



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Caracterización bacteriana en el tracto digestivo de termitas  
humívoras del género *Embiratermes***

Trabajo previo a la obtención del título de Bióloga

**Autora:**

Maite Gabriela Borja Brito

**Director:**

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres, Ph. D.

Cuenca – Ecuador

2026

## **Dedicatoria**

A mis padres, María Teresa y Diego Fernando, por crecer bajo el amparo de su amor incondicional, por creer en mí y sostenerme desde el primer día. Su apoyo constante es el cimiento sobre el que construyo cada logro. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.

A mi Tía Carmita y Abuelita, por su dulzura, sus consejos y su escucha atenta, que tienen el don de convertir los días más complicados en algo llevadero.

A mis hermanos Juan y Jessy, porque a pesar de la distancia siempre supieron hacerse presentes con sus buenas vibras y su cariño. Son y serán siempre mis mejores amigos.

Y a aquella pequeña Maité que un día sintió curiosidad por la biología y decidió no dar paso al torcer.

## **Agradecimiento**

A mi director, Rodrigo Caroca, por su paciencia, comprensión y dedicación a lo largo de todo este proceso. Su guía fue fundamental para llevar este trabajo a buen puerto.

A Johanna Romero, por compartir su conocimiento sobre las termitas, despertando en mí la curiosidad por estudiar estos fascinantes organismos y por facilitarme las muestras que hicieron posible esta investigación.

A Pedro Astudillo, por saber escuchar, por sus palabras siempre asertivas, concretas, y por hacer de este proceso más llevadero.

A Sami Zeas, Gabi Pulgarín y Pedrito Guerra, por sus consejos, su paciencia y su disposición para ayudarme en cada etapa, y por crear un ambiente divertido en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de carrera, por sacarme una sonrisa, ayudarme a desestresarme en los momentos más intensos, y por hacer de cada salida de campo, cada chiste y cada canción compartida sean momentos que atesoraré para siempre. Con mención especial a la Maquita Muñoz, por escucharme siempre que lo necesité y por permitirme ser yo misma.

## Resumen

Las termitas del género *Embiratermes* cumplen funciones ecológicas clave en ecosistemas tropicales, descomponiendo y reciclando nutrientes; sin embargo, su microbiota intestinal permanece escasamente caracterizada. En este trabajo se evaluaron dos métodos de extracción de ADN bacteriano y se caracterizó la comunidad microbiana de la región P3 del intestino posterior mediante secuenciación de la región V3–V4 del gen 16S rRNA.

El kit comercial mostró mayor eficiencia y reproducibilidad, y la región P3 el mejor rendimiento para la obtención de ADN amplificable. Se obtuvieron 81.431 secuencias no quiméricas agrupadas en 3.011 ASVs, sin diferencias significativas en la diversidad alfa ni beta entre muestras.

Entre los géneros identificados, *Tyzzerella* y *Treponema* podrían estar asociados a procesos de fermentación y degradación de materia orgánica, en concordancia con estudios previos en termitas, destacando la importancia de optimizar los métodos de extracción en este tipo de estudios.

**Palabras clave:** *Microbiota intestinal de termitas, termitas húmvoras, Embiratermes, secuenciación del gen 16S rRNA, intestino posterior P3, diversidad microbiana.*

## Abstract

Termites of the genus *Embiratermes* play key ecological roles in tropical ecosystems by decomposing organic matter and recycling nutrients; however, their gut microbiota remains poorly characterized. In this study, two bacterial DNA extraction methods were evaluated, and the microbial community of the P3 region of the hindgut was characterized using sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene.

The commercial kit showed higher efficiency and reproducibility, and the P3 region yielded the best performance for obtaining amplifiable DNA. A total of 81,431 non-chimeric sequences were obtained and grouped into 3,011 ASVs, with no significant differences in alpha or beta diversity among samples.

Among the identified genera, *Tyzzarella* and *Treponema* may be associated with fermentation processes and organic matter degradation, consistent with previous studies in termites, highlighting the importance of optimizing DNA extraction methods in this type of research.

**Keywords:** *Termite gut microbiota, humivorous termites, Embiratermes, 16S rRNA gene sequencing, P3 hindgut, microbial diversity.*

## Índice de contenidos

### Contenido

Dedicatoria.....	i
Agradecimiento .....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de contenidos.....	v
Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Índice de anexos.....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	3
2.1 Área de estudio.....	3
2.2 Procesamiento de muestras biológicas .....	4
2.3 Extracción de ADN .....	4
2.3.1 Extracción casera.....	5
2.3.2 Extracción con kit comercial .....	6
2.5 Amplificación y secuenciación.....	7
2.6 Análisis bioinformático .....	8
2.7 Análisis Estadístico .....	8
3. RESULTADOS.....	10
DISCUSIONES.....	23
4.1 Optimización del protocolo de extracción y amplificación.....	23
4.2 Selección de la región P3 .....	24
4.3 Diversidad microbiana y variación entre colonias .....	24
4.4 Composición taxonómica y estructura funcional .....	25
4.5 Organización de la comunidad bacteriana a partir de curvas rango-abundancia.....	26
4.6 Influencia potencial de las características del nido sobre la microbiota.....	27
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	28
REFERENCIAS.....	29
ANEXOS .....	33
Anexo 1. Evaluación de la extracción de ADN mediante el método casero (CTAB) .....	33
Anexo 2. Glosario de términos técnicos .....	34

## Índice de tablas

Tabla 1. Concentración y pureza del ADN extraído a partir de colonias independientes del género Embiratermes .....	13
Tabla 2. Abundancia relativa (%) de los principales filos bacterianos en las muestras analizadas .....	18
Tabla 3. Abundancia relativa (%) de las principales familias bacterianas en las muestras analizadas .....	19
Tabla 4. Abundancia relativa (%) de los principales géneros bacterianos en las muestras analizadas .....	21

## Índice de figuras

Figura 1. Área de muestreo en el cantón Tiwintza, Morona Santiago .....	3
Figura 2. Amplificación por PCR del gen 16S usando ADN obtenido mediante un protocolo casero basado en CTAB y un kit comercial como molde.....	10
Figura 3. Extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S de diferentes regiones del tracto digestivo de termitas.....	11
Figura 4. Reproducibilidad de la extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S en la región P3.....	12
Figura 5. Evaluación del ADN genómico de colonias independientes y su capacidad de amplificación.....	13
Figura 6. Curvas de rarefacción de la microbiota bacteriana intestinal de tres colonias de termitas del género <i>Embiratermes</i> .....	14
Figura 7. Diversidad alfa (índice de Shannon) de las comunidades bacterianas de la región P3 del intestino de termitas provenientes de tres colonias independientes.....	15
Figura 8. Análisis de diversidad beta mediante NMDS basado en la distancia de Bray–Curtis de las comunidades bacterianas de la región P3 del intestino de termitas provenientes de tres colonias independientes.....	16
Figura 9. Composición taxonómica bacteriana a nivel de filo.....	17
Figura 10. Composición taxonómica bacteriana a nivel de familia. ....	19
Figura 11. Composición taxonómica bacteriana a nivel de género.....	20
Figura 12. Curvas rango–abundancia de la comunidad bacteriana por muestra a nivel de familia. ....	22

## **Índice de anexos**

Anexo 1 .Evaluación de la extracción de ADN mediante el método casero (CTAB) y ensayos de amplificación del gen ARNr 16S en diferentes regiones del tracto digestivo de termitas.....	33
Anexo 2. Glosario de términos técnicos .....	35

## INTRODUCCIÓN

Las termitas participan activamente en los ciclos biogeoquímicos del suelo al contribuir a la descomposición de materia orgánica y a la movilización de nutrientes. (Jouquet et al., 2006). A través de procesos de fragmentación, ingestión y transformación microbiana, intervienen en la mineralización del carbono, en procesos del ciclo de nitrógeno y en rutas anaerobias relacionadas con el metabolismo del azufre dentro de su sistema digestivo (Köhler, 2012). Estas funciones están mediadas por comunidades bacterianas intestinales especializadas, esenciales para la degradación de compuestos orgánicos complejos (Brune & Dietrich, 2015).

El origen evolutivo del linaje de las termitas y el establecimiento de sus comunidades microbianas digestivas se remontan a hace aproximadamente 150 millones de años, lo que refleja un proceso de coevolución entre el hospedador y sus simbioses intestinales (Bourguignon et al., 2015). Sin embargo, gran parte de la investigación se ha centrado en su impacto económico como plagas, lo que ha relegado el estudio de su contribución ecológica y ha limitado la caracterización integral de sus comunidades microbianas (Evans et al., 2013).

Aunque se han descrito más de tres mil especies de termitas a nivel global (Constantino, 2020) la caracterización molecular de sus microbiotas intestinales continúa siendo limitada, con un enfoque predominante en especies xilófagas de relevancia económica (Evans et al., 2013). En consecuencia, numerosos linajes tropicales, en particular las termitas húmidas, permanecen escasamente representados en estudios moleculares comparativos, pese a presentar estructuras digestivas y asociaciones microbianas diferenciadas (Marynowska et al., 2020). Considerando que la diversidad microbiana varía entre los distintos grupos tróficos de termitas, resulta necesario ampliar la caracterización de linajes edáficos aún poco estudiados (Vikram et al., 2021).

El intestino de las termitas es un sistema anaerobio compartimentalizado que alberga comunidades bacterianas metabólicamente activas (Brune, 2014). La región P3 del intestino posterior constituye el principal compartimento fermentativo y concentra una alta actividad microbiana, favoreciendo la producción de ácidos grasos de cadena corta que representan la principal fuente energética del hospedador (Brune & Dietrich, 2015). La composición de estas comunidades está influida por la dieta y el nicho ecológico de la

especie (Hongoh, 2010). En este contexto, las termitas humívoras presentan comunidades microbianas especializadas asociadas a la degradación de materia orgánica. Entre ellas se encuentran especies del género *Embiratermes*, pertenecientes a la subfamilia *Syntermitinae* y ampliamente distribuidas en ecosistemas neotropicales, las cuales se clasifican dentro del grupo trófico III de termitas consumidoras de suelo. Estas termitas se asocian principalmente a suelos ricos en materia orgánica altamente humificada, donde consumen detritos vegetales en avanzado estado de descomposición, junto con partículas minerales y microorganismos presentes en el humus (Donovan et al., 2001). La disponibilidad de estos compuestos orgánicos parcialmente degradados favorece la presencia de linajes bacterianos asociados a procesos fermentativos y de reducción anaerobia, incluyendo miembros de *Clostridia*, *Spirochaetota* y *Deltaproteobacteria* (Vikram et al., 2021).

La secuenciación del gen 16S rRNA, en particular de sus regiones hipervariables, ha permitido caracterizar microbiota bacterianas complejas sin necesidad de cultivo (Caporaso et al., 2011). La asignación taxonómica de estas secuencias se realiza mediante bases de datos de referencia especializadas, como SILVA ribosomal RNA database, que contribuye a mejorar la resolución taxonómica y la consistencia de los análisis filogenéticos (Quast et al., 2013). Sin embargo, la obtención de ADN microbiano de alta calidad constituye un paso crítico, especialmente en matrices asociadas al suelo, donde la presencia de compuestos húmicos y otros inhibidores puede afectar la eficiencia de la extracción y amplificación, introduciendo sesgos en la estimación de la diversidad bacteriana, particularmente en muestras intestinales de termitas humívoras cuyo contenido digestivo puede interferir con la amplificación por PCR (Kennedy et al., 2014; Schrader et al., 2012).

Por lo antes expuesto, este estudio se centró en la caracterización del perfil taxonómico de la microbiota intestinal de termitas humívoras del género *Embiratermes* en la región Neotropical, mediante la evaluación de dos métodos de extracción de ADN y secuenciación de regiones variables del gen 16S.

## METODOLOGÍA

### 2.1 Área de estudio

Las muestras analizadas fueron recolectadas previamente en dos localidades del cantón Tiwintza, provincia de Morona Santiago: Santiago de Tiwintza y Puerto Morona (-3.045280 S, -78.00694 O), a una altitud comprendida entre 50 y 450 m s.n.m. (Figura 1). El área de estudio se localizó en el valle del río Santiago, dentro de la llanura amazónica sur del Ecuador, caracterizada por relieve irregular y alta diversidad de ecosistemas (GADMT, 2014). El clima se clasificó como megatérmico lluvioso, con temperaturas medias anuales entre 17 y 26 °C. De acuerdo con el Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental (MAE, 2013), la vegetación corresponde al ecosistema bosque siempreverde piemontano de la cordillera del Cóndor Kutukú (BSPA02), caracterizado por cobertura boscosa densa y siempreverde, desarrollada en zonas de piedemonte con colinas y cuevas, bajo condiciones pluviales húmedas e hiperhúmedas. Este ecosistema presenta un dosel cercano a 20 m de altura y árboles emergentes superiores a 30 m, además de abundante presencia de epífitas y elevada diversidad florística típica de la región amazónica.

La colecta de especímenes se realizó bajo el Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos Nro. MAATE-DBI-CM-2024-0406, emitido por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Ecuador (MAATE).

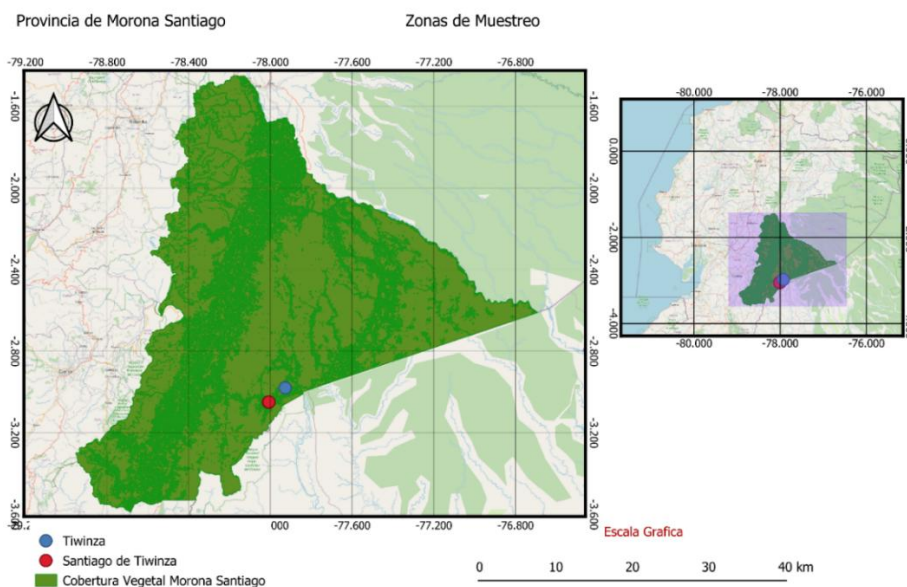


Figura 1. Área de muestreo en el cantón Tiwintza, Morona Santiago

## 2.2 Procesamiento de muestras biológicas

Una vez recolectadas, las termitas del género *Embiratermes* fueron transportadas al laboratorio en tubos Falcon de 50 mL con etanol al 70% hasta su procesamiento. Se trabajó con tres colonias, denominadas M46, M52 y M62. De cada colonia se seleccionaron aproximadamente 20 obreras maduras para los análisis moleculares, debido a que son la casta encargada de la ingestión y procesamiento del alimento, lo que se asocia a una mayor diversidad y abundancia de microorganismos intestinales en comparación con otras castas (Bourguignon et al., 2019). Los especímenes fueron separados manualmente con pinzas entomológicas estériles y clasificados por casta con base en características morfológicas externas que permiten su diferenciación. El proceso de disección se adaptó de Matson et al. (2007), comenzando con el lavado de cada espécimen con agua libre de nucleasas para eliminar residuos de etanol y posibles contaminantes externos en una cabina de flujo laminar. Posteriormente, se extrajo el intestino de cada individuo, que se almacenó en tubos Eppendorf a -20 °C hasta la extracción de ADN.

## 2.3 Extracción de ADN

El ADN microbiano intestinal se extrajo del intestino posterior de termitas (P3) obreras del género *Embiratermes*. Inicialmente, se realizaron pruebas preliminares con individuos de la subfamilia *Syntermitinae* (familia *Termitidae*), a la cual pertenece también *Embiratermes* y que comparte el mismo grupo trófico húmido, evaluando diferentes regiones del tracto digestivo, incluyendo el mesenterón, las regiones P2 (válvula entérica) y P3 del intestino posterior, con el fin de determinar cuál permitía obtener ADN apto para la amplificación de la región 16S mediante PCR.

Durante las pruebas iniciales, las extracciones se realizaron con pools de 8 y 12 individuos para evaluar la cantidad de tejido idóneo necesaria para obtener ADN detectable. Una vez verificada la viabilidad del procedimiento, se estableció el protocolo definitivo trabajando con pools de 20 individuos por colonia y utilizando tres colonias independientes como réplicas biológicas.

Las disecciones se realizaron en una cabina de bioseguridad bajo condiciones estériles. Los individuos conservados en etanol fueron previamente lavados con agua estéril para eliminar los residuos externos. La región P3 de cada individuo fue disectada y agrupada en un tubo *ependorf* por colonia. Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas

mediante *vortex* (*Digital Vortex Mixer, Thermo Fisher Scientific, USA*) y centrifugadas brevemente en una microcentrífuga (*Sorvall Legend Micro 17 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, USA*) para concentrar el tejido antes de proceder con la extracción de ADN.

Se compararon dos métodos de extracción de ADN: un protocolo casero basado en CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Tadevosyan et al., 2025) y un método comercial con el *DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN, Germany)*.

### **2.3.1 Extracción casera**

La extracción casera de ADN se realizó mediante un protocolo basado en CTAB, un detergente catiónico ampliamente utilizado para la purificación de ADN en matrices con alto contenido de compuestos orgánicos e inhibidores, como el material intestinal.

Se utilizaron aproximadamente 150 mg de tejido intestinal previamente homogeneizado, por cada extracción, correspondientes a fragmentos de la región P3 de 20 termitas. A cada muestra se añadieron 100  $\mu$ L de buffer CTAB al 2 % (p/v), que contenía, además, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl y 20 mM EDTA. Posteriormente, se incorporaron 5  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL) y las muestras se mezclaron suavemente por inversión. La lisis celular se llevó a cabo mediante incubación a 65 °C durante 60 minutos (*Thermo Scientific, Digital Dry Block Heater*), invirtiendo los tubos cada 10 minutos para favorecer la homogeneización y la acción enzimática.

Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se mezclaron por inversión durante 5 minutos y se centrifugaron a 12 000  $\times$  g durante 10 minutos en una microcentrífuga (*Thermo Scientific, Sorvall LegendMicro 17 Microcentrifuge*). La fase acuosa superior se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo.

El ADN se precipitó añadiendo 80  $\mu$ L de isopropanol frío, seguido de incubación a -20 °C durante 30 minutos y centrifugación a 12000  $\times$  g durante 10 minutos en la misma microcentrífuga. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue conservado.

El *pellet* fue lavado con 200  $\mu$ L de etanol al 70 % frío, centrifugado a 12 000  $\times$  g durante 5 minutos y secado al aire durante 10 minutos. Finalmente, el ADN fue resuspendido en

50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas incubado a 37 °C durante 10 minutos para favorecer su completa disolución. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

### **2.3.2 Extracción con kit comercial**

La extracción de ADN con el *DNeasy PowerSoil Pro Kit* (QIAGEN, Germany) se realizó según las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se emplearon aproximadamente 150 mg de tejido intestinal de la región P3, obtenidos de 20 individuos, los cuales se colocaron en tubos *PowerBead Pro*. Posteriormente, se añadieron 800  $\mu$ L de solución CD1 y las muestras se homogeneizaron mediante disrupción mecánica a 30 Hz durante 10 minutos utilizando un homogenizador de perlas (*Mixer Mill MM 400*, Retsch GmbH, Germany).

Posteriormente, se centrifugaron a 15.000  $\times$  g durante 1 minuto en una microcentrífuga (*Thermo Scientific, Sorvall LegendMicro 17 Microcentrifuge*). El sobrenadante fue transferido a tubos limpios y se añadieron 200  $\mu$ L de solución CD2 para precipitar inhibidores potenciales como ácidos húmicos y proteínas.

Tras una nueva centrifugación, el sobrenadante fue mezclado con solución CD3 y cargado en la columna *MB Spin Column*. Se centrifugó a 15.000  $\times$  g durante 1 minuto para permitir la unión del ADN a la membrana de sílica. La columna fue lavada secuencialmente con soluciones EA y C5, incluyendo una centrifugación adicional para eliminar residuos de etanol.

El ADN fue eluido en 50  $\mu$ L de solución C6 (10 mM Tris) mediante centrifugación a 15.000  $\times$  g durante 1 minuto y almacenado a 20 °C.

### **2.4 Evaluación de calidad, integridad y capacidad de amplificación del ADN**

La concentración y pureza del ADN extraído se determinaron mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro de microplacas (*Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, USA*), registrando las relaciones de absorbancia A260/A280. Se consideraron valores entre 1,8 y 2,0 como indicativos de una pureza adecuada y de una baja presencia de contaminantes proteicos.

La integridad del ADN genómico se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) preparado en tampón TAE 1X. La corrida se realizó a 90 V durante 45 min

en una cámara de electroforesis (*Owl EasyCast B2 Mini Gel Electrophoresis System, Thermo Fisher Scientific, USA*). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (250–10 000 pb, Invitrogen) como referencia para verificar la presencia de ADN de alto peso molecular. El gel fue teñido con *SYBR Safe (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)* y visualizado en un equipo de documentación de geles (*ENDURO, Gel Documentation System, Labnet International, Inc., USA*).

La capacidad de amplificación del ADN se evaluó mediante PCR dirigida al gen 16S rRNA, empleando los cebadores bacterianos 7F/1015R (AGAGTTTGATYMTGGCTCA / ACGGYTACCTTGTTACGACTT) y 7F/RVBF (AGAGTTTGATYMTGGCTCA / GGTTACCTTGTTACGACTT). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ L, conteniendo 10  $\mu$ L de *Master Mix* comercial 2X con ADN polimerasa *DreamTaq (DreamTaq PCR Master Mix, Thermo Scientific)* para una concentración final de 1X, 1  $\mu$ L de cada cebador (10  $\mu$ M), 2  $\mu$ L de ADN molde y 6  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para completar el volumen final.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (*MiniAmp Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, USA*) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 s; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 52 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 2 min; con una extensión final a 72 °C durante 2 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) para confirmar la obtención del fragmento esperado, estimado por comparación con el marcador de peso molecular de 1 kb (250–10.000 pb, Invitrogen).

## **2.5 Amplificación y secuenciación**

El ADN extraído fue enviado a la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), donde se realizaron la amplificación, preparación de bibliotecas, indexación y secuenciación. La amplificación se llevó a cabo con cebadores universales bacterianos 341F y 806R, ampliamente validados para estudios de diversidad microbiana (Klindworth et al., 2013), en la región hipervariable V3–V4 del gen 16S rRNA. Esta región fue seleccionada por su adecuado equilibrio entre la resolución taxonómica y la longitud compatible con plataformas de secuenciación de nueva generación, empleando la plataforma Illumina MiSeq con el esquema paired-end 2 $\times$ 300 bp, generando archivos *FASTQ* pareados de lecturas *forward* y *reverse* por muestra, lo que permitió el solapamiento de las lecturas y

el ensamblaje de los amplicones para el procesamiento bioinformático posterior. (Sapkota & Scharf, 2022).

## 2.6 Análisis bioinformático

El procesamiento bioinformático de las lecturas se realizó en QIIME 2 (v2024.2). Inicialmente, las secuencias demultiplexadas fueron sometidas a control de calidad y filtrado para eliminar lecturas de baja calidad y posibles artefactos de secuenciación. La inferencia de variantes de secuencia de amplicón (ASVs), eliminación de secuencias quiméricas y corrección de errores se realizó mediante el plugin DADA2.

Posteriormente, las secuencias representativas fueron alineadas con MAFFT (v7.520). La asignación taxonómica se realizó utilizando un clasificador Naïve Bayes preentrenado basado en la base de datos SILVA v138.1 para el gen ARNr 16S. (Sapkota & Scharf, 2022).

## 2.7 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos y la visualización de la estructura de las comunidades microbianas se realizaron en R (v4.3.2) utilizando el paquete *phyloseq* para la integración y análisis de datos de microbiomas (McMurdie & Holmes, 2013), junto con los paquetes *vegan* y *ggplot2* (Oksanen et al., 2022). La suficiencia del esfuerzo de secuenciación se evaluó mediante curvas de rarefacción construidas a partir de la tabla de ASVs utilizando la función *rarecurve* del paquete *vegan*.

La diversidad alfa se estimó mediante el índice de Shannon calculado con la función *diversity* del paquete *vegan*. La diversidad beta se analizó a partir de matrices de distancia de Bray–Curtis calculadas con la función *vegdist*, y se visualizó mediante un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) utilizando la función *metaMDS* del paquete *vegan*. Las diferencias en la composición bacteriana entre muestras se evaluaron mediante un análisis *PERMANOVA* (Anderson, 2001) usando la función *adonis2* con 999 permutaciones y un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

La composición taxonómica se analizó a nivel de filo, familia y género mediante agrupación taxonómica utilizando la función *tax\_glom* del paquete *phyloseq*. Las abundancias relativas se visualizaron mediante gráficos de barras generados con *ggplot2*. Adicionalmente, la estructura de las comunidades bacterianas se evaluó mediante curvas

de rango–abundancia construidas a nivel de familia, ordenando los taxones de acuerdo con su abundancia relativa en cada muestra.

## RESULTADOS

Se comparó la extracción de ADN mediante un protocolo basado en CTAB y un kit comercial (*DNeasy PowerSoil Pro Kit, QIAGEN, Germany*). Se analizó si este ADN es apto para ser usado en reacciones de PCR mediante la amplificación del gen ARNr 16S utilizando dos pares de cebadores previamente descritos, los cuales amplifican un fragmento del gen 16S con un tamaño esperado cercano a 1500 pb.

Inicialmente, se empleó un pool de ocho individuos por método de extracción, utilizando el tracto digestivo completo. El ADN obtenido presentó baja integridad en gel de agarosa en ambos casos (Figura 2, carriles rotulados como "ADN"). Sin embargo, al evaluar su capacidad de amplificación mediante PCR del gen ARNr 16S, únicamente las muestras procesadas con el kit comercial generaron bandas de tamaño esperado, mientras que el método CTAB no produjo productos de amplificación detectables (Figura 2, carriles rotulados como "PCR 1" y "PCR 2").

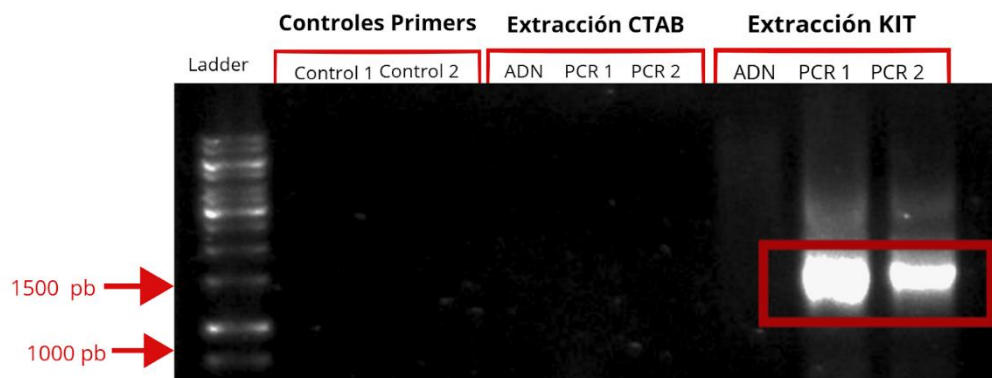


Figura 2. Amplificación por PCR del gen 16S usando ADN obtenido mediante un protocolo casero basado en CTAB y un kit comercial como molde. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1,5 % y se empleó el *Ladder* 1 kb (Invitrogen). Control 1 y Control 2 corresponden a controles de la reacción de PCR en los que no se puso ADN molde. Extracción CTAB: ADN extraído, PCR1 y PCR2. Extracción KIT: ADN extraído, PCR1 y PCR2.

Posteriormente, se evaluó la extracción de ADN usando distintas regiones del tracto digestivo: región P3 (intestino posterior), región P2 (válvula entérica) y región M (mesenterón). Se realizaron extracciones de ADN mediante ambos métodos, utilizando un pool de 12 intestinos por muestra para incrementar la cantidad de material biológico disponible. La capacidad de amplificación del ADN extraído se verificó mediante PCR

del gen ARNr 16S. Únicamente las muestras correspondientes a la región P3, extraídas con el kit comercial, presentaron bandas de aproximadamente 1500 pb (Figura 3), mientras que las regiones P2 (válvula entérica) y M, así como las muestras obtenidas mediante CTAB, no mostraron amplificación detectable. (Anexo 1).

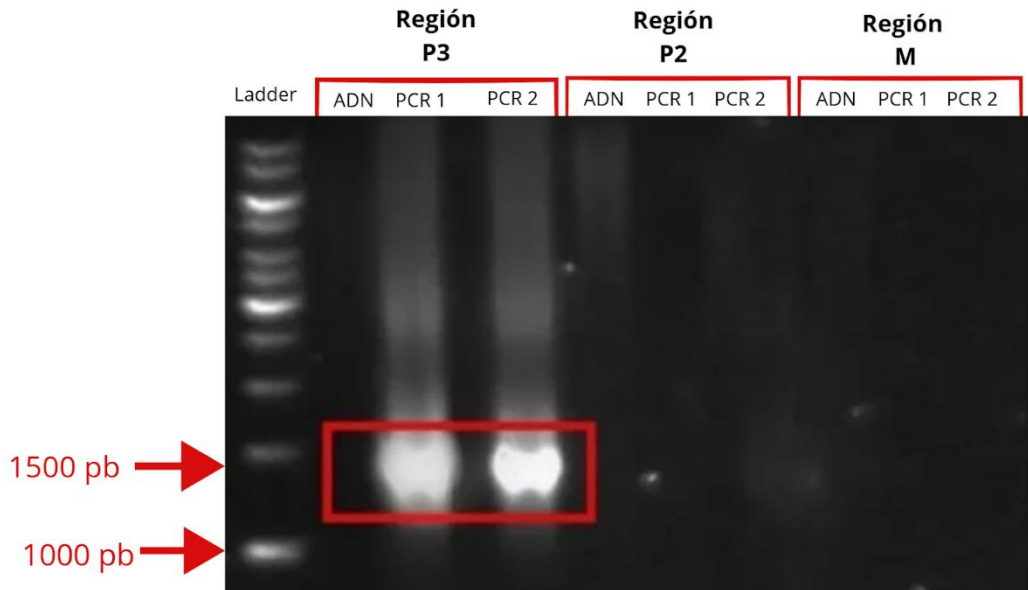


Figura 3. Extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S de diferentes regiones del tracto digestivo de termitas, visualizadas en gel de agarosa al 1,5 %. Se empleó el Ladder 1 kb (Invitrogen) para estimar el tamaño de las bandas. Para cada región evaluada se muestran carriles cargados con el ADN extraído y con los productos de PCR (PCR1 y PCR2). P3: intestino posterior; P2: válvula entérica y; M: mesenterón.

Con el fin de evaluar la reproducibilidad del protocolo, se realizaron tres extracciones independientes de ADN de la región P3; cada una se efectuó con un pool de 12 individuos obtenido de tres colonias diferentes. La PCR mostró bandas bien definidas en todas las

repeticiones con ambos pares de cebadores (PCR1 y PCR2), lo que confirma la reproducibilidad del protocolo (Figura 4).

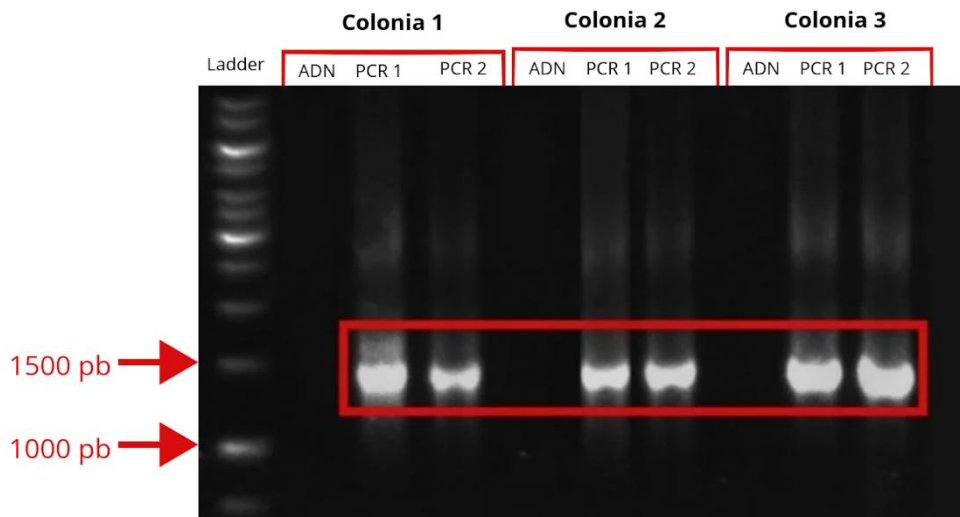


Figura 4. Reproducibilidad de la extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S en la región P3. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1,5 % y se empleó el Ladder 1 kb (Invitrogen) para estimar el tamaño de las bandas. Para cada colonia se muestran el ADN extraído de la región P3 (carril “ADN”) y los productos de PCR (carriles “PCR 1” y “PCR 2”).

Una vez implementado el protocolo de extracción, se procesaron muestras del género *Embiratermes* destinadas al análisis de secuenciación, manteniendo la región P3 y el kit comercial como condiciones seleccionadas. En esta fase, el número de intestinos por muestra se aumentó de 12 a 20. Se analizaron tres colonias independientes y una réplica técnica de la colonia M62, identificadas como M46, M52, M62A y M62B. La electroforesis mostró integridad parcial del ADN (Figura 5A), con concentraciones entre 39,18 y 47,61 ng/ $\mu$ L, y valores de pureza (A260/A280) entre 1,88 y 1,89 (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración y pureza del ADN extraído a partir de colonias independientes del género *Embiratermes*.

Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)	Relación 260/280
M 46	39,18	1,884
M 52	47,307	1,881
M 62A	47,614	1,893
M 62B	47,015	1,886

Seguidamente, el ADN fue evaluado mediante PCR, observándose bandas definidas de aproximadamente 1500 pb en todas las muestras (Figura 5B). Esto confirmó que, aunque el ADN no presentaba un alto grado de integridad, es apto para la amplificación de las regiones hipervariables V3–V4 del gen 16S y su secuenciación mediante la plataforma Illumina. Para este propósito, estas muestras fueron enviadas a la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), donde se realizaron la amplificación y la secuenciación.

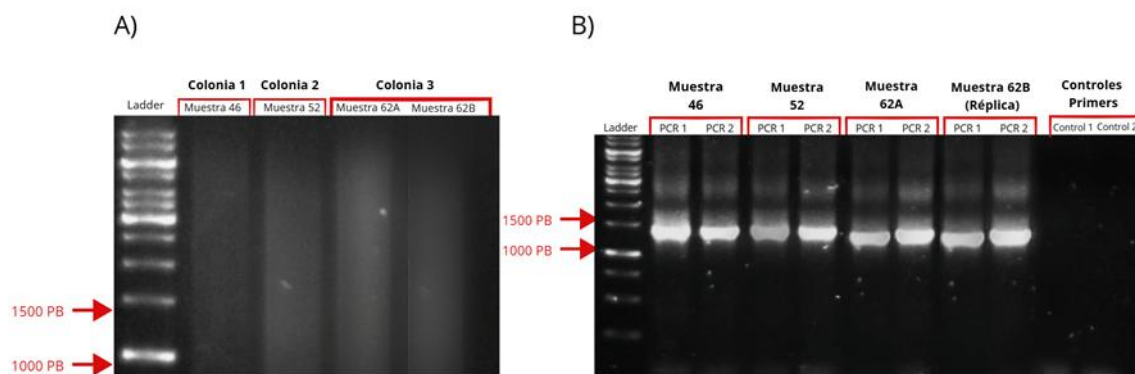


Figura 5. Evaluación del ADN genómico de colonias independientes y su capacidad de amplificación. (A) Gel de agarosa al 1,5 % que muestra el ADN metagenómico de las muestras M46, M52, M62A y M62B. (B) Amplificación del gen ARNr 16S. Ladder: marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen). Para cada muestra se muestran los productos de PCR (PCR 1 y PCR 2). Carriles Control 1 y Control 2: controles de las reacciones de PCR1 y PCR2, respectivamente.

Una vez obtenidas las secuencias, el procesamiento bioinformático posterior fue realizado en QIIME2, mostrando lecturas de alta calidad con valores promedio *Phred* cercanos a Q38. Tras el control de calidad y la eliminación de secuencias quiméricas, se retuvieron 81,431 secuencias no quiméricas, agrupadas en 3.011 variantes amplicónicas (ASVs), utilizadas en los análisis de diversidad y composición taxonómica. La distribución de lecturas por muestra fue de 17.897 en M46, 23.429 en M52, 19.270 en M62A y 20.835 en M62B.

La evaluación de la profundidad de secuenciación mediante curvas de rarefacción mostró un incremento en la riqueza observada a medida que aumentaba el número de secuencias analizadas, seguido de una tendencia a la estabilización en todas las muestras (Figura 6).

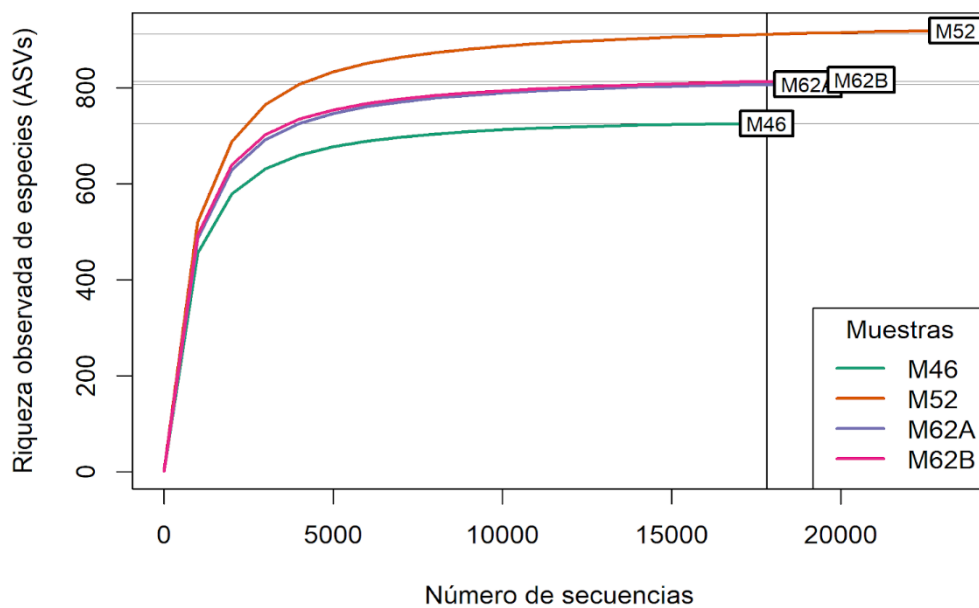


Figura 6. Curvas de rarefacción de la microbiota bacteriana intestinal de tres colonias de termitas del género *Embiratermes*, en función del número de secuencias obtenidas.

El índice de diversidad alfa de Shannon presentó valores similares entre las muestras analizadas (Figura 7), con valores comprendidos aproximadamente entre 6,2 y 6,6. La

muestra M52 registró el valor más alto, mientras que M46 presentó el valor más bajo. Las muestras M62A y M62B mostraron valores cercanos entre sí.

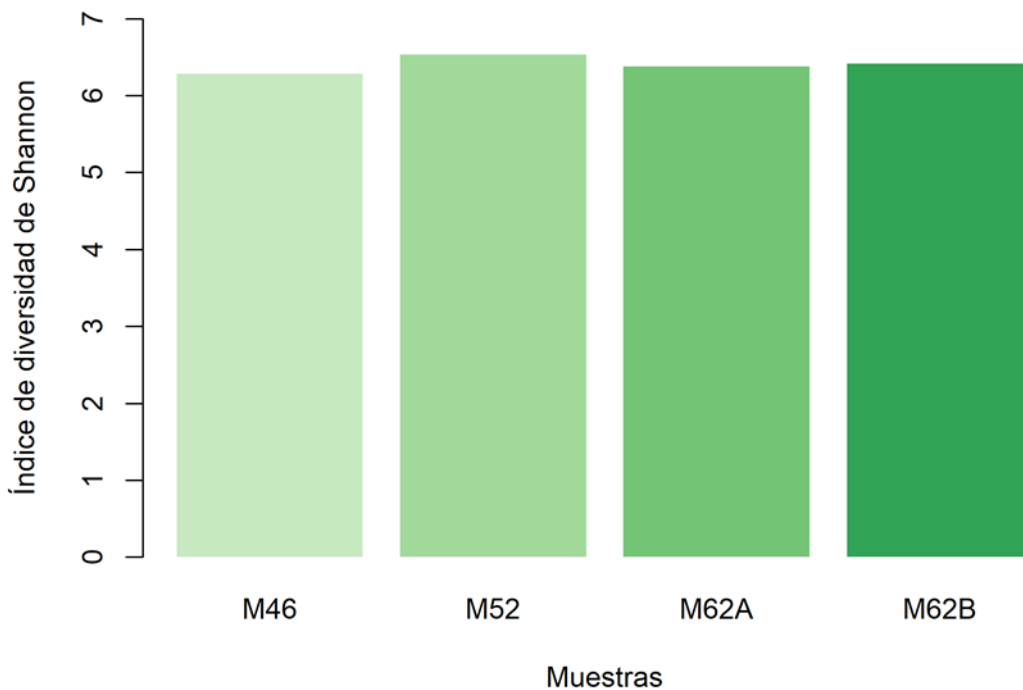


Figura 7. Diversidad alfa (índice de Shannon) de las comunidades bacterianas de la región P3 del intestino de termitas provenientes de tres colonias independientes.

Para evaluar si estas diferencias también se reflejan en la composición global de las comunidades, se realizó un análisis de diversidad beta mediante escalamiento multidimensional no métrico (*NMDS*) basado en la distancia de Bray-Curtis (Figura 8). Este análisis permite visualizar similitudes y diferencias entre comunidades. La ordenación mostró una separación parcial entre las muestras: M52 se mostró más distante del resto; mientras que M62A y M62B se agruparon de forma cercana; y M46 ocupó una posición intermedia.

El análisis *PERMANOVA* se utilizó para contrastar estadísticamente estas diferencias en la composición microbiana entre las colonias. El modelo explicó el 70,4 % de la variación observada ( $R^2 = 0.70375$ ), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $F = 1.1878$ ,  $p = 0.1667$ ), lo que indica que los patrones observados en la ordenación no están respaldados por evidencia inferencial suficiente.

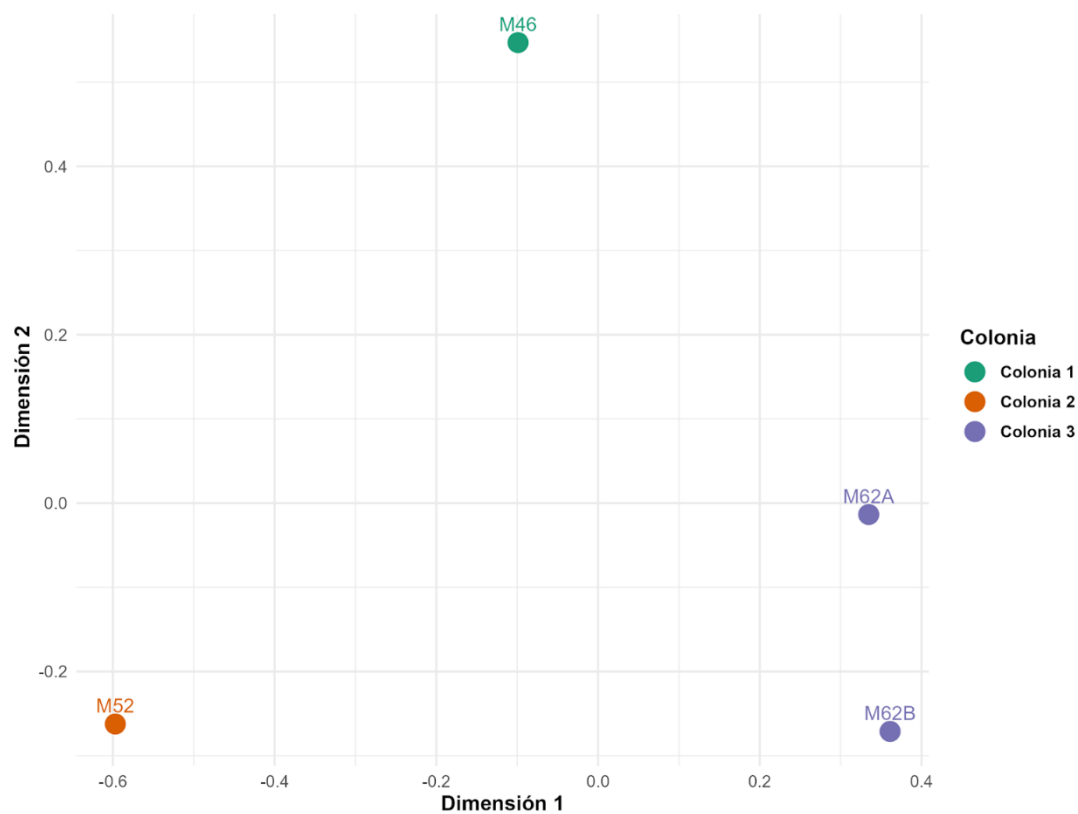


Figura 8. Análisis de diversidad beta mediante *NMDS* basado en la distancia de Bray–Curtis de las comunidades bacterianas de la región P3 del intestino de termitas provenientes de tres colonias independientes.

La composición taxonómica bacteriana a nivel de filo evidenció el predominio de un número reducido de grupos con alta abundancia relativa (Figura 9; Tabla 2). El filo *Firmicutes* fue el más abundante en todas las muestras, con una abundancia relativa promedio de 41,4% y un rango entre 36,48% y 48,92%. Le siguieron *Actinobacteriota* (13,1%; 8,38–19,53%) y *Proteobacteria* (11,5%; 7,02–14,98%).

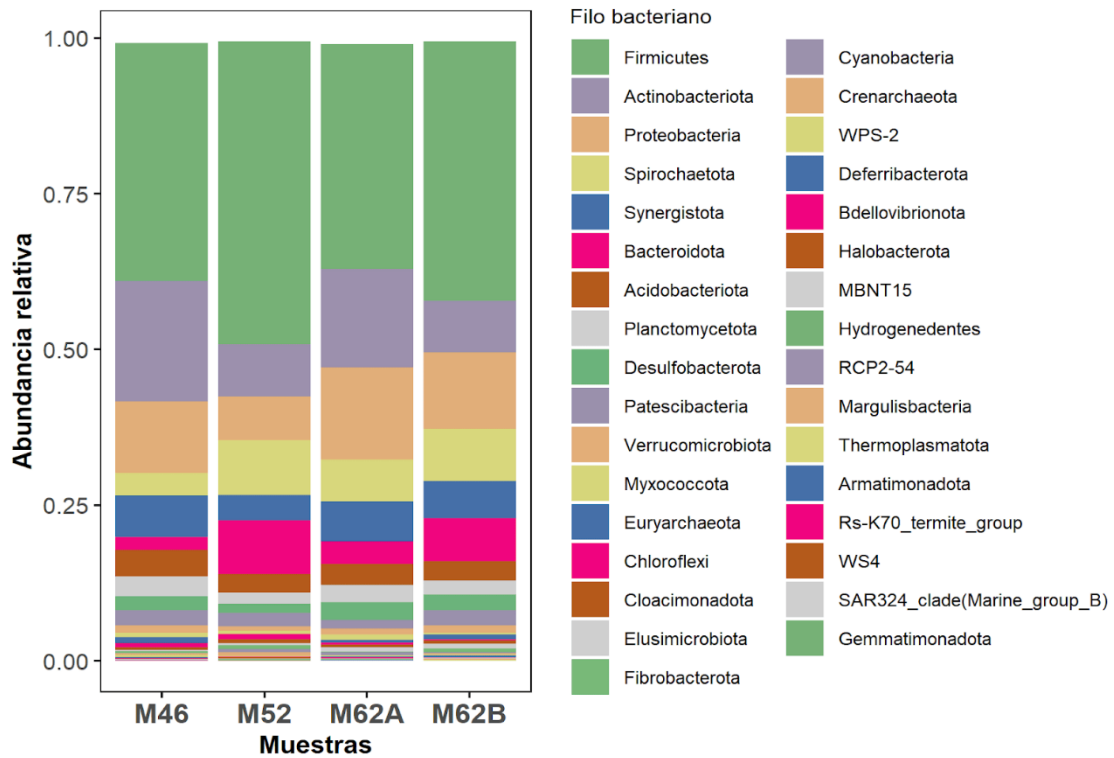


Figura 9. Composición taxonómica bacteriana a nivel de filo. Gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa de los principales filos bacterianos en las muestras M46, M52, M62A y M62B. Cada barra representa una muestra y cada color corresponde a un filo bacteriano.

Tabla 2. Abundancia relativa (%) de los principales filos bacterianos en las muestras analizadas.

Filo	Abundancia relativa total%	M46 %	M52 %	M62A %	M62B %
<i>Firmicutes</i>	41,4	38,5	48,9	36,5	41,8
<i>Actinobacteriota</i>	13,1	19,53	8,42	15,9	8,38
<i>Proteobacteria</i>	11,5	11,6	7,02	14,98	12,3
<i>Spirochaetota</i>	6,92	3,63	8,88	6,74	8,43
<i>Synergistota</i>	5,82	6,71	4,11	6,46	6,01
<i>Bacteroidota</i>	5,36	2,08	8,65	3,71	6,99

A nivel de familia, *Lachnospiraceae* fue la familia más abundante, con un valor promedio de 9,59% y un rango entre 9,05% y 10,9% (Figura 10; Tabla 3). Le siguieron *Oscillospiraceae* (9,19%; 6,61–11,4%) y *Spirochaetaceae* (6,51%; 3,34–8,42%).

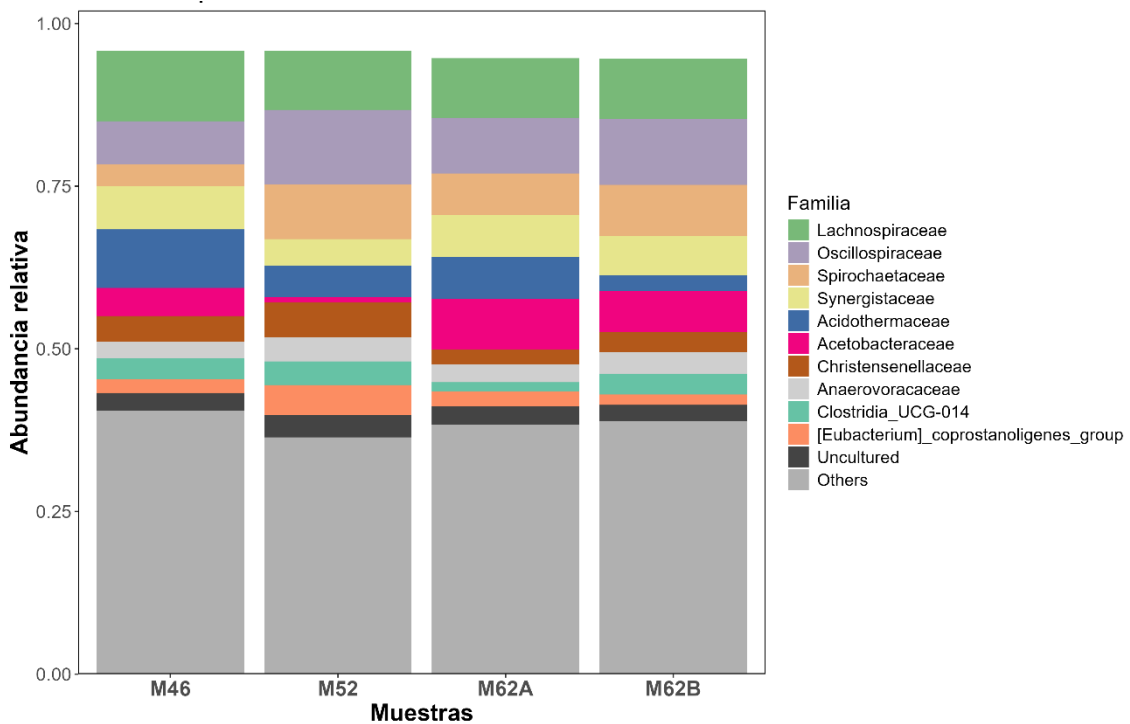


Figura 10. Composición taxonómica bacteriana a nivel de familia. Gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa de las principales familias bacterianas en las muestras M46, M52, M62A y M62B. Cada barra representa una muestra y cada color corresponde a una familia bacteriana

Tabla 3. Abundancia relativa (%) de las principales familias bacterianas en las muestras analizadas

<b>Familia</b>	<b>Abundancia relativa total (%)</b>	<b>M46 (%)</b>	<b>M52 (%)</b>	<b>M6A (%)</b>	<b>M62B (%)</b>
<i>Lachnospiraceae</i>	9,59	10,9	9,05	9,17	9,3
<i>Oscillospiraceae</i>	9,19	6,61	11,4	8,59	10,1
<i>Spirochaetaceae</i>	6,51	3,34	8,42	6,4	7,89
<i>Synergistaceae</i>	5,78	6,66	4,09	6,39	5,97
<i>Acidothermaceae</i>	5,68	9,02	4,81	6,43	2,45
<i>Acetobacteraceae</i>	4,81	4,27	0,78	7,85	6,32
<i>Christensenellaceae</i>	3,7	4	5,42	2,28	3,08
<i>Uncultured</i>	3,56	3,73	3,76	3,55	3,18
<i>Anaerovoracaceae</i>	3,04	2,52	3,67	2,68	3,3
<i>Clostridia_UCG-014</i>	2,89	3,22	3,63	1,49	3,19
<i>[Eubacterium]_coprostanoligenes_group</i>	2,65	2,12	4,67	2,21	1,62

A nivel de género, los grupos *Unassigned* (rango entre 25,76% y 33,41%) y *Uncultured* (rango entre 14,5% y 15,41%) representaron las categorías más abundantes (Figura 11; Tabla 4), reflejando limitaciones en la resolución taxonómica a este nivel. Entre los géneros identificados, destacaron *Tyzzerella* (7,79%–9,45%) y *Acidothermus* (2,45%–9,02%).

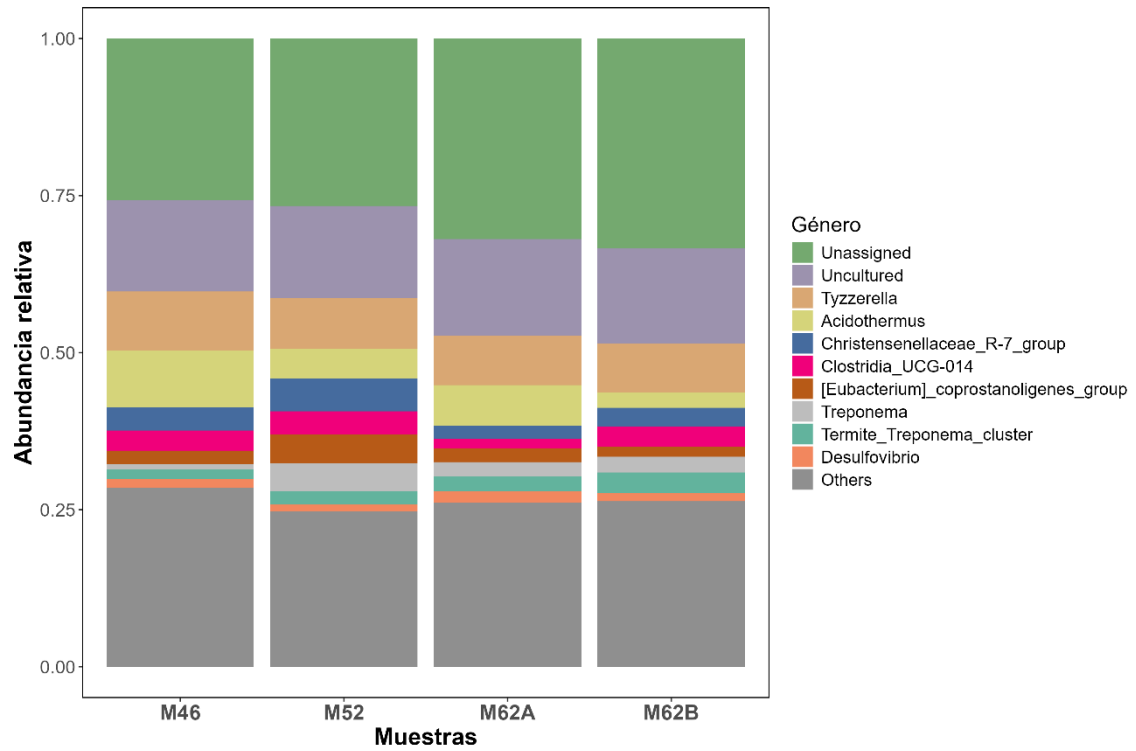


Figura 11. Composición taxonómica bacteriana a nivel de género. Gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa de los géneros bacterianos en las muestras M46, M52, M62A y M62B. Cada barra representa una muestra y cada color corresponde a un género bacteriano.

Tabla 4. Abundancia relativa (%) de los principales géneros bacterianos en las muestras analizadas.

<b>Género</b>	<b>Abundancia relativa total (%)</b>	<b>M46 (%)</b>	<b>M52 (%)</b>	<b>M62A (%)</b>	<b>M62B (%)</b>
<i>Unassigned</i>	29,4	25,8	26,6	31,9	33,4
<i>Uncultured</i>	14,9	14,5	14,7	15,4	15,2
<i>Tyzzerella</i>	8,27	9,45	8,01	7,83	7,79
<i>Acidothermus</i>	5,68	9,02	4,81	6,43	2,45
<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	3,49	3,69	5,22	2,1	2,96
<i>Clostridia_UCG-014</i>	2,89	3,22	3,63	1,49	3,19
<i>[Eubacterium]_coprostanoligenes_group</i>	2,65	2,12	4,67	2,21	1,62
<i>Treponema</i>	2,51	0,838	4,37	2,3	2,51
<i>Termite_Treponema_cluster</i>	2,36	1,56	2,21	2,38	3,32
<i>Desulfovibrio</i>	1,36	1,35	1,05	1,79	1,25

Las curvas rango–abundancia a nivel de familia evidenciaron diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana entre las colonias analizadas (Figura 12). En todas las muestras se observó una pendiente pronunciada en los primeros rangos, seguida de una disminución progresiva hacia los rangos más altos. La muestra M52 presentó una mayor extensión en el eje de rangos en comparación con las demás muestras, mientras que M46 mostró una disminución más rápida en los primeros rangos. Por su parte, M62A y M62B, correspondientes a la misma colonia, presentaron curvas con tendencias semejantes durante gran parte del gradiente, aunque con variaciones en los rangos intermedios y finales.

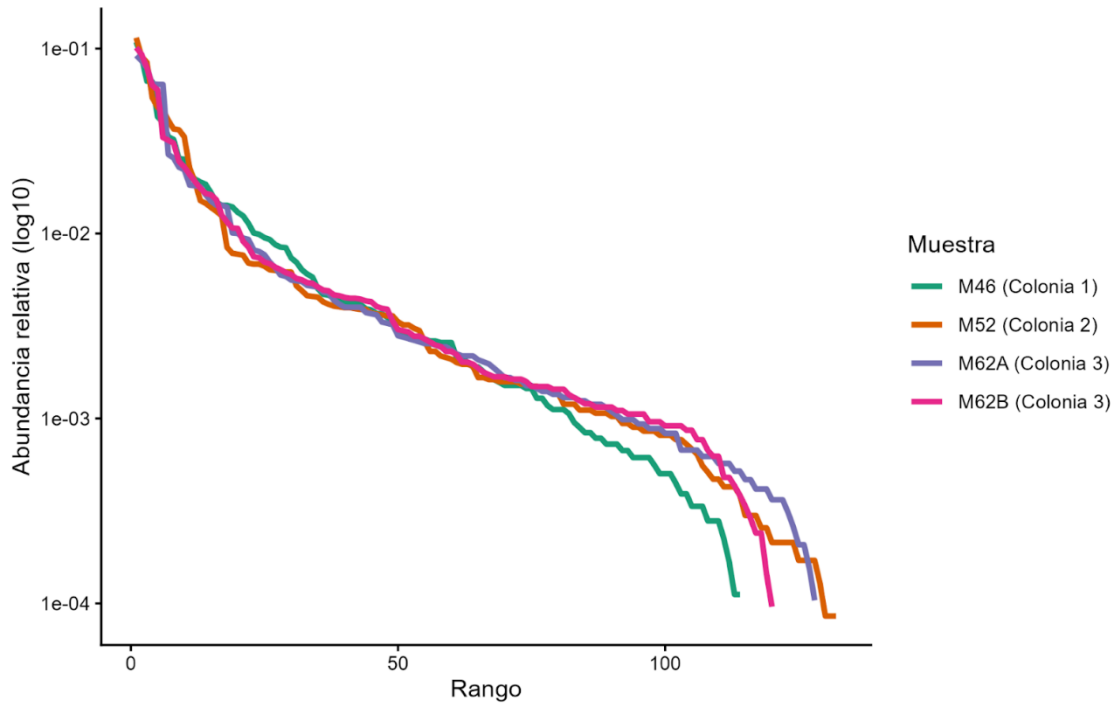


Figura 12. Curvas rango–abundancia de la comunidad bacteriana por muestra a nivel de familia.

## DISCUSIONES

### 4.1 Optimización del protocolo de extracción y amplificación

Los resultados obtenidos indican que el método de extracción, la región del tracto digestivo seleccionada y la cantidad de material biológico influyeron en la obtención de ADN bacteriano amplificable. El kit comercial y la región P3 presentaron el mejor desempeño en términos de rendimiento y reproducibilidad. Si bien el ADN obtenido presentó un grado considerable de fragmentación, lo cual es esperable en especímenes conservados en etanol al 70% (Gmür et al., 2015), cumplió con los criterios de calidad establecidos por MacroGen Inc. y fue apto para su uso en *PCR* y secuenciación posterior. Esto sugiere que, en sistemas intestinales complejos, no solo es importante recuperar ADN, sino obtener extractos con calidad suficiente para la amplificación molecular, aun cuando el material presente cierto grado de degradación.

La diferencia observada entre el protocolo CTAB y el kit comercial puede explicarse por la naturaleza de la matriz intestinal analizada. El tracto digestivo de insectos alberga comunidades microbianas densas cuya interacción con la dieta genera compuestos orgánicos complejos (Calderón-Cortés et al., 2010). En termitas humívoras, además, la ingestión de suelo y materia orgánica en descomposición puede favorecer la presencia de ácidos húmicos, fenoles y polisacáridos, compuestos capaces de inhibir la *PCR* (Wilson, 1997; Schrader et al., 2012). Bajo estas condiciones, aunque CTAB permitió recuperar ADN, la coextracción de inhibidores probablemente redujo su utilidad para amplificar el gen ARNr 16S.

En contraste, los kits comerciales incorporan etapas de purificación orientadas a eliminar dichos compuestos. Además, el uso de la lisis mecánica mediante *bead beating* en el *DNeasy PowerSoil Pro Kit* pudo favorecer la ruptura celular de bacterias con paredes celulares resistentes, mejorando la recuperación total de ADN microbiano (Bagger et al., 2021; Salonen et al., 2010).

La cantidad de material biológico también influyó en el desempeño del protocolo. El incremento progresivo del número de individuos por muestra (8, 12 y 20) mejoró la concentración y la calidad del ADN obtenido, probablemente debido al aumento de la biomasa microbiana disponible y sin llegar a saturar el sistema de extracción. Estos

hallazgos resaltan que la elección del método de extracción y la escala de muestreo son factores clave en los estudios de microbiota intestinal.

#### **4.2 Selección de la región P3**

La región P3 presentó mayor rendimiento de amplificación en comparación con P2 (válvula entérica) y el mesenterón, lo que sugiere diferencias en la cantidad y calidad del ADN bacteriano recuperado entre compartimentos intestinales. Este resultado concuerda con estudios recientes que describen al tracto digestivo de las termitas como un sistema altamente compartimentalizado, en el que la composición y función microbiana varían entre regiones intestinales según gradientes fisicoquímicos y disponibilidad de sustratos (Arora et al., 2022).

En termitas superiores y humívoras, los segmentos posteriores del intestino concentran una elevada densidad microbiana y actividad metabólica asociada a la degradación de materia orgánica compleja y compuestos lignocelulósicos, lo que podría favorecer una mayor recuperación de ADN bacteriano y una amplificación más eficiente en la región P3 (Salgado et al., 2024).

En contraste, el mesenterón cumple principalmente funciones digestivas del hospedador y suele presentar menor carga microbiana, mientras que P2 (válvula entérica) representa una zona transicional entre el intestino medio y posterior, donde la abundancia bacteriana puede diferir respecto a P3. Cambios recientes observados en la microbiota del intestino posterior respaldan la importancia funcional de estos compartimentos en la nutrición del hospedador (Alom et al., 2024).

#### **4.3 Diversidad microbiana y variación entre colonias**

Las curvas de rarefacción tendieron a la estabilización en todas las muestras, lo que indica que la profundidad de secuenciación fue suficiente para recuperar gran parte de la diversidad microbiana presente. Esto permite realizar comparaciones confiables de diversidad alfa y beta sin una subestimación importante de la riqueza bacteriana, ya que la saturación de las curvas suele interpretarse como un indicador de esfuerzo de muestreo adecuado en estudios de microbioma basados en secuenciación masiva (Weiss et al., 2017; Nearing et al., 2022).

El índice de Shannon mostró valores similares entre las muestras (6,2–6,6), lo que refleja una diversidad bacteriana relativamente homogénea entre colonias. Estos valores se

consideran elevados y son consistentes con comunidades intestinales complejas como las descritas en termitas y otros organismos detritívoros (Hongoh, 2010). Aunque M52 presentó el valor más alto y M46 el más bajo, estas diferencias fueron pequeñas y no evidencian cambios sustanciales en la diversidad total

En la diversidad beta, el análisis *NMDS* basado en Bray–Curtis mostró una separación parcial entre muestras. M52 se ubicó a mayor distancia del resto, mientras que M62A y M62B se agruparon cercanamente y M46 ocupó una posición intermedia. Este patrón sugiere variaciones en la composición relativa de las comunidades bacterianas. Si bien el análisis *PERMANOVA* no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.1667$ ), el valor de  $R^2$  (0.7) sugiere una contribución importante del agrupamiento a la variación observada.

#### **4.4 Composición taxonómica y estructura funcional**

La composición taxonómica bacteriana evidenció el predominio de un número reducido de grupos con alta abundancia relativa, acompañado por múltiples taxones menos frecuentes, patrón característico de microbiotas intestinales complejas reportadas en termitas (Hongoh, 2010). A nivel de filo, *Firmicutes* fue el grupo dominante (41,4%), representado por las familias *Lachnospiraceae* y *Oscillospiraceae*, grupos fermentadores productores de ácidos grasos de cadena corta en ambientes anaerobios (Flint et al., 2012). Particularmente, el género *Tyzzarella*, el más abundante detectado y perteneciente a la familia *Lachnospiraceae*, se ha asociado con la fermentación de carbohidratos complejos (Vikram et al., 2021). *Actinobacteriota* (13,1%) estuvo representada por *Acidothermaceae* y el género *Acidothermus*, vinculados a la degradación de celulosa, hemicelulosa y materia orgánica compleja (Arora et al., 2022; Goodfellow & Williams, 1983). Dentro de la familia Spirochaetota, *Treponema* y el *Termite\_Treponema\_cluster* fueron los géneros más representativos, con funciones en fermentación anaerobia y degradación de lignocelulosa, contribuyendo a la producción de acetato como principal metabolito energético del hospedador (Brune, 2014; Bourguignon et al., 2015; Otani et al., 2021). Proteobacteria (11,5%) estuvo representada por *Acetobacteraceae*, asociada a la oxidación de compuestos orgánicos en los intestinos de insectos (Crotti et al., 2010).

Los grupos *Unassigned* (29,4%) y *Uncultured* (14,9%) representaron una proporción importante de las secuencias, evidenciando limitaciones en la resolución taxonómica de

las bases de datos disponibles, patrón frecuente en microbiomas de insectos con sistemas simbióticos intestinales complejos (Do et al., 2014; Engel & Moran, 2013; Otani et al., 2021). Una parte significativa de estas secuencias no asignadas pertenece a *Firmicutes*, lo que sugiere que los principales ejecutores de la fermentación intestinal en *Embiratermes* aún no han sido resueltos taxonómicamente, lo que constituye una brecha de investigación relevante (Engel & Moran, 2013).

Entre muestras se observó una estructura comunitaria general conservada, con diferencias en abundancias relativas consistentes con estudios comparativos en termitas de distintas colonias (Brune & Dietrich, 2015; Hongoh, 2010). M46 presentó la mayor proporción de *Acidothermus* comparada con las demás muestras, lo que podría reflejar una mayor actividad de degradación de compuestos recalcitrantes. M62A y M62B compartieron una composición a nivel de género similar, coherente con su origen en una misma colonia, aunque con variaciones en géneros como *Treponema* y *Tyzzarella* que podrían indicar heterogeneidad microambiental interna del nido. Estas diferencias podrían además estar influenciadas por factores técnicos como sesgos de amplificación durante la PCR, variabilidad en la extracción de ADN o efectos del proceso de secuenciación (Pollock et al., 2018; McLaren et al., 2019).

#### **4.5 Organización de la comunidad bacteriana a partir de curvas rango-abundancia**

Las curvas rango–abundancia se construyeron a nivel de familia porque este nivel ofrece un balance entre resolución biológica y cobertura taxonómica: a nivel de filo la resolución es demasiado gruesa para detectar variaciones estructurales entre muestras, mientras que a nivel de género la elevada proporción de secuencias no asignadas distorsionaría la representación real de la comunidad. El patrón general mostró una estructura característica de microbiotas complejas, con pocos taxones dominantes y una larga cola de familias de baja abundancia (Magurran, 2004).

Se observaron diferencias en la riqueza y la equidad entre las muestras. M52 presentó una curva más extendida, lo que sugiere una mayor riqueza taxonómica, mientras que M46 mostró una pendiente más pronunciada, lo que indica una distribución menos equitativa y una mayor dominancia de pocos grupos bacterianos. Estos resultados coinciden con las variaciones observadas en diversidad alfa y composición taxonómica.

Un resultado llamativo de la Figura 12 es que M46 y M62A, provenientes de colonias distintas, presentan curvas más similares entre sí que M62A y M62B, réplicas de una misma colonia, en las que M62B se separa claramente en la pendiente y en la extensión de la cola. Esta aparente paradoja puede explicarse porque la variación intracolonia en termitas puede ser considerable dependiendo de la casta, la posición en el nido o el estado fisiológico del individuo muestreado (Hongoh, 2010; Brune, 2014), mientras que la similitud entre M46 y M62A podría reflejar convergencia funcional entre individuos en condiciones fisiológicas o dietéticas equivalentes, fenómeno documentado en termitas donde la función del microbioma se conserva entre colonias a pesar de variaciones en composición (Engel & Moran, 2013). No obstante, análisis adicionales serían necesarios para confirmar si este patrón es representativo de la variación microbiana en *Embiratermes*.

#### **4.6 Influencia potencial de las características del nido sobre la microbiota**

Considerando el origen de las muestras, las tendencias observadas en diversidad y composición bacteriana podrían estar relacionadas con diferencias microambientales entre nidos. La mayor riqueza aparente registrada en M52, junto con su separación parcial en el análisis NMDS y su elevada proporción de *Firmicutes*, correspondió a una muestra recolectada en material edáfico con raíces finas y agregados de suelo, condiciones que podrían favorecer una mayor heterogeneidad de sustratos y recursos microbianos.

En contraste, M46, proveniente de un nido superior compacto con escasa presencia de raíces finas, presentó el valor más bajo de diversidad alfa, una curva rango–abundancia más pronunciada y mayor representación de *Actinobacteriota*, lo que sugiere una comunidad relativamente menos equitativa y posiblemente asociada a condiciones más homogéneas.

Por su parte, M62A y M62B, obtenidas de un nido terrestre asociado a lianas y con cámaras amplias, mostraron cercanía en el análisis de beta diversidad y curvas rango–abundancias globalmente similares, aunque con diferencias internas en abundancias relativas a nivel de filo y familia. Esto indicaría que una misma colonia puede albergar variación microbiana interna sin perder una estructura comunitaria general compartida. Este patrón sugiere que las características físicas del nido como su ubicación, estructura y disponibilidad de sustratos modulan la composición de la microbiota intestinal, tal como ha sido documentado en termitas (Brune & Dietrich, 2015).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este estudio permitió implementar un protocolo para la caracterización de la microbiota intestinal en termitas humívoras del género *Embriatermes*, demostrando que el uso del kit comercial *DNeasy PowerSoil Pro* y la selección de la región P3 son determinantes para obtener ADN de calidad amplificable en matrices complejas ricas en compuestos inhibidores.

A nivel ecológico, la microbiota intestinal presentó una estructura diversa pero relativamente estable entre colonias, sin diferencias estadísticamente significativas en su composición global. La presencia de géneros como *Tyzzerella*, *Treponema* y el *Termite\_Treponema\_cluster* sugiere una comunidad con potencial para participar en procesos fermentativos y de degradación de materia orgánica, en concordancia con estudios previos en termitas consumidoras de suelo.

La alta proporción de taxones no asignados resalta el potencial del intestino de *Embriatermes* como reservorio de diversidad microbiana aún no descrita, constituyendo una brecha de investigación relevante para futuros estudios.

Los resultados obtenidos contribuyen al entendimiento de las interacciones simbióticas en termitas consumidoras de suelo, destacando la importancia de enfoques metodológicos adecuados para su estudio, y sientan las bases para futuras investigaciones que, mediante el aumento en el número de réplicas biológicas, permitan profundizar en la dinámica, estabilidad y función ecológica de la microbiota intestinal en termitas del género *Embriatermes*.

## REFERENCIAS

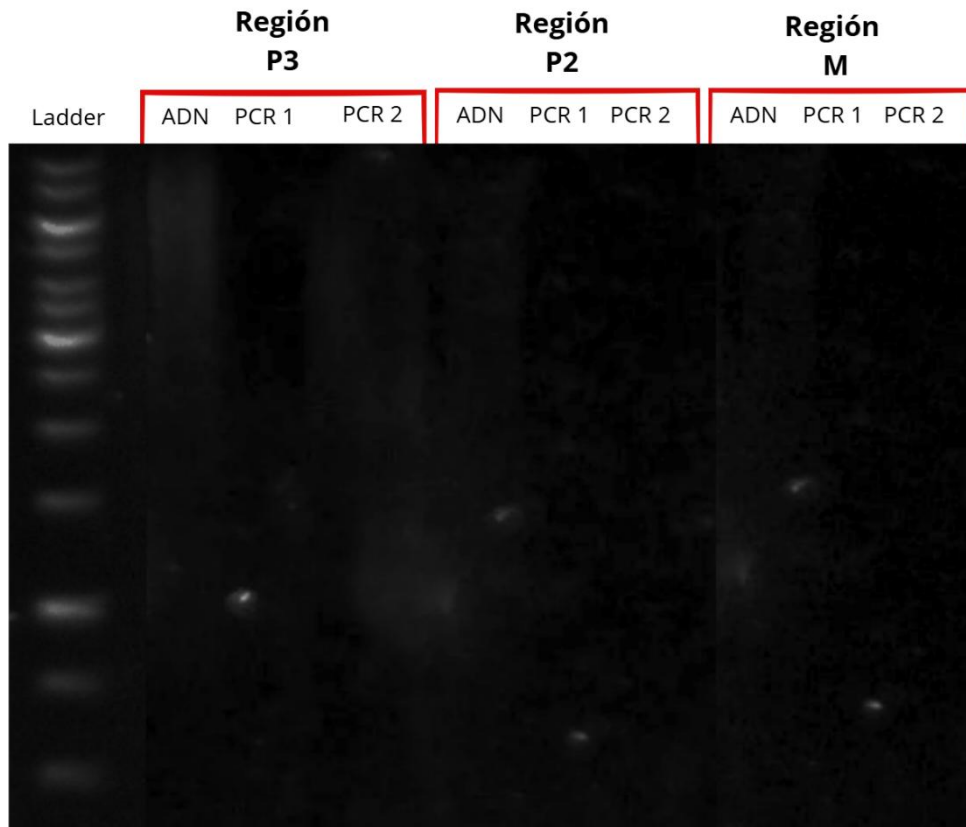
- Alom, M. S., Cen, Y., Tang, R., Chen, D., Dou, H., Mo, Z., & Du, H. (2024). Change of termite hindgut metabolome and bacteria after captivity indicates the hindgut microbiota provides nutritional factors to the host. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*, 1228918. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1228918>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, *26*(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Arora, J., Kinjo, Y., Šobotník, J., Buček, A., Clitheroe, C., Stiblik, P., Roisin, Y., Žifčáková, L., Park, Y. C., Kim, K. Y., Sillam-Dussès, D., Hervé, V., Lo, N., Tokuda, G., Brune, A., & Bourguignon, T. (2022). The functional evolution of termite gut microbiota. *Microbiome*, *10*, 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01258-3>
- Baguer, A. J., et al. (2021). Impact of bead-beating intensity on the genus- and species-level characterization of the gut microbiome using amplicon and complete 16S rRNA gene sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 678522. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.678522>
- Bourguignon, T., Lo, N., Dietrich, C., Šobotník, J., Sidek, S., Roisin, Y., Brune, A., & Evans, T. A. (2015). The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. *Current Biology*, *25*(11), 1440–1445. [https://www.researchgate.net/publication/268231810\\_The\\_Evolutionary\\_History\\_of\\_Termites\\_as\\_Inferred\\_from\\_66\\_Mitochondrial\\_Genomes](https://www.researchgate.net/publication/268231810_The_Evolutionary_History_of_Termites_as_Inferred_from_66_Mitochondrial_Genomes)
- Bourguignon, T., Kinjo, Y., Villa-Martín, P., Coleman, N. V., Tang, Q., Arab, D. A., Wang, Z., Tokuda, G., Hongoh, Y., Ohkuma, M., & Lo, N. (2019). Termite evolution: mutualistic associations, key innovations, and the rise of Termitidae. *ISME Journal*, *14*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03728-z>
- Brune, A. (2014). Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(3), 168–180. <https://www.nature.com/articles/nrmicro3182>
- Brune, A., & Dietrich, C. (2015). The gut microbiota of termites: Digesting the diversity in the light of ecology and evolution. *Annual Review of Microbiology*, *69*, 145–166. DOI: [10.1146/annurev-micro-092412-155715](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155715)
- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Watanabe, H., Cano-Camacho, H., & Oyama, K. (2010). Endogenous plant cell wall digestion: A key mechanism in insect evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *41*, 45–71. DOI:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160312
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Suppl. 1), 4516–4522. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1000080107>
- Constantino, R. (2020). Termite Database. *Zootaxa*, *4979*(1). <https://www.mapress.com/zt/article/view/zootaxa.4979.1.22/44104>

- Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., Sacchi, L., Bourtzis, K., Mandrioli, M., Cherif, A., Bandi, C., & Daffonchio, D. (2010). Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6963–6970. <https://doi.org/10.1128/AEM.01336-10>
- Do, T. H., Nguyen, T. T., Nguyen, T. N., Le, Q. G., Nguyen, C., Kimura, K., & Nguyen, N. L. (2014). Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(5), 591–601. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24928651/>
- Donovan, S. E., Eggleton, P., & Bignell, D. E. (2001). Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecological Entomology*, 26(4), 356–366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00342.x>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects: Diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 512–529. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23692388/#:~:text=Abstract,found%20in%20social%20insect%20species.>
- Evans, T. A., Forschler, B. T., & Grace, J. K. (2013). Biology of invasive termites: A worldwide review. *Annual Review of Entomology*, 58, 455–474. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23020620/>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 577–589. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Tiwintza [GADMT]. (2014). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Tiwintza*. Gobierno Municipal de Tiwintza. <https://www.tiwintza.gob.ec/plan-de-desarrollo-y-ordenamiento-territorial/>
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>
- Gmür, D. J., Inauen, J., & Cantarero, A. (2015). Evidence-based recommendations on storing and handling specimens for analyses of insect microbiota. *PeerJ*, 3, e1190. <https://doi.org/10.7717/peerj.1190>
- Hongoh, Y. (2010). Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(6), 1145–1151. <https://doi.org/10.1271/bbb.100094>
- Jouquet, P., Dauber, J., Lagerlöf, J., Lavelle, P., & Lepage, M. (2006). Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil processes. *Applied Soil Ecology*, 32(2), 153–164. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139305001265?via%3Dihub>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and

- next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Köhler, T., Dietrich, C., Scheffrahn, R. H., & Brune, A. (2012). High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the hindgut in wood-feeding higher termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), 4691–4701. <https://doi.org/10.1128/AEM.00683-12>
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1371188>
- Marynowska, M., Goux, X., Sillam-Dussès, D., Roisin, Y., Delfosse, P., & Calusinska, M. (2020). Compositional and functional characterisation of biomass-degrading microbial communities in guts of plant fibre- and soil-feeding higher termites. *Microbiome*, 8, 96. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00872-3>
- Matson, E., Ottesen, E., & Leadbetter, J. (2007). Extracting DNA from the gut microbes of the termite (*Zootermopsis angusticollis*). *Journal of Visualized Experiments*, 4, e195. <https://doi.org/10.3791/195>
- McLaren, M. R., Willis, A. D., & Callahan, B. J. (2019). Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments. *eLife*, 8, e46923. <https://doi.org/10.7554/eLife.46923>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador [MAE]. (2013). *Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental*. Subsecretaría de Patrimonio Natural. <https://archive.org/details/ecosistemas-del-ecuador-2013>
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications*, 13, 342. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2022). *vegan: Community ecology package* (R package version 2.6-4). <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Otani, S., Mikaelyan, A., Nobre, T., Hansen, L. H., Koné, N. A., Sørensen, S. J., Aanen, D. K., Boomsma, J. J., Brune, A., & Poulsen, M. (2021). Identifying the core microbial community in the gut of fungus-growing termites. *Molecular Ecology*, 23(18), 4631–4644. <https://doi.org/10.1111/mec.12874>
- Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., & Watson, M. (2018). The madness of microbiome: Attempting to find consensus "best practice" for 16S microbiome studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7), e02627-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02627-17>

- Salgado, J. F. M., Hervé, V., Vera, M. A. G., Tokuda, G., & Brune, A. (2024). Unveiling lignocellulolytic potential: A genomic exploration of bacterial lineages within the termite gut. *Microbiome*, *12*, 201. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01917-7>
- Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R. A., Palva, A., & de Vos, W. M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiological Methods*, *81*(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.007>
- Sapkota, R., & Scharf, M. E. (2022). Intercolony comparisons of gut microbiome composition from lab reared eastern subterranean termites (Blattodea: Rhinotermitidae). *Journal of Insect Science*, *22*(2), 9. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieac015>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors: Occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Tadevosyan, M. M., Panosyan, H. H., & Avetisyan, A. Zh. (2025). CTAB protocol optimization for high-purity DNA extraction from acidic soil in the habitat of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Proceedings of the YSU B: Chemical and Biological Sciences*, *59*(1–2), 26–35. <https://doi.org/10.46991/PYSUB.2025.59.1-2.026>
- Vikram, S., Arneodo, J. D., Calcagno, J., Ortiz, M., Mon, M. L., Etcheverry, C., Cowan, D. A., & Talia, P. (2021). Diversity structure of the microbial communities in the guts of four neotropical termite species. *PeerJ*, *9*, e10959. <https://doi.org/10.7717/peerj.10959>
- Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Zhu, Q., & Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, *5*, 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(10), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>

## ANEXOS



Anexo 1. Evaluación de la extracción de ADN mediante el método casero (CTAB) y ensayos de amplificación del gen ARNr 16S en diferentes regiones del tracto digestivo de termitas, visualizadas en gel de agarosa al 1,5 %. y se empleó el Ladder 1 kb (Invitrogen) para estimar el tamaño de las bandas. Para cada región evaluada se muestran carriles cargados con el ADN extraído y con los productos de PCR (PCR1 y PCR2) por P3 (intestino posterior), P2 (válvula entérica) y M (mesenterón).

## Anexo 2. Glosario de términos técnicos

**Amplicón:** Fragmento de ADN obtenido mediante la amplificación por PCR de una región específica del genoma, utilizado como marcador para la identificación taxonómica de microorganismos.

**ASV (Variante de secuencia de amplicón):** Secuencia exacta obtenida tras el procesamiento bioinformático de datos de secuenciación masiva, que representa una unidad taxonómica de alta resolución sin agrupación por similitud.

**Mesenterón (región M):** Sección media del tracto digestivo de las termitas, equivalente al intestino medio, donde ocurren procesos de digestión enzimática.

**NMDS (Escalamiento multidimensional no métrico):** Técnica de ordenación que representa gráficamente las diferencias en composición entre comunidades microbianas en un espacio de pocas dimensiones.

**PERMANOVA:** Análisis de varianza multivariado por permutaciones, utilizado para evaluar diferencias estadísticas en la composición de comunidades entre grupos de muestras.

**Rarefacción:** Técnica estadística que normaliza el número de secuencias entre muestras para permitir comparaciones justas de diversidad microbiana.

**Región P2 (válvula entérica):** Segmento del intestino posterior de las termitas que conecta el intestino medio con el intestino posterior, con función de regulación del flujo del contenido digestivo.

**Región P3 (intestino posterior fermentativo):** Principal compartimento fermentativo del intestino posterior de las termitas, caracterizado por alta densidad microbiana y actividad metabólica anaerobia intensa, donde se produce la mayor parte de la degradación microbiana de la materia orgánica.

**Secuenciación paired-end:** Estrategia de secuenciación masiva en la que cada fragmento de ADN es secuenciado desde ambos extremos, generando lecturas complementarias que se solapan para mejorar la precisión del ensamblaje.

**Taxa/Taxón:** Unidad de clasificación biológica que agrupa organismos con características comunes, utilizada en diferentes niveles jerárquicos como filo, familia o género.