Jessenia Faz Tapia, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Alejandra Cruz Salazar
Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología
C. I. 1719928572

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

Valeria Jessenia Faz Tapia

C.I.0502934888

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser mi principal eje. A mis padres por darme la vida, el amor y el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Gracias a la Universidad Politécnica de las Fuerzas Armadas (ESPE), por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación. Gracias a la MSc. Alma Koch, por sus enseñanzas y tiempo invertido en este trabajo. Agradezco a mi tutor MSc. Andrés Bastidas por compartir conmigo sus conocimientos para completar este proyecto de titulación.

DEDICATORIA

A mis padres, abuelitos y hermanos quienes han sido mi fortaleza para seguir adelante cada día.

Al amor de mi vida Jefferson, por apoyarme y enseñarme que con dedicación y amor todo dará buen resultado.

RESUMEN

El Ecuador se encuentra situado en el Cinturón de Fuego del Pacífico. Por este motivo, es un país caracterizado por tener una gran diversidad de fuentes geotermales de origen volcánico o de fallas geológicas. Actualmente son de uso recreativo y terapéutico debido a sus componentes fisicoquímicos, que han sido motivo de estudio a lo largo del tiempo. Sin embargo, no existe mayor información acerca de la biodiversidad microbiana de las fuentes geotermales del país. Por esta razón el objetivo del presente estudio fue el aislamiento e identificación de bacterias termófilas provenientes de la fuente geotermal Papallacta ubicada en la provincia de Napo. La temperatura y pH in-situ de la terma fue de aproximadamente 53 °C y 7.1 respectivamente. Las muestras se obtuvieron de agua y sedimento del ojo de la terma, para identificación a partir de ADN total, bajo el procedimiento de secuenciación masiva. Posteriormente, dentro del proceso de aislamiento bacteriano, las muestras se procesaron, inocularon y purificaron en medios de cultivo semiespecíficos. Los aislados bacterianos fueron caracterizados mediante amplificación del gen 16S rRNA y secuenciación. Se aislaron un total de 22 cepas bacterianas con morfología similar y alta producción de esporas. Los resultados de la secuenciación masiva-Illumina indicaron una mayor cantidad de OTUs en el filo *Proteobacteria* tanto en agua como en sedimento con un porcentaje de 47.5% y 69,7 % respectivamente. Dentro del filo *Proteobacteria* la clase más predominante fue *Alpha-proteobacteria* (50 géneros) ya que se conoce que son bacterias cultivables en su mayoría y que proliferan favorablemente en ambientes acuáticos. Las bacterias identificadas en el estudio están relacionadas directamente con la diversidad de ecosistemas del Ecuador y del mundo. La magnitud de bacterias existentes en la fuente geotermal Papallacta, alienta a futuros estudios para explorar otros ambientes extremos y su variedad microbiana de interés biotecnológico.

ABSTRACT

Ecuador is located in the Pacific Ring of Fire. For this reason, it is a country characterized by a large diversity of geothermal sources of volcanic origin or geological faults. Actually they are use as therapeutic and recreational, due to its physico-chemical components, which have been studied over time. However, there is no greater information about the microbial biodiversity of the geothermal sources in the country. For this reason the objective of this study was the isolation and identification of thermophilic bacteria from the geothermal source Papallacta located in Napo province. The temperature and in-situ pH of the terma was approximately 53°C and 7.1, respectively. The samples were obtained from water and sediment from the eye of the terma, for identification from DNA total, under the massive sequencing. Subsequently, within the process of bacterial isolation, samples were processed, inoculated and purified in semi-specific culture media. The bacterial isolates were characterized through amplification of 16S rRNA gene and sequencing. A total of 22 bacterial strains with similar morphology were isolated and high production of spores. The results of the massive sequencing-Illumina indicated a greater number of OTUs in the *Proteobacteria* phylum in both water and in sediment with a percentage of 47.5% and 69.7% respectively. Inside the edge *Proteobacteria* the most predominant class was *Alpha-proteobacteria* (50 genders) and that are known to be mostly culturable and proliferating bacteria favorably in aquatic environments. The bacteria identified in the study are directly related to the diversity of ecosystems in Ecuador and the world. The magnitude of existing bacteria in the Papallacta geothermal source encourages to future studies to explore other extreme environments and their microbial variety of biotechnological interest.

ÍNDICE

1. Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema.....	5
1.3 Objetivo General.....	6
1.4 Objetivos Específicos	6
1.5 Justificación de la investigación.....	6
2. Capítulo II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Ambientes extremos.....	7
2.2 Condiciones Ambientales.....	8
2.3 Diversidad de Ambientes Extremos.....	9
2.3.1 Ambientes con desecación y estrés UV	10
2.3.2 Ambientes en fondos marinos	10
2.3.3 Ambientes ácidos	11
2.3.4 Ambientes de baja temperatura	11
2.3.5 Ambientes de alta temperatura	12
2.3.5.1 Manantiales Geotermales.....	13
2.3.5.1.1 Manantiales geotermales del Ecuador.....	15
2.3.5.1.1.1 FuentestermalesPapallacta.....	16
2.4 Microorganismos extremófilos	17
2.5 Clasificación de microorganismos extremófilos	19
2.5.1 Clasificación según nivel de salinidad	19
2.5.2 Clasificación según Potencial Hidrógeno (pH)	20

2.5.3	Clasificación según Presión	21
2.5.4	Clasificación según nivel de sequedad.....	22
2.5.5	Clasificación según Temperatura	22
2.6	Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Extremófilos	25
2.6.1	Enzimas Termoestables	26
2.7	Técnicas independientes de cultivo	27
2.7.1	Domesticación iCHIP.....	28
2.7.2	Extracción de ADN de muestras ambientales	29
2.7.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	29
2.7.4	Secuenciación de ADN.....	30
3.	Capítulo III. PROCEDIMIENTOS.....	33
3.1	Determinación de la población y muestra	33
3.2	Materiales y métodos para la obtención de los datos	33
3.3	Fase de campo	33
3.3.1	Toma de muestras	33
3.3.2	Muestreo para aislamiento de bacterias.....	34
3.4	Fase de laboratorio.....	35
3.4.1	Extracción y cuantificación de ADN de agua y sedimento para secuenciación masiva-Illumina	35
3.4.2	Preparación de medios de cultivo	37
3.4.3	Procesamiento y siembra de muestras	38
3.5	Evaluación de las características microscópicas del cultivo	39
3.5.1	Tinciones.....	39

3.6	Extracción y cuantificación de ADN bacteriano	40
3.7	Amplificación del gen 16 rRNA	40
4.	Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	Caracterización de los puntos de muestreo.....	42
4.2	Análisis fisicoquímico	44
4.3	Obtención de cultivos puros	48
4.4	Caracterización microscópica de las cepas aisladas	50
4.5	Extracción de ADN genómico	52
4.6	Amplificación del gen 16S rRNA.....	56
4.7	Identificación de la Comunidad Bacteriana mediante secuenciación masiva	59
4.7.1	Diversidad de filos bacterianos en agua y sedimento	60
4.7.2	Diversidad de especies identificadas en agua y sedimento	63
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
5.1	Conclusiones.....	70
5.2	Recomendaciones	70
	REFERENCIAS.....	72
	ANEXOS.....	87

1. Capítulo I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Los hábitats extremos son considerados ambientes inusuales con gran biodiversidad, donde se desarrollan microorganismos aún no identificados, que podrían ser de interés biotecnológico, al portar genes y metabolitos que permiten su crecimiento en estos lugares. Las fuentes geotermales son reconocidos por ser nichos o ambientes extremos, debido a sus altas temperaturas y concentraciones iónicas (Hlodan, 2010). Los manantiales termales hoy en día son reconocidas por su aprovechamiento en complejos recreativos y terapéuticos en vista de que su temperatura y presencia de sales minerales, al interactuar directamente con la piel ejerce efectos beneficiosos para la salud, mejorando la actividad muscular, disminuyendo el dolor y provocando la relajación mental (Henn, Lopes, Goncalves, y Fraiz, 2008).

Las características geotérmicas no son rasgos ecológicos comunes; se encuentran en pocas partes del mundo y están ampliamente separadas a lo largo de las cordilleras, donde las condiciones ambientales son específicas para cada fuente termal (Gonz, 2015). Debido a la naturaleza y biodiversidad única de las fuentes geotérmicas se han realizados investigaciones, principalmente en Islandia, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Japón, Italia, Indonesia, América Central y África Central, siendo el principal motivo de estudio, la relación ecológica entre los hábitats de agua caliente y su variedad de organismos con importantes componentes moleculares (Mohammad, Al Daghistani, Jaouani, Abdel-Latif, y Kennes, 2017b).

Se sabe que la existencia de microorganismos se da en cada lugar del planeta por más inhóspito que este sea, los organismos se adaptan y cumplen su ciclo de vida, haciendo de estos ambientes su hábitat natural (Amils, Ellis-Evans, y Hinghofer-Szalkay, 2007). Estos microorganismos se denominan extremófilos, aquellos que pueden desarrollarse en distintos lugares donde las condiciones

son extremas, y podrían ser mortales para otro organismo, mientras que para los extremófilos son esenciales e influyen dentro de sus funciones vitales (Ramírez, Serrano, y Sandoval, 2006).

En los últimos años, los microorganismos extremófilos en sus diferentes categorías como: termófilos que soportan elevadas temperaturas (45°C-121°C), acidófilos que habitan en pHs bajos, alcalófilos en pHs altos, halófilos que se desarrollan en altas concentraciones de sal y psicrófilos que habitan en bajas temperaturas, han fascinado a los científicos en muchos campos de la investigación, debido a la capacidad que tienen de sobrevivir bajo condiciones extremas (Quintana, Badillo, y Maldonado, 2013).

El descubrimiento de microorganismos extremófilos ha permitido completar el conocimiento filogenético de los seres vivos y ha despertado el interés de estudiar sus biomoléculas, aquellas que les permiten resistir a las condiciones agresivas de su entorno (Miralles, 2011). Las fuentes termales son uno de los ambientes extremos donde existen microorganismos extremófilos autóctonos que se relacionan sin ningún inconveniente con el medio acuático y por ende con las condiciones físico químicas del mismo (Gómez, 2015).

Los primeros estudios que se han realizado en base a microorganismos de aguas termales fueron elaborados con el objetivo de conocer bacterias patógenas promotoras de varias enfermedades transmitidas por el medio (Arce, Arias, y Mera, 2017). En base a varios resultados de la diversidad microbiana, se reconoce que no solo existen bacterias patógenas, también las bacterias no patógenas se desarrollan y habitan las aguas termales, estas son caracterizadas para diversos estudios en campos de la biotecnología, produciendo una visión distinta de la biodiversidad geotermal (Romero, 2005).

En el Ecuador existen varias fuentes termales debido a su ubicación geográfica en el Cinturón de Fuego del Pacífico, entre las más importantes se encuentran las termas de: Baños de Agua Santa, Papallacta, Baños de Cuenca, Chachimbiro, entre otras que son visitadas por miles de turistas por los beneficios que éstas aportan (Carrera, 2017).

La fuente geotermal de Papallacta tiene parámetros ambientales únicos que han sido motivo de análisis. En el 2012 se han realizado investigaciones sobre las condiciones físico químicas y concentraciones iónicas en muestras de agua de las termas de Papallacta, para ser comparadas con otros manantiales termales del Ecuador (González, 2008), en el estudio se obtuvo como resultado diferentes condiciones de temperatura, por ejemplo las termas de Jamanco, aquellas que superan los 72 °C, seguida de la fuente termal Papallacta con 57 °C y en Oyacachi las termas de El Chaco que tienen una temperatura de 45 °C (Masabanda, 2017).

Además se compararon los resultados en la caracterización de diferentes minerales en cada fuente geotermal como el cloro, calcio, sulfatos, sodio y con menor proporción de magnesio y nitratos en la fuente de Papallacta, de esta forma concluyeron que las principales aguas termales del Ecuador presentan diferentes condiciones por lo que cada una de ellas son un ecosistema completamente distinto (López y Oleas, 2012)

A nivel mundial, las investigaciones realizadas se basan en estudios físico-químicos y microbiológicos de las fuentes geotermales. Una de las primeras investigaciones relacionadas con este tema fue elaborada en la Universidad de Indiana en 1993 donde se detectó una notable diversidad de arqueas en un ambiente termal del Parque Nacional de Yellowstone (Barns, Fundyga, Jeffries, y Pace, 1994).

Los resultados obtenidos, a partir de sedimento extraído de la fuente, muestran la existencia no solo de especies pertenecientes al género *Crenarqueas*, sino también de especies para las cuales no se han encontrado parientes cercanos hasta el momento (Ward y Cohan, 2006). En conclusión, las técnicas independientes de cultivo, demostraron que *Crenarchaeota* es un grupo mucho más diverso de lo que se esperaba. Los resultados mostraron un impacto en conceptos de la organización filogenética de Arqueas (Barns, Fundyga, Jeffries, y Pace, 1994).

En el 2006, se realizó el aislamiento de 170 cepas bacterianas termófilas de una fuente termal de Xiamen, en China, donde para facilitar la identificación

realizaron la técnica molecular SDS-PAGE de las proteínas de células completas a partir de las cepas aisladas. Los resultados mostraron la existencia de 4 patrones de proteínas diferentes, lo que demostró que las 170 cepas podrían pertenecer a 4 géneros distintos. De esta manera comprobaron que la técnica SDS-PAGE puede ser un método rápido y simple para la diferenciación e identificación de bacterias termófilas (Liu, Li, Wu, Zhang, y Xie, 2006).

Un estudio de partida para el aislamiento e identificación de bacterias termófilas, fue realizado en el 2017 en aguas termales de Jordania. El estudio demostró una dominancia del género *Bacillus* representado por *B. licheniformis* y la presencia de *Thermomonas hydrothermalis* en diferentes fuentes termales que cubren una amplia área geográfica de Jordania. Este fue el primer informe sobre el aislamiento e identificación de *Thermomonas* existentes en aguas termales jordanas (Mohammad, 2017).

En el 2011, para la identificación de la microbiota ambiental existente en esteras de la costa de Holanda, se realizó secuenciación masiva Illumina con primers específicos para bacterias y arqueas. Los resultados revelaron que en estos ecosistemas marinos se encuentran en su mayoría una gran biodiversidad de arqueas con un 80% del total de OTUs identificados y bacterias del filum *Actinobacteria* con 66% de OTUs (Bolhuis y Stal, 2011).

Debido a estos y otros estudios preliminares donde muestran que la principal característica de los recursos de agua termal es su variedad de microorganismos y la resistencia molecular de sus componentes, el propósito del estudio es aislar e identificar bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta, y de esta manera ampliar las oportunidades para que se realicen más investigaciones dentro del país, en las que incluyan principalmente los microorganismos extremófilos productores de metabolitos de interés biotecnológico.

1.2 Planteamiento del problema

La diversidad de ecosistemas en el mundo favorece la existencia de múltiples especies que se adaptan a las condiciones poco comunes de cada uno de estos entornos. Las investigaciones acerca de bacterias termófilas aisladas de diferentes ambientes extremos son diversas en todo el mundo y a pesar de ello, en fuentes termales solo se han podido identificar aquellas bacterias cultivables que crecen fácilmente en condiciones aerobias, cortos periodos de incubación, baja necesidad nutricional y los resultados no solo muestran bacterias de importancia científica, también aquellas que podrían ser parte de la contaminación del acuífero (Mohammad, Al Daghistani, Jaouani, Abdel-Latif, y Kennes, 2017).

El Ecuador tiene diferentes ambientes ecológicos al encontrarse en el callejón interandino, y por ende cuenta con una gran variedad de fuentes geotermales de origen volcánico, cada una con diferentes condiciones ambientales de temperatura, presión, salinidad, pH y conductividad (Carrera y Guevara, 2016). Debido a estas condiciones, se produce el desarrollo de especies con alta variabilidad genética que para su aislamiento y diferenciación requieren condiciones específicas y semejantes a su entorno natural (Zapata, Helena Beatriz y Castellanos, 2014). Pese a ello no siempre se obtienen resultados confiables, esto sucede principalmente en comunidades bacterianas que no han podido ser exploradas hasta el momento por la dificultad que se presenta, en las técnicas de muestreo e identificación (Sen y Maiti, 2014).

El Ecuador es un país mega diverso y posee diferentes hábitats donde se desarrollan microorganismos importantes para la investigación en los campos de la Microbiología y Biotecnología, entre ellos se encuentran las bacterias que poseen mecanismos de tolerancia y defensa a condiciones adversas, como es resistir a altas temperaturas. Sin embargo la identificación molecular de bacterias termófilas es escasa en el Ecuador dado que las condiciones y medios de cultivo deben ser específicos para cada especie (Müller, 2014).

A pesar de que se ha demostrado la importancia industrial y ambiental de los microorganismos termófilos y que se han realizado estudios preliminares sobre la microbiota de ambientes extremos, en el Ecuador se puede evidenciar claramente que no existen investigaciones de carácter científico que identifiquen los microorganismos de las fuentes geotermales, mediante técnicas de biología molecular, donde se pueda demostrar el origen y el tipo de especies bacterianas que habitan las fuentes geotermales del país.

1.3 Objetivo General

Aislar e identificar bacterias termófilas presentes en la fuente geotermal Papallacta ubicada en la provincia de Napo.

1.4 Objetivos Específicos

- a) Aislar bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta en medios de cultivo específicos.
- b) Identificar bacterias termófilas existentes en la fuente geotermal Papallacta empleando técnicas independientes de cultivo.

1.5 Justificación de la investigación

Dada la dificultad de cultivar la mayoría de microorganismos ambientales, especialmente los que se encuentran en zonas extremas, ha surgido un gran interés por el aislamiento y estudio de estas comunidades microbianas para conocer la metagenómica y la evolución de la biodiversidad que existe en

fuentes termales, con el propósito de determinar cuáles son las características distintivas que permiten a estos microorganismos sobrevivir y adaptarse en su naturaleza (Jiménez, 2007).

Las aguas termales son hábitats extremos ya que tienen sus propias condiciones de temperatura elevada y gran concentración de sales, características desfavorables para la vida de muchos organismos (Gonz, 2015). Sin embargo, se conoce que estas aguas termales, como cualquier ambiente acuático natural, poseen una población microbiana autóctona que aún no se ha podido identificar con exactitud, es por eso que el aislamiento e identificación de bacterias termófilas es un tema de investigación importante para conocer la biodiversidad que se encuentra formando parte e interactuando con el medio acuático y que es capaz de resistir los cambios constantes de cada una de las fuentes termales.

Después de la caracterización de bacterias termófilas, la aplicación de sus metabolitos en diferentes procesos de laboratorio y a nivel industrial ha demostrado la importancia del aislamiento y caracterización molecular de especies bacterianas termófilas. Además, el presente proyecto servirá como punto de partida en la investigación de carácter científico para la identificación fenotípica y genotípica de bacterias termófilas.

2. Capítulo II. MARCO TEÓRICO

2.1 Ambientes extremos

El planeta Tierra está conformado por una gran variedad de ambientes donde, debido a las condiciones físico químicas extremas, se vuelven inhabitables para la existencia de algunos organismos superiores. Sin embargo, en estos ambientes pueden existir microorganismos que se desarrollan de mejor manera

en estas condiciones (Hlodan, 2010). Los ambientes extremos se extienden desde los mares, la profundidad de los océanos, desiertos con alto contenido de sal hasta regiones cálidas, volcanes y la Antártida. Cada uno de ellos con características diferentes que hacen posible la existencia de organismos únicos con cualidades que no solo son de interés científico sino también que tienen potencial comercial (Maier, Gerba, y Pepper, 2009).

Los ambientes denominados extremos son numerosos en la Tierra y presentan varias características (alta o baja temperatura, acidez, alcalinidad, entre otros) que hacen posible el proceso de la vida para diversas especies, en especial microorganismos denominados extremófilos (Grundstein, Cooper, Ferrara, y Knox, 2014). Algunos microorganismos, plantas y animales han demostrado tener la capacidad de adaptarse y metabolizarse en condiciones de alto estrés ambiental, portando mecanismos específicos y complejos. Algunos organismos incluso requieren tales condiciones de manera obligatoria para vivir y evolucionar (Smith, Murray, Harding, Lease, y Martin, 2014).

En definitiva, los ambientes extremos y su biodiversidad son importantes para comprender la historia evolutiva de un planeta en constante cambio y los posibles impactos, motivo del cambio climático y las actividades antropogénicas (Andersson y Prieur, 2002).

2.2 Condiciones Ambientales

Existen parámetros ambientales que son variables según el espacio y el tiempo. Cada organismo desarrolla su ciclo de vida completo en un rango específico de los diferentes parámetros ambientales y tiene la capacidad de tolerar algunos límites más allá de los que necesita para sobrevivir (Andersson y Prieur, 2002). Sin embargo, lo que se conoce como ambiente apto para la supervivencia de una especie, puede ser mortal para otra, por lo que en microbiología se han clasificado a los microorganismos según sus condiciones óptimas de crecimiento por ejemplo, los mesófilos son organismos que se

desarrollan en un rango de 20-40 °C, pero su temperatura óptima es de alrededor de 37 °C, y al superar este grado de temperatura toman el nombre de termófilos, aquellos que pueden crecer hasta una temperatura de 80°C, mientras que los hipertermófilos pueden soportar temperaturas superiores a los 350°C (Maier, 2009, pp. 209-218).

Según Andersson y Prieur (2002), existen condiciones ambientales que limitan la vida de ciertos organismos (Tabla 1).

Tabla 1.

Ejemplos de parámetros que limitan los procesos de vida.

Parámetros ambientales	Límite inferior para la vida	Límite superior para la vida	Comentario
Temperatura	-18°C	350°C	La temperatura media del cuerpo humano es 37°C.
pH	Negativo	13,2	pH neutral: 7.
Presión	10 ⁻¹⁴ Pa	130 MPa	Presión atmosférica: 101 Kpa.
Concentración de sal	Ninguna	5 M	Salinidad de sangre humana: 3,5 %.

Adaptado de (Andersson y Prieur, 2002).

2.3 Diversidad de Ambientes Extremos

La evolución de la Tierra, los cambios geofísicos y climáticos, con el transcurso del tiempo han formado una serie de ecosistemas con gran

variedad de factores fisicoquímicos y biológicos que forman parte de nuestro medio ambiente. En cada espacio de la Tierra existe vida y las especies presentes desarrollan adaptaciones para sobrevivir a los parámetros agresivos de cada lugar (Pikuta, Hoover, y Tang, 2007).

2.3.1 Ambientes con desecación y estrés UV

Las áreas semiáridas e hiperáridas como los desiertos, presentan extremas condiciones para la productividad y el desarrollo de la vida, esto debido a la baja disponibilidad de agua, alta temperatura y la intensidad de radiación UV (O'Connell y Keppel, 2016). En Chile, el desierto de Atacama es uno de los lugares más secos de la Tierra con ausencia total de vegetación, a causa de pasar años o décadas sin lluvia (García y Osses, 2017). En cuanto a Microbiología, la principal característica de estos ambientes es la existencia de comunidades microbianas fotoautótrofas fijadoras de nitrógeno que se desarrollan en las rocas y poros de rocas subsuperficiales de donde obtienen el suministro de agua. (Maier, 2009, pp. 423-440).

2.3.2 Ambientes en fondos marinos

Los respiraderos hidrotermales o grietas en aguas profundas son ambientes extremos en el fondo del océano, conocidos por ser un espacio sin luz y con temperatura y presión extremadamente alta. (Sandrin, Dowd, Herman, y Maier, 2009). El agua, en estas zonas llega a una temperatura de 420°C y sale del respiradero hidrotermal a una velocidad aproximada de 3 m/s (Gontz, Belknap, y Kelley, 2002).

2.3.3 Ambientes ácidos

Existen ambientes ácidos naturales que surgen de algunas fuentes termales de origen volcánico, sin embargo el drenaje ácido de minas (AMD) es el claro ejemplo de un ambiente ácido antropogénico, producto de la actividad minera que genera compuestos de sulfuro hacia el aire y el agua, formando lixiviados ácidos de pH 2 que son ricos en metales tóxicos (Brake y Hasiotis, 2010). ADM a pesar de ser un entorno ácido con altas concentraciones de sulfato y metales tóxicos, es el hábitat de microorganismos especializados para desarrollarse en altos niveles de acidez (Huddart y Stott, 2010).

2.3.4 Ambientes de baja temperatura

Estos ecosistemas pueden llegar a temperaturas muy bajas, dentro de un rango de -30°C y -80°C (Tabla 2), y sus lagos tienen una capa de hielo permanente, con un espesor de aproximadamente 5 metros (Muir, Biek, y Mable, 2014). El valle de Mc Murdo en la Antártida representa uno de los ecosistemas más secos y fríos, a pesar de que no contiene capa de hielo es un ambiente de baja temperatura y se ha convertido en uno de los sitios más estudiados por la NSF (Fundación Nacional de la Ciencia), siendo ya uno de los observatorios microbianos más grandes, que ha permitido caracterizar diversas comunidades bacterianas (Maier, 2009, pp. 520-530), aportando de esta manera al avance científico en ambientes extremos donde se puede conocer hasta donde llegan los límites de la vida para ciertas especies.

Tabla 2.

Principales características en los ambientes de baja temperatura.

Ambientes	Localización	Temperatura	Luz
-----------	--------------	-------------	-----

Regiones Polares	Áreas del globo que rodean los polos.	El récord más frío del mundo: -89.2 °C en la estación de Vostok en la Antártida.	Oscuro durante el invierno.
Glaciares	En las montañas, a más de 1.500 m de altitud, y puede llegar a los 8.800 m.	Decrece a medida que crece la altitud.	Alta claridad en el verano.

Adaptado de (Andersson y Prieur, 2002).

2.3.5 Ambientes de alta temperatura

En el planeta Tierra existen zonas con temperaturas extremadamente altas, por ejemplo los ventos del fondo marino llegan a una temperatura aproximada de 400 °C y son hábitats de microorganismos hipertermófilos (Sandrin, 2009, pp. 89-95). Los desiertos y aguas termales de origen volcánico también forman parte de ambientes de alta temperatura debido a su procedencia, sus componentes y las condiciones del lugar (Brake y Hasiotis, 2010).

Se sabe que en estos ecosistemas la biodiversidad de especies es numerosa, en su mayoría microorganismos poco estudiados que han desarrollado adaptaciones para su forma de vida en estos lugares (Ulrich y Marsh, 2008). En Estados Unidos, el Parque Nacional Yellowstone es uno de los ambientes con características de temperatura extrema, las aguas termales del lugar pueden llegar a una temperatura de 100 °C, lo que genera la colonización de microorganismos hipertermófilos que han provocado la investigación en distintas áreas de la ciencia (Huddart y Stott, 2010).

En Ecuador, también existen zonas de alta temperatura, como las fuentes termales que con el tiempo se han ido convirtiendo en laboratorios naturales únicos y observatorios de la microfauna, muchos de estos ambientes son de

difícil acceso que mediante técnicas de monitoreo y equipos de muestreo se puede investigar y beneficiar a la comunidad científica (Gómez, 2015, pp. 560-574).

2.3.5.1 Manantiales Geotermiales

Durante muchos años, el origen de los manantiales ha despertado curiosidad, por el hecho de ser fenómenos naturales que demuestran la dinámica de la Tierra al igual que los terremotos y erupciones volcánicas (Tarbuck, 2005).

La formación de manantiales proviene de la zona de saturación, originada de las precipitaciones. Cuando el nivel freático intersecta la superficie terrestre, se produce un flujo natural de salida del agua subterránea, que se denomina manantial o fuente (Andersson y Prieur, 2002). Muchos procesos geológicos llevan a la formación de manantiales, por ejemplo cuando el agua subterránea circula a grandes profundidades, se calienta y si se eleva a la superficie, se convierte en una fuente termal (Miller, 2010).

El agua de algunas fuentes termales de Estados Unidos se calienta de esta manera, sin embargo la gran mayoría de fuentes termales a nivel mundial (más del 50%) son de origen volcánico (Negri, Daniele, Morata, Delgado, y Valdes, 2015). Debido a su procedencia volcánica, las fuentes geotermiales presentan altas concentraciones de sales y minerales que son captados por el agua al momento de atravesar las distintas capas terrestres (Cárdenas y Baena, 2015). Las características fisicoquímicas son resultado de la geografía del acuífero del cual surgen, por tal motivo todas las fuentes termales tienen diferentes características de temperatura, pH, salinidad y distintas concentraciones de compuestos químicos (Corominas, 1989).

Las aguas termales son reconocidas como un recurso natural que proviene de zonas subterráneas o de origen volcánico. Se caracterizan por las altas condiciones de temperatura, entre 6 y 9 °C más que la temperatura del

ambiente del cual se originan. En estos ambientes las placas tectónicas de la Tierra y la actividad volcánica de la corteza terrestre permiten la formación de zonas de salida denominados géiseres (Gonz, 2015).

Los géiseres son fuentes termales intermitentes en las cuales las columnas de agua son expulsadas con gran fuerza al aire, en diversos intervalos, alcanzando aproximadamente 30-60 metros de longitud. Después de cesar el chorro de agua, lanza una columna de vapor normalmente con un ruido similar a una pequeña erupción (O'Connell y Keppel, 2016). El géiser más famoso del mundo es el Old Faithful del Parque Nacional Yellowstone, que hace erupción aproximadamente cada hora. Las características térmicas y la naturaleza del géiser ha hecho que sea uno de los más importantes, pero existen géiseres en Nueva Zelanda e Islandia, donde también se puede encontrar fuentes termales de origen volcánico (Tarbuck, 2005).

Cuando el agua subterránea de las fuentes termales y los géiseres fluye hacia afuera, el material en disolución suele precipitar, produciendo una acumulación de roca sedimentada. El material depositado en cualquier lugar determinado, refleja la composición química de la roca a través de la cual el agua circuló (Huddart y Stott, 2010). Cuando el agua contiene sílice disuelta, se deposita alrededor de la fuente un material denominado geiserita. Cuando el agua contiene disuelto carbonato cálcico, se deposita en forma de caliza que se denomina travertino o tabla calcárea (Craig, 2006).

En los depósitos de las fuentes termales, conforme el agua caliente fluye hacia la superficie a través de una serie de canales, la presión permite que se separe el dióxido de carbono y escape del agua. Esta pérdida hace que el agua se sobresature con carbonato cálcico, y precipite (Tarbuck, 2005). Además de contener sílice y carbonato cálcico disueltos, algunas fuentes termales contienen azufre, que proporciona al agua un mal sabor y un olor desagradable, como es el caso de la fuente Rotten Egg (huevo podrido) de Nevada (Miller, 2010).

2.3.5.1.1 Manantiales geotermiales del Ecuador

El Ecuador es un país reconocido por tener diversidad de ambientes, entre zonas cálidas, como las Costas y la Amazonía, además de los páramos como zonas de baja temperatura. Esta mega diversidad ha convertido al Ecuador en hábitat para diferentes especies reconocidas y por conocer (Carrera, 2017). A pesar de ello, el país es considerado una zona de riesgo por la presencia de volcanes activos, al estar ubicado en el denominado Cinturón de Fuego del Pacífico. Esta actividad subterránea ha provocado la existencia de vertientes de agua termal con características físico químicas extremas, lo que le convierte en un país con importante potencial geotérmico (Masabanda, 2017).

Las aguas termales están extendidas en todo el país (Figura 1) con diferentes rangos dentro de los parámetros ambientales de temperatura, presión y concentración de compuestos químicos (Ulrich y Marsh, 2008). Entre las termas más conocidas se encuentran, la fuente geotermal de Chachimbiro, ubicada en la provincia de Imbabura al noroeste del Ecuador, la temperatura de estas termas varía entre los 45-60 °C, con un pH de 8 a 7 y contiene altas concentraciones de sales minerales (Moposita, 2017).

En la provincia del Azuay, el cantón Cuenca posee fuentes geotermiales con temperatura variable de 30-34 °C, según la época del año, se conoce que puede llegar a 72 °C, (Sandrin, 2009, pp. 560-572), por otra parte, los parámetros físico químicos de las aguas termales de Baños de Agua Santa, en la provincia de Tungurahua, son muy similares a los de Baños de Cuenca con temperaturas variables, mientras que la fuente geotermal de Guapán, en Azogues comparte características naturales con las termas de Papallacta en la provincia de Napo, consideradas fuentes geotermiales termófilas (Naranjo, 2017).

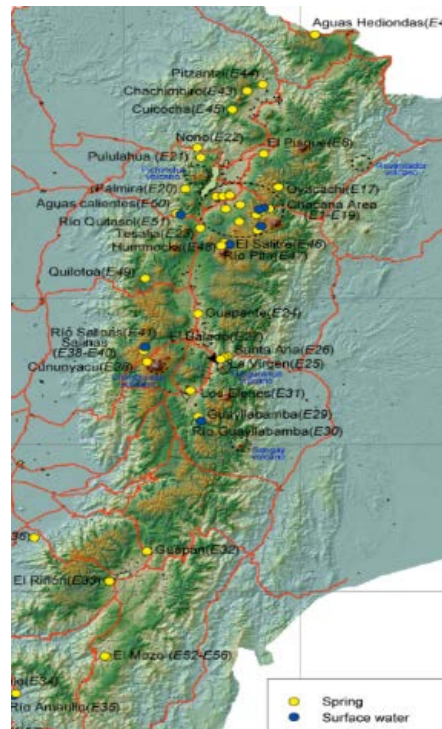


Figura 1. Principales fuentes geotermales del Ecuador

Tomado de (Instituto Geofísico del Ecuador, 2015).

2.3.5.1.1.1 Fuentes termales Papallacta

En la provincia de Napo, la parroquia Papallacta que se encuentra a las faldas de los volcanes Cayambe y Antisana, cuenta con fuentes termales de origen volcánico, reconocidas por ser un atractivo turístico para nacionales y extranjeros al poseer características curativas y de relajación debido a su composición química y la concentración de minerales (mayor concentración de cloro, sulfatos, calcio y menor concentración de nitratos) (Masabanda, 2017).

En estas termas se encuentran varios minerales, aquellos que están disueltos en diferentes concentraciones y su temperatura oscila entre 30 y 70 °C, según la época del año, clasificándose en aguas mesotermales (35 – 45 °C) y aguas hipotermales (temperatura mayor a 50 °C) (Arias, 2016).

Dichas condiciones y la composición de minerales han hecho posible la existencia de microorganismos denominados extremófilos que para desarrollarse en estos ambientes, crean mecanismos de adaptación y sobrevivencia, permitiendo de esta manera el crecimiento de la microfauna del lugar (Baker, Gaffar, Cowan, y Suharto, 2001).

2.4 Microorganismos extremófilos

Los ambientes extremos son colonizados por ciertos microorganismos que sobreviven en distintas condiciones extremas, por ejemplo de alta temperatura (45°C - 80°C), baja temperatura (0°C – 10°C), acidez (pH menor a 5), alcalinidad (pH superior a 8), disponibilidad de oxígeno (aerobias y anaerobias), salinidad (5% - 30% de sal), (Figura 2) entre otros (Moposita, 2017). Los microorganismos denominados extremófilos tienen la capacidad de absorber iones metálicos, vivir en ambientes hipersalinos con distintos compuestos tóxicos y son clasificados según el hábitat donde se desarrollan y las características fisicoquímicas del lugar del cual surgen (Oliart, Manresa, y Sánchez, 2016).

Se han aislado microorganismos extremófilos de muestras de agua y sedimento en diferentes partes del mundo con el objetivo de identificar y aprovechar sus biomoléculas, mismas que les permiten la estabilidad en condiciones agresivas de su entorno (Maier et al., 2009). Existen reportes de que los extremófilos fueron descubiertos a mediados de los años 60 para descubrir sus mecanismos de adaptación, entre ellos se encuentran las estructuras de protección (monocapa lipídica y endosporas) y enzimas estables (extremoenzimas) que no se desnaturalizan en extremas condiciones (Giménez, 2011).

El descubrimiento de los microorganismos extremófilos ha permitido conocer la gran diversidad microbiana que existe en cada rincón del planeta por más inhóspito que este sea, y la importancia que pueden tener en diferentes

campos de la ciencia, por ejemplo, en las aplicaciones industriales que incluyen condiciones extremas de pH, temperatura y presión (Omelchenko et al., 2005). Los biocatalizadores estables al calor presentan ventajas de estabilidad, como es el caso de las lipasas termoestables que llevan a cabo reacciones hidrolíticas en presencia de disolventes orgánicos y permiten una esterilización de ropa y materiales en condiciones de alta temperatura (Wong y Farrés, 1999). Estos procedimientos han abierto un gran panorama dentro de la biotecnología. Sin embargo, solo se ha podido aislar lo cultivable que se encuentra dentro del 1% de especies que se conocen con exactitud mediante técnicas microbiológicas y moleculares (García, 2014).

La gran mayoría de microorganismos ambientales son incultivables y las condiciones necesarias para el aislamiento de extremófilos han causado problemáticas y escasos resultados en las investigaciones, ya que los entornos de laboratorio deben ser similares al del sitio del cual provienen y pocas veces se ha podido replicar las condiciones de los hábitats extremos (Arce et al., 2017).

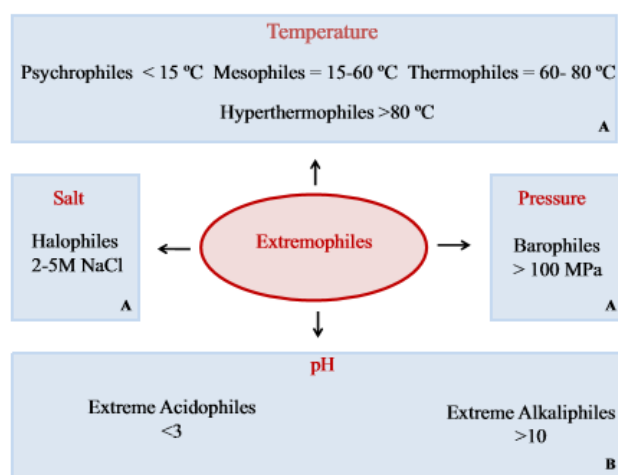


Figura 2. Clasificación de los extremófilos desde diferentes condiciones extremas.

Tomado de (Dhakar y Pandey, 2016).

2.5 Clasificación de microorganismos extremófilos

En el planeta Tierra existen diversos espacios, cada uno de ellos con distintos parámetros físico químicos que podrían albergar especies únicas de interés científico. Aquellos organismos que se adaptan y requieren de estas condiciones para sobrevivir, despiertan el interés de la comunidad científica, al ser reconocidas por estar dispersas en diferentes zonas ambientales, mismas que se encuentran en constante cambio. Los microorganismos extremófilos se clasifican según las condiciones extremas del ambiente donde se desarrollan (Maier y Pepper, 2009).

2.5.1 Clasificación según nivel de salinidad

2.5.1.1 Halófilos

Los lagos salinos, aguas marinas e incluso los alimentos con alta concentración de sal (salmuera, salsa de soya y pescado) son el hábitat de microorganismos denominados halófilos que requieren NaCl (Cloruro de Sodio) para su desarrollo y crecimiento (Piñar, Dalnodar, Voitl, Reschreiter, y Sterflinger, 2016).

Para resistir los efectos desnaturalizantes de las sales, los halófilos presentan una serie de mecanismos como la barrera en la membrana que separa el medio citoplasmático del exterior y equilibra la presión osmótica del ambiente, la acumulación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular en el citoplasma que ayudan a equilibrar la concentración de sal para que esta no interfiera en el metabolismo celular (Selvarajan, Sibanda, Tekere, Nyoni, y Meddows-Taylor, 2017).

Según Ramírez (2016), los halófilos se pueden clasificar en función a la sal que requieren (Tabla 3).

Tabla 3.

Clasificación de halófilos en función de la salinidad.

Microorganismos	Concentración de NaCl
Halófilos extremos	Arriba de 20%
Halófilos moderados	Arriba de 10 – 20%
Halófilos débiles	0.5 – 10%
Halotolerantes	Toleran la sal

Tomado de (Ramírez, 2006, pp. 45-51).

2.5.2 Clasificación según Potencial Hidrógeno (pH)

2.5.2.1 Alcalófilos

Los microorganismos alcalófilos son aquellos que viven en ambientes alcalinos, con pH por encima de 9. Se encuentran principalmente en ambientes básicos como suelos con alta concentración de carbonato sódico y lagos sódicos (Ramírez et al., 2006). Estudios realizados demuestran que los microorganismos alcalófilos son también halófilos por necesitar altas concentraciones de sal, superior al 33% (Coronel, 2017). Estos microorganismos han perfeccionado adaptaciones metabólicas en la membrana, haciendo que esta produzca un sistema antitransportador de Na/H para mantener en equilibrio el pH interior de la célula (Arias, 2016).

2.5.2.2 Acidófilos

A pesar de que no se conocen organismos que sobrevivan a pHs muy ácidos, se ha observado proliferación de microorganismos denominados acidófilos extremos en minas ácidas que se desarrollan a $\text{pH} < 3$, (Dopson y Holmes, 2014). Sin embargo con valores de pH más moderado pueden crecer los microorganismos acidófilos, aquellos que tienen pH de crecimiento < 5 (Bulaev, 2017). Los ambientes ácidos donde se desarrollan son las minas que surgen de las actividades geoquímicas y las emanaciones volcánicas (Dopson y Holmes, 2014).

Para sobrevivir a la acidez de estos medios, producen varios mecanismos como la carga positiva de la membrana, sistemas de transporte y la regulación interna (Zhang, Hedrich, y Schippers, 2017).

2.5.3 Clasificación según Presión

2.5.3.1 Piezófilos

Los microorganismos anteriormente llamados barófilos se definen como aquellos que muestran un crecimiento óptimo a presiones superiores a 1 atm. Son generalmente organismos aislados de aguas profundas (océanos), aproximadamente a 400 metros del fondo marino (Fang, 2015). Como adaptación, para crecer a presiones elevadas, los microorganismos aumentan las concentraciones de ácidos grasos no saturados de la membrana plasmática, permitiendo la función normal de los procesos bioquímicos de la célula (Li, 2015).

2.5.4 Clasificación según nivel de sequedad

2.5.4.1 Xerófilos

Son microorganismos que pueden sobrevivir a extremas condiciones de desecación durante largos periodos de tiempo. Especies de hongos, algas y líquenes son expertos en adaptarse a zonas secas, pero se conoce que algunas comunidades bacterianas se han desarrollado en estos ambientes, especialmente en rocas superficiales expuestas al sol (Ramírez, 2006, pp. 722-740).

Los microorganismos xerófilos presentan estrategias de adaptación y supervivencia donde incluyen la capacidad de proteger y reparar el ADN expuesto a la radiación UV, debido a la presencia de polisacáridos que protegen la membrana de las proteínas manteniéndolas estables e integra durante la desecación (Maier, 2009, pp. 390-402).

2.5.5 Clasificación según Temperatura

2.5.5.1 Psicrófilos

El agua en estado sólido pone límites para el crecimiento de ciertos microorganismos que no toleran las bajas temperaturas. Los microorganismos psicrófilos son aquellos que sobreviven en temperaturas muy bajas desde -80°C hasta los 0°C como en la Antártida (Velázquez y Quesada, 2011).

Estos microorganismos sintetizan enzimas que soportan el frío y tienen un sitio activo flexible para operar eficientemente a dichas condiciones, además las

reacciones que se llevan a cabo en condiciones de baja temperatura requieren menos energía, lo que representa un ahorro energético para la célula (García, 2014).

2.5.5.2 Termófilos

Se denominan termófilos a los microorganismos que sobreviven en altas temperaturas, por encima de los 50°C y hasta los 70°C, según el lugar en donde habitan y se desarrollan de manera óptima. El hábitat natural para este tipo de especies tiene temperaturas permanentemente altas y entre las zonas más conocidas se encuentran: ventos marinos, fuentes geotermales, procesos de fermentación (compost) y ambientes involucrados con fenómenos volcánicos (Ramírez, 2006).

Las condiciones de alta temperatura normalmente desnaturalizan proteínas y destruyen el material genético de algunos microorganismos, sin embargo los termófilos pueden sobrevivir a altas temperaturas gracias a enzimas que han desarrollado y a mecanismos moleculares (Andersson y Prieur, 2002). La tolerancia a altas temperaturas es un tema de interés en la evolución de las especies y en la producción de metabolitos termoestables de uso práctico en las industrias biotecnológicas. La adaptación a la temperatura requiere cambios coordinados en todas las moléculas biológicamente activas, en los niveles de genoma (ADN), transcriptoma (ARN) y proteoma (proteínas) (Omelchenko, 2005).

Existen varios mecanismos que ayudan a los termófilos para adaptarse al estrés térmico, entre ellos la modificación de las proteínas, las interacciones entre moléculas y la estructura de la membrana (Amils et al., 2007). La membrana citoplasmática es una importante barrera selectiva para el transporte de sustancias y en el caso de bacterias termófilas se compone de ácidos grasos saturados que forman enlaces hidrófobos resistentes al calor y

una doble capa de lípidos que determinan la fluidez de la membrana, estabilización y conformación original de las enzimas (Poutou, 1999). Los microorganismos termófilos tienen lípidos de cadena larga con grupos acilo saturados, involucrados en la adaptación homeoviscosa y termoadaptación, donde las bacterias mantienen a la membrana en fase líquido-cristalina para adecuarse a los cambios ambientales sin ningún daño celular (Jegousse, Yang, Zhan, Wang, y Zhou, 2017).

El alto costo de energía metabólica en microorganismos termófilos se debe al aumento de permeabilidad de la membrana. A medida que aumenta la temperatura, se incrementa la permeabilidad de la membrana a los protones. Para evitar este efecto, las bacterias termófilas han desarrollado mecanismos de la bomba sodio como acoplador de iones y alta velocidad de retorno de la bomba de protones para un ajuste óptimo en la composición de la membrana (Wolferen, Driessen, y Albers, 2013).

A nivel de proteínas los termófilos han desarrollado múltiples mecanismos de estabilización, incluida la eliminación de bucles de superficie, empaquetamiento ajustado por cadenas laterales hidrofóbicas más ramificadas y un mayor uso de la red de puentes salinos. Por lo tanto, la adaptación a la temperatura de las proteínas se produce tanto a nivel estructural secuencial como tridimensional (Maier, 2009, pp. 58-64), con actividad enzimática de cierre y apertura de la hélice de ADN.

A pesar de que los genomas de especies termófilas tienen un mayor contenido de GC para contrarrestar la desnaturalización térmica, la estabilidad del ADN está dado principalmente por el aumento de la fuerza iónica, las proteínas catiónicas y el superenrollamiento (Jegousse, 2017).

Según Ramírez y colaboradores (2006), los microorganismos termófilos pueden clasificarse según la temperatura de crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4.

Clasificación de microorganismos extremófilos en función de su temperatura.

Organismos	Descripción
Termófilos	Crecen en una temperatura entre 45-70 °C.
Termófilos extremos	Capaces de crecer entre 55-85 °C.
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 90-113 °C.

Adaptado de (Ramírez et al., 2006).

2.6 Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Extremófilos

Probablemente los microorganismos aislados y estudiados en el laboratorio, en la actualidad no representan ni el 1% de especies que habitan en el planeta, por la dificultad de acceso a los puntos de muestro y a las condiciones que ellos necesitan para crecimiento a gran escala, se les conoce como microorganismos no cultivables. Debido a ello, la Biotecnología se encuentra en constante búsqueda de microorganismos productores de metabolitos de interés, capaces de resistir las condiciones extremas de temperatura, pH y presión que inducen los procesos industriales (Roane, Reynolds, Maier, y Pepper, 2009).

Por estas condiciones, el aislamiento de microorganismos extremófilos y la caracterización de sus biomoléculas tienen un papel importante para mejorar procesos o ser la base para otros nuevos, como por ejemplo en la industria textil o de procesamiento de alimentos (Pikuta et al., 2007). La utilización de nuevas técnicas, condiciones y medios de cultivo, podrían hacer posible el aislamiento de un gran número de microorganismos por descubrir y la producción de metabolitos nuevos con gran potencial.

Los organismos que viven en condiciones físico-químicas extremas, representan una de las fronteras más importantes para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas. En realidad, los extremófilos y sus componentes han sido la principal fuerza impulsora de la investigación en esta área y entre

ellos podemos encontrar la biominería, en la que las comunidades microbianas que operan a pH ácido se utilizan para extraer metales de los minerales (Andersson y Prieur, 2002). El diseño de crioenzimas para que la industria alimentaria funcione a bajas temperaturas y un sin número de utilidades que van en constante crecimiento especialmente en la industria comercial para el desarrollo de nuevos productos en diversos campos, tales como cosméticos, estabilizantes de alimentos, respuesta a derrames de petróleo, aplicaciones farmacéuticas y descontaminación (Liu et al., 2006).

2.6.1 Enzimas Termoestables

Se han caracterizado varias enzimas provenientes de microorganismos extremófilos que actualmente son utilizadas en procesos industriales por sus características únicas. El interés parte desde el descubrimiento de la enzima ADN polimerasa termoestable, obtenida del microorganismo *Thermus aquaticus*, que fue aislado de Yellowstone, y ahora se la utiliza para la automatización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), misma que ha significado un gran avance en la biología molecular al permitir la amplificación de fragmentos de ADN en pocas horas, lo cual representa un gran avance en procesos de laboratorio (Oliart et al., 2016).

Otros ejemplos incluyen proteasas, en la industria de detergentes, lipasas que son utilizadas para el procesamiento enzimático de lípidos, amilasas, xilanasas, entre otras que se usan en los diferentes campos de la industrias (agrícola, papelera, farmacéutica, biorremediación, minería). Dentro de las enzimas termoestables y barófilas, las lipasas se encuentran entre las más importantes ya que presentan diversas ventajas de estabilidad térmica y la capacidad de llevar a cabo reacciones de hidrólisis en altas temperaturas y altas presiones (Wong y Farrés, 1999). Debido a ello, son utilizadas en la industria de alimentos para hidrólisis de grasas en productos lácteos, para remover

impurezas del algodón en la industria textil, entre otras aplicaciones (Pikuta et al., 2007).

En la industria farmacéutica, las enzimas termoestables son utilizadas para la formación de compuestos quirales y síntesis de enantiómeros para la formación de farmacoquímicos, mientras que en el área ambiental, las extremoenzimas son utilizadas para métodos de biorremediación de zonas contaminadas con hidrocarburos o residuos sólidos (Mohammad et al., 2017).

Por estas y otras aplicaciones, es importante la utilización de enzimas termoestables, no solo por los beneficios de producción en los procesos industriales, sino porque son más eficientes sin necesidad de llevar a cabo varias reacciones secundarias y principalmente son procedimientos amigables con el medio ambiente en comparación con los métodos químicos en los que se utiliza enzimas a base de metales pesados, provocando a largo plazo un daño ambiental irreparable (Care, Petroll, Gibson, Bergquist, y Sunna, 2017).

2.7 Técnicas independientes de cultivo

A pesar de que las técnicas dependientes de cultivo siguen siendo importantes como primera etapa de clasificación y caracterización fenotípica de microorganismos, se han desarrollado nuevos métodos que representan un avance en la biología molecular para la identificación especialmente de microorganismos ambientales que no se han podido cultivar aún (Lee, Narayanan, y Sim, 2009). Las tecnologías incluyen: extracción de ADN a partir de muestras ambientales, reacción en cadena de la polimerasa convencional o en tiempo real, amplificación del genoma completo, secuenciación y metagenómica. En general, estos métodos otorgan a la ciencia la capacidad de descubrir el mundo microbiano a partir de una pequeña muestra e identificar microorganismos no cultivables (Newby, Marlowe, y Maier, 2009).

La mayoría de las comunidades microbianas son complejas y actualmente solo se pueden cultivar algunos ejemplares. Las técnicas basadas en secuencias para estudiar el metabolismo de comunidades microbianas se están utilizando para obtener información genómica de la comunidad para uso potencial en Biotecnología (metagenómica) (Andersson y Prieur, 2002).

2.7.1 Domesticación iCHIP

Actualmente, la mayoría de microorganismos se cultivan en medios de crecimiento con agar sólido o medio líquido nutriente, enriquecido de acuerdo a las necesidades nutricionales de la especie que se va a cultivar. Los requerimientos de temperatura, pH, concentración de oxígeno y nutrientes, son un punto importante para el aislamiento de microorganismos, los medios de cultivo y las condiciones de laboratorio han proporcionado los entornos óptimos para el desarrollo de diversas especies (O'Connell y Keppel, 2016). Sin embargo existen microorganismos incultivables que son exigentes y necesitan requerimientos nutricionales y ambientales muy complejos. Es por ello que la idea de utilizar nuevas tecnologías microbiológicas para propagación microbiana ha ido progresando a lo largo de los años y ha sido un gran avance no solo para la microbiología, también en campos de la biología, genética y biología molecular (Sherpa, Reese, y Montazeri Aliabadi, 2015).

Las cajas Petri y las incubadoras son métodos básicos dentro de la microbiología y los microorganismos que se pueden aislar en un laboratorio son una fracción mínima de la gran diversidad que se muestra en estudios de metagenómica. Para explorar la variedad microbiana se ha utilizado el aislamiento *in situ* utilizando un chip (Medina, Medina, y Merino, 2010).

El chip de aislamiento o denominado iChip es un método de cultivo bacteriano que fue desarrollado por Epstein para el cultivo de ese 99% de especies incultivables que no pueden crecer en condiciones de laboratorio (Ulrich y Marsh, 2008). El iChip está compuesto de una placa de polioximetileno (POM)

de plástico hidrofóbico con varios orificios de 1mm de diámetro y la técnica se basa en un sistema de pequeñas cámaras de difusión que permite la interacción con los nutrientes naturales del medio y las condiciones ambientales. Se ha demostrado que la técnica logra aislar un mayor número de microorganismos en comparación con procesos tradicionales (55% frente a 1%) (Sherpa et al., 2015).

2.7.2 Extracción de ADN de muestras ambientales

La extracción de ácidos nucleicos (ADN) por lo general es la primera etapa del análisis molecular. La validación de datos obtenidos en esta etapa es importante para la realización de métodos posteriores. La extracción y purificación de ADN directamente de muestras ambientales (agua, suelo, aire) ayudan a identificar especies que no se han podido aislar en laboratorio (Pepper, Gerba, y Maier, 2009).

La ADN extraído representa la población microbiana del lugar, resultado que se puede usar posteriormente en análisis que otorgaran la información necesaria para conocer las especies más representativas de la zona de estudio. Una de las limitaciones del método es que la pureza del ADN obtenido puede variar de una muestra a otra, dependiendo de las características de la muestra, por ejemplo los componentes del suelo que intervienen en la eficacia del método de extracción (Lee et al., 2009).

2.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica enzimática utilizada para amplificar copias de una secuencia de ADN, hasta aproximadamente 10^6 veces o más a través de ciclos de temperatura. La técnica fue descubierta por Kerry Mullis en 1985 y desde entonces ha revolucionado la biología molecular, ya que se ha

convertido en una técnica esencial y de rutina en los laboratorios. Las limitaciones del método se dan por el bajo número de copias, producto de inhibidores presentes en la muestra y por altas o bajas concentraciones de reactivos o del ADN que afectan la unión del cebador. Para conocer el producto final, se usa la técnica de electroforesis con gel de agarosa y el tamaño se estima al comparar con un control positivo de ADN con tamaño conocido (estándar) en el mismo gel (Newby et al., 2009).

2.7.4 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN es una técnica utilizada para conocer el orden de las bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina, timina) que conforman un gen o el genoma completo (Mardis, 2008). La secuenciación es un método de análisis que incluye muestras de microorganismos, animales, plantas y humanos, ya que la aplicación de esta tecnología otorga la información suficiente para conocer especies ambientales que no se han podido aislar en microbiología, diagnóstico y tratamiento de enfermedades en cuanto a la salud y generar nuevos productos en diversas industrias como en la agricultura (Shendure y Ji, 2008).

2.7.4.1 Secuenciación Sanger

Este método de secuenciación fue desarrollado en 1977 por Sanger y Gilbert, desde entonces se ha convertido en la técnica más desarrollada debido a su eficacia al utilizar didexosinucleótidos trifosfatos (ddNTP), nucleótidos fluorescentes, análogos de los dNTP (Faveri, Figueiredo, Shibli, Pérez-Chaparro, y Feres, 2015).

Con el uso de equipos automatizados y dotas bioinformáticos es posible determinar la secuencia de fragmentos de ADN, mediante cuatro reacciones separadas, en las que incluye: una plantilla de ADN, ddNTP fluorescentes y PCR para que las secuencias diana de ADN se amplifiquen (Kraková et al., 2016). Finalmente, las cadenas se separan y analizan con secuenciadores automáticos, lo que da como resultado un cromatograma con una serie de picos de cuatro colores que representan cada una de las bases de ADN. Las computadoras se usan para ensamblar secuencias y analizarlas para una variedad de características (Men, Wilson, Siemering, y Forrest, 2008).

2.7.4.2 Secuenciación Masiva

Se han desarrollado nuevas tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NSG) que permiten el análisis rápido, masivo y de bajo costo de genomas completos con mayor rendimiento. Mediante estas técnicas se hacen posible los estudios ecológicos y evolutivos en investigaciones relacionadas con la conservación y el manejo de la biodiversidad de una zona ambiental. Existen diferentes plataformas de secuenciación y difieren en los procedimientos especialmente en la formación de bibliotecas genómicas y el proceso de secuenciación (Cadena-Zamudio, Martínez-Peña, Guzmán-Rodríguez, y Arteaga-Garibay, 2016). Entre las plataformas disponibles para la secuenciación, los más utilizados son los de segunda generación: Pirosecuenciación, Illumina, e Ion-Torrent (Gomez, 2016).

2.7.4.2.1 Secuenciación Masiva Illumina

El analizador de genoma Illumina (GAIIx) es una de las plataformas de secuenciación masiva más utilizadas debido a su alta calidad y cobertura al

analizar millones de fragmentos secuenciados simultáneamente y para la construcción de bibliotecas genómicas se basa en la síntesis de hebra complementaria mediante PCR. Como la mayoría de los protocolos actuales de secuenciación masiva, la fragmentación del ADN y la selección del tamaño son pasos necesarios antes de la construcción de la biblioteca. Una vez que se seleccionan los fragmentos de un tamaño deseado, se agregan adaptadores específicos de plataforma que permiten la unión a la matriz de secuenciación y cada fragmento adjunto se amplifica produciendo copias de ADN idénticas (Kraková et al., 2016).

En la plataforma Illumina el procedimiento empieza con la adición de un nucleótido que bloquea la incorporación de otros nucleótidos, interrumpiendo la síntesis y liberando una señal fluorescente que es única para cada tipo de nucleótido. Los resultados se muestran en imágenes de la señal fluorescente, según la incorporación de cada nucleótido (Wan, Ruan, Zhang, y Li, 2017). Después de la obtención de imágenes fluorescentes, el grupo de bloqueo se elimina y deja las cadenas de ADN listas para la siguiente incorporación de nucleótidos con la ayuda de la ADN polimerasa (Figura 3). Esta serie de pasos continúa durante un número específico de rondas que permiten longitudes de lectura de 60-150 bases (Escalante, Barbolla, Ramírez-Barahona, y Eguiarte, 2014).

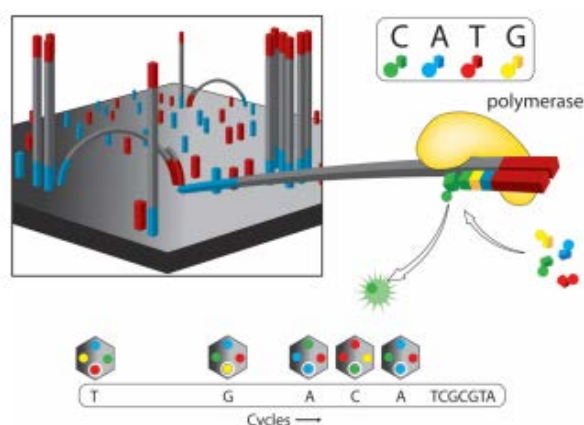


Figura 3. Plataforma Illumina.

Adaptado de (Escalante et al., 2014).

3. Capítulo III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Determinación de la población y muestra

En el presente proyecto la población es la totalidad de los microorganismos que se capturaron en la fuente geotermal de Papallacta, mientras que al hablar de muestra, nos referimos a las bacterias termófilas que se van a identificar en el estudio.

3.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos

3.3 Fase de campo

El proceso se llevó a cabo en la provincia de Napo, cantón Quijos, parroquia Papallacta en la “Hosteria Pampallacta” con coordenadas de longitud $78^{\circ} 8'26,75''\text{O}$ y latitud $0^{\circ} 18'53,5''\text{S}$, aproximadamente a una altura de 3324 m.s.n.m.

3.3.1 Toma de muestras

Se realizaron 2 muestreos para corroborar los resultados, el primero el 13 de Noviembre del 2017 y el segundo el 15 de Marzo del 2018. En esta primera fase se establecieron los sitios de muestreo, (Figura 4), la caracterización del lugar (medición de parámetros físico-químicos) y las técnicas a utilizar (Figura 5).



Figura 4. Fuente geotermal Papallacta- Provincia de Napo.



Figura 5. Medición de parámetros ambientales y toma de muestras en la fuente geotermal Papallacta- Provincia de Napo.

3.3.2 Muestreo para aislamiento de bacterias

Se recolectaron muestras de agua y sedimento en dos puntos de la terma. Para la recolección del sedimento se realizó un raspado en las paredes de la terma por duplicado, con la ayuda de hisopos estériles y se colocó en tubos de ensayo con medio de cultivo líquido: CN (caldo nutriente), caldo *Pseudomonas* y medio mineral *Czapek* (DIFCO®). Las muestras de agua fueron recolectadas en tubos falcón estériles de 50mL en los dos puntos de muestreo. Según el

protocolo descrito por (Naranjo, 2017). Todas las muestras fueron transportadas en termo portátil para mantener la temperatura del agua y posteriormente procesarlas en el laboratorio (Cole et al., 2013).

3.3.2.1 Muestreo para análisis físico-químico y secuenciación masiva-Illumina

Se recolectó 3 litros de agua en 2 botellas plásticas y para recolectar el sedimento se utilizó fundas *Ziploc* de 1Kg. El procedimiento se realizó por duplicado en cada punto del ojo de la terna y las muestras se mantuvieron a las condiciones del lugar hasta su procesamiento en el laboratorio (Naranjo, 2017).

3.4 Fase de laboratorio

Las muestras recolectadas fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE dos horas después del muestreo.

3.4.1 Extracción y cuantificación de ADN de agua y sedimento para secuenciación masiva-Illumina

Para la extracción de ADN del agua se utilizó el kit de extracción *PowerWater® DNA Isolation Kit* (Catálogo: 14900-100-NF), y se siguió el protocolo establecido por el fabricante MOBIO, 2013. El protocolo se realizó por duplicado.

Se filtró el agua utilizando un embudo de filtro desechable con membranas de 0,22 μm conectado a una fuente de vacío. Una vez filtrada el agua, con ayuda de pinzas estériles se levantó la membrana del filtro y se la colocó en tubos de perlas de 5 mL. Se agregó 1 mL de la *Solution PW1* en cada tubo de perlas y se mezcló con vortex a máxima velocidad por 5 minutos. Después, se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo colector nuevo. Se centrifugó a 13000xg por 1 minuto y se trasladó el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL para añadir 200 μL de *Solution PW2*, se realizó un breve vortex y se incubó a 4°C por 5 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó a 11000 rpm por 1 minuto y se transfirió el sobrenadante a un tubo colector limpio. Se añadió 650 μL de *Solution PW3*, se realizó vortex brevemente y se transfirió 650 μL del lisado a un tubo colector con filtro, se centrifugó a 11000 rpm por 1 minuto y se colocó el filtro a un tubo colector nuevo. Se agregó 650 μL de *Solution PW4* y se centrifugó a 11000 rpm por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se añadió 650 μL de *Solution PW5*. Se centrifugó a 11000 rpm por 1 minuto y se descartó el filtrado (este procedimiento se realizó por duplicado para eliminar los residuos). El filtro centrifugado se transfirió a un nuevo tubo colector de 2 mL y se añadió 100 μL de *Solution PW6* en el centro del filtro, se centrifugó a 11000 rpm por 1 minuto y se descartó la columna de filtro. Finalmente, el ADN extraído se cuantificó en el equipo *Nanodrop 8000 Thermo Scientific* y se almacenó a -20°C hasta su posterior aplicación.

Para la extracción de ADN en sedimento se utilizó el kit de extracción *PowerSoil® DNA Isolation Kit* (Catálogo: 12888-100), y se siguió el protocolo descrito por el fabricante (MOBIO, 2013).

Se tomó 25 mg de muestra de sedimento y se colocó en tubos Power Bead. Se añadió 60 μL de *Solution C1* y se mezcló con vortex por 10 min. Se centrifugó a 9000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se añadió 250 μL de *Solution C2*. Se mezcló con vortex por 5 segundos. Posteriormente se centrifugó a 10000xg por 1 min y se transfirió 600 μL de sobrenadante a otro tubo colector. Se añadió 200 μL de *Solution C3* y se mezcló vigorosamente con vortex. Seguido, se incubó a 4°C

por 5 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 9000 rpm por 1 min a temperatura ambiente y se transfirió 750 μL del sobrenadante a otro tubo colector. Se añadió 1200 μL de *Solution C4* y se mezcló con vortex por 5 segundos. Se transfirió 675 μL del lisado a una columna con tubo colector, se centrifugó a 9000 rpm por 1 min y se descartó el filtrado (la actividad se realizó por triplicado). Posterior a ello, se añadió 500 μL de *Solution C5* y se centrifugó a 10000xg por 30 segundos. Se descartó el filtrado y se centrifugó a 9000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo y se añadió 100 μL de *Solution C6* (en el centro de la columna) y se centrifugó a 9000 rpm por 30 segundos. Finalmente, se descartó la columna y se cuantificó el ADN extraído en el *Nanodrop 8000 Thermo Scientific*. Las muestras de ADN fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior uso.

El ADN extraído de las muestras de agua y sedimento fue enviado a la compañía Macrogen en Korea para su posterior purificación y secuenciación. Se enviaron cuatro muestras (dos de agua y dos de sedimento), cada una con un volumen de 20 μL a una concentración aproximada de 15-20 ng/ μL . Además se enviaron 25 μL de cada cebador a una concentración de 10 nM, según el protocolo de (Naranjo, 2017).

3.4.2 Preparación de medios de cultivo

3.4.2.1 Medios de cultivo para muestreo

Para la toma de muestra de sedimento se preparó medios de cultivo líquido. En el primer muestreo se realizó medios generales de adaptación: Caldo Nutriente y Caldo LB (Luria Bertani), mientras que en el segundo muestreo al conocer las bacterias predominantes se realizó medios de cultivo líquidos: Caldo *Pseudomonas*, Medio Glicerol, Caldo Nutriente, Caldo LB (Luria Bertani), según el protocolo establecido por (Arias, 2016).

3.4.2.2 Medios de cultivo para aislamiento

Para el análisis de laboratorio se realizó la preparación de medio sólido. En el primer muestreo se utilizó medio mineral R2A (Reasoner's 2 agar), ANS (Agar Nutriente Sólido), LB (Luria Bertani), y para el segundo muestreo se preparó Medio Pseudomonas, LB, Medio mineral *Czapek* y Medio Glicerol. Todos los medios fueron ajustados a pH neutro (7-7.15), al igual que del agua termal de Papallacta, según protocolo de (Mohammad et al., 2017b).

3.4.3 Procesamiento y siembra de muestras

3.4.3.1 Análisis físico-químico

Para el análisis físico-químico se enviaron 3 litros de agua y 1 Kg de sedimento al Centro de Servicios Ambientales y Químicos (CESAQ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

3.4.3.2 Siembra

Se colocó 100 μL y 150 μL de la muestra de agua y sedimento respectivamente, en una caja Petri con medio de cultivo sólido (*Czapek*, Medios Pseudomonas, Medios Glicerol, Medio LB) y se inocularon con varilla angular de vidrio (*Drigalski*) y se encubaron a 50°C por 12 horas, según el protocolo de (Camargo et al., 2005).

3.4.3.3 Aislamiento bacteriano

Después de observar el crecimiento masivo en cada placa, se seleccionaron y se resembraron colonias bacterias cultivables utilizando el método de estriado por agotamiento en otra placa Petri con el mismo medio sólido estéril del que provenía dicha colonia y se incubó a 50°C por 12 horas con la finalidad de obtener cultivos puros.

Posteriormente, las colonias puras se resembraron en tubos de tapa rosca con medio sólido semi-inclinado (pico de flauta) para obtener un cultivo axénico, preservarlo y utilizarlo en procesos posteriores, como se observa en la Figura 6 (Martinez, Stratton, y Bianchini, 2017).

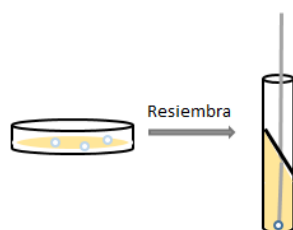


Figura 6. Método de resiembra para preservación de cepas.

3.5 Evaluación de las características microscópicas del cultivo

3.5.1 Tinciones

Para confirmar la pureza de las cepas bacterianas y diferenciarlas se realizó tinción Gram, según el protocolo obtenido de (Zapata, Helena Beatriz y Castellanos, 2014).

Se realizó un frotis de cada aislado bacteriano en porta objetos y utilizando el kit de tinción Gram (*BD Kit de Tinción Gram BBL™*) se siguió el protocolo establecido por el fabricante Invitrogen.

La existencia de mecanismos de resistencia en bacterias termófilas (esporas) se comprobó al realizar tinción de esporas, siguiendo el protocolo establecido por (Vázquez, Martín, Isabel, y Serrano, 2010).

3.6 Extracción y cuantificación de ADN bacteriano

La extracción y cuantificación de ADN se realizará siguiendo el protocolo descrito por (Arias, 2016). En el que se utilizó un inóculo de 24 horas de incubación a 50°C. Se concentró la biomasa en tubos *eppendorf* de 2 mL con perlas de vidrio de 5 mm. Se colocó 1800 µL de inóculo y se centrifugó a 13000 rpm por 3 min, (este procedimiento se repitió 3 veces hasta obtener la mayor cantidad de biomasa). Sobre la biomasa obtenida se colocó 1mL de buffer de extracción y se mezcló bien por vortex durante 2 minutos a máxima velocidad. Se añadió 400 µL de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) y se homogenizó con vortex durante 2 minutos. Se incubó los tubos a 50°C por 30 minutos con agitación de 300 rpm en el termobloque *ProvoCell* (ESCO). Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se trasladó el sobrenadante a otro tubo *eppendorf* y se colocó 800 µL de isopropanol. Se incubaron las muestras a -20°C por 2 horas y se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet. Se realizó 2 lavados con 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm por 3 min. Se dejó reposar boca abajo los tubos en la cabina de seguridad biológica, con flujo por media hora y luego se agregó 50 µL de agua ultrapura y 2 µL de ARNasa (*Promega*) y se incubó a 37 °C por 35 minutos en el termobloque *ProvoCell* (ESCO).

Por último, se midió la concentración de ADN extraído en el equipo *Nanodrop 8000 Thermo Scientific*. Las muestras, se ajustaron a concentración de 40 ng /µL con agua ultrapura, para su posterior uso.

3.7 Amplificación del gen 16 rRNA

La amplificación del gen 16S se realizó con la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando la enzima *Go Taq® Green Master Mix*,

siguiendo el manual del fabricante (Promega). En la Tabla 5, se observa las concentraciones de los componentes para una reacción (Promega Corporation, 2016). Se utilizaron los cebadores universales 27F y 1492R, mostrados en la Tabla 6.

Tabla 5.

Volumenes para la reacción de PCR en ambos cebadores.

Reactivo/Concentración	1x a volumen final de 25 μ L
<i>Go Taq® Green Master Mix</i>	12.5 μ L
Cebador <i>Forward</i> (5 μ M)	1 μ L
Cebador <i>Reverse</i> (5 μ M)	1 μ L
AND (40 ng μ L ⁻¹)	2 μ L
Agua libre de ARNasa	8.5 μ L
TOTAL	25 μ L

Adaptado de (Promega Corporation, 2016).

Tabla 6.

Primers universales para el gen 16S.

Gen	Primers	Secuencia (5'–3')	Tamaño
16S ARNr	27F	AGATTTGATYMTGGCTCAG	~1500 pb
	1492R	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	

Tomado de (Weisburg, Barns, Pelletier, y Lane, 1991).

Las muestras se colocaron en el Termociclador *Proflex 3 bloques* (Thermo Fisher) y se llevó a cabo con las condiciones descritas en la tabla 7.

Tabla 7.

Condiciones para la PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 min	1 ciclo

94°C	30 seg	30 ciclos
52°C	30 seg	
72°C	1.5 min	
72°C	10 min	
4°C	A	

Adaptado de (Mohammad et al., 2017).

Los productos de PCR, se analizaron mediante electroforesis con gel de agarosa al 1%. Se utilizó tampón TAE 1X y 2 μ L de visualizador Gel Star Nucleic Acid (Lonza). Para analizar el tamaño de los amplicones, se cargó 3 μ L de marcador molecular 1Kb Ladder DNA Marker (Promega) de 300 a 10000 pares de bases (pb) de tamaño y el buffer de carga Blue/Orange Loading Dye, 6X (Promega). Se colocó 3 μ L por pasillo, de producto de PCR y se corrió en el gel de agarosa a 95 V por 20 min utilizando una fuente de poder ENDURO™ modelo 300V de Labnet.

4. Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de los puntos de muestreo

En cada punto de muestreo se obtuvieron datos de temperatura y pH con variación no significativa, como se observa en la Tabla 8. Los dos muestreos fueron realizados en diferentes fechas (Noviembre del 2017 y Marzo del 2018), en los mismos puntos y, a pesar de ello, no se observó una diferencia considerable en la temperatura. Además los datos de pH, demostraron la neutralidad (7) de las aguas termales de Papallacta.

En Papallacta las aguas termales son de origen volcánico y meteórico, que permanecen constantes en temperatura y composición química. Según el INAMHI la temperatura de las fuentes termales Papallacta se encuentra en un

rango de 45 y 55°C, y en algunas épocas del año pueden llegar a una temperatura de 70°C, considerándose aguas termófilas (Rodríguez y Simbaña, 2010).

La temperatura de las fuentes termales se encuentra relacionada directamente con el clima del lugar del cual provienen y el origen de las mismas, en Papallacta las fuentes de agua son aguas termales y en ocasiones hipertermales por sus cambios elevados de temperatura y por su ubicación en un valle andino y procedentes de la erupción del volcán Antisana (Caisedo, 2011).

Según Fossati y Calvez, (2006), en agosto del 2014 la temperatura de las termas de Papallacta llegó a los 72°C, mostrando una gran diferencia respecto al estudio realizado en Enero del 2016, donde se aislaron microorganismos termófilos en la fuente termal Papallacta a una temperatura de 54°C. Esto concuerda con los resultados del presente proyecto ya que la variación de temperaturas probablemente se debe a la época del año en el que se realizaron los muestreos, debido a que en Ecuador los meses de Noviembre a Marzo, generalmente son época de invierno con abundante precipitación de lluvia, en relación al mes de Agosto que es verano y aumenta la temperatura de la superficie terrestre y acuática (Galarza, 2014).

Respecto al pH, las aguas termales de las zonas de Jamanco y Papallacta se caracterizan por ser de pH neutro o ligeramente alcalino a razón de que las aguas son meteóricas y se infiltran en zonas de recarga a una altura de 4000 m.s.n.m., mezclándose con minerales y diluciones de compuestos químicos que les convierten en aguas mineromedicinales neutras (Masabanda, 2017).

Los resultados de pH y temperatura demuestran que las fuentes geotermales de Papallacta son ambientes termófilos y neutros, aptos para el desarrollo de diversos microorganismos (Carrera y Guevara, 2016).

Tabla 8.

Datos de la Fuente Geotermal Papallacta.

Muestreo 1				Muestreo 2			
Punto de muestreo	Hora	T [°C]	pH	Punto de muestreo	Hora	T [°C]	pH
P1	10:40 am	52.0	7.10	P1	10:20 am	54.5	7.01
P2	11:17 am	50.5	7.09	P2	12:25 am	51.8	7.14

4.2 Análisis fisicoquímico

En la Tabla 9 se encuentran los resultados del análisis fisicoquímico de la muestra de agua que fueron entregados por el Laboratorio del Centro de Servicios Ambientales y Químicos (CESAQ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

La investigación se centra en el estudio de la microbiota de la Fuente Geotermal Papallacta por lo que fue necesario conocer los parámetros fisicoquímicos naturales del lugar y de esta manera facilitar el aislamiento de bacterias que se desarrollan en dicho ambiente. De acuerdo a la Tabla 9, los análisis fisicoquímicos de la Fuente Geotermal Papallacta, muestran la presencia de arsénico, calcio metálico, cloruros, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y sulfatos. Además un valor de pH y conductividad de 7,1 y 2152,0 uS/cm, respectivamente.

Estudios realizados en la Universidad Politécnica del Ejército ESPE en el año 2017, sobre las condiciones fisicoquímicas de las fuentes geotermales de Guapan, El Riñón y Chachimbiro, muestran la presencia de compuestos como

cloruros a una concentración de 844,1 mg/L y 509,5 mg/L en las termas El Riñón y Guapan, mientras que en Papallacta la concentración es de 419,9 mg/L. Por otro lado el sodio presenta una concentración elevada de 2187 mg/L en la fuente termal de Chachimbiro y mayor a 50 mg/L en las fuentes Riñón y Guapan, en cambio Papallacta sobrepasa los 100 mg/L (Moposita, 2017).

El sodio al ser un elemento alcalino que forma parte de compuestos minerales, está presente a diferentes concentraciones en aguas termales, pero en pocas ocasiones sobrepasa los 100 o 150 mg/L en agua dulce (Pérez y Prieto, 2003). Una fuente importante de sodio son las aguas marinas en las que se encuentra como NaCl producto de la disolución de rocas sedimentarias. Algunas fuentes termales tienen influencia de aguas marinas al presentar una relación (Na/Cl) menor a 0,55, al dividir las concentraciones de sodio y cloro, en este caso la relación de las fuentes El Riñón y Guapan es de 16,88 y 10,18 lo que muestra una mínima influencia, al igual que las termas de Papallacta con una relación de 4,19 lo que demuestra que los valores son característicos de aguas de río y subterráneas (Naranjo, 2017).

La concentración de calcio es variable en aguas subterráneas, en Chachimbiro el calcio se encuentra a 122,81 mg/L y en Papallacta la concentración es mayor a 40 mg/L, lo que demuestra que en Chachimbiro el intercambio iónico con otros cationes, especialmente el sodio por su alta concentración, aumenta y por ello crece notablemente la concentración de calcio, a diferencia de Papallacta que debido a la difusión de rocas sedimentarias parte del calcio aparece en forma de sulfato (Rodríguez, 2009). La concentración de sulfatos en la fuente de Papallacta es de 424,0 mg/L, debido a la tendencia de formar compuestos con los iones sodio y calcio.

El potasio presente en la fuente de Papallacta se encuentra a una concentración de 9,9 mg/L, probablemente por la presencia de minerales con alta capacidad de intercambio iónico, ya que la presencia de ión potasio se relaciona con la meteorización y disolución de potasio proveniente de las rocas (Moposita, 2017).

El magnesio se encuentra a una concentración de 6,8 mg/L, encontrándose en el rango de aceptación según el Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (TULSMA). Por otro lado el magnesio es un mineral esencial en hábitats ambientales y juega un papel importante en la membrana de microorganismos para el transporte de Na, Ca y K.

En la fuente de Papallacta también se encuentran metales, entre ellos el arsénico, cobre, hierro y manganeso en concentraciones de 0,6667 mg/L, <0,05 mg/L, <0,3 mg/L y <0,1 mg/L, correspondientemente. Los metales son persistentes en el medio ambiente y difíciles de eliminar, sin embargo la biodisponibilidad permite la absorción y transformación del metal por acción de microorganismos, en este caso, para que pueda ser liberado al ambiente sin provocar daño (Cervantes et al., 2006). Debido a la toxicidad de los metales los microorganismos han desarrollado mecanismos para evitar el daño. Mantener la homeostasis de metales esenciales (cobre, hierro, manganeso y zinc) es uno de ellos y permite el buen funcionamiento celular. La forma más común en que los microorganismos manejan el exceso de metal es bombear los iones metálicos y restringir la absorción al mismo tiempo. Además, algunos microorganismos tienen mecanismos para secuestrar e inmovilizar metales, mientras que otros realmente mejoran la solubilidad del metal en el medio ambiente (Roane, Rensing, Pepper, y Maier, 2009).

El arsénico es un metaloide, contaminante de agua subterránea y causante de graves enfermedades alrededor del mundo. En Ecuador el Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (TULSMA) acepta un límite máximo de 0,035 mg/L de arsénico, en la fuente geotermal de Papallacta la concentración supera el límite con 0,6667 mg/L, presentando una contaminación mínima posiblemente causada por el uso de pesticidas a los alrededores del ambiente acuífero y por la cantidad de desechos producidos por industrias cercanas (Ben y Gonz, 2017).

En este estudio la conductividad eléctrica (CE) en el agua es de 2154,0 uS/cm, mientras que la CE de la fuente de Chachimbiro es de 6500 uS/cm, mostrando una gran diferencia entre los valores. Según (Moreno, 2007), debido a que la

conductividad eléctrica en aguas termales aumenta conforme se incrementa los sólidos totales, de esta manera podemos justificar los valores descritos en la (Tabla 9), donde la CE (2154,0 uS/cm) y los sólidos totales (1380 mg/L) fueron altos, según CESAQ-PUCE.

Tabla 9.

Análisis fisicoquímico de muestra de agua de la Fuente Geotermal Papallacta.

Parámetro	Método Analítico	Unidades	Resultado
*Arsénico	SM3112 B/SM3114C/CP-PEE-A009	mg/L	0,6667
Calcio Metal	SM3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	>40
Cloruros	SM4500CI/CP-PEE-A013	mg/L	419,9
*Cobre	SM3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	<0,05
Conductividad Eléctrica	SM2510 B/CP-PEE-A033	uS/cm	2154,0
Hierro	SM3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	<0,3
*Magnesio	SM3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	6,8
*Manganeso	SM3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	<0,1
pH	SM4500-H+B/CP-PEE-A042	unid pH	7,1
Potasio	SM3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	9,9
Sólidos	SM2540 F/CP-PEE-A061	mL/L	<0,1

Sedimentables

Sólidos	SM2540 B/CP-PEE-A063	mg/L	1380
Totales			
Sólidos	SM2540 E/CP-PEE-A015	mg/L	80
Volátiles			
Sólidos	No SM2540 E/CP-PEE-A015	mg/L	1420
Volátiles			
Sodio	SM3111 B/CP-PEE-A010	mg/L	>100

Nota: *Compuestos que se encuentran en las concentraciones aceptables por el TULSMA.

4.3 Obtención de cultivos puros

En el aislamiento de bacterias provenientes de la Fuente Geotermal de Papallacta se obtuvieron 22 cultivos puros: 12 en el primer muestreo y 10 en el segundo. Se obtuvo mayor crecimiento bacteriano en el medio de cultivo mineral Czapek, debido a su alto contenido de sales (Cloruro de Potasio, Sulfato Ferroso, Nitrato de Sodio, entre otros) y sacarosa como fuente de carbono (Liofilchem, 2015). En los resultados del análisis fisicoquímico se encuentra altas concentraciones de estos componentes químicos, es por ello que el medio de cultivo permitió satisfacer las necesidades de las bacterias aisladas de la fuente geotermal, obteniendo un crecimiento óptimo (Naranjo, 2017). En la figura 7 se muestran ejemplos de cultivos puros del primero y segundo muestreo, cultivados en medio Czapek, *Pseudomonas* y LB. En los diferentes medios de cultivo, los aislados mostraron variaciones morfológicas en el color, textura y forma de las colonias. Eran colonias cremosas y blancas; opaca o translúcida; áspera y lisa; con bordes regulares e irregulares. Las

colonias también se mostraron finamente arrugadas y adherentes a la superficie del agar.

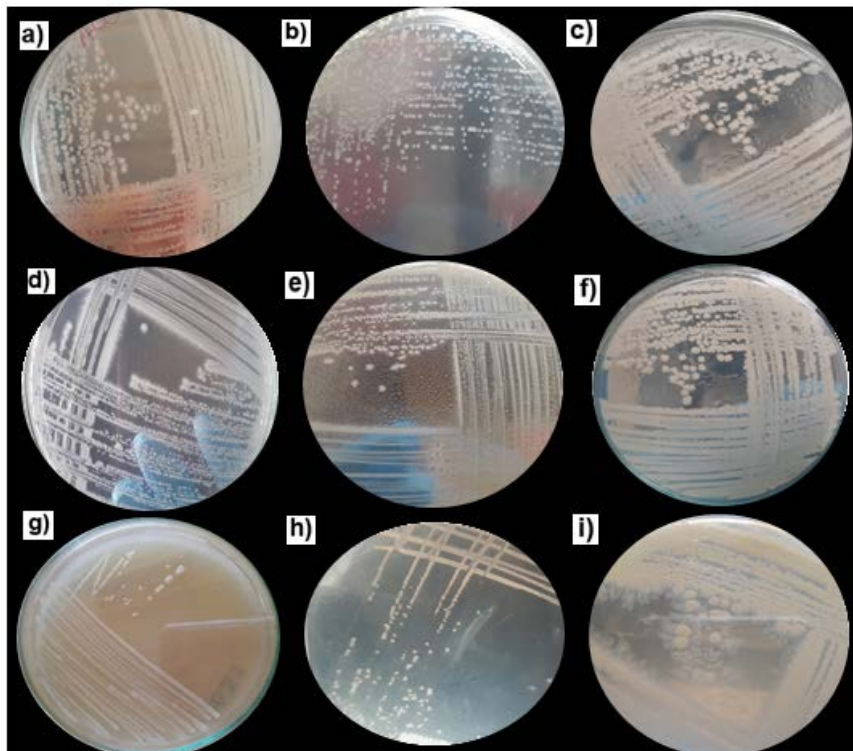


Figura 7. Ejemplos de cepas bacterianas aisladas de la Fuentes Geotermal Papallacta.

- a) Colonias puras de 48 horas de crecimiento a 50 °C en medio Czapek (C2AM1).
- b) Colonias puras de 24 horas de crecimiento a 50 °C en medio Czapek (C17AM2).
- c) Colonias puras de 48 horas de crecimiento a 50 °C en medio Czapek (C8SM1).
- d) Colonias puras de 24 horas de crecimiento a 50 °C en medio LB (C7AM1).
- e) Colonias puras de 24 horas de crecimiento a 50 °C en medio Pseudomonas (C10SM1).
- f) Cultivo puro de 48 horas de crecimiento a 50 °C en medio Czapek (C11AM2).
- g) Cultivo puro de 48 horas de crecimiento a 50 °C en medio Czapek (C15AM2).
- h) Colonias puras de 24 horas de crecimiento a 50 °C en medio LB (C6AM1).
- i) Colonias puras de 24 horas de incubación a 50 °C en medio LB (C1SM1).

4.4 Caracterización microscópica de las cepas aisladas

Para conocer las características microscópicas de las cepas aisladas, se realizó tinción diferencial Gram y tinción de esporas. En los resultados se demostró que la mayoría de las cepas fueron de morfología bacilos Gram negativos y en menor cantidad bacilos Gram positivos. Este resultado demuestra la prevalencia de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* que son bacterias Gram negativas, autóctonas de manantiales de aguas minerales y termales (Vinueza, 2015). Estos datos concuerdan con los resultados de la secuenciación masiva de muestras de agua y sedimento (Figura 15 y 16).

Según Arias (2016), la diversidad de bacterias en fuentes termales es amplia y entre los microorganismos cultivables se ha podido identificar morfológicamente los fillos *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, ya que son bacterias aerobias y anaerobias facultativas, la gran mayoría de estos, bacilos Gram negativos formadoras de esporas que les permiten crecer y desarrollarse a altas temperaturas. Estos resultados se corroboran con el presente estudio ya que la mayoría de las cepas aisladas son bacilos Gram negativos y aquellas que son Gram positivas (Figura 8a), podrían pertenecer al filo *Actinobacteria*, de acuerdo al alto porcentaje de OTUs, obtenido en la secuenciación masiva de muestras de sedimento y debido a que son especies que se desarrollan en formas de vida terrestre y en su mayoría son Gram positivas (Gupta, 2000).

Los dos fillos son formadores de esporas y en los resultados de tinción se puede observar esporas en todos sus estadios (Figura 10a-b-c).

En las siguientes Figuras 8, 9, y 10, se muestran las tinciones Gram de algunas cepas y la tinción de esporas, respectivamente.

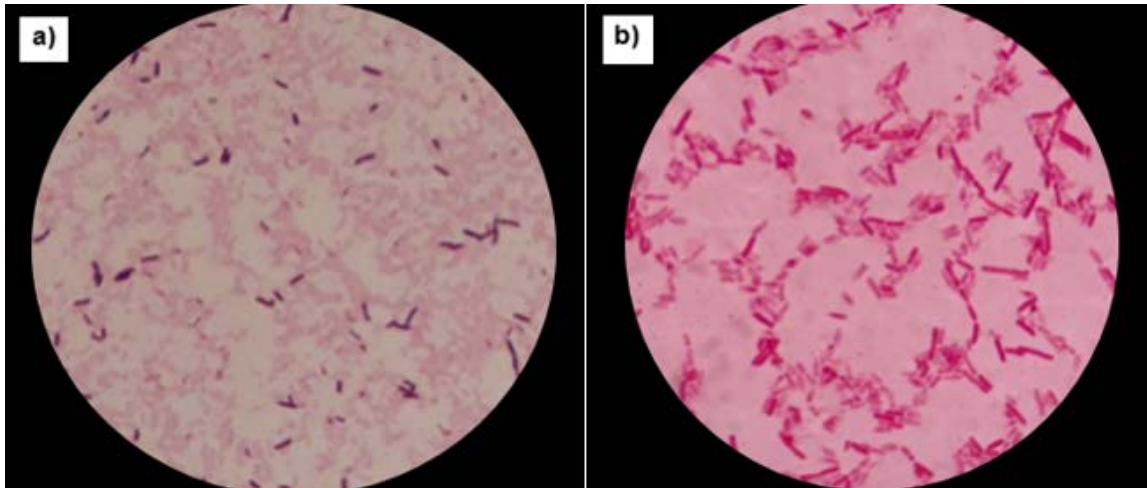


Figura 8. Tinción Gram de las cepas 6 y 7, 100X.

- a) Cepa 6 de muestra de agua, bacilos Gram positivos formadores de esporas.
- b) Cepa 7 de muestra de agua, bacilos Gram negativos formadores de esporas.

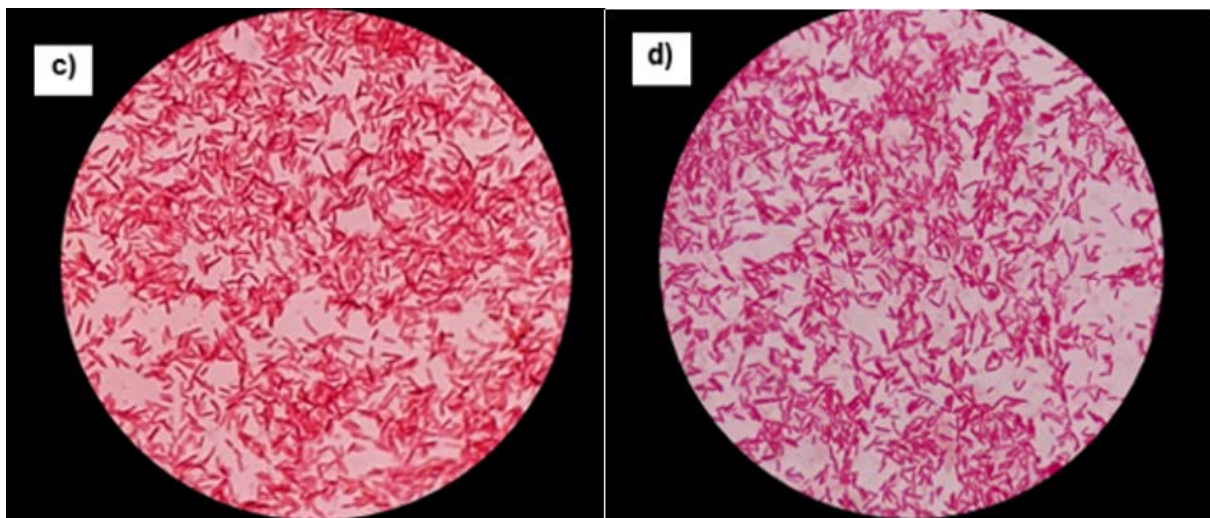


Figura 9. Tinción Gram de las cepas 1 y 2, 100X.

- c) Cepa 1 de muestra de sedimento, bacilos Gram negativos.
- d) Cepa 2 de muestra de agua, bacilos Gram negativos.

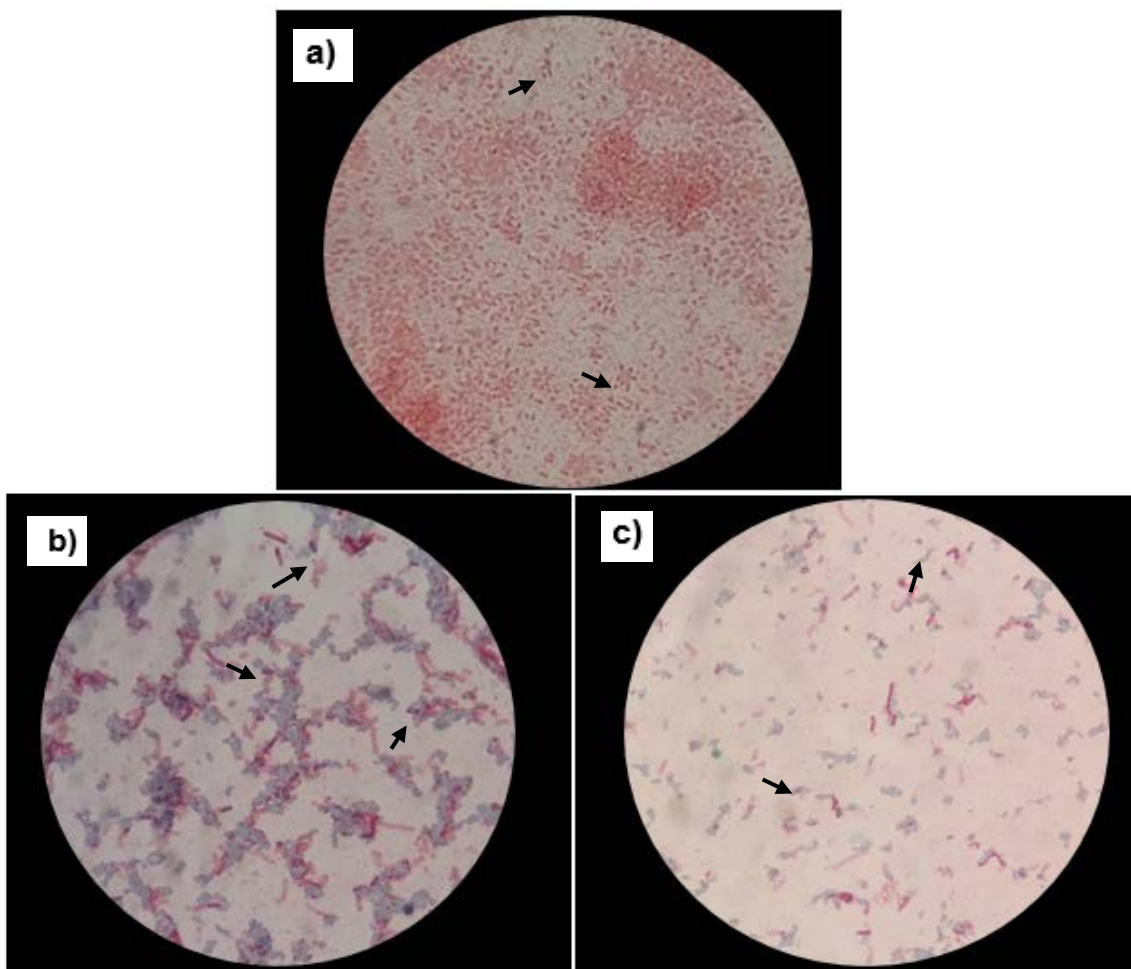


Figura 10. Tinción de esporas de las cepas 7 y 8, 100X. Las flechas indican la existencia de esporas en la tinción.

- a) Esporas sin teñir, de la cepa 7, de muestra de agua.
- b) Tinción de esporas de la cepa 7.
- c) Tinción de esporas de la cepa 8 de muestra de sedimento.

4.5 Extracción de ADN genómico

Las perlas de vidrio utilizadas en el protocolo de extracción de ADN ayudaron a la lisis mecánica para la ruptura de la membrana celular, y con los componentes seleccionados se obtuvieron los resultados esperados en cuanto a calidad y pureza del ADN extraído, de acuerdo a los valores indicativos del Banco Nacional de ADN (Tabla 10).

Con el pasar de los años se han ido utilizando diferentes protocolos de extracción, todos con el objetivo de obtener alta concentración y calidad de ADN. Los métodos tradicionales requieren de preparación de soluciones y tiempo necesario para seguir las cinco etapas del protocolo que empieza con la obtención de biomasa (en caso de ADN bacteriano), seguido de la lisis celular, separación de moléculas (proteínas y lípidos), precipitación y resuspensión del ADN (Velázquez, Aragón, y Romero, 2008). Los protocolos tradicionales se caracterizan por usar solventes orgánicos (CTAB) que logran separar las proteínas del ADN y una vez suspendido en fase acuosa, precipitar el ADN en etanol.

El CTAB es una sustancia utilizada en los protocolos para muestras con alta concentración de polisacáridos, obteniendo buenos resultados en diversas especies de bacterias, hongos e insectos (Tiscornia, Cubilla, Lorenzati, Cariaga, y Zapata, 2010). Hoy en día aún se utiliza este protocolo, ya que el ADN obtenido resulta ser de buena calidad y a una concentración aceptable, eliminando todos los inhibidores que podrían afectar los posteriores métodos de análisis (Castañeda, McEwen, Hidalgo, y Castañeda, 2004), esto concuerda con los resultados obtenidos en cuanto absorbancia 260/280 y se observa que los aislados C1SM1, C4SM1, C6AM1 y C9AM1 tienen una pureza aceptable, mientras que las demás se encuentran en el rango de una pureza óptima.

Tabla 10.

Valores de pureza en muestras de ADN

Radio	Valor	Pureza
260/280	1,8 - 2	ADN con pureza óptima.
	1,6 – 1,8	ADN de pureza aceptable.

	<1,6	Presencia de compuestos aromáticos.
	> 2,1	Contaminación de ARN.
260/230	<1,5	Contaminación con sales, carbohidratos.

Adaptado de (Banco Nacional de ADN Carlos III, s.f.).

Los valores del ADN extraído de todas las cepas aisladas fueron de alta concentración y calidad aceptable, como se muestran en la Tabla 11.

Las concentraciones de ADN se encontraron por encima de 40 ng/μL, por lo que fue necesario realizar diluciones con agua ultra pura, excepto en las cepas C13SM2, C15AM2 y C16SM2 que tuvieron valores menores a 40 ng/μL. Al existir una alta concentración de ADN el rendimiento de la PCR podría verse afectado, causando la inhibición de la técnica. Es importante señalar que la concentración de ADN debe ser ≤40 ng/μL, ya que si los valores son menores también podría afectar la intensidad de las bandas de amplificación (Naranjo, Otero, y Martínez-Zubiaur, 2013).

Tabla 11.

Concentración y pureza de ADN genómico de las muestras aisladas, medido en el equipo NanoDrop 8000.

Cepas	Concentración	Absorvancia	Absorvancia
	(ng/μL)	260/280	260/230
C1SM1	61,8	1,62 A	1,93
C2AM1	44,9	1,82 O	1,77
C3SM1	60,0	1,90 O	1,70

C4SM1	55,9	1,60 A	1,59
C5AM1	57,7	1,83 O	2,00
C6AM1	221,7	1,64 A	1,89
C7AM1	117,0	1,73 A	1,69
C8SM1	49,3	1,80 O	2,10
C9AM1	57,5	1,82 O	1,99
C10SM1	204,3	1,76 A	1,97
C11AM2	206,3	1,98 O	1,68
C13SM2	21,6	1,84 O	1,82
C14SM2	294,1	1,91 O	1,97
C15AM2	29,6	1,98 O	1,73
C16SM2	23,5	2,05 O	1,54
C17AM2	233,0	1,85 O	1,68
C18SM2	404,3	1,96 O	2,03
C19SM2	496,2	1,97 O	2,1
C20AM2	302,4	1,96 O	1,85
C21SM1	45,8	1,80 O	1,90
C22SM2	120,9	1,79 A	2,0

Nota: A = concentración aceptable, O = concentración óptima.

4.6 Amplificación del gen 16S rRNA

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó mediante la técnica de PCR utilizando los primers universales 27F y 1492R y se obtuvieron bandas de aproximadamente 1400 y 1500 pb, según el marcador molecular 1Kb Ladder DNA Marker (Frank et al., 2008).

Como se muestra en la Figura 11, las 3 bandas obtenidas del producto de PCR a partir de aislantes bacterianos y analizadas en el gel de agarosa al 1%, corresponden al número de pares de bases de los cebadores utilizados en la investigación, lo que indica que las muestras corridas en el gel tienen amplificada una región de la secuencia en común que pertenece al gen 16S rRNA. El control positivo pertenece a una cepa aislada de la fuente geotermal El Guapán de la provincia del Cañar (*Paenibacillus barengoltzii*), el tamaño de la banda es de aproximadamente 1500 pb, dado a que se utilizaron los mismos cebadores para la identificación de gen 16S rRNA en bacterias termófilas (Naranjo, 2017).

En el estudio de Mohammad (2017), para la caracterización de bacterias termófilas de aguas termales jordanas, también utilizaron los cebadores 27F y 1492R y obtuvieron bandas de un tamaño aproximado de 1480 pb. Con una diferencia no significativa, esto demuestra que las bandas obtenidas en ambos estudios corresponden a la misma secuencia con excepción de los aislados C7AM1 y C22SM2 en las Figura 12 y 14, que no mostraron la presencia de bandas, por lo que se deduce que ambos aislados podría pertenecer al dominio Arquea, aquellas especies que son cultivables en condiciones similares a las de bacterias termófilas. Probablemente con los primers utilizados no se amplificó la secuencia del gen 16S rRNA (Pallares, 2017).

La similitud del tamaño de las bandas con el control positivo, obtenido a partir de una cepa identificada como *Bacillus licheniformis*, en el estudio de Moposita,

2017, también confirma los resultados de la amplificación de un mismo gen como se aprecia en la Figura 13, donde todos los pocillos muestran bandas similares al control.

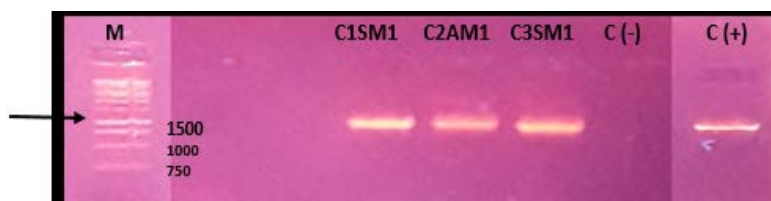


Figura 11. Amplificación del gen 16S de las cepas C1SM1, C2AM1 y C3SM1 (M= marcador molecular, C (-)= control negativo, C (+)= control positivo), con bandas de aproximadamente 1500 pb, según Ladder DNA Marker.

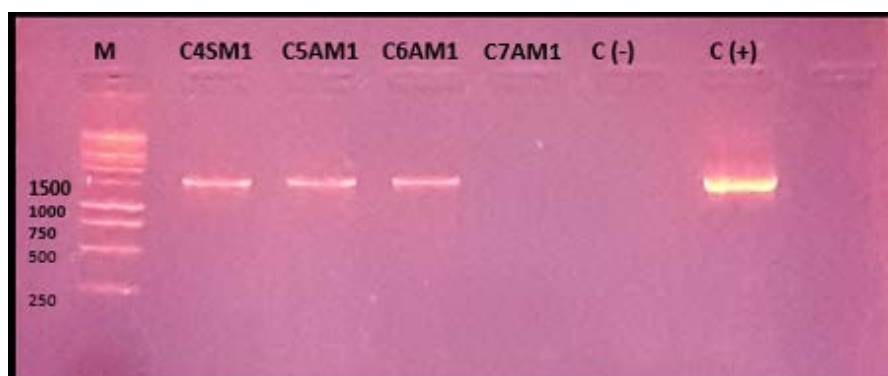


Figura 12. Amplificación del gen 16S de las cepas C4SM1, C5AM1, C6AM1 y C7AM1. (M= marcador molecular, C (-)= control negativo, C (+) = control positivo), con bandas de aproximadamente 1500 pb, según Ladder DNA Marker.

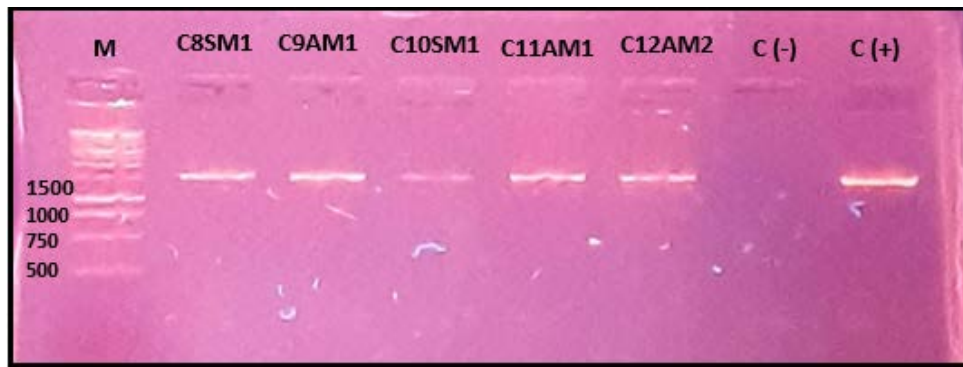


Figura 13. Amplificación del gen 16S de las cepas C8SM1, C9AM1, C10SM1, C11AM1 y C12AM2 (M= marcador molecular, C (-)= control negativo, C (+) = control positivo), con bandas de aproximadamente 1500 pb, según Ladder DNA Marker.

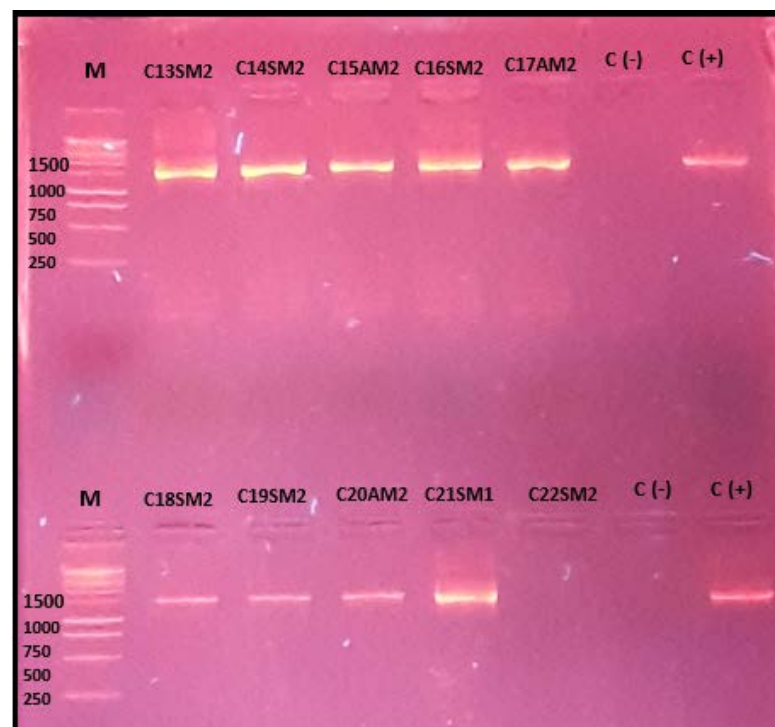


Figura 14. Amplificación del gen 16S de las cepas, C13SM2, C14SM2, C15AM2, C16SM2, C17AM2, C18SM2, C19SM2, C20AM2, C21SM1 y C22SM2 (M= marcador molecular, C (-) = control negativo, C (+) = control positivo), con bandas de aproximadamente 1500 pb, según Ladder DNA Marker.

4.7 Identificación de la Comunidad Bacteriana mediante secuenciación masiva

Las fuentes termales en todo el mundo forman parte de aquellos ambientes extremos donde las condiciones fisicoquímicas son adversas para ciertas especies, estos parámetros les convierten en ecosistemas únicos en cuanto a biodiversidad (Gupta, 2000). La tierra está llena de fuentes geotermales con una gran variedad de microorganismos que los investigadores todavía no han podido completar su identificación y aislamiento. Esta biodiversidad que aún no se conoce en su totalidad, conlleva a investigaciones extensas en las que intervienen las técnicas moleculares independientes de cultivo, como la secuenciación masiva de muestras ambientales, que se realizan para conocer la mayoría de los microorganismos presentes (Mohammad et al., 2017).

En este estudio, a partir de la secuenciación masiva (Illumina), se obtuvo información de la biodiversidad de microorganismos presentes en muestras ambientales de la Fuente Geotermal Papallacta, partiendo de extracción de ADN total de las muestras (Moposita, 2017), en este caso de agua y sedimento de la fuente geotermal Papallacta. La Tabla 12 muestra las concentraciones de ADN obtenidos de agua y sedimento de la fuente, para luego ser enviadas a la Empresa MacroGen.

Tabla 12.

Muestras de ADN para análisis de secuenciación masiva.

MUESTRA	ORIGEN	CONCENTRACIÓN
MA1	Agua	31,4 ng/ μ L
MA2	Agua	31,7 ng/ μ L

MS1	Sedimento	25,9 ng/ μ L
MS2	Sedimento	25,3 ng/ μ L

Los resultados muestran secuencias genómicas que se clasificaron en unidades taxonómicas operativas (OTUs), en agua y sedimento, con umbral de similitud del 97% a nivel de género de acuerdo a la Empresa Macrogen.

Los datos fueron ordenados y representados en gráficos según los diferentes niveles taxonómicos utilizando el programa Excel. Para analizar y comparar los resultados se tomaron en cuenta los OTUs >100, ya que son valores más representativos y coinciden con géneros termófilos cultivables e incultivables de ambientes acuáticos a nivel mundial (López, 2016). Al clasificar se obtuvieron un total de 95104 OTUs en agua y 113415 OTUs en sedimento (Anexos 1 y 2).

4.7.1 Diversidad de filios bacterianos en agua y sedimento

En la Figura 15 se puede apreciar los filios bacterianos que fueron identificados mediante secuenciación masiva en muestras de agua.

FILOS OBTENIDOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DE AGUA

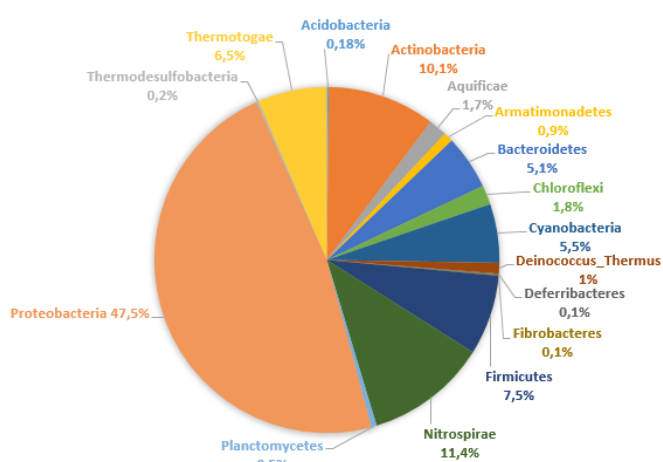


Figura 15. Filios identificados mediante secuenciación masiva en muestra de agua de la Fuente Geotermal Papallacta.

En el agua se obtuvo un total de 16 filos de los cuales, *Proteobacteria* fue el filo que más OTUs tiene, con un valor significativo de 47,5%; esto probablemente por la capacidad de proliferación que tienen estas especies en los ambientes acuáticos de temperatura variable, sin embargo *Proteobacteria* es uno de los filos bacterianos más diverso y representa la gran mayoría de bacterias Gram negativas. Este grupo abarca bacterias conocidas y por conocer de importancia biológica, por lo que no todas las especies de este filo son termófilas y al ser un grupo muy diverso existen también aquellas especies que son causantes de enfermedades en plantas, animales y humanos (Gupta, 2000).

Según Pallares (2017), en su estudio metagenómico, logra identificar especies de bacterias termófilas y halófilas pertenecientes a 8 filos, entre ellos, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Thermotogae*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes* y *Spirochaetes* siendo los filos con mayor número de representantes termófilos y halófilos: *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*, esto debido a su capacidad de crecimiento en diferentes ambientes, desde lugares con alta concentración de sal hasta aguas subterráneas con diversos parámetros de temperatura (Cárdenas y Baena, 2015). Los resultados coinciden con los datos obtenidos en este estudio, ya que tanto en agua como en sedimento de las termas de Papallacta prevalecen los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, por lo que se puede deducir que las especies identificadas corresponden a bacterias que se desarrollan en ambientes extremos (Centeno, Mejía, y Falcón, 2016).

Los filos presentes en sedimento se observan en la Figura 16 y al comparar con los OTUs identificados en agua, podemos demostrar que el filo *Proteobacteria* también es el más representativo con un porcentaje de 69,7%, seguido de *Nitrospirae* con 10,5% a pesar de ser un porcentaje muy bajo. Ambos filos se componen de especies cultivables e incultivables que se desarrollan en ambientes con diversos parámetros ambientales y se sabe que se adaptan a las variaciones de temperatura de las diferentes épocas del año, es por ello que en el aislamiento de estos microorganismos se puede obtener

buenos resultados con un crecimiento óptimo de 24 horas de aislamiento (Craig, 2006).

FILOS OBTENIDOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DE SEDIMENTO

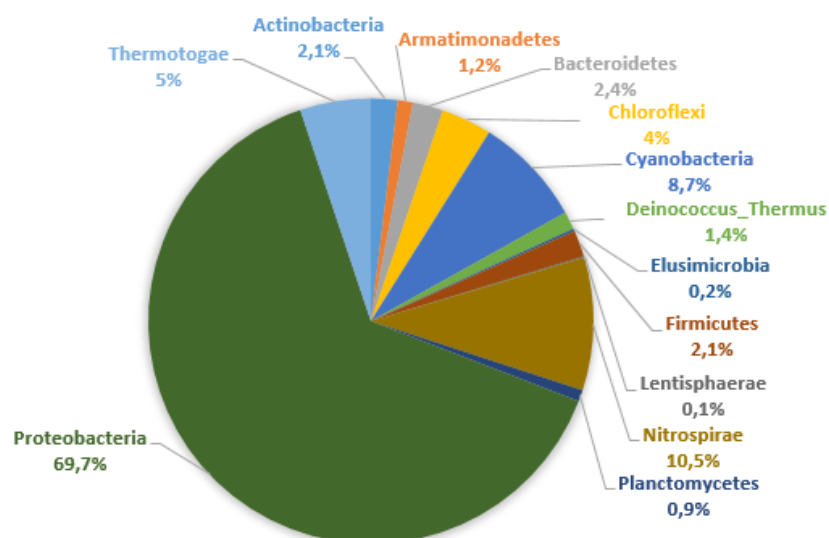


Figura 16. Filos identificados mediante secuenciación masiva en muestra de sedimento de la Fuente Geotermal Papallacta.

De acuerdo al Anexo 3 y 4 el número de OTUs en agua y sedimento varía de acuerdo al filo, revelando mayor cantidad de OTUs en el filo *Proteobacteria* (45170 OTUs) continuando con *Nitrospirae* (10850 OTUs) y *Actinobacteria* (9567 OTUs) en agua y de igual forma en sedimento, el filo *Proteobacteria* (78999 OTUs) y *Nitrospirae* (1913 OTUs).

En cuanto a los resultados obtenidos en la secuenciación masiva del gen 16S rRNA, el número de OTUs indicaron que los filos anteriormente mencionados representan la gran mayoría de la biodiversidad bacteriana en aguas termales de Papallacta. A pesar de ello, existen otros filos con un número menos significativo de OTUs como *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, con 6386 OTUs y 4761 OTUs, en agua y en sedimento 2379 OTUs y 2762 OTUs, respectivamente.

La presencia de estos filos coinciden con el trabajo realizado por Moposita, (2017), donde el mayor número de OTUs perteneció al filo *Proteobacteria*,

seguido de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, siendo estos dos últimos especies productoras de esporas que logran sobrevivir a temperaturas superiores a 60°C y son en su mayoría bacterias incultivables.

Al comparar con el estudio de Arias, (2016) en el que el 42% de bacterias identificadas en las termas de Jamanco y Papallacta pertenecieron al filo *Proteobacteria*, se puede constatar que este filo es el que más prolifera en ambientes termales de la provincia de Napo, obteniendo más diversidad en muestra de sedimento donde la clase *Alphaproteobacteria* es aquella que prevalece con 64868 OTUs, mientras que *Beta-Delta-Gammaproteobacteria* presentan 2311, 2602 y 9218 OTUs respectivamente (Anexo 5).

4.7.2 Diversidad de especies identificadas en agua y sedimento

En muestras de agua de la Fuente Geotermal Papallacta las especies que mayor número de OTUs tienen son *Rhodoplanes* spp. (42,1%) y *Sulfitobacter* sp. (12%), que pertenecen a la clase *Alphaproteobacteria*, como se aprecia en la Figura 17. Se conoce que dentro del género *Rhodoplanes* las especies se caracterizan por ser bacterias fotótrofas, Gram negativos y móviles que crecen y se desarrollan en ambientes subterráneos, de sedimentos y ampliamente distribuidos en hábitats acuáticos (Srinivas, Sasikala, y Ramana, 2014).

Los resultados coinciden con la investigación de Kalyana (2012), donde se identificaron las especies *Rhodoplanes* spp y *Rhodoplanes pilsnae* con un 30% y 54% de OTUs, presente en el agua de un estanque. Si bien es cierto, el género *Rhodoplanes* se ha identificado en agua y en sedimento, dentro de fuentes de agua dulce y marina, por lo tanto se deduce que dichas especies podrían ser aisladas de diferentes ecosistemas, ya que son fotótrofas, quimioautótrofas y anaerobias facultativas (Imhoff, 1995).

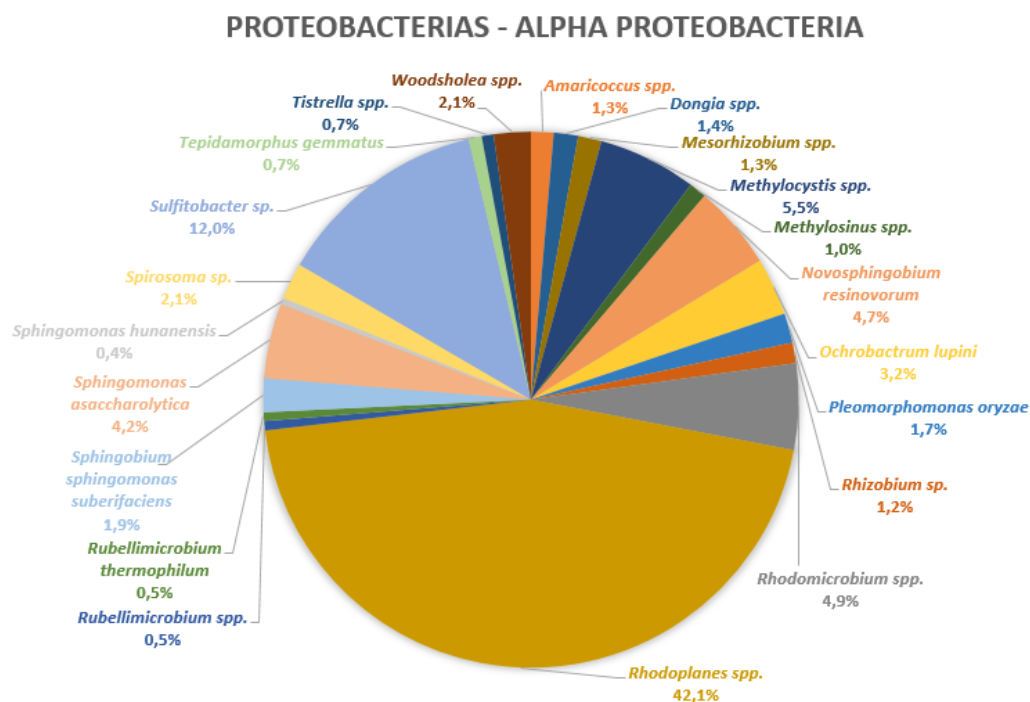


Figura 17. Especies identificadas en agua dentro de la clase *Alphaproteobacteria*.

Dentro del filo *Nitrospirae*, también se halla la mayor cantidad de OTUs identificados en agua de la fuente geotermal (Anexo 6 y 7). En este filo comúnmente se encuentran las bacterias reductoras de sulfato y oxidantes de nitrito que soportan temperaturas mayores a los 55 °C, temperaturas que identifican la mayoría de ambientes geotérmicos, sin embargo hasta el momento no se ha podido obtener cultivos puros de especies termófilas pertenecientes a *Nitrospira* (Lebedeva et al., 2011).

Mediante técnicas independientes de cultivo, en el presente estudio se han identificado 4 especies en agua, y 2 en sedimento donde el 61% de OTUs pertenecen a la especie *Nitrospira enrichment*, 37% a *Nitrospira calida*, el 1 % a *Nitrospira spp.* y *Thermodesulfovibrio spp.* (Figura 18), en cuanto a sedimento *Nitrospira calida* es la especie más representativa con 91,9% seguido de 8,1% en *Nitrospira enrichment* (Figura 19). Según Kunisawa, (2010), todas las especies del filo *Nitrospirae* son termófilas, algunas incultivables, pero reconocidas por ser identificadas en lugares extremos, por ejemplo aguas

termales geotérmicas y de la ventilación del lago Yellowstone, donde fue identificada la bacteria *Thermodesulfovibrio yellowstinii*.

ESPECIES IDENTIFICADAS EN AGUA DENTRO DEL FILO *NITROSPIRAE*

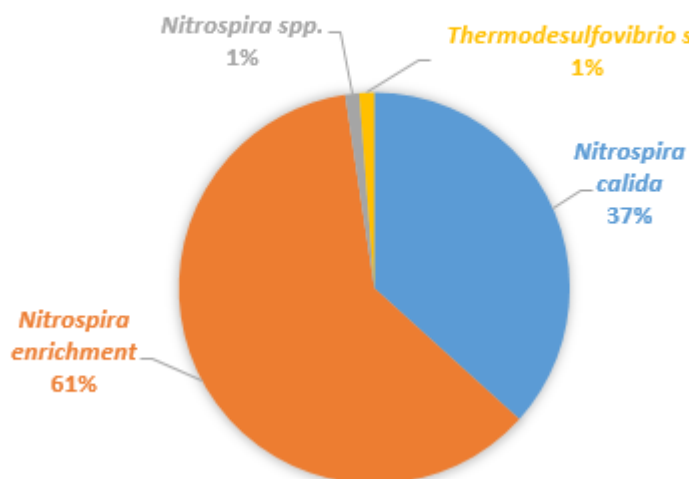


Figura 18. Especies identificadas en agua dentro del filo *Nitrospirae*.

ESPECIES IDENTIFICADAS EN SEDIMENTO DENTRO DEL FILO *NITROSPIRAE*

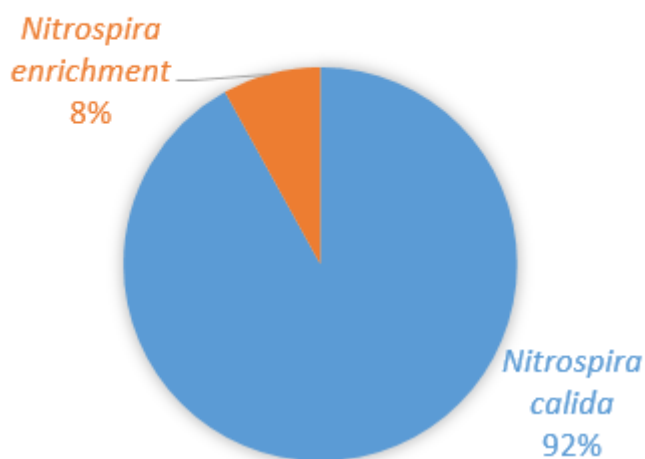


Figura 19. Especies identificadas en sedimento dentro del filo *Nitrospirae*.

Los resultados en muestras de sedimento revelan que la especie *Sulfitobacter* sp. de la clase *Alphaproteobacteria*, tiene mayor porcentaje en comparación a *Rhodoplanes* spp. con 44,8% y 20,4% respectivamente (Figura 20). Según Ben (2017), el género *Sulfitobacter* está compuesto por 10 especies ya identificadas en diferentes ecosistemas acuáticos del planeta. Las especies son bacterias aerobias, Gram negativas, heterótrofas, algunas termófilas y tolerantes a altas concentraciones de sal.

Estas especies se encuentran principalmente en zonas con alta concentración de azufre, el cual se convierte en su única fuente de carbono (Fukui et al., 2014), es por ello que en este proyecto *Sulfitobacter* tiene un porcentaje representativo de OTUs, ya que según el análisis fisicoquímico el azufre está presente en forma de sulfatos a una concentración de 424,0 mg/L.

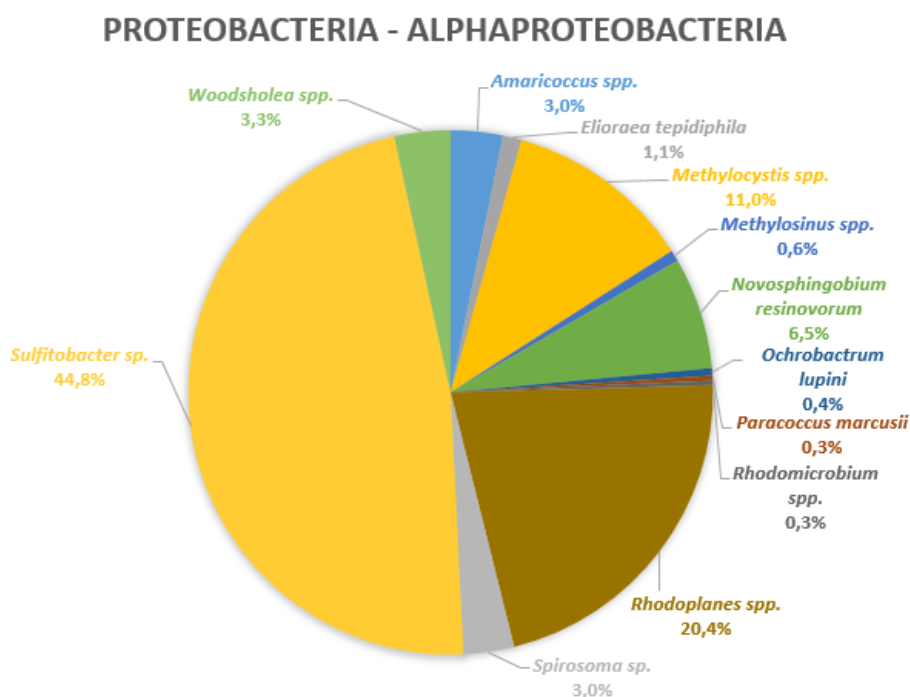


Figura 20. Especies identificadas en sedimento dentro de la clase *Alphaproteobacteria*.

Para conocer la diversidad de microorganismos y sus requerimientos en cuanto a factores ambientales y nutricionales, es importante la combinación de técnicas moleculares independientes de cultivo, para aquellas especies que son difíciles de cultivar y técnicas de aislamiento para aquellas que son cultivables en medios de cultivo ya establecidos (Ben y Gonz, 2017).

La relación entre el número de microorganismos existentes y los ambientes donde se desarrollan depende principalmente de varios factores, siendo entre los más importantes, los componentes nutricionales que se encuentran disponibles para el metabolismo de microorganismos, la disponibilidad de oxígeno, ya que con la gran diversidad de hábitats existentes en el mundo, es claro saber que en cada estrato ambiental existen especies que crecen sin oxígeno y otras que se adaptan a las diferentes concentraciones del mismo. El rango de temperatura es otro factor que es indispensable para algunas especies y en ocasiones limita la vida de una cierta microbiota (Cervantes et al., 2006).

La unificación de métodos de biología molecular y herramientas de bioestadística para estudios ecológicos de la biodiversidad, ha contribuido para estimaciones fiables de diversidad microbiana a partir de la gran disponibilidad de datos que nos aportan las técnicas de secuenciación masiva. Estos enfoques estadísticos hacen posible la descripción detallada y rigurosa de la distribución de la vida microbiana en diversos ambientes (Kunisawa, 2010).

En este caso, el análisis estadístico indica que la existencia de especies termófilas en la fuente geotermal Papallacta, depende de las condiciones fisicoquímicas del lugar de donde se obtuvo la muestra.

La prueba estadística no paramétrica Chi cuadrado de Pearson generó un valor de significancia de 0,000, es decir, menor al nivel de confianza (0,05), lo que indica que el número de OTUs depende de la muestra (agua, sedimento) de la cual proviene (Figura 21).

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	218,145 ^a	16	,000
Razón de verosimilitud	47,215	16	,000
Asociación lineal por lineal	35,170	1	,000
N de casos válidos	211		

Figura 21. Estadístico de prueba Chi cuadrado de Pearson.

La identificación de microorganismos requiere el conocimiento de la distribución microbiana y las condiciones de los diversos ecosistemas que se van a estudiar, utilizando métodos de análisis para conocer los datos de nutrientes esenciales que se encuentran en el lugar, temperatura, concentración de sal, entre otros factores que aportan la información inicial acerca de la diversidad microbiana (Hughes et al., 2016). Estas investigaciones requieren que la diversidad de una muestra ambiental se compare entre diferentes entornos, en este caso se comparó entre agua y sedimento de un mismo ambiente, debido a su gran abundancia y diferencia de componentes nutricionales en ambas muestras, sin embargo, esta tarea ha demostrado ser muy difícil, ya que en una muestra determinada no se asegura tener la totalidad de la microbiota del lugar y en muchos de los casos, se discrimina microorganismos extremófilos que podrían ser de gran potencial por sus condiciones de sobrevivencia (Bohannan y Hughes, 2003).

Existen varias aplicaciones biotecnológicas que incluyen a estos microorganismos extremófilos, y la mayoría se basan en sus biomoléculas y a pesar de las dificultades que existen y la escasa tecnología, la exploración en ambientes extremos se ha convertido en un desafío para la ciencia (Oliart et al., 2016). Sin embargo, es importante fomentar y acelerar los procesos de investigación en ambientes extremos, no solo para identificación de microorganismos en estos ambientes, sino también porque las aplicaciones

detrás de los microorganismos que habitan estos lugares, tienen un potencial económico importante.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se aislaron 22 cepas termófilas, productoras de esporas, las cuales crecieron en el medio mineral Czapek, LB y medio *Pseudomonas*, mostrando una morfología distinta en cada medio. Se amplificó el gen 16S rRNA de 20 cepas, mediante PCR utilizando los cebadores universales 27F y 1492R y se obtuvieron bandas de aproximadamente 1500 pb.

Mediante la secuenciación masiva Illumina, se identificó la diversidad de bacterias termófilas de la fuente termal de Papallacta a partir de muestras de agua y sedimento, obtenidas de dos puntos de la terma. Siendo *Proteobacteria* y *Nitrospirae* los filos más predominantes en agua y sedimento de la fuente termal con porcentajes representativos. A nivel de género el mayor número de OTUs en agua coinciden con las muestras de sedimento, siendo *Rhodoplanes* y *Sulfitobacter* los géneros más representativos.

Los resultados muestran que en las aguas termales de Papallacta, se encuentran diversas poblaciones microbianas que están correlacionadas directamente con las condiciones ambientales del medio, tales como la alta temperatura y las concentraciones de nutrientes disponibles para el desarrollo óptimo de bacterias en agua y sedimento de este hábitat extremo.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda utilizar nuevas técnicas de domesticación microbiana para el aislamiento de microorganismos incultivables, tomando en cuenta los requerimientos nutricionales y condiciones ambientales de especies que aún no se han podido caracterizar.

Es recomendable reproducir el procedimiento de muestreo en diferentes épocas del año para conocer las diferencias en cuanto a diversidad bacteriana, debido a la variación de temperatura en la Fuente Geotermal Papallacta.

Se recomienda la caracterización de las cepas aisladas para posteriormente ser utilizadas en proyectos donde se produzcan metabolitos de interés industrial y biotecnológico.

REFERENCIAS

- Amils, R., Ellis-Evans, C., y Hinghofer-Szalkay, H. (2007). *Life in extreme environments. Life in Extreme Environments*. Recuperado el 22 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6285-8>.
- Andersson, B., y Prieur, D. (2002). *Investigating Life in Extreme A European Perspective. Environmental Sciences*. Recuperado el 5 de junio del 2018 de <http://archives.esf.org/home.html>.
- Arce, Z., Arias, A., y Mera, A. (2017). *Organismos extremófilos en el ojo de la ciencia*. Recuperado el 23 de agosto del 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.1510461112.5.6.Horikawa>.
- Arias, J. (2016). *Aislamiento e Identificación De Bacterias. Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE. Departamento de Ciencias de La Vida y La Agricultura. Laboratorio de Microbiología. Quito-Ecuador*.
- Baker, C., Gaffar, S., Cowan, D., y Suharto, R. (2001). *Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. FEMS Microbiology Letters*. Recuperado el 18 de junio del 2018 de [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00207-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00207-5).
- Barns, M., Fundyga, E., Jeffries, W., y Pace, R. (1994). *Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Recuperado el 11 de julio del 2018 de <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1609>
- Ben, P., y Gonz, M. (2017). *Analysis of the microbial ecology of bacterioplankton of the oceans by genomes sequencing and implication of*. Recuperado el 22 de marzo del 2018 de <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5015>.
- Bohannon, M., y Hughes, J. (2003). *New approaches to analyzing microbial*

- biodiversity data. Current Opinion in Microbiology*. Recuperado el 15 de agosto del 2018 de [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00055-9).
- Brake, S., y Hasiotis, T. (2010). *Eukaryote-dominated biofilms and their significance in acidic environments. Geomicrobiology Journal*. Madrid, España. Recuperado el 19 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1080/01490451003702966>.
- Bulaev, A. (2017). *Resistance of Moderately Thermophilic Acidophilic Microorganisms to Ferric Iron Ions. Solid State Phenomena*. Lima, Peru. Recuperado el 3 de julio del 2018 de <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.471>.
- Cadena-Zamudio, D., Martínez-Peña, D., Guzmán-Rodríguez, L. F., y Arteaga-Garibay, R. I. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad de Argentina*. Buenos Aires, Argentina.
- Caisedo, A. (2011). *Características Ambientales de las fuentes termales del Ecuador*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Camargo, N., Durán, C., Rada, C., Hernández, C., Linero, G., Muelle, M., y Sorgeloos, P. (2005). *Determination of biological and physicochemical parameters of Artemia franciscana strains in hypersaline environments for aquaculture in the Colombian Caribbean*. Recuperado el 12 de agosto del 2018 de <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-9>.
- Cárdenas, C., y Baena, S. (2015). *Manantiales salinos: inventarios de la diversidad metabólica y filogenética de microorganismos de ambientes salinos*. Academia Colombiana de la Ciencia. Recuperado el 28 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.18257/raccefyn.199>.
- Care, A., Petroll, K., Gibson, Y., Bergquist, L., y Sunna, A. (2017). *Solid-binding peptides for immobilisation of thermostable enzymes to hydrolyse biomass polysaccharides. Biotechnology for Biofuels*, Recuperado el 13 de mayo de

2018 de <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0715-2>.

Carrera, D. (2017). *Fuentes termales del Ecuador*. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. Manual de Ecología.

Castañeda, A., Mcewen, J., Hidalgo, M., y Castañeda, E. (2004). *Evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de Cryptococcus spp . a partir de muestras ambientales*. Madrid, España. Ciencias Biomédicas.

Centeno, M., Mejía, O., y Falcón, I. (2016). *Habitat conditions drive phylogenetic structure of dominant bacterial phyla of microbialite communities from different locations in Mexico*. *Revista de Biología Tropical*. Recuperado el 29 de julio del 2018 de <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.18806>.

Cervantes, C., Espino-saldaña, E., Rodríguez, L., Riveracano, E., Gutiérrez, F., y Zavala, S. (2006). *Microbial interactions with heavy metals*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Recuperado el 25 de mayo del 2018 de <https://www.researchgate.net/publication/6259274%0A>.

Cole, K., Peacock, P., Dodsworth, A., Williams, J., Thompson, B., Dong, H., Hedlund, P. (2013). *Sediment microbial communities in Great Boiling Spring are controlled by temperature and distinct from water communities*. *ISME Journal*. Recuperado el 11 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.157>.

Corominas, A. (1989). *Estudio hidrogeológico de los manantiales y su aplicación geológica*. Universidad Politecnica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Coronel, C. (2017). *Aislamiento y caracterización de una bacteria oxidadora de Mn proveniente de agua*. Ciencias Biológicas y de la Salud. México D.F., México.

Dhakar, K., y Pandey, A. (2016). *Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Recuperado el 4 de agosto del

2018 de <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7285-2>.

Dopson, M., y Holmes, S. (2014). *Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Recuperado el 12 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5982-2>.

Escalante, E., Barbolla, J., Ramírez-Barahona, S., y Eguiarte, E. (2014). *The study of biodiversity in the era of massive sequencing*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Recuperado el 10 de julio del 2018 de <https://doi.org/10.7550/rmb.43498>.

Fang, S., Zhang, L., Li, T., Kato, C., Tamburini, C., Zhang, Z., y Wang, P. (2015). *The POM-DOM piezophilic microorganism continuum (PDPMC). The role of piezophilic microorganisms in the global ocean carbon cycle*. *Science China Earth Sciences*. Recuperado el 12 de mayo del 2018 de <https://doi.org/cielo/s11430-014-4985-2>.

Faveri, M., Figueiredo, C., Shibli, A., Pérez, J., y Feres, M. (2015). *Microbiological diversity of peri-implantitis biofilms*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Recuperado el 23 de junio del 2018 de https://doi.org/journals/978-3-319-11038-7_5.

Fossati, O., y Calvez, R. (2006). *Requerimientos científicos para caudales ecológicos en ríos del sistema Papallacta*. Quito, Ecuador.

Frank, A., Weisbaum, S., Wilson, A., Olsen, J., Reich, I., y Sharma, S. (2008). *Bacterial 16S rRNA Genes Commonly Used for Amplification of Critical Evaluation of Two Primers*. *Applied and Environmental Microbiology*. Recuperado el 22 de julio del 2018 de <https://doi.org/journals/AEM.02272-07>.

Fukui, Y., Abe, M., Kobayashi, M., Shimada, Y., Saito, H., Oikawa, H., y Satomi, M. (2014). *Sulfitobacter porphyrae sp. nov., isolated from the red alga Porphyra yezoensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology. Recuperado el 10 de junio del 2018 de <https://doi.org/journals.0.053090-0>.

Galarza, N. (2014). *Ecoturismo y las propiedades de las aguas termales de Papallacta*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Quito, Ecuador.

García, L., y Osses, P. (2017). *Investigaciones en el desierto de Atacama Centro UC Desierto de Atacama – Estación Atacama UC, Oasis de Niebla Alto Patache*. Revista de Geografía Norte Grande. Recuperado el 4 de junio del 2018 de <https://doi.org/journal/S0718-34022017000300005>

García, L. (2014). *Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica Shewanella frigidimarina*. Madrid, España.

Giménez, M. (2011). *Nuevas enzimas termoestables aplicadas a la síntesis de nucleósidos farmacológicamente activos*. Recuperado el 13 de junio del 2018 de <file:///C:/journals.plos.org>.

Gomez, B. (2016). *Ecología microbiana , secuenciación masiva y bioinformática*. Revista ecológica de Madrid. Madrid, España.

Gómez, R., Alfaro, V., María, O., y Miguel, A. (2015). *Aislamiento y caracterización parcial de microorganismos de aguas termales del Carrizal y su aplicacion potencial en la recuperacion mejorada del petróleo*. Lima, Peru.

Gontz, M., Belknap, F., y Kelley, T. (2002). *Seafloor features and characteristics of the Black Ledges Area, Penobscot Bay, Maine, USA*. *Journal of Coastal Research*. Recuperado el 13 julio del 2018 de <https://doi.org/sielo/1551-5036-36.sp1.333>.

Gonz, P. (2015). *Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y termales*. México D.F., México.

González, E. (2008). *Turismo Rural*. Manual Ecológico. Recuperado el 10 de

junio del 2018 de <https://doi.org/EBSCO198-2009>.

- Grundstein, A., Cooper, E., Ferrara, M., y Knox, A. (2014). *The geography of extreme heat hazards for American football players*. *Applied Geography*. Recuperado el 23 de agosto del 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2013.10.007>
- Gupta, S. (2000). *The phylogeny of proteobacteria:relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes*. *FEMS Microbiology*. Recuperado el 11 de agosto del 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.BioOne.tb00547>.
- Henn, R., Lopes, P., Goncalves, M., y Fraiz, A. (2008). *Turismo termal: cambios conceptuales y mercadológicos de los balnearios en España*. *Revista Turismo Visao e Acao*. Recuperado el 12 de junio del 2018 de <https://doi.org/journals/RTVA.V10N3.P415-434>
- Hlodan, O. (2010). *Evolution in Extreme Environments*. *BioScience*. Recuperado el 2 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.6.4>
- Huddart, D., y Stott, T. (2010). *Earth Environments: Past, Present and Future*. *Wiley-Blackwell* (2ª, ed.). Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Hughes, B., Hellmann, J., Ricketts, H., Bohannan, M., Sinclair, L., Osman, A., y Michaelakis, A. (2016). *Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity* MINIREVIEW *Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity*. *Applied and Environmental Microbiology*. Recuperado el 5 de julio del 2018 de <https://doi.org/BioOneAEM.67.10.4399>
- Imhoff, F. (1995). *Taxonomy and Physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria*. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (7ª ed.). Recuperado el 4 de agosto del 2018 de https://doi.org/journals/0-306-47954-0_1
- Jegousse, C., Yang, Y., Zhan, J., Wang, J., y Zhou, Y. (2017). *Structural*

signatures of thermal adaptation of bacterial ribosomal RNA, transfer RNA, and messenger RNA. Recuperado el 3 de mayo del 2018 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184722>

Jiménez, D. (2007). *Caracterización Molecular de Cepas Nativas Colombianas de Azotobacter spp. mediante análisis de restricción del DNAr ribosomal 16S.* Facultad de Ciencias Basicas. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.

Kalyana, S., Ramaprasad, V., Shobha, E., Sasikala, C., y Ramana, V. (2012). *Rhodoplanes piscinae sp. nov. isolated from pond water.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Recuperado el 13 de julio del 2018 de <https://doi.org/internationaljournal/ijs.0.037663-0>.

Kraková, L., Šoltys, K., Budiš, J., Grivalský, T., Ďuriš, F., Pangallo, D., y Szemes, T. (2016). *Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE-cloning.* Extremophiles. Recuperado el 13 de mayo del 2018 de <https://doi.org/EBSCO/s00792-016-0855-5>.

Kunisawa, T. (2010). *Evaluation of the phylogenetic position of the sulfate-reducing bacterium Thermodesulfovibrio yellowstonii (phylum Nitrospirae) by means of gene order data from completely sequenced genomes.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Recuperado el 7 de mayo del 2018 de <https://internationaljournals/10.1099/ijs.0.014266-0>.

Lebedeva, S., Zumbrägel, S., Kruse, M., Shagzhina, A., Lückner, S., y Spieck, E. (2011). *Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring.* FEMS Microbiology Ecology. Recuperado el 15 de junio del 2018 de <https://doi.org/journals/j.1574-6941.2010.01006>.

Lee, C., Narayanan, K., y Sim, E. (2009). *Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters.* Ciencias Marinas.

Recuperado el 15 de junio del 2018 de <https://doi.org/sielo/cm.v35i2.1525>.

Li, X., Fu, L., Li, Z., Ma, X., Xiao, X., y Xu, J. (2015). *Genetic tools for the piezophilic hyperthermophilic archaeon Pyrococcus yayanosii. Extremophiles*. Recuperado el 8 de julio del 2018 de <https://doi.org/EBSCO/s00792-014-0705-2>.

Liu, B., Li, H., Wu, S., Zhang, X., y Xie, L. (2006). *A simple and rapid method for the differentiation and identification of thermophilic bacteria. Canadian Journal of Microbiology*. Recuperado el 6 de mayo del 2018 de <https://doi.org/canadianjournals/w06-036>.

López, L. (2016). *Valorización biotecnológico de descartes blandos del procesamiento de concha de abanico mediante el uso de Lactobacillus caracterizados molecularmente*. (3ª ed.). Madrid, España.

López, F., y Oleas, A. (2012). *Estudio iónico y físico químico de fuentes geotermicas en el Ecuador*. (7ª ed.). Quito, Ecuador.

Maier, M., Gerba, C., y Pepper, I. (2009). *Extreme Environments. Environmental Microbiology* (2ª ed.). Elsevier Inc. Recuperado el 10 de julio del 2018 de <https://doi.org/10.1016/BioOne-12-370519-8.00007-9>.

Maier, M., y Pepper, L. (2009). *Bacterial Communities in Natural Ecosystems. Environmental Microbiology* (2ª ed.). Elsevier Inc. Recuperado el 15 de julio del 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00017-1>.

Mardis, R. (2008). *Next-Generation DNA Sequencing Methods. Annual Review of Genomics and Human Genetics*. Recuperado el 16 de mayo del 2018 de <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>.

Martinez, A., Stratton, J., y Bianchini, A. (2017). *Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. Journal of Dairy Science*. Recuperado el 18 de junio del 2018 de <https://EBSCO/10.3168/jds.2016-11660>.

- Masabanda, B. (2017). *Estudio de fuentes termales, fallas geológicas, descarga de calor en la caldera de Chacana y el aprovechamiento actual de los recursos geotermicos. Escuela Politecnica Nacional. Facultad de Ingenieria en Geología y Petroleos*. Recuperado el 11 de agosto del 2018 de <http://www.epn.edu.ec/institucion/ubicacion-geografica/>.
- Medina, L., Medina, G., y Merino, A. (2010). *Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, (3ª ed.), pp. 83–90. México D.F., México.
- Men, E., Wilson, P., Siemering, K., y Forrest, S. (2008). *Sanger DNA Sequencing. In Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. Recuperado el 3 de mayo del 2018 de <https://doi.org/EBSCO/9783527625130.ch1>.
- Miralles, F. (2011). *Compositional and structural features related to thermal stability in the archaea SRP19 and SRP54 signal recognition particle proteins. Journal of Molecular Evolution*. Recuperado el 20 de julio del 2018 de <https://doi.org/internationaljournals/s00239-011-9443-6>.
- Mohammad, T., Al Daghistani, I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., y Kennes, C. (2017a). *Characterization of thermophilic bacteria isolated from two hot springs in Jazan, Saudi Arabia. Journal of Pure and Applied Microbiology*. Recuperado el 11 de julio del 2018 de <https://doi.org/journal/JPAM.11.2.13>.
- Mohammad, T., Al Daghistani, I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., y Kennes, C. (2017b). *Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: Bacillus licheniformis and Thermomonas hydrothermalis Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. International Journal of Microbiology*. Recuperado el 10 de julio del 2018 de <https://doi.org/journal/2017/6943952>.
- Moposita, F. (2017). *Identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal "CHACHIMBIRO" mediante técnicas*

microbiológicas y moleculares. Universidad Politécnica del Ejército ESPE. Quito, Ecuador.

- Mosso, A. (2005). *Diversidad microbiana de las aguas minerales termales*, (2ª ed.). Madrid, España. Panamericana.
- Muir, A., Biek, R., y Mable, B. (2014). *Behavioural and physiological adaptations to low-temperature environments in the common frog, Rana temporaria*. *BMC Evolutionary Biology*. Recuperado el 26 de julio del 2018 de <https://doi.org/BioOne-2148-14-110>.
- Müller, L., De Rezende, R., Hubert, J., Kjeldsen, U., Lagkourados, I., Berry, D., y Loy, A. (2014). *Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents*. *ISME Journal*. Recuperado el 21 de mayo del 2018 de <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.225>.
- Naranjo, E., Otero, A., y Martínez-Zubiaur, Y. (2013). *Optimización de la amplificación por PCR del gen de la endoglucanasa de Ralstonia solanacearum* *Rev. Protección Vegetal*, pp. 211–214. Barcelona, España.
- Naranjo, Y. (2017). *Identificación de bacterias, hongos y algas mesófilas y termófilas de las fuentes geotermales de Azuay y Cañar*. Departamento de Ciencias de La Vida y La Agricultura. Quito, Ecuador.
- Negri, A., Daniele, L., Morata, D., Delgado, A., y Valdes, A. (2015). *Origen y procesos en las aguas termales de la región de Aysén: primeros resultados desde la hidrogeoquímica*. XIV Congreso Geológico Chileno. Recuperado el 15 de julio del 2018 de http://biblioteca.sernageomin.cl/opac/DataFiles/14905_v2_pp_256_259.pdf
- Newby, T., Marlowe, M., y Maier, M. (2009). *Nucleic Acid-Based Methods of Analysis*. *Environmental Microbiology*. Recuperado el 11 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00013-4>.
- O'Connell, C., y Keppel, G. (2016). *Deep tree hollows: important refuges from extreme temperatures*. *Wildlife Biology*. Recuperado el 13 de agosto del

2018 de <https://doi.org/EBSCO/wlb.00210>.

Oliart, R., Manresa, Á., y Sánchez, G. (2016). *Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico*. Santiago, Chile.

Omelchenko, V., Wolf, I., Gaidamakova, K., Matrosova, Y., Vasilenko, A., Zhai, M., y Makarova, S. (2005). *Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: Divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance*. *BMC Evolutionary Biology*. Recuperado el 17 de agosto del 2018 de <https://bmc/journals/1471-2148-5-57>

Pallares, R. (2017). *Aislamiento de nuevas cepas de *Spiribacter**. Lima, Perú. McGraw Hill.

Pepper, L., Gerba, P., y Maier, M. (2009). *Environmental Sample Collection and Processing*. *Environmental Microbiology* (2ª ed.). Elsevier Inc. Recuperado el 13 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00008-0>.

Peréz, F., y Prieto, F. (2003). *Caracterización química de aguas subterráneas en pozos y un distribuidor de agua de Zimapán , Estado de Hidalgo , Mexico*. *Hidrobiológica*. México D.F., México.

Pikuta, V., Hoover, B., y Tang, J. (2007). *Microbial extremophiles at the limits of life*. *Critical Reviews in Microbiology*. Recuperado el 11 de junio del 2018 de <https://doi.org/journals/08410701451948>.

Piñar, G., Dalnodar, D., Voithl, C., Reschreiter, H., y Sterflinger, K. (2016). *Biodeterioration risk threatens the 3100 year old staircase of hallstatt (Austria): Possible involvement of halophilic microorganisms*. Recuperado el 9 de agosto del 2018 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148279>.

Poutou, R. A. (1999). *Es posible la vida a altas temperaturas*. *Innovacion y Ciencia*, (7ª ed.). Bogotá, Colombia. Panamericana.

- Quintana, T., Badillo, F., y Maldonado, A. (2013). *Characterisation of the first actinobacterial group isolated from a Mexican extremophile environment. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Recuperado el 12 de mayo del 2018 de <https://doi.org/internationaljournals/s10482-013-9926-0>.
- Ramírez, N., Serrano, A., y Sandoval, H. (2006). *Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. México D.F., México.
- Roane, M., Rensing, C., Pepper, L., y Maier, M. (s.f). *Microorganisms and Metal Pollutants. Environmental Microbiology* (2ª ed.). Elsevier Inc. Recuperado el 3 de abril del 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00021-3>.
- Roane, M., Reynolds, A., Maier, M., y Pepper, L. (2009). *Microorganisms. Environmental Microbiology*. Recuperado el 16 de abril del 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00002-X>.
- Rodriguez, J. (2009). *Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio , pH , conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto , (ASADAS), de cada distrito de Grecia , cantón de Alajuel. Revista Pensamiento Actual, Universidad de Costa Rica*. Recuperado el 10 de mayo del 2018 de <https://C:/Users/Miqueas/Downloads/2842-4409-1-SM.pdf>
- Rodriguez, R., y Simbaña, M. (2010). *Plan de negocios para mejorar la situación financiera del complejo de aguas termales Jumanco situado en Papallacta. Escuela Politecnica Nacional . Facultad de Ingenieria En Ciencias Economicas y Financieras*. Quito, Ecuador.
- Sandrin, R., Dowd, E., Herman, C., y Maier, M. (2009). *Aquatic Environments. Environmental Microbiology* (2ª ed.). Elsevier Inc. Recuperado el 4 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00006-7>.

- Selvarajan, R., Sibanda, T., Tekere, M., Nyoni, H., y Meddows-Taylor, S. (2017). *Diversity analysis and bioresource characterization of halophilic bacteria isolated from a South African saltpan*. *Molecules*. Recuperado el 3 de junio del 2018 de <https://doi.org/journals/molecules22040657>.
- Sen, R., y Maiti, K. (2014). *Genomic and Functional Diversity of Bacteria Isolated from Hot Springs in Odisha, India*. *Geomicrobiology Journal*. Recuperado el 14 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1080/BioOne.2013.850560>.
- Sharma, R., Nezami, S., Joseph, K., Ahsan, A., Aparna, S., Sharma, R., y Jha, K. (2016). *Screening of Commercially Important Halophilic Microbial Community for Bioactive Compounds*. Madrid, España.
- Shendure, J., y Ji, H. (2008). *Next-generation DNA sequencing*. *Nature Biotechnology*. Recuperado el 4 de julio del 2018 de <https://doi.org/sielo/nbt1486>.
- Sherpa, T., Reese, J., y Montazeri Aliabadi, H. (2015). *Application of iChip to Grow "Uncultivable" Microorganism and its Impact on Antibiotics Discovery*. *Journal Pharm. Science*. Recuperado el 11 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.18433/J30894>.
- Smith, A., Murray, W., Harding, E., Lease, M., y Martin, J. (2014). *Life in an extreme environment: a historical perspective on the influence of temperature on the ecology and evolution of woodrats*. *Journal of Mammalogy*. Recuperado el 3 de junio del 2018 de <https://doi.org/10.1644/13-MAMM-S-070>.
- Srinivas, A., Sasikala, C., y Ramana, V. (2014). *Rhodoplanes oryzae sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from the rhizosphere soil of paddy*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Recuperado el 25 de junio del 2018 de <https://doi.org/BioOne/journals.0.063347-0>.

- Srinivasan, A., Montelongo, D., y Ramasubramanian, K. (s.f.). *Desarrollo de chips microbianos y sus aplicaciones en el diagnóstico , tratamiento y estudio de la patogenia de la candidiasis P2 Aplicación de la genotipificación al estudio de brotes nosocomiales y resistencia antifúngica en Aspergillus y*, 1–77. Recuperado el 14 de mayo del 2018 de http://www.aemicol.com/CNM2014/comunicaciones/XIICNM_Ponencias.pdf
- Tiscornia, M., Cubilla, A., Lorenzati, M., Cariaga, A., y Zapata, D. (2010). *Estandarización de un método para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas parafinadas. Rev. Cienc. Tecnol. Madrid, España.*
- Ulrich, N., y Marsh, G. (2008). *Proteome Assay of Temperature Stress and Protein Stability in Extreme Environments: Groundwork with the Heat Stress Response of the Bivalve Mercenaria mercenaria. Journal of Shellfish Research.* Recuperado el 2 de junio del 2018 de [https://doi.org/EBSCO/0730-8000\(2008\)27journal2.0.CO](https://doi.org/EBSCO/0730-8000(2008)27journal2.0.CO).
- Vázquez, C., Martín, A., Isabel, I., y Serrano, S. (2010). *Técnicas básicas de Microbiología - Observación de bacterias. Reduca (Biología).* Caracas, Venezuela.
- Velázquez, D., y Quesada, A. (2011). *Las cianobacterias en ambientes polares. Ecosistemas.* Bogotá, Colombia. Panamericana.
- Velázquez, L., Aragón, C., y Romero, C. (2008). *Extracción y purificación de ADN. Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología.* Recuperado el 23 de julio del 2018 de <https://doi.org/BioOne/CBO9781107415324.004>.
- Vinueza, R. (2015). *Análisis microbiológico de las fuentes termales del balneario El Tingo ubicado en Sangolquí.* Recuperado el 5 de julio del 2018 de <file:///C:/Users/Miqueas/Downloads/2842-4409-1-SM.pdf>
- Wan, Y., Ruan, X., Zhang, Y., y Li, R. (2017). *Illumina sequencing-based analysis of sediment bacteria community in different trophic status*

freshwater lakes. *MicrobiologyOpen*. Recuperado el 3 de julio del 2018 de <https://doi.org/scielo/mbo3.450>.

Ward, D., y Cohan, F. (2006). *Microbial Diversity in Hot Spring Cyanobacterial Mats: Pattern and Prediction. Geothermal Biology and Geochemistry in Yellowstone National Park*. Recuperado el 16 de agosto del 2018 de http://works.bepress.com/cgi/viewcontent.cgi?article=1053&context=frederick_cohan.

Wolferen, M. Van, Driessen, M., y Albers, S. (2013). *How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions*. Recuperado el 18 de mayo del 2018 de <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0552-6>.

Wong, P., y Farrés, A. (1999). *Lipasa termoestable de Bacillus pumilus GMA1 : Producción fermentativa y algunas propiedades*. Madrid, España.

Zapata, B. y Castellanos, R. (2014). *Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas termófilas de Candarabe. Laboratorio de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Ciencias de La Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmana*. Madrid, España.

Zhang, Y., Hedrich, S., y Schippers, A. (2017). *Reduction of Iron(III) Ions at Elevated Pressure by Acidophilic Microorganisms. Solid State Phenomena*. Recuperado el 13 de julio del 2018 de <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.88>.

ANEXOS

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	OTUs	
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	172	
		Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	Acidimicrobium	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	122	
Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	Rubrobacter	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	220	
			Corynebacteriaceae	Corynebacterium	<i>Corynebacterium spp.</i>	847	
			Frankiaceae	Frankia	<i>Frankia sp.</i>	547	
			Geodermatophilaceae	Geodermatophilus	<i>Geodermatophilus obscurus</i>	253	
			Gordoniaceae	Gordonia	<i>Gordonia gordonae bronchialis</i>	277	
				Agromyces	<i>Agromyces sp.</i>	154	
			Microbacteriaceae	Subtercola	<i>Candidatus microthrix sp.</i>	430	
				Arthrobacter	<i>Arthrobacter agilis</i>	313	
					<i>Arthrobacter spp.</i>	172	
			Micromonosporaceae	Micromonospora	<i>Micromonospora spp.</i>	229	
			Mycobacteriaceae	Mycobacterium	<i>Mycobacterium neglectum</i>	114	
			Nocardiaceae	Nocardia	<i>Nocardia ninae</i>	208	
				Virgisporangium	<i>Virgisporangium ochraceum</i>	229	
			Nocardiodaceae	Nocardiodes	<i>Nocardiodes spp.</i>	1472	
			Propionibacteriaceae	Microlunatus	<i>Microlunatus panaciterrae</i>	2660	
				Marmoricola	<i>Marmoricola spp.</i>	285	
			Pseudonocardiaceae	Pseudonocardia	<i>Pseudonocardia yunnanensis</i>	467	
Streptomycetaceae	Streptomyces	<i>Streptomyces spp.</i>	203				
Streptosporangiaceae	Streptosporangium	<i>Streptosporangium sp.</i>	365				
Aquificae	Thermoleophilia	Thermoleophilales	Thermoleophilaceae	Thermoleophilum	<i>Thermoleophilum album</i>	211	
					<i>Thermoleophilum spp.</i>	1395	
Armatimonadetes	Armatimonadia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	Solirubrobacter	<i>Solirubrobacter spp.</i>	620	
	Fimbriimonadia	Fimbriimonadales	Fimbriimonadaceae	Chryseobacterium	<i>Chryseobacterium spp.</i>	196	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidetes	Prevotellaceae	Prevotella	<i>Prevotella sp.</i>	400	
			Cytophagaceae	Rudanella	<i>Rudanella lutea</i>	779	
	Cytophagia	Cytophagales	Chitinophagaceae	Chitinophaga	<i>Chitinophaga spp.</i>	196	
				Ferruginibacter	<i>Ferruginibacter spp.</i>	2790	
				Terrimonas	<i>Terrimonas spp.</i>	271	
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	<i>Flavobacterium spp.</i>	103	
				Empedobacter	<i>Empedobacter wautersiella falsenii</i>	222	
Chloroflexi	Chloroflexi	Candidatus brocadiales	Candidatus brocadiaceae	Candidatus amoebophilus	<i>Candidatus amoebophilus asiaticus</i>	418	
	Chloroflexia	Kallotenuales	Kallotenaceae	Kallotenua	<i>Kallotenua chloroflexi bacterium</i>	285	
	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Bellilinea	<i>Anaerolinea thermophila</i>	250	
					<i>Bellilinea caldifistulae</i>	181	
	Caldilineae	Caldilineales	Caldilineaceae	Litorilinea	<i>Litorilinea aerophila</i>	176	
Cyanobacteria	Cyanobacteria	Nostocales	Nostocaceae	Nostoc	<i>Nostoc sp.</i>	572	
				Fischerella	<i>Fischerella muscicola</i>	1575	
					Vamprovibrio	<i>Vamprovibrio spp.</i>	655
	Oscillatorioophycideae	Oscillatoriales	Cyanobacteriaceae	Cyanobacterium	Cyanobacterium	<i>Cyanobacterium spp.</i>	135
					Chroococcidiopsis	<i>Chroococcidiopsis sp.</i>	235
					<i>Chroococcidiopsis spp.</i>	234	
					<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	1868	
Deinococcus_Thermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus	<i>Deinococcus apachensis</i>	221	
		Thermales	Thermaceae	Rhabdothermus	<i>Rhabdothermus arcticus</i>	122	
Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	Calditerrivibrio	<i>Calditerrivibrio spp.</i>	128	
				Vulcanithermus	<i>Vulcanithermus mediatlanticus</i>	582	
Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	Fibrobacter	<i>Fibrobacter spp.</i>	118	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Anoxybacillus	<i>Anoxybacillus hidirlerensis</i>	729	
				Sporomusa	<i>Sporomusa spp.</i>	192	
				Thermoflavimicrobium	<i>Thermoflavimicrobium spp.</i>	120	
			Thermoactinomycetaceae	Laceyella	<i>Laceyella putida</i>	821	
				Planifilum	<i>Planifilum fulgidum</i>	192	
			Paenibacillaceae	Paenibacillus	<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i>	149	
				Ammoniphilus	<i>Ammoniphilus sp.</i>	1489	
		Aneurinibacillus		<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	148		
		Lactobacillales	Pasteuriaceae	Theermaerobacter	<i>Theermaerobacter nagasakiensis</i>	106	
			Halanaerobiaceae	Halothermothrix	<i>Halothermothrix spp.</i>	278	
			Ruminococcaceae	Ruminococcus	<i>Ruminococcus spp.</i>	350	
			Symbiobacteriaceae	Symbiobacterium	<i>Symbiobacterium spp.</i>	169	
			Thermanaerobacteraceae	Fervidicola	<i>Fervidicola ferrireducens</i>	134	
				Moorella	<i>Moorella sp.</i>	264	
				Thermanaeromonas	<i>Thermanaeromonas spp.</i>	271	
Thermodesulfobiaceae	Thermodesulfobium	<i>Thermodesulfobium spp.</i>	308				
Syntrophomonadaceae	Syntrophomonas	<i>Syntrophomonas wolfei</i>	117				
Thermolithobacteria	Thermolithobacterales	Thermolithobacteraceae	Thermolithobacter	<i>Thermolithobacter spp.</i>	549		
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	<i>Nitrospira calida</i>	3981	
					<i>Nitrospira enrichment</i>	6609	
					<i>Nitrospira spp.</i>	127	
				Thermodesulfobivrio	<i>Thermodesulfobivrio spp.</i>	133	

Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Blastopirellula	<i>Blastopirellula</i> spp.	117		
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Gemmata	<i>Gemmata</i> spp.	341		
				Aliiohoeflea	<i>Aliiohoeflea aestuarii</i>	358		
				Rhizobium	<i>Rhizobium</i> sp.	351		
				Tepidamorphus	<i>Tepidamorphus gemmatus</i>	226		
			Phyllobacteriaceae	Chelativorans	<i>Chelativorans multitrophicus</i>	129		
				Mesorhizobium	<i>Mesorhizobium</i> spp.	401		
				Nitratireductor	<i>Nitratireductor indicus</i>	157		
				Hyphomicrobium	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	202		
				Rhodomicrobium	<i>Rhodomicrobium</i> spp.	1474		
				Rhodoplanes	<i>Rhodoplanes</i> spp.	12802		
			Aurantimonadaceae	Aurantimonas	<i>Aurantimonas</i> sp.	106		
			Beijerinckiaceae	Chelatococcus	<i>Chelatococcus</i> sp.	396		
			Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	139		
			Brucellaceae	Ochrobactrum	<i>Ochrobactrum lupini</i>	985		
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	Woodsholea	<i>Woodsholea</i> spp.	633		
				Methylocystis	<i>Methylocystis</i> spp.	1685		
			Methylocystaceae	Methylosinus	<i>Methylosinus</i> spp.	298		
				Pleomorphomonas	<i>Pleomorphomonas oryzae</i>	505		
				Sulfitobacter	<i>Sulfitobacter</i> sp.	3645		
				Paracoccus	<i>Paracoccus marcusii</i>	125		
		Rodobacteriales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	<i>Paracoccus</i> spp.	188		
				Amaricoccus	<i>Amaricoccus</i> spp.	386		
				Rubellimicrobium	<i>Rubellimicrobium</i> spp.	158		
				Rubellimicrobium	<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	150		
			Hyphomonadaceae	Hirschia	<i>Hirschia</i> spp.	110		
			Dongia	<i>Dongia</i> spp.	417			
		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Tistrella	<i>Tistrella</i> spp.	204		
				Sphingomonas	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i>	1282		
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	<i>Sphingomonas hunanensis</i>	107		
				Spirosoma	<i>Spirosoma</i> sp.	627		
				Novosphingobium	<i>Novosphingobium resinovorum</i>	1443		
				Novosphingobium	<i>Novosphingobium subarcticum</i>	115		
				Sphingobium	<i>Sphingobium sphingomonas suberifaciens</i>	578		
				Burkholderia	<i>Burkholderia</i> spp.	210		
				Ralstonia	<i>Ralstonia mannitolitica</i>	189		
				Ralstonia	<i>Ralstonia</i> spp.	151		
				Sterolibacterium	<i>Sterolibacterium</i> spp.	191		
				Tepidimonas	<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	651		
		Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Variovorax	<i>Variovorax paradoxus</i>	609	
					Duganella	<i>Duganella zoogloeoides</i>	1179	
				Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	<i>Herbaspirillum</i> spp.	102	
					Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Methyloversatilis	<i>Methyloversatilis</i> spp.
		Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Alcanivorax	<i>Alcanivorax</i> sp.	448
						Acinetobacter	<i>Acinetobacter boissieri</i>	282
						Acinetobacter	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	288
						Acinetobacter	<i>Acinetobacter</i> sp.	200
				Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas	<i>Pseudomonas putida</i>	103
						Pseudomonas	<i>Pseudomonas</i> sp.	221
	Pseudomonas					<i>Pseudomonas</i> spp.	1756	
	Pseudomonas					<i>Pseudomonas tolaasii</i>	238	
Xanthomonadales	Xanthomonadaceae		Xanthomonas	<i>Xanthomonas oryzae</i>	1009			
			Deferrisoma	<i>Deferrisoma camini</i>	138			
			Luteimonas	<i>Luteimonas</i> spp.	359			
			Lysobacter	<i>Lysobacter xanthomonadaceae bacterium</i>	120			
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae		Enterobacter	Enterobacter	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1145		
				Methylothermus	<i>Methylothermus</i>	302		
Methylococcales	Methylothermaceae	Methylothermus	Methylobacterium	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	171			
			Methylobacterium	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	171			
Deltaproteobacteria	Desulfobacteriales	Desulfobacteraceae	Desulforegula	Desulforegula	<i>Desulforegula</i> spp.	264		
				Myxococcales	Cystobacteraceae	Cystobacter	<i>Cystobacter gracilis</i>	144
Oligoflexia	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio	Bdellovibrio	<i>Bdellovibrio</i> spp.	436		
				Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteriales	Thermodesulfobacteriaceae	Thermosulfurimonas	<i>Thermosulfurimonas dismutans</i>
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	Thermotoga	Thermotoga	<i>Thermotoga petrophila</i>	232	
					Thermotoga	<i>Thermotoga</i> spp.	590	
					Thermotoga	<i>Thermotoga thermarum</i>	238	
	Spartobacteria	Spartobacteria	Spartobacteria	Fervidobacterium	<i>Fervidobacterium</i> sp.	5088		

Anexo 1. Diversidad bacteriana en agua de la fuente geotermal Papallacta.

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	OTUs	
Actinobacteria	Blastocatellia	Blastocatellia	Blastocatellia	Blastochloris	<i>Blastocatella fastidiosa</i>	156	
	Actinobacteria	Rubrobacterales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	<i>Corynebacterium spp.</i>	616	
			Gordoniaceae	Gordonia	<i>Gordonia gardona bronchialis</i>	187	
			Mycobacteriaceae	Mycobacterium	<i>Mycobacterium neglectum</i>	175	
			Nocardioidaceae	Nocardioides	<i>Nocardioides spp.</i>	128	
			Propionibacteriaceae	Microlunatus	<i>Microlunatus panaciterrae</i>	838	
Streptomycetaceae	Streptomyces	<i>Streptomyces sp.</i>	288				
Armatimonadetes	Armatimonadia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	Solirubrobacter	<i>Solirubrobacter spp.</i>	1308	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidetes	Rhodothermaceae	Rhodothermus	<i>Rhodothermus marinus</i>	118	
	Cytophagia	Cytophagales	Chitinophagaceae	Chitinophaga	<i>Chitinophaga spp.</i>	156	
Chloroflexi	Chloroflexi	Candidatus brocadiiales	Candidatus brocadiaceae	Candidatus amoebophilus	<i>Candidatus amoebophilus asiaticus</i>	693	
	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Bellilinea	<i>Anaerolinea thermophila</i>	1564	
	Dehalococcidia	Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae	Dehalococcoides	<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	1975	
Cyanobacteria	Cyanobacteria	Nostocales	Nostocaceae	Nostoc	<i>Nostoc sp.</i>	4159	
				Fischerella	<i>Fischerella muscicola</i>	3892	
	Oscillatoriothyriceae	Oscillatoriales	Cyanobacteriaceae	Cyanobacterium	<i>Cyanobacterium spp.</i>	589	
				Leptolyngbyaceae	Leptolyngbya	<i>Leptolyngbya sp.</i>	355
		Pleurocapsales	Chroococcales	Chroococcidiopsis	Chroococcidiopsis	<i>Chroococcidiopsis sp.</i>	664
					<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	177	
Deinococcus_Thermus	Deinococci	Thermales	Thermaceae	Meiothermus	<i>Meiothermus sp.</i>	171	
Elusimicrobia	Elusimicrobia	Elusimicrobiales	Elusimicrobiaceae	Elusimicrobium	<i>Elusimicrobium minutum</i>	172	
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Peptococcaceae	Desulfotomaculum sp.	<i>Desulfotomaculum sp.</i>	127	
			Ruminococcaceae	Ruminococcus	<i>Ruminococcus spp.</i>	226	
			Symbiobacteriaceae	Symbiobacterium	<i>Symbiobacterium spp.</i>	1049	
			Thermodesulfobiaceae	Thermodesulfobium	<i>Thermodesulfobium spp.</i>	626	
			Thermodesulfobium	<i>Thermodesulfobium spp.</i>	351		
Lentisphaerae	Lentisphaeria	Lentisphaerales	Lentisphaeraceae	Lentisphaera	<i>Lentisphaera spp.</i>	139	
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	<i>Nitrospira calida</i>	1759	
					<i>Nitrospira enrichment</i>	154	
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Planctomyces	<i>Planctomyces spp.</i>	108	
				Gemmata	<i>Gemmata spp.</i>	967	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Tepidamorphus	<i>Tepidamorphus gemmatus</i>	1506	
			Hyphomicrobiaceae	Rhodomicrobium	<i>Rhodomicrobium spp.</i>	179	
			Bruceellaceae	Rhodoplanes	<i>Rhodoplanes spp.</i>	13237	
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	Ochrobactrum	<i>Ochrobactrum lupini</i>	290	
			Methylocystaceae	Woodsholea	<i>Woodsholea spp.</i>	2119	
		Rodobacterales	Rhodobacteraceae	Methylocystis	<i>Methylocystis spp.</i>	7116	
				Methylosinus	<i>Methylosinus spp.</i>	420	
				Sulfitobacter	<i>Sulfitobacter sp.</i>	29071	
				Paracoccus	<i>Paracoccus marcusii</i>	175	
				Amaricoccus	<i>Amaricoccus spp.</i>	1970	
	Roseobacter			<i>Roseobacter spp.</i>	105		
	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Rubellimicrobium	<i>Rubellimicrobium spp.</i>	235		
			<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	743			
			Dongia	<i>Dongia spp.</i>	748		
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Elioraea	<i>Elioraea tepidiphila</i>	703		
			Spirosoma	<i>Spirosoma sp.</i>	1915		
			Novosphingobium	<i>Novosphingobium resinovarum</i>	4236		
			Sphingobium	<i>Sphingobium sp.</i>	100		
			Methylibium	<i>Methylibium spp.</i>	422		
			Tepidimonas	<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	1773		
			Oxalobacteraceae	Duganella	<i>Duganella zoogloeoides</i>	116	
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	<i>Acinetobacter spp.</i>	159	
				Psychrobacter	<i>Psychrobacter sp.</i>	162	
Pseudomonadaceae				Pseudomonas	<i>Pseudomonas putida</i>	138	
Xanthomonadales		Xanthomonadaceae	Deferrisoma	<i>Deferrisoma camini</i>	179		
			Methylothermus	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	8447		
Deltaproteobacteria		Methylococcales	Sandaracinaceae	Sandaracinus	<i>Sandaracinus amylolyticus</i>	133	
	Desulfobacteriales			Desulfobacteraceae	Desulforegula	<i>Desulforegula spp.</i>	356
	Cystobacteraceae			Cystobacter	<i>Cystobacter gracilis</i>	358	
	Kofleria			<i>Kofleria spp.</i>	674		
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	Thermotoga	<i>Thermotoga spp.</i>	700	
					<i>Thermotoga thermarum</i>	256	
Spartobacteria	Spartobacteria	Spartobacterales	Spartobacteriaceae	Fervidobacterium	<i>Fervidobacterium sp.</i>	5364	

Anexo 2. Diversidad bacteriana en sedimento de la Fuente Geotermal Papallacta

FILUM	OTUs	%
Acidobacteria	172	0,18
Actinobacteria	9567	10,1
Aquificae	1606	1,7
Armatimonadetes	816	0,9
Bacteroidetes	4828	5,1
Chloroflexi	1744	1,8
Cyanobacteria	5274	5,5
Deinococcus_Thermus	925	1
Deferribacteres	128	0,1
Fibrobacteres	118	0,1
Firmicutes	7109	7,5
Nitrospirae	10850	11,4
Planctomycetes	458	0,5
Proteobacteria	45170	47,5
Thermodesulfobacteria	191	0,2
Thermotogae	6148	6,5
TOTAL	95104	100

Anexo 3. Diversidad de filios en agua de la Fuente Geotermal Papallacta.

FILUM	OTUs	%
Actinobacteria	2388	2,1
Armatimonadetes	1308	1,2
Bacteroidetes	2762	2,4
Chloroflexi	4563	4
Cyanobacteria	9836	8,7
Deinococcus_Thermus	1561	1,4
Elusimicrobia	172	0,2
Firmicutes	2379	2,1
Lentisphaerae	139	0,1
Nitrospirae	1913	10,5
Planctomycetes	1075	0,9
Proteobacteria	78999	69,7
Thermotogae	6320	5,6
TOTAL	113415	100

Anexo 4. Diversidad de filios en sedimento de la Fuente Geotermal Papallacta.

SEDIMENTO		AGUA	
PROTEOBACTERIAS	OTUs	PROTEOBACTERIAS	OTUs
Alphaproteobacterias	64868	Alphaproteobacterias	30382
Betaproteobacterias	2311	Betaproteobacterias	7164
Deltaproteobacteria	2602	Deltaproteobacteria	844
Gammaproteobacteria	9218	Gammaproteobacteria	6780
TOTAL	78999	TOTAL	45170

Anexo 5. Diversidad de clases dentro del filo *Proteobacteria* en muestras de aguas y sedimento de la Fuente Geotermal Papallacta.

AGUA	
Nitrospirae	OTUs
<i>Nitrospira calida</i>	3981
<i>Nitrospira enrichment</i>	6609
<i>Nitrospira</i> spp.	127
<i>Thermodesulfobivrio</i> spp.	133
TOTAL	10850

Anexo 6. Diversidad de especies dentro del filo *Nitrospirae* en muestras de aguas de la Fuente Geotermal Papallacta.

SEDIMENTO	
Nitrospirae	OTUs
<i>Nitrospira calida</i>	1759
<i>Nitrospira enrichment</i>	154
TOTAL	1913

Anexo 7. Diversidad de especies dentro del filo *Nitrospirae* en muestras de sedimento de la Fuente Geotermal Papallacta.

