



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“DIVERSIDAD MICROBIANA DE UN MANANTIAL
TERMAL Y ÁCIDO EN LA ZONA GEOTÉRMICA DE LOS
AZUFRES, MICHOACÁN, MÉXICO”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**OPCIÓN EN:
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:
BIOL. HANS ROMÁN PACHECO LAMAS**

**ASESOR:
D. C. JESUS CAMPOS GARCÍA**

MORELIA, MICHOACÁN. AGOSTO 2012

¡Ay, ay, cómo culpan los mortales a los dioses!,
pues de nosotros, dicen, proceden los males.
Pero también ellos por su estupidez soportan
dolores más allá de lo que les corresponde.

La Odisea, Homero

REALIZACIÓN:

El trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ASESOR:

D. C. Jesús Campos García

COMITÉ TUTORAL

D. C. Carlos Cervantes Vega

D. C. Homero Reyes de la Cruz

D. C. Gustavo Santoyo Pizano

D. C. Eduardo Valencia Cantero

DEDICATORIA

Dedico este trabajo:

A la memoria de mi madre Ana Bertha Lamas Nolasco[†] quien pudo ver en vida el inicio de estas andanzas y quien como muchos otros ha esperado largamente por ver el final. ¡Pronto lo verás!

A Ernesto Román Pacheco, mi padre, por sus enseñanzas, su gran apoyo, sus bendiciones y su cariño.

A Liz, mi esposa, por su amor, comprensión, presencia y ayuda invaluable en todo este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de la manera más sincera y atenta a mi asesor el Doctor en Ciencias Jesús Campos García por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por su asesoría y respaldo durante el desarrollo del mismo, por su apoyo en los momentos difíciles que me han tocado vivir durante estos años, pero sobretodo, por la enorme paciencia y tolerancia que ha tenido conmigo a pesar de la larguísima espera.

Agradezco también a todos los miembros de mi comité tutorial, los Doctores en Ciencias Carlos Cervantes Vega, Eduardo Valencia Cantero, Gustavo Santoyo Pizano y Homero Reyes de la Cruz por las observaciones, críticas y correcciones hechas a mi trabajo de tesis, por los llamados de atención y exhortaciones hechas a mi persona y, de igual forma, por su paciencia y espera.

Agradezco de manera especial a la Maestra en Ciencias Alma Laura Díaz Pérez y al Doctor en Ciencias César Díaz Pérez por su gran ayuda y observaciones hechas a este trabajo durante el desarrollo de la parte experimental y bioinformática. Les agradezco también por la amistad y camaradería que me han brindado.

Les agradezco a todos mis compañeros y amigos de generación, a mis compañeros y amigos del laboratorio de biotecnología microbiana y de Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas y, en especial, a Mauricio Chávez y Amada Díaz por su amistad, por ayuda y apoyo anímico en todo momento y, también, por sus críticas y observaciones personales que, en más de una ocasión, me ayudaron a ver las cosas desde una perspectiva muy distinta.

Gracias también a mis amigos: Fabio Noriega, Adela Serrano, Arturo Jiménez, Magdalena Monroy, Hernán Alvarado, Ruy Alvarado y en general a toda la familia Alvarado Sizzo por su aliento, su apoyo, sus perspectivas y buenas conversaciones. ¡Gracias a todos!

A mi esposa Liz A. Urióstegui Alejo por acompañarme y apoyarme en esta jornada desde aquellos primeros días en que nos hicimos amigos. Ahora que hemos iniciado juntos un viaje por demás emocionante y desafiante a la vez, te agradezco, sobretodo, por tu gran amor, fe, y excepcional compañía. ¡Te Amo!

Al final, pero no por ello menos importantes, quiero dar las gracias a toda mi familia, por su aliento, su compañía, su fe en mí y por el cariño que me tienen desde que nací. Agradezco especialmente a mi tío Mario A. Lamas Nolasco y a su esposa, mi tía Rosario Saavedra, por toda la ayuda que me han brindado a lo largo de estos años, particularmente en varios de los momentos más difíciles que he tenido que confrontar en mi vida.

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 Zonas geotérmicas	1
	1.2 Manantiales termales	1
	1.3 Diversidad microbiana en zonas geotérmicas	2
	1.4 Estudios de diversidad microbiana realizados en ambientes termales ácidos.	5
II	ANTECEDENTES	6
	2.1 Descripción del área	6
	2.1.1 Ubicación geográfica y clima	6
	2.1.2 Geología	6
	2.1.3 Reservorio profundo y manifestaciones termales profundo	7
III	JUSTIFICACIÓN	10
IV	HIPÓTESIS	11
V	OBJETIVOS	12
	5.1 Objetivo general	12
	5.2 Objetivos específicos	12
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	13
	6.1 Sitio del muestreo y colecta de las muestras	13
	6.2 Extracción de ADN metagenómico	13
	6.3 Amplificación de los genes ribosómicos 16S de bacterias y arqueas	15
	6.4 Purificación de los productos de PCR	16
	6.5 Clonación de los productos de PCR	16
	6.6 Transformación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> JM101	17
	6.7 Aislamiento de plásmidos	18
	6.8 Restricción de plásmidos	19
	6.9 Electroforesis en geles de agarosa	19
	6.10 Secuenciación de clonas con inserto	19
	6.11 Análisis bioinformático de las secuencias	20
	6.12 Búsqueda de secuencias homólogas y ensamblado de contigs	21

6.13 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	21
6.14 Estimación del índice de diversidad de Shannon (H')	22
VII RESULTADOS	23
7.1 Geo-referenciación y parámetros fisicoquímicos de los puntos muestreados en el manantial de Marítaro	23
7.2 Geoquímica de Marítaro	23
7.3 Extracción de ADN metagenómico	25
7.4 Amplificación de los genes ribosómicos 16S	27
7.5 Purificación de los productos de PCR	29
7.6 Clonación de los productos de PCR y transformación en <i>E. coli</i> JM101	29
7.7 Secuenciación y búsqueda de homólogos	33
7.8 Ensamblado de contigs	34
7.9 Filogenias moleculares	36
7.9.1 Árbol patrón	42
7.9.2 Secuencia MAAR 2 – 13	42
7.9.3 Secuencia MAAR 16 – 17	43
7.9.4 Grupo de “ <i>Acidianus</i> ” de Marítaro	44
7.10 Índice de diversidad de Shannon	44
VIII DISCUSIÓN	45
IX RESUMEN DE RESULTADOS	50
X CONCLUSIÓN	51
XI PERSPECTIVAS	52
XII LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Fotografías de los puntos muestreados en el manantial de Marítaro.	24
2	Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN metagenómico extraído según el método descrito por Hetzer et al., 2007.	26
3	Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN metagenómico extraído con el kit UltraClean™ Water DNA Isolation.	27
4	Gel de agarosa que muestra la amplificación de los genes 16S de bacterias y arqueas.	28
5	Gel de agarosa que muestra los productos de PCR (genes 16S de arqueas), purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.	30
6	Aislamiento de plásmidos de 24 clonas seleccionadas al azar.	31
7	Digestión de los plásmidos recombinantes pGAAR con la enzima <i>EcoRI</i> .	32
8	Gráfica que muestra el número de clonas por cada OTU.	34
9	Ensamblado de los contigs MAAR 2 – 13 y MAAR 16 – 17.	35
10	Árbol patrón.	37
11	Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining (NJ) de las secuencias MAAR 2 – 13 y MAAR 17 – 16.	38
12	Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia (MP) de las secuencias MAAR 2 – 13 y MAAR 17 – 16.	39
13	Árbol filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) de las secuencias MAAR 2 – 13 y MAAR 17 – 16.	40
14	Árbol filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) de las secuencias MAAR 2 – 13 y las secuencias individuales agrupadas en el OTU 1 (Grupo de “ <i>Acidianus</i> ” de Marítaro).	41

ÍNDICE DE CUADROS

1	Estudios de Diversidad Microbiana realizados en ambientes termales ácidos.	5
2	Oligonucleótidos empleados para amplificar los genes del <i>ARNr 16S</i>	15
3	Geo-referenciación y parámetros fisicoquímicos medidos en campo (Marítaro).	23
4	Parámetros fisicoquímicos de Marítaro.	25
5	Catalogación de secuencias.	36

RESUMEN

Los manantiales termales ácidos se consideran como ambientes “extremos” debido a las restricciones que las altas temperaturas y los bajos valores de pH imponen a muchas formas de vida. Sin embargo, en estos sistemas naturales hay vida microbiana capaz de desarrollar todas sus funciones biológicas, jugando un papel importante en los procesos ecológicos que allí ocurren. Arqueas y bacterias termoacidófilicas han sido cultivadas a partir de muestras obtenidas en diferentes manifestaciones termales del mundo. No obstante, la diversidad de microorganismos no cultivables supera a aquellos que pueden recuperarse en cultivos puros y por ello es importante conocer tal diversidad mediante métodos independientes del cultivo que emplean marcadores moleculares.

En este trabajo se estudió la diversidad microbiana del manantial termal ácido de Marítaro, ubicado en el campo geotérmico de Los Azufres, Michoacán, mediante métodos independientes del cultivo. Se amplificaron y secuenciaron los genes que codifican para el ARN ribosómico 16S de arqueas y se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias obtenidas para determinar la diversidad microbiana del lugar en base a sus relaciones evolutivas. Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de las secuencias obtenidas (91.3%) pertenecen al orden *Sulfolobales* y el 8.7% restante al orden *Thermoproteales*. Ambos órdenes pertenecen al phylum *Crenarchaeota*. Los árboles filogenéticos obtenidos sugieren que el manantial de Marítaro alberga dos especies de arqueas no reportadas a la fecha. Una de ellas (MAAR 2 – 13) del género *Acidianus* y la otra (MAAR 16 – 17) podría representar un género novedoso dentro del orden *Thermoproteales*. El índice de diversidad de Shannon tuvo un valor de 0.29, indicando que la diversidad de arqueas en el manantial de Marítaro es reducida.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Zonas geotérmicas

Las zonas geotérmicas naturales son manifestaciones termales superficiales del calor contenido en el interior de la tierra, cuya distribución se encuentra restringida a regiones del planeta con actividad tectónica y volcánica reciente en términos geológicos (Brock, 1978; Prol-Ledesma, 2002; Hobel 2004). Estas zonas se circunscriben a las fronteras entre placas tectónicas donde pueden darse eventos de expansión y subducción que permiten que el material del manto terrestre, cuya temperatura es mayor que el de la corteza, ascienda hacia la superficie generando anomalías térmicas. El agua subterránea que se filtra y entra en contacto con las rocas calientes circundantes eleva su temperatura y, mediante movimientos convectivos, es forzada de nuevo hacia la superficie terrestre, experimentando cambios en su composición química a lo largo del trayecto debido a la disolución de diferentes compuestos minerales (Wicander y Monroe, 2000; Reysenbach y Cady, 2001; Prol-Ledesma, 2002). El fluido hidrotermal puede llegar hasta la superficie de la litósfera en forma líquida, gaseosa o ambas, dando origen a diferentes manifestaciones como son: manantiales termales, géiseres, fumarolas, solfataras, pozas de lodo, suelos vaporizantes y diferentes tipos de volcanes en la corteza continental así como chimeneas y ventilas hidrotermales en el piso oceánico (Huber et al., 2000; Reysenbach y Cady, 2001; Prol-Ledesma, 2002).

1.2 Manantiales termales

Prol-Ledesma (2002), define a los manantiales termales como aquellos que descargan agua a una temperatura por lo menos 5°C mayor que la temperatura media anual del lugar y los clasifica como de alta o baja temperatura si ésta es mayor o menor a 50°C, respectivamente. Esta autora también clasifica a los manantiales termales como ácidos, alcalinos o neutros de acuerdo al pH de las aguas que descargan, o bien como sulfatados, bicarbonatados o clorurados de acuerdo a su composición química predominante. Hobel (2004) maneja una clasificación semejante, mencionando que en los campos geotérmicos con temperaturas elevadas el agua puede ir de los 150 a los 350°C a profundidades cuyo rango va de los 500 a los 3000 m en zonas volcánicas activas. Menciona también que la composición de los gases volcánicos emitidos hacia

la superficie (junto con vapor de agua) consiste principalmente en N_2 y CO_2 , además, el H_2 y el H_2S pueden constituir el 10% de la cantidad total de gases producidos. Por otro lado, este mismo autor menciona que los campos geotérmicos con bajas temperaturas se ubican fuera de las zonas volcánicas activas, donde la fuente de calor pueden ser cámaras magmáticas muertas y flujos de lava profundos o extintos, donde la temperatura del agua a las profundidades ya mencionadas es usualmente menor a $150^\circ C$.

El CO_2 y el H_2S provenientes de las profundidades del subsuelo del campo geotérmico son oxidados química y biológicamente al mezclarse con aguas subterráneas frías dando origen a manantiales ácidos donde, el ácido sulfúrico formado actúa como un agente amortiguador. Las aguas ácidas y calientes de estos manantiales tienen un alto poder corrosivo y, debido a ello, disuelven el material rocoso circundante, formando fumarolas o pozos de lodo (Prol-Ledesma, 2002; Hobel 2004). Los manantiales de naturaleza alcalina o neutra son más raros en las zonas con temperaturas elevadas y las aguas que descargan suelen ser claras (Prol-Ledesma, 2002; Hobel 2004).

1.3 Diversidad microbiana en zonas geotérmicas

Las áreas geotérmicas y volcánicas presentan temperaturas frecuentemente más altas que la de ebullición del agua, el suelo y el sedimento cercanos a estas zonas alcanzan una temperatura de hasta $70^\circ C$. En los manantiales termales, la temperatura es arriba de $60^\circ C$ y se mantiene constante por la continua actividad volcánica. Además de la temperatura, otros parámetros ambientales tales como pH (el cual en las zonas geotérmicas puede presentarse muy alto o muy bajo), disponibilidad de fuentes de energía, fuerza iónica y nutrientes influyen en la diversidad de poblaciones microbianas termofílicas (Satyanarayana et al., 2005).

A los microorganismos que son capaces de crecer en altas temperaturas se les conoce como termófilos. Brock (1986) sugirió la siguiente definición: "Un termófilo es un organismo capaz de vivir a la máxima temperatura o a temperaturas cercanas a la máxima, que puede alcanzar el grupo taxonómico del cual forma parte". Diversos microorganismos, los cuales son capaces de crecer a temperaturas elevadas, han sido

clasificados en “moderados” (*Bacillus caldolyticus*, *Geobacillus stearothermophilus*), “extremos” (*Thermus aquaticus*, *Thermomicrobium roseum*, *Thermotoga maritima*) y los “hipertermófilos” (*Methanococcus jannaschii*, *Acidianus infernus*, *Archaeoglobus profundus*) (Satyanarayana et al., 2005).

Otro grupo de microorganismos que viven en ambientes inhóspitos son los acidófilos su pH interno cerca al neutral y por lo tanto, mantienen un alto gradiente de protones a través de la membrana. El movimiento de protones dentro de la célula es minimizado por una red intracelular de cargas positivas; las células tienen un potencial de membrana interno causado por las cadenas laterales de los aminoácidos y los grupos fosforilados de los ácidos nucleicos y los intermediarios metabólicos que actúan como grupos titulables y producen una red intracelular de cargas positivas. Ejemplo de este tipo es *Dunaliella acidophila*, en donde la carga de la superficie y el potencial de membrana interno son positivos, lo cual se espera para reducir el flujo de entrada de protones a la célula (Satyanarayana et al., 2005).

La diversidad microbiana ha sido tradicionalmente estudiada por el ensayo de la concurrencia de especies particulares, por ejemplo, con un fenotipo específico, obtenido por aislados puros y enriquecidos, seguido por la identificación extensiva de sus fenotipos. Un medio y un conjunto de condiciones de incubaciones podrían ser selectivos para organismos específicos con fenotipos de interés y contra selectivos para organismos indeseables (Hobel, 2004).

Para estudiar a los microorganismos de cualquier zona geotérmica el principal problema al que se enfrentan es a la imposibilidad de cultivar a los microorganismos después de que estos fueron colectados. Un concepto incorrecto común de que los microorganismos aislados en cultivos puros de ambientes extremos representan la dominancia numérica y/o las especies son significativamente funcionales. En efecto, los microorganismos aislados usando los métodos de cultivo tradicionales son raramente dominantes numéricamente hablando de las comunidades de las cuales fueron obtenidos; en cambio, estos fueron aislados en virtud de su habilidad para crecer rápidamente en colonias en medios artificiales enriquecidos, típicamente bajo condiciones aeróbicas y a temperaturas moderadas (Hugenholtz, 2002).

Hasta mediados de los años 60's, los microbiólogos simplemente distinguían a los procariotas de los eucariotas. Las cosas mejoraron cuando se desarrollaron las primeras herramientas fenotípicas y en particular el uso de la biología molecular, la cual ayudo en el campo de la taxonomía microbiana (Hobel, 2005).

Uno de los trabajos pioneros fue de Carl Woese y colaboradores sobre el análisis comparativo de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (16S para procariotas y 18S para eucariotas) proveen un marco de trabajo para determinar las relaciones evolutivas entre organismos y por tanto "cuantificar" la diversidad como consecuencia de la divergencia en un árbol filogenético (Hugenholtz, 2002).

El RNA ribosómico es una molécula ancestral, funcionalmente constante, universalmente distribuida y moderadamente bien conservada a través de las distancias filogenéticas. La molécula 16S del RNA ribosómico presenta diversas ventajas. Algunas regiones del gen son universalmente conservadas y adecuadas para los estudios filogenéticos de organismos lejanamente relacionados. Otras regiones son semi-conservadas y son más útiles para el análisis de relaciones filogenéticas entre "phylas" y familias y regiones variables y hipervariables en el 16S del RNA ribosómico ayudan a discriminar organismos pertenecientes al mismo género o aún entre especies, aunque no entre cepas dentro de la misma especie. La longitud del gen es conveniente para facilitar tanto para PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) como la secuenciación. Además, los extremos del gen son altamente conservados a través de todos los dominios bacteriano y arqueas, por lo tanto, casi todo el gen puede ser amplificado por PCR. Esta última característica es el fundamento del enfoque independiente del cultivo (Hobel, 2005).

La química de los ambientes microbianos aparece para ser crítica para la determinación de la composición, especialmente en manantiales calientes ácidos, donde los quimiolitotróficos son reportados como productores primarios. La presencia o ausencia de genes en las rutas importantes en oxidación-reducción de los diferentes elementos químicos provee notables estrategias metabólicas a los microorganismos nativos de los sistemas geotérmicos. Además la temperatura afecta el crecimiento microbiano. En un estudio comparativo de las comunidades microbianas en manantiales calientes, Skirnisdottir et al. (2000) mostró que las comunidades en las

temperaturas más extremas tuvieron la más baja diversidad global bacteriana. Otro estudio realizado por Chapelle et al. (2002) sugiere que bajo condiciones ambientales más extremas las arqueas son el grupo predominante.

1.4 Estudios de diversidad microbiana realizados en ambientes termales ácidos

En el cuadro 1 se resumen los más recientes estudios de diversidad microbiana realizados en ambientes extremos (pH en un rango de 1.2 a 2.5 y temperaturas de 40 a 93.5 °C).

Cabe mencionar que en dichos estudios se encontraron tanto bacterias como arqueas.

Cuadro 1. Estudios de diversidad microbiana realizados en ambientes termales ácidos

Localidad	Temperatura y pH	Diversidad (OTUs y especies más cercanas)
Lassen Volcanic National Park, California, E. U. A (Siering et al., 2006)	T: 82 – 93.5 °C pH: 1.20 – 2.1	No se detectaron secuencias bacterianas! 65 OTUs con baja similitud (<85%) a las secuencias reportadas. Clonas más prevalecientes: <i>Stygiolobus azoricus</i> y <i>Sulfolobus solfataricus</i> (92%), <i>Vulcanisaeta distributa</i> (97%)
Sulphur Springs, St. Lucía, Antillas Menores (Stout et al., 2009)	T: 40 – 80.5 °C pH: 2.0	Bacterias: Comunidad dominada por Aquificales (<i>Hydrogenobacter subterraneus</i>), <i>Acidithiobacillus</i> , <i>Sulfobacillus</i> Arqueas: Todos los sitios dominados por <i>Acidianus spp.</i> y <i>Thermoproteales</i>
Hveragerði, Islandia (Kvist et al., 2007)	T: 81 y 90° C pH: 2.5	Sulfolobales : <i>S. solfataricus</i> , <i>Acidianus infernus</i> , <i>St. azoricus</i> Thermoproteales : <i>Thermoproteus tenax</i> , <i>Thermocodium modestius</i>

II. ANTECEDENTES

2.1 Descripción del área de estudio

2.1.1 Ubicación geográfica y clima

El campo geotérmico de Los Azufres se localiza en la sierra de San Andrés, al interior de la provincia geotérmica del Cinturón Volcánico Transmexicano (CVT), aproximadamente a 80 kilómetros al oriente de la ciudad de Morelia, en el estado de Michoacán. Las coordenadas del centro del campo son 19° 48' y 19° 51' de latitud norte, y 100° 37' y 100° 43' de longitud oeste. La extensión del campo es de 81 km² y se ubica a 2800 metros sobre el nivel del mar (msnm), en una zona dominada por bosque de coníferas (pino–oyamel). El clima de la región se describe como templado sub-húmedo con una precipitación media anual de 1200 mm y temperaturas promedio anual mínima y máxima de 12 y 18 °C, respectivamente (González-Partida, 2000; Tello-López y Suarez-Arriaga, 2000; Mendoza-Rangel y Hernández-Ayala, 2004).

2.1.2 Geología

La zona de Los Azufres es uno de varios centros volcánicos silícicos del CVT cuyo origen geológico se remonta al Plioceno-Pleistoceno y se relaciona con la subducción oblicua de la Placa de Cocos bajo la Placa Norteamericana. El volcanismo de la zona es de tipo adesítico-basáltico y el campo geotérmico se considera como el centro de una caldera anidada que se formó entre el Mioceno tardío y el Plioceno. La litología de Los Azufres se caracteriza por la presencia de más de 2000 m de derrames andesíticos que se ven interrumpidos por basaltos y aglomerados formando el basamento local del campo geotérmico. Sobre el basamento andesítico, se depositaron rocas ácidas como son ignimbritas, tobas riolíticas (Riolita Agua Fría) y cenizas producto de un ciclo volcánico de 1.05 a 0.84 millones de años. Finalmente, encima de estas rocas hay depósitos lacustres que datan del Pleistoceno y dacitas (Dacita San Andrés) como producto de una fase volcánica de 0.3 millones de años de edad (Ferrari et al., 1991; González-Partida, 2000 y referencias citadas en ese trabajo).

2.1.3 Reservorio profundo y manifestaciones termales superficiales

El reservorio hidrotermal profundo de Los Azufres se divide en dos subsistemas cuya fuente de calor está relacionada al volcán San Andrés, localizado en el extremo sur del reservorio; estos subsistemas difieren en sus características termodinámicas pero poseen el mismo tipo de fluido con características geoquímicas muy semejantes (Tello-López y Suarez-Arriaga, 2000; Suarez-Arriaga et al., 2000; Quijano-León y Gutierrez-Negrín, 2003). El subsistema Marítaro, o sector norte, está dominado por una fase líquida localizada entre los 200 y los 2200 msnm y se caracteriza por tener una presión hidrostática vertical promedio de 90 bar y una temperatura media de 300 °C. El subsistema Tejamaniles, o sector sur cuenta, con tres perfiles termodinámicos diferentes: un perfil superficial bifásico dominado por vapor, localizado entre los 1800 y los 2600 msnm, con una presión y temperatura media de 55 bar y 270 °C, respectivamente; un estrato intermedio bifásico dominado por líquido a 100 bar y 300 °C, localizado entre los 400 y 1800 msnm; y un estrato profundo con líquido comprimido a 180 bar y 350 °C, localizado entre los -50 y 400 msnm (Tello-López y Suarez-Arriaga, 2000; Suarez-Arriaga et al., 2000).

El fluido profundo o salmuera geotérmica consiste en aguas clorurado-sódicas (ricas en NaCl), con un pH entre 5.8 y 7.2 cuyas temperaturas van de los 240 a los 280 °C de manera normal, pero que pueden alcanzar valores mayores a los 300 °C (Tello-López y Suarez-Arriaga, 2000; Birkle et al., 2001). La concentración de Cl en la salmuera varía entre los 1485 y los 7297 mg/L mientras que la concentración de Na va de los 914 a los 4442 mg/L (González-Partida et al., 2005). La fase de vapor en el reservorio tiene una composición heterogénea de gases no condensables como CO₂, H₂S, NH₃, CH₄, O₂, H₂, N₂, He y Ar que, en conjunto, constituyen del 1 al 9% de la masa total del fluido profundo. De estos gases, el CO₂ es el componente principal, con valores del 70 al 99% del peso total de los gases no condensables. El segundo compuesto gaseoso más abundante es el ácido sulfhídrico (H₂S), con porcentajes del 0.2 al 13% del peso total de los gases (Suarez-Arriaga et al., 2000; González-Partida et al., 2005).

En su paso hacia la superficie, el fluido profundo interactúa con la roca encajonante y es alterado químicamente mediante la adición de calcio, bicarbonato y sulfatos. En la superficie, el agua meteórica poco profunda es calentada por el vapor de

origen geotérmico y se acidifica debido a la oxidación del H₂S dando origen a manantiales y pozas de lodo con temperaturas que alcanzan los 90 °C, un pH menor que 4.0, un alto contenido de sulfatos (1500 ppm) y una baja concentración de cloruros (20 ppm). El agua ácido-sulfatada es la más común en áreas con fumarolas debido a la condensación superficial del vapor que asciende a partir de zonas donde el agua se encuentra en ebullición. En la periferia del reservorio geotérmico, se ubican algunos manantiales cuyas aguas son neutras, cloruradas (NaCl) y de origen meteórico. Finalmente, en la parte sur del campo pueden encontrarse fumarolas, pozas de lodo y suelos vaporizantes distribuidos entre las fallas (Tello-López y Suarez-Arriaga, 2000).

En algunas descargas naturales son evidentes los fenómenos de caolinización y precipitación de alunita y azufre elemental; este último fenómeno es lo que le da el nombre al lugar “Los Azufres” (González-Partida, 2000).

El campo geotérmico de los Azufres ha sido aprovechado formalmente para la producción de energía eléctrica desde la década de 1980 y se ha convertido en el segundo más importante en cuanto a su capacidad de generación (Quijano-León y Gutiérrez Negrín, 2003; Mendoza-Rangel y Hernández Ayala, 2004).

De manera independiente a su aprovechamiento, pero motivados por el desarrollo del lugar, se han realizado algunos estudios de corte biológico en el campo cuyo enfoque ha sido la diversidad vegetal o de otros organismos como los líquenes (Gómez-Peralta, 1992). Sin embargo, el estudio de la microbiota del lugar ha sido soslayado y hasta la fecha no existe un reporte que aborde este tema.

En la planta geotermoeléctrica “Tejamaniles”, ubicada dentro del perímetro de Los Azufres, los condensadores de dicha planta presentan un alto grado de corrosión, en donde se trabaja con temperaturas de vapor en un rango de 40 a 150°C. Torres-Sánchez *et al.* (1997) en base en la observación de sus características físicas, utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido y consultando el Manual de Bergey's, identificaron a dos especies en el condensador: *Desulfotomaculum nigrificans* y *D. acetoxidans*. En el fondo de los pozos de la planta mencionada, encontraron un biofilm, al cual se le practicó la metodología anterior, los autores sugieren que en base a su morfología hay dos representantes de los géneros *Desulfovibrio* y *Thermodesulfobacterium*, además Navarrete-Bedolla *et al.* (1999) identificó la presencia

de la bacteria hipertermofílica *Thermoproteus neutrophilus*, que crece en un rango de pH de 6.8–8.0 y en un intervalo de temperaturas de 85–105°C en los ductos de vapor de los pozos de la planta, los cuales muestran una temperatura de hasta 140 °C.

El trabajo de Castorena et al. (2006), en el que describe el aislamiento de una cepa de *Burkholderia sp.* capaz de biodegradar el compuesto tóxico carbazol, es probablemente la única excepción.

En las pozas termales de Araró, localizado a 20 km de Los Azufres, Prieto–Barajas et al. (2011) reportan que los tapetes microbianos de esa zona están constituidos por los géneros cianobacterianos *Synechococcus* (49%) y *Cyanobium* (5%), así como diversas cianobacterias (26%) y bacterias no cultivadas (20%), de los cuales el 46% del total de clonas analizadas mostraron homología con bacterias no cultivadas. Además en este trabajo utilizaron técnicas moleculares, es decir amplificaron con la región intergénica de los genes 16S y 23S, posteriormente clonaron, secuenciaron para llevar a cabo los correspondientes alineamientos y hacer su respectivo análisis bioinformático.

III. JUSTIFICACIÓN

Las manifestaciones termales de Los Azufres son ejemplos de ambientes extremos cuya diversidad de microorganismos así como la participación de éstos en los procesos ecológicos que ocurren en dichas manifestaciones han sido poco estudiadas, por lo tanto, el estudio de los microorganismos de Los Azufres mediante métodos moleculares independientes del cultivo es una primera aproximación hacia el conocimiento de su diversidad y de su posible participación a nivel ecológico.

IV. HIPÓTESIS

El manantial termal de Marítaro en Los Azufres alberga microorganismos termofílicos diferentes a los encontrados en ambientes similares, cuya diversidad podría ser endémica.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Estudiar la diversidad microbiana de un manantial termal ácido ubicado en Marítaro, dentro del campo geotérmico de Los Azufres, Michoacán.

5.2 Objetivos específicos:

1. Obtener una biblioteca de los genes 16S ARNr amplificados a partir del ADN metagenómico.
2. Catalogar y realizar el análisis filogenético de las secuencias obtenidas.
3. Determinar la diversidad microbiana de la comunidad e inferir la participación ecológica de los organismos encontrados en dicho ambiente.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitio del muestreo y colecta de las muestras

Para realizar el estudio de diversidad microbiana se escogió el manantial de Marítaro ubicado en el sector norte del campo geotérmico de Los Azufres, cerca del pozo productor Az-28. Las coordenadas geográficas del punto de acceso a esta área son: 19° 49' 19.8" de latitud norte (N) y 100° 40' 01.5" de longitud oeste (O). Las coordenadas de este punto y de las pozas muestreadas fueron obtenidas en campo con ayuda de un GPS eTrex H (Garmin, Ltd.). La temperatura y el pH fueron medidos en cada punto de muestreo con un termómetro de mercurio y con tiras indicadoras de pH, respectivamente. En cada punto, se colectaron muestras de 1L de agua caliente con sedimentos en suspensión en frascos de vidrio estériles (Schott), por duplicado. Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente hasta el laboratorio de biotecnología microbiana donde se almacenaron a 4 °C. El día siguiente a la colecta se filtró el agua (1L) con sedimentos a través de filtros de nitrocelulosa de 0.22 µm (Millipore), los cuales se guardaron a -80 °C en tubos de polipropileno de 50 ml hasta su procesamiento posterior (Nota: por cada litro de agua se utilizaron de 3 a 4 filtros debido a que estos se ocluían fácilmente por los sedimentos en suspensión).

6.2 Extracción de ADN metagenómico

Para realizar la extracción del ADN metagenómico se procesaron los filtros mediante dos protocolos distintos: el primero de ellos fue descrito por Hetzer *et al.* (2007) y el segundo fue usando el kit "UltraClean™ Water DNA Isolation" (Mo Bio Laboratories, Inc.). Cada uno es descrito a continuación:

Método descrito por Hetzer *et al.* (2007) con ligeras modificaciones:

1. En tubos de polipropileno de 50 ml se colocaron de 3 a 4 filtros y se añadieron 2 ml de buffer de extracción [Tris-HCl 100 mM, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2% (w/v), Polivinilpirrolidona (PVP, 360,000), al 1% (w/v), pH 8.0] por cada filtro. Se añadieron 4 µl de 2-mercaptoetanol al 0.4% recién preparado, por cada mililitro de buffer de extracción.

2. Los tubos se incubaron en baño maría durante 20 min.
3. Después de la incubación, se añadió 1 vol igual de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló en un vortex y se centrifugó a 16,000 x g durante 15 min (centrifuga Eppendorf 5810R) a temperatura ambiente.
4. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se añadieron 0.1 vol de acetato de sodio 3 M (pH 5.5) y 1 vol de isopropanol.
5. Los tubos se almacenaron por toda la noche a -20 °C para precipitar el ADN y al día siguiente se centrifugaron a 16,000 x g durante 20 min.
6. Las pastillas de ADN fueron lavadas dos veces con etanol al 70%, secadas y resuspendidas en el buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).
7. El ADN metagenómico fue almacenado a -20 °C o sometido a corrimiento electroforético.

Extracción de ADN con el kit “UltraClean™ Water DNA Isolation”, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante con algunas modificaciones:

1. Se colocaron 3 filtros provenientes de cada muestra de agua previamente procesada en un “bead tube”, se agregaron 4 ml de la “bead solution” y se agitó cada tubo en el vortex a toda velocidad durante 1 min.
2. Se agregaron 500 µl de la solución WD1 a cada tubo y se mezcló en un vortex por 30 seg. Inmediatamente, se aseguraron los tubos al vortex en posición horizontal con cinta adhesiva y se mezcló a toda velocidad durante 10 min.
3. Los tubos se centrifugaron a 2,500 x g durante 1 min a temperatura ambiente.
4. El sobrenadante de cada tubo fue transferido a tubos de 15 ml y se agregaron 600 µl de la solución WD2. Se mezcló en un vortex por 5 seg y se almacenaron a 4 °C por 5 min.
5. Los tubos se centrifugaron a 2,500 x g durante 4 min. Se transfirió el sobrenadante a tubos limpios, se agregaron 8 ml de la solución WD3 y se mezcló en un vortex por 5 seg.
6. La mezcla se transfirió cuidadosamente a los “tubos-filtro” (spin filter) y se centrifugaron a 2,500 x g durante 3 min. Se desechó el filtrado.

7. Se agregaron a los “tubos-filtro” 3 ml de la solución WD4 y se centrifugaron a 2,500 x g durante 3 min. Se desechó el filtrado.
8. Se centrifugó nuevamente a 2,500 x g durante 5 min.
9. Los filtros fueron colocados en tubos limpios de 50 ml y se agregaron 3 ml de la solución WD5 en la parte central de la membrana. Se dejaron reposar por 10 min a temperatura ambiente.
10. Los tubos se centrifugaron a 2,500 x g durante 2 min y posteriormente se desechó el filtro.
11. El ADN eluido mediante la solución WD5 (Tris 10 mM) fue almacenado a -20 °C.

6.3 Amplificación de los genes ribosómicos 16S de bacterias y arqueas.

Los genes que codifican para el ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) fueron amplificados por PCR con la siguiente combinación de oligonucleótidos: 27F y 1492R para bacterias, y 21F y 1492R para arqueas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Oligonucleótidos empleados para amplificar los genes del ARNr 16S

Nombre (especificidad)	Secuencia	Referencia
27F (Dominio <i>Bacteria</i>)	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Reysenbach <i>et al.</i> , 2000
21F (Dominio <i>Archaea</i>)	5'-TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA-3'	Martín-Cuadrado <i>et al.</i> , 2007
1492R (Universal)	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Reysenbach <i>et al.</i> , 2000

Los componentes de la mezcla de reacción y las condiciones utilizadas para amplificar los genes ribosómicos se presentan a continuación:

Como molde se utilizó el ADN metagenómico obtenido de la muestra de Marítaro (5 µl), amortiguador de reacción 5X (5 µl; concentración final 1X), 2 µl de MgCl₂ 25 mM

(concentración final 2 mM), 0.5 µl de dNTPs (0.2 mM), 1.25 µl de cada oligonucleótido (1 µM; combinaciones previamente mencionadas) y 1.25 unidades de GoTaq® Hot Start Polimerasa (Promega). La mezcla se llevó a un volumen final de 25 µl y se sometió al siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 50 seg a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 52 °C (alineamiento), 2 min a 72 °C (extensión) y un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. Como control positivo se utilizó el ADN total de *Escherichia coli* JM101 (PCR de colonia).

6.4 Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante que se describen a continuación:

1. Se adicionó un volumen igual de solución de unión a la reacción del PCR.
2. Se insertó una minicolumna en el tubo colector. La minicolumna se cargó con la mezcla de paso anterior y se incubó a temperatura ambiente por 1 min.
3. Se centrifugó la minicolumna ensamblada a 13,200 rpm por 1 min. Se desechó el líquido filtrado y regresó la minicolumna al tubo colector.
4. Se adicionaron 700 µl de la solución de lavado (con etanol) en la minicolumna y se centrifugó a 13,200 rpm por 1 min.
5. Se repitió el paso anterior con 500 µl de solución de lavado y se centrifugó a 13,200 rpm por 5 min.
6. Se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrífuga limpio y se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasa directamente en el centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y para recuperar el filtrado, se centrifugó a 13,200 rpm por 1 min.
7. Se desechó la minicolumna y el tubo con el ADN eluido se almacenó a -20 °C.

6.5 Clonación de los productos de PCR

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron ligados al vector linearizado pGEM®-T Easy (Promega), manteniendo una proporción de 3:1 (inserto:vector); se utilizó la enzima T4 ADN ligasa y el amortiguador de ligación rápida

incluidos en el kit del vector. La reacción de ligación se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche.

6.6 Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* JM101

A. Preparación de células electrocompetentes

La preparación y transformación de células electrocompetentes de *E. coli* se realizó de acuerdo con los procedimientos contenidos en el manual MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide (Bio-Rad), que se describen a continuación:

- a. Se creció la cepa en 4 ml de Caldo Luria-Bertani (CLB; NaCl 10 g/L, peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L), con agitación constante a 37°C durante toda la noche.
- b. 2.5 ml del cultivo fueron transferidos a 250 ml de CLB precalentado a 37°C en 1 matraz de 1 litro. Se incubó a 37°C a 250 rpm por 3 a 4 h hasta obtener una absorbencia entre 0.6 y 0.8 a una longitud de onda de 590 nm.
- c. El cultivo fue colocado en hielo durante 10 min y después se centrifugó en tubos de 80 ml a 5,000 rpm por 10 min a 4°C.
- d. Las células obtenidas fueron lavadas 2 veces con 50 ml de agua destilada estéril y fría, centrifugando a 5,000 rpm por 10 min a 4°C en cada ocasión.
- e. Por último las células fueron resuspendidas en 2 ml de glicerol al 10% frío.
- f. Las células fueron almacenadas a -80°C en alícuotas de 100 µl.

B. Transformación

- a. A 100 µl de células electrocompetentes se les adicionó 1 µl de la mezcla de ligación de ADN plasmídico y después la mezcla se colocó entre los electrodos de una celda en la cámara del electroporador y se le dio un pulso de 1.80 kV durante 4 mseg.
- b. Inmediatamente después, las células fueron transferidas a un tubo con 1 ml de CLB y se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación constante.

- c. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl del cultivo en placas de Agar Luria-Bertani (ALB; medio LB con 15 g/l de agar bacteriológico), adicionado con 100 µg/ml de ampicilina (Ap), 80 µg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido) y 0.5 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) para las construcciones provenientes del vector pGEM[®]-T Easy.
- d. Las colonias seleccionadas (colonias blancas resistentes a Ap) se inocularon en tubos con 4 ml de CLB y se incubaron a 37°C durante toda la noche para posteriormente aislar el plásmido y caracterizarlo.

6.7 Aislamiento de plásmidos

El aislamiento de ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina (adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowicz y Burke, 1981) que es descrito a continuación:

1. Se creció un cultivo en CLB durante toda la noche a 37°C con agitación constante.
2. El cultivo se centrifugó a 12,000 rpm en una microcentrifuga Eppendorf 5415 D por 3 min.
3. El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en 100 µl de STE (sacarosa 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8), se agregaron 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 5 min.
4. Se agregaron 200 µl de una solución recién preparada de NaOH (0.2 N) y SDS (1%), se mezcló suavemente y se mantuvo en hielo durante 10 min.
5. Se adicionaron 150 µl de una solución 3 M de acetato de potasio (pH 4.8), se mantuvo 10 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min.
6. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron 500 µl de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló en un vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min.

7. La fase superior se transfirió a otro tubo y se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío para precipitar el ADN; se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min y el sobrenadante fue desechado.
8. La pastilla fue lavada 3 veces con etanol al 70% y después fue secada y resuspendida en 50 µl de agua destilada estéril.
9. Las muestras se almacenaron a -20°C o se sometieron a corrimiento electroforético.

6.8 Restricción de plásmidos

El ADN fue digerido utilizando una unidad de endonucleasa de restricción por µg de ADN en la solución amortiguadora correspondiente e incubando por 1 h a 37°C como mínimo. Después se realizó el corrimiento electroforético de la mezcla de restricción en un gel de agarosa al 1%.

6.9 Electroforesis en geles de agarosa

Al ADN metagenómico o plasmídico se les realizaron corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1% disuelta en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 1 mM, pH 8.5). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se sumergieron en amortiguador TAE. Las muestras de ADN se mezclaron con 1 µl de amortiguador de carga (azul de bromofenol en solución de glicerol al 30%) y se colocaron en los pozos del gel. El corrimiento electroforético se realizó aplicando de 100 a 120 voltios por 35 a 60 min. Posteriormente, los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 a 10 min y se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta y fueron fotografiados por medio de un fotodocumentador BioCaptMw Vilber Lourmat.

6.10 Secuenciación de clonas con inserto

A partir de la biblioteca obtenida, se seleccionaron clonas al azar a las cuales se les extrajo el plásmido y se corroboró la presencia del inserto mediante los métodos

descritos en los párrafos anteriores. Una vez realizado esto último, se repitió la extracción de los plásmidos de cada clona con la finalidad de purificarlos y mandarlos a secuenciar. La purificación o limpieza de los plásmidos se realizó mediante un protocolo que utiliza bromuro de etidio y fenol y se describe a continuación:

1. Se resuspendieron los plásmidos en 200 µl de agua destilada estéril.
2. Se adicionaron 140 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló suavemente.
3. Se adicionaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/µl) y se agitó suavemente hasta que se incorporó completamente.
4. Se adicionaron 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló hasta lograr una emulsión.
5. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo.
6. Se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente por inversión.
7. Se incubaron los tubos por 10 min en hielo o toda la noche a -20 °C.
8. Se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 5 min. Se lavaron las pastillas con etanol al 70% y se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 1 min. El lavado se repitió dos veces más.
9. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendieron en agua destilada estéril (10 – 30 µl).
10. Los tubos se almacenaron a -20 °C.

Finalmente, los plásmidos purificados de las clonas seleccionadas se llevaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Cinvestav-LANGEBIO, Irapuato, Gto. La secuenciación parcial de los fragmentos se realizó utilizando el oligonucleótido M13 Forward (Promega).

6.11 Análisis bioinformático de las secuencias

Las secuencias parciales fueron revisadas y editadas manualmente con la finalidad de eliminar los fragmentos de secuencias pertenecientes al vector donde fueron clonadas. Posteriormente, con estas secuencias, se creó una base de datos local de nucleótidos con el programa BioEdit (Hall, 1999) y se realizó un análisis de

búsqueda tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) con cada una de las secuencias para identificar aquellas que fueran idénticas y agruparlas en unidades taxonómicas operativas (OTU's, por sus siglas en inglés).

A partir de los análisis previos se seleccionaron secuencias representativas de cada OTU diferente a las cuales se les realizó un análisis adicional para buscar secuencias quiméricas con el programa Bellerophon (Huber et al., 2004).

6.12 Búsqueda de secuencias homólogas y ensamblado de contigs

Con las secuencias seleccionadas, se realizaron búsquedas de secuencias homólogas en la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el programa BLASTN.

El ensamblado de contigs se realizó con la aplicación CapContig Assembly del programa BioEdit. Finalmente, con los contigs completos se realizaron nuevamente las búsquedas de homólogos con el programa BLASTN del NCBI y se seleccionaron aquellas secuencias que tuvieran una mayor identidad para ser alineadas y realizar el análisis filogenético.

6.13 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Todos los alineamientos de secuencias múltiples se realizaron en línea con el programa T-Coffee::Regular (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular>) (Notredame et al., 2000) y se editaron manualmente con BioEdit.

Para realizar la construcción de los árboles filogenéticos a partir de las secuencias alineadas de los genes ribosómicos se utilizaron los programas MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2007) y RAxML BlackBox (<http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/>) (Stamatakis et al., 2008). Estos análisis se llevaron a cabo por tres métodos diferentes: vecino más cercano (NJ, neighbor-joining), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML, maximum likelihood).

6.14 Estimación del índice de diversidad de Shannon (H')

El índice de diversidad de Shannon es la suma negativa de la abundancia proporcional de cada OTU multiplicada por el logaritmo de su abundancia proporcional. Este índice mide la cantidad de información en un sistema y, de manera más general, es una medida de la dificultad para predecir la identidad del siguiente individuo muestreado (en este caso, la siguiente clona muestreada) (Hill et al., 2003). El índice se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$H' = -\sum(p_i)(\ln p_i)$$

Donde p_i es la proporción de clonas en el i -ésimo OTU y se calcula dividiendo el número de clonas que pertenecen a un OTU determinado entre el número total de clonas ($p_i = n_i/N$) (Hill et al., 2003).

VII. RESULTADOS

7.1 Geo-referenciación y parámetros fisicoquímicos de los puntos muestreados en el manantial de Marítaro

La zona de Marítaro, ubicada en el sector norte del campo geotérmico Los Azufres, se caracteriza por la presencia de pozas de lodos ácidos y calientes que se distinguen por presentar diferentes niveles de fluidez o consistencia según las observaciones realizadas en campo. Los dos puntos muestreados se seleccionaron en base a la temperatura, pH y consistencia del lodo, y se consideraron como representativos del lugar (figura 1). El punto 2 se subdividió en 2 y 2' por tratarse de pozas muy cercanas entre sí y por presentar parámetros fisicoquímicos muy semejantes (figura 1 B y cuadro 3). Los valores de temperatura, pH y los datos de geo-referenciación para cada punto muestreado se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Geo-referenciación y parámetros fisicoquímicos medidos en campo (Marítaro)

Punto	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Temperatura (°C) en campo	pH en campo*	pH en laboratorio+
1	19° 49.463'N 100° 40.059'O	2832	78	5.0	4.43
2	19° 49.364'N 100° 40.036'O	2828	86	3.0	3.09
2'	19° 49.343'N 100° 40.098'O	2827	85	2.5	2.79

* Medido con tiras

+ Potenciómetro

7.2 Geoquímica de Marítaro

En el cuadro 4 se enlistan los valores de concentración de algunos elementos y compuestos que se encuentran en solución en el agua de Marítaro. Estos datos fueron proporcionados por la Comisión Federal de Electricidad (CFE), institución que se encarga de monitorear con regularidad las manifestaciones termales presentes en Los

Azufres. Algunos valores correspondientes a compuestos gaseosos fueron tomados de los datos que reportan González-Partida et al. (2005).

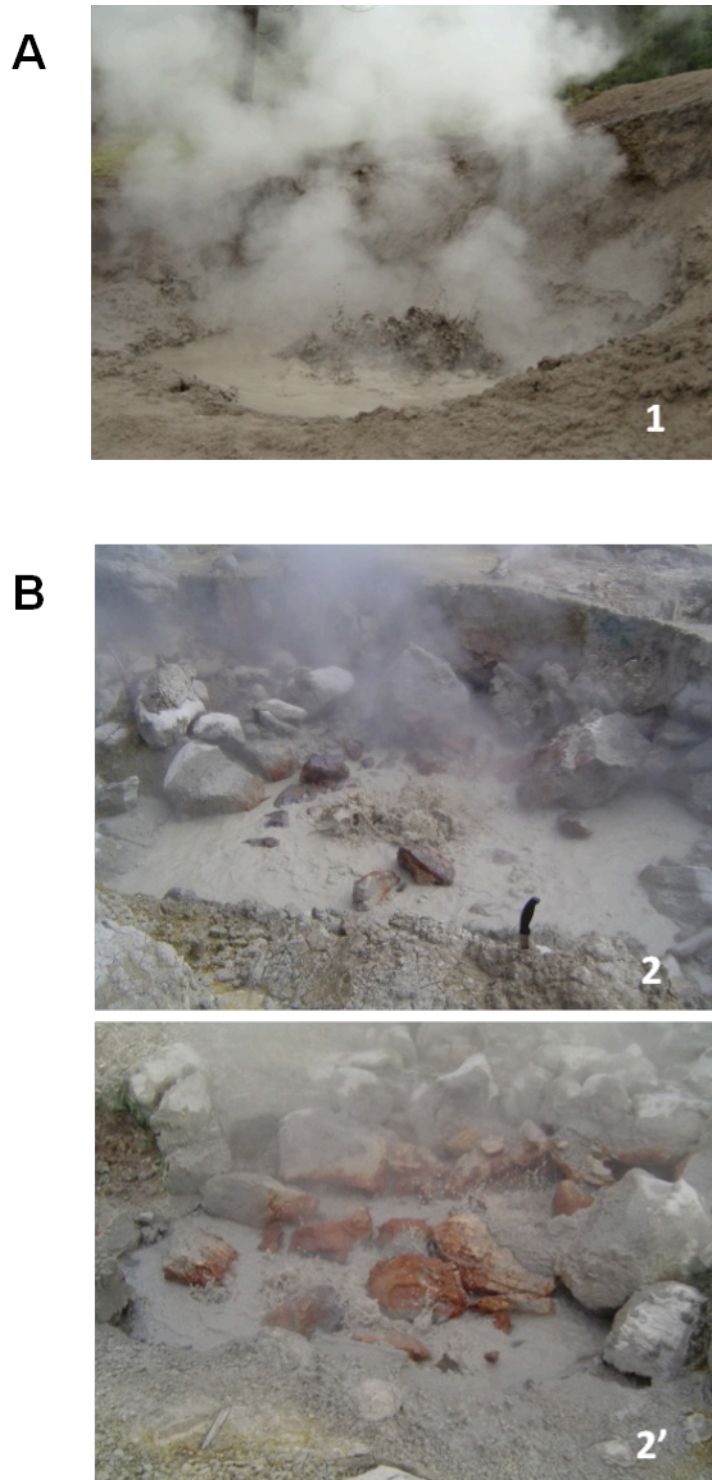


Figura 1. Fotografías de los puntos muestreados en el manantial de Maritara. (A) Punto 1. (B) Pozas muy cercanas entre sí del punto 2 (designadas como 2 y 2').

Cuadro 4. Parámetros fisicoquímicos de Marítaro.^{a, b}

Fecha: 16/04/2007	
Temperatura (°C)	83
pH	4.20
Cond. Elect. (µS)	11620
Alcalinidad total	0
Cl	3120.90
Na	1921.60
SiO₂	578.94
K	498.20
B	271.35
SO₄	52.58
Ca	34.21
Li	30.40
Rb	11.04
NH₄	8.35
Fe	3.51
As	3.00
Al	2.13
Mg	0.63
Cs	0
HCO₃	0
CO₂^{c, d}	90.11 (80 – 98)
H₂S^{c, d}	5.365
H₂^{c, d}	0.0640

^aProporcionados por CFE

^bValores en mg/L

^cValores en % de peso seco en vapor del pozo Az-028 (Marítaro)

^dTomados de González-Partida et al., 2005

7.3 Extracción de ADN metagenómico

Como primera aproximación para obtener ADN metagenómico a partir de las muestras colectadas en cada punto, se siguió el protocolo descrito por Hetzer et al. (2007) (ver materiales y métodos). En la figura 2 se muestra los resultados obtenidos

con este protocolo donde se aprecian las bandas de ADN metagenómico extraído a partir de las muestras provenientes de los puntos 2 y 2'; con la muestra proveniente del punto 1 no se pudo obtener ADN de forma apreciable. A pesar de estos resultados, el ADN obtenido no se utilizó en los experimentos subsecuentes debido a que éste se degradaba muy rápidamente y por esta razón, se consideró el uso de un kit comercial para obtener ADN de mejor calidad. El kit seleccionado fue el UltraClean™ Water DNA Isolation diseñado especialmente para la extracción y purificación de ADN a partir de muestras ambientales. Siguiendo el protocolo descrito por el fabricante con algunas modificaciones, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3. En ella se puede apreciar que al igual que con el método utilizado previamente, no se pudo obtener ADN a partir de la muestra proveniente del punto 1 y que sólo de las muestras provenientes de los puntos 2 y 2' se obtuvo ADN en cantidades apreciables. Sin embargo, la diferencia entre ambos protocolos fue que con este último se obtuvo ADN de mejor calidad que pudo almacenarse por más tiempo sin degradarse. Este ADN fue el que se utilizó en los experimentos subsecuentes.

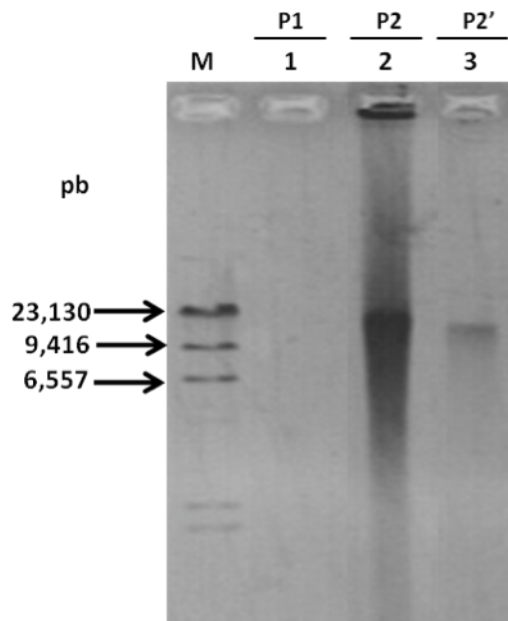


Figura 2. Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN metagenómico extraído según el método descrito por Hetzer et al., 2007. M, ADN del fago λ (*Hind*III), utilizado como marcador de tamaño molecular; carril 1, muestra procesada proveniente del punto 1 (P1), sin ADN apreciable; carril 2, ADN metagenómico obtenido a partir de la muestra tomada en el punto 2 (P2); carril 3, ADN metagenómico obtenido a partir de la muestra tomada en el punto 2' (P2'); pb = pares de bases.

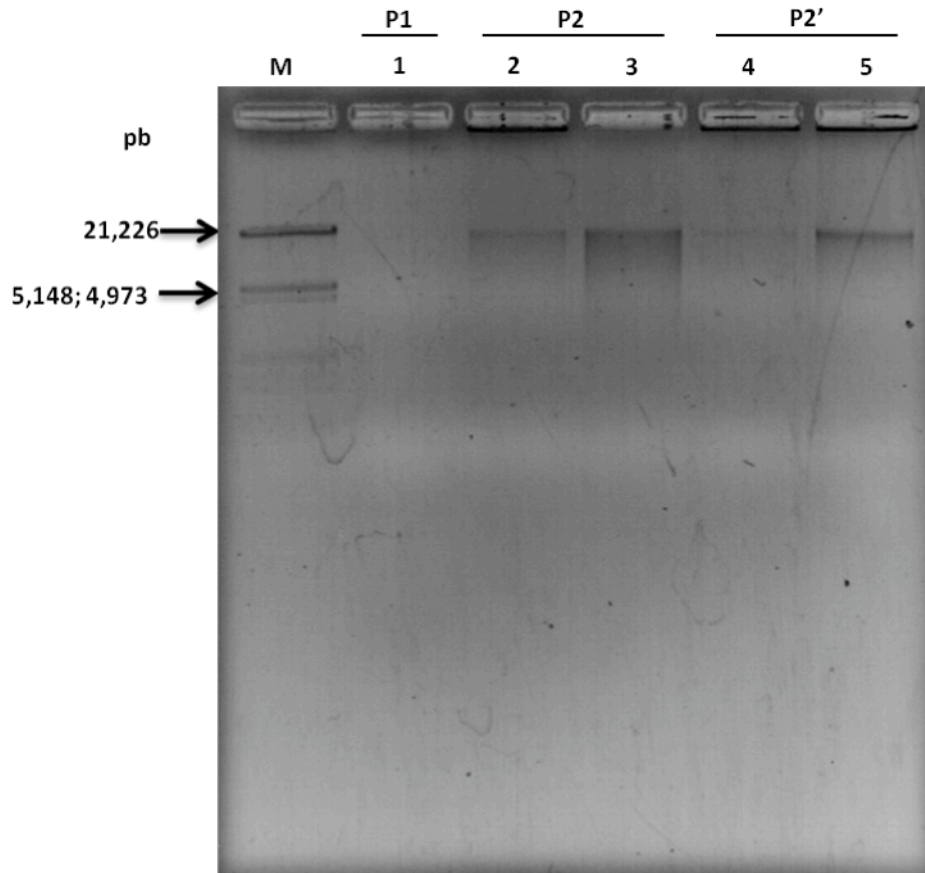


Figura 3. Gel de agarosa que muestra las bandas de ADN metagenómico extraído con el kit UltraClean™ Water DNA Isolation. M, ADN del fago λ (*HindIII/EcoRI*); carril 1, muestra procesada proveniente del punto 1 (P1), sin ADN apreciable; carriles 2 y 3, ADN metagenómico obtenido a partir de la muestra tomada en el punto 2 (P2); carriles 4 y 5, ADN metagenómico obtenido a partir de la muestra tomada en el punto 2' (P2'); pb = pares de bases.

7.4 Amplificación de los genes ribosómicos 16S

Los genes que codifican para el ARN ribosómico 16S de bacterias y arqueas se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde el ADN aislado de los puntos 2 y 2', la respectiva combinación de oligonucleótidos y las condiciones descritas en Materiales y Métodos. El punto 1 quedó excluido a partir de este experimento debido a que no se logró obtener ADN de las muestras procesadas. En la figura 4 se presentan los resultados obtenidos.

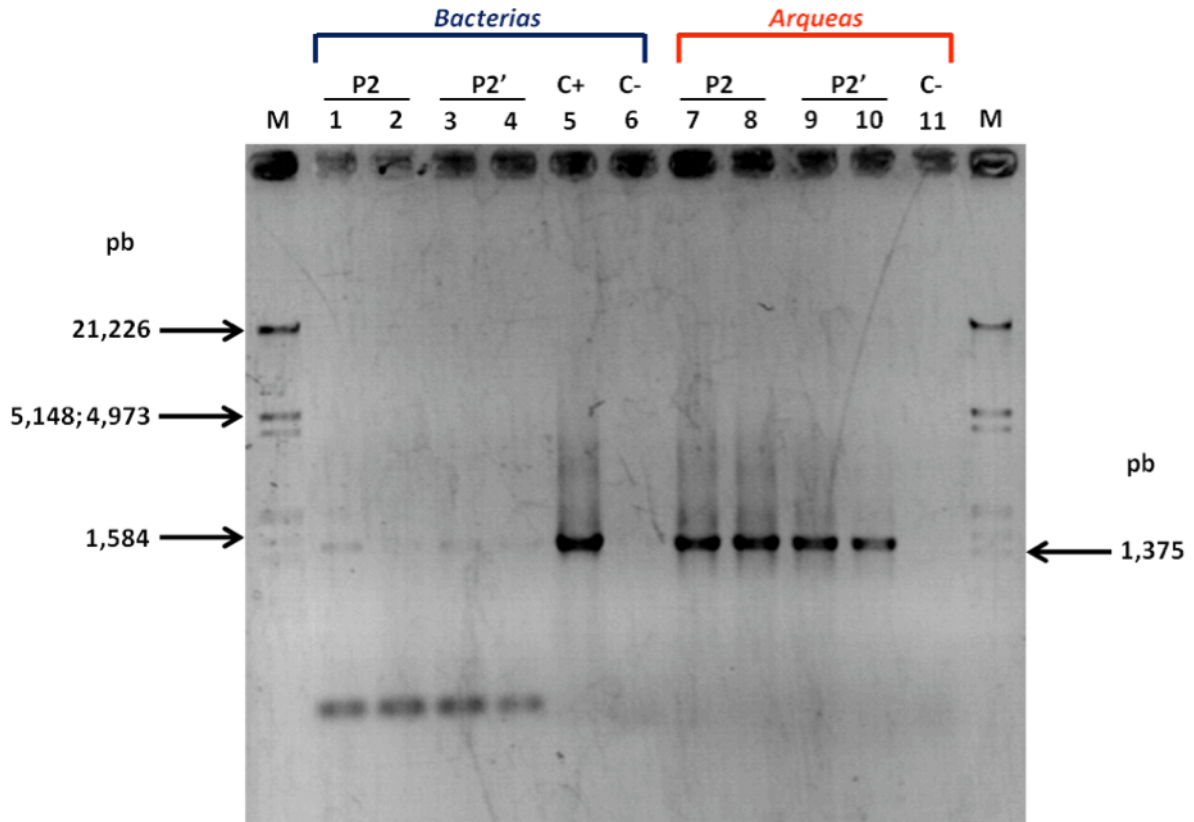


Figura 4. Gel de agarosa que muestra la amplificación de los genes 16S de bacterias y arqueas. M, ADN del fago λ (*HindIII/EcoRI*), utilizado como marcador de tamaño molecular. *Bacterias*: carriles 1 y 2, reacciones de PCR del punto 2; carriles 3 y 4, reacciones de PCR del punto 2'; carril 5, control positivo (C+), en el que se usó ADN genómico de *E. coli* JM101 como templado; carril 6, control negativo (C-), sin ADN templado. *Arqueas*: carriles 7 y 8, reacciones de PCR del punto 2; carriles 9 y 10, reacciones de PCR del punto 2'; carril 11, control negativo sin ADN templado. En estos últimos carriles se observa claramente las bandas de aproximadamente 1,400 pares de bases (pb), correspondientes a los genes 16S de arqueas.

En esta última figura se pueden observar con claridad las bandas de aproximadamente 1,400 pares de bases, valor que corresponde al tamaño esperado para los genes ribosómicos 16S de arqueas amplificados con la combinación de oligonucleótidos 21F y 1492R; la amplificación fue exitosa para los puntos 2 y 2'. En el caso de las reacciones de PCR en donde se utilizó el par de oligonucleótidos 27F y 1492R con la finalidad de amplificar los genes ribosómicos 16S pertenecientes a bacterias, a partir del ADN proveniente de los puntos antes mencionados, se observan bandas minoritarias con el tamaño que corresponde a lo esperado (1,400 pb), en comparación con el fragmento de mismo tamaño amplificado del control positivo (*E. coli* JM101). Adicionalmente, se

observan bandas de menor tamaño que corresponden a fragmentos amplificados de manera inespecífica.

7.5 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR correspondientes a los genes que codifican para el ARN ribosómico 16S de arqueas fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, como se describe en el Materiales y Métodos, y los resultados se muestran en la figura 5. Las bandas que se observan en la fotografía del gel de agarosa corresponden a los productos de PCR purificados.

7.6 Clonación de los productos de PCR y transformación en *E. coli* JM101

La clonación de los genes ribosómicos 16S de arqueas del punto 2 y 2', se realizó en el vector pGEM®-T Easy, como está descrito en materiales y métodos. Con la mezcla de ligación se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* JM101 que se seleccionaron en placas de ALB con Ap¹⁰⁰, X-gal e IPTG, eligiendo las colonias de color blanco resistentes a ampicilina. Un total de 240 clonas fueron obtenidas como resultado; de este total, se seleccionaron 24 clonas al azar (designadas como: MAAR 1-24), a las que se les realizó un aislamiento de ADN plasmídico para corroborar la presencia de los plásmidos recombinantes (pGAAR) (figura 6). Posteriormente, los plásmidos fueron digeridos con la enzima *EcoRI* para liberar el fragmento clonado. El resultado de la digestión se muestra en la figura 7 donde se observan los fragmentos liberados del vector pGEM®-T-Easy con un tamaño de aproximadamente 1,400 pb que corresponde al tamaño de los productos de PCR clonados.

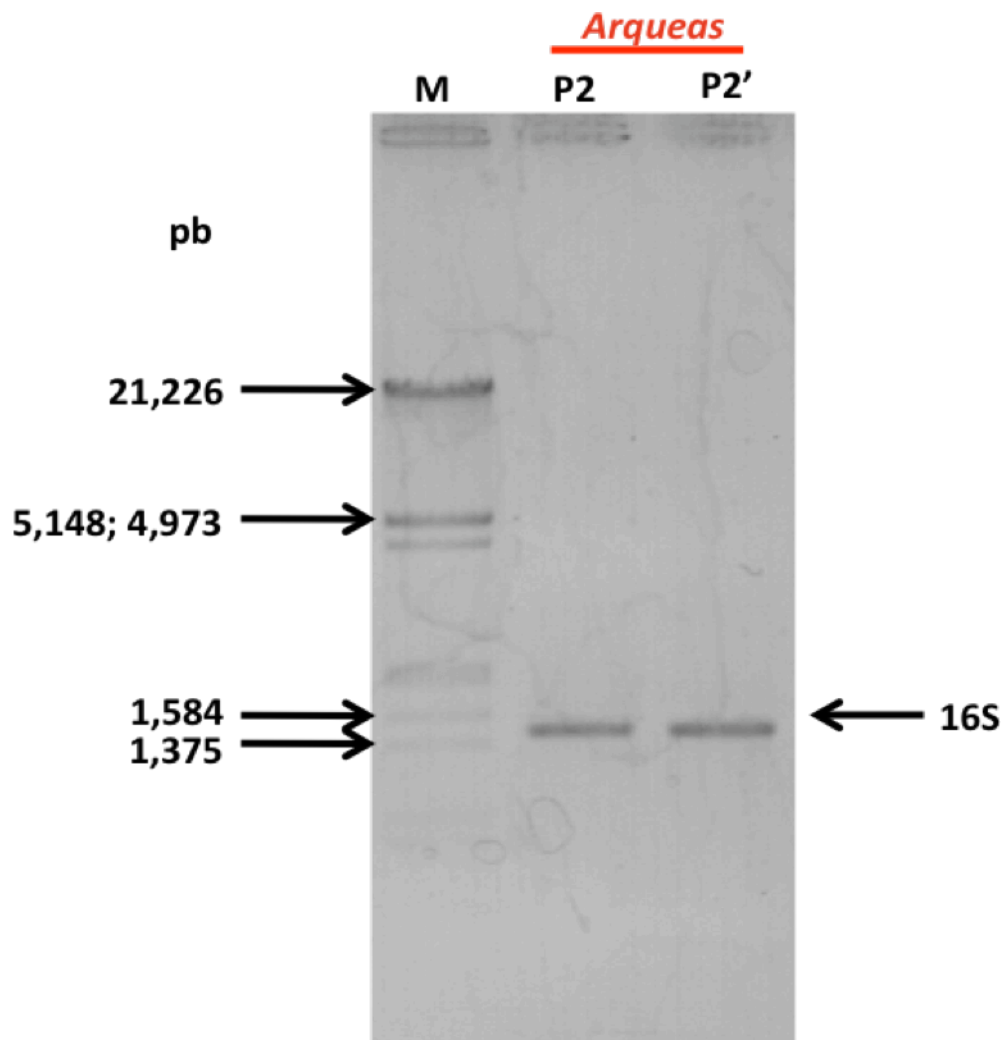


Figura 5. Gel de agarosa que muestra los productos de PCR (genes 16S de arqueas), purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. M, ADN del fago λ (*HindIII/EcoRI*): carriles P2 v P2'. fragmentos purificados de los puntos 2 v 2' respectivamente.

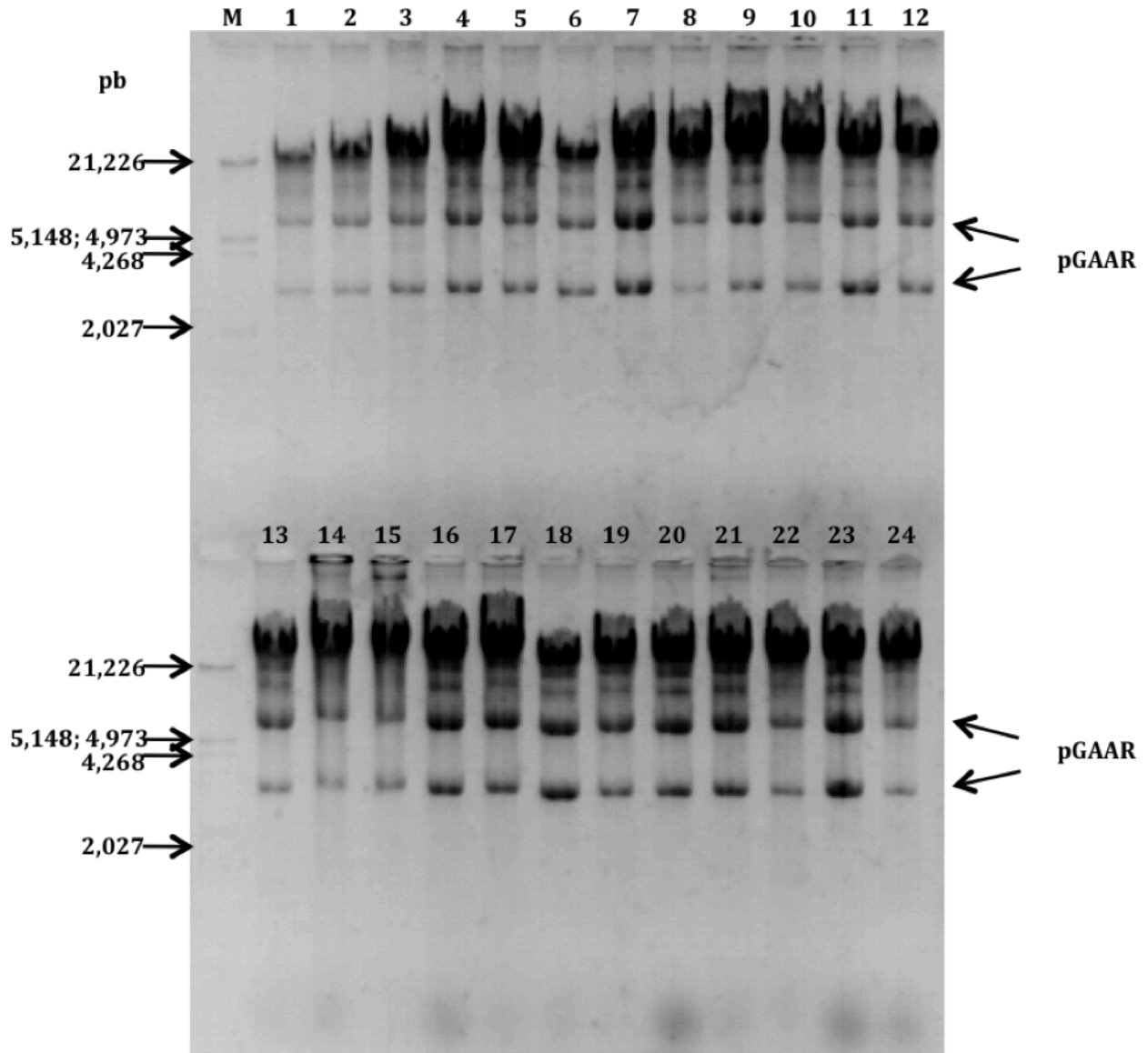


Figura 6. Gel de agarosa que muestra el aislamiento de plásmidos de las 24 clonas seleccionadas. M, ADN del fago λ (*Hind*III/*Eco*RI); carriles 1-24, plásmidos recombinantes pGAAR aislados de *E. coli* JM101 mediante lisis alcalina.

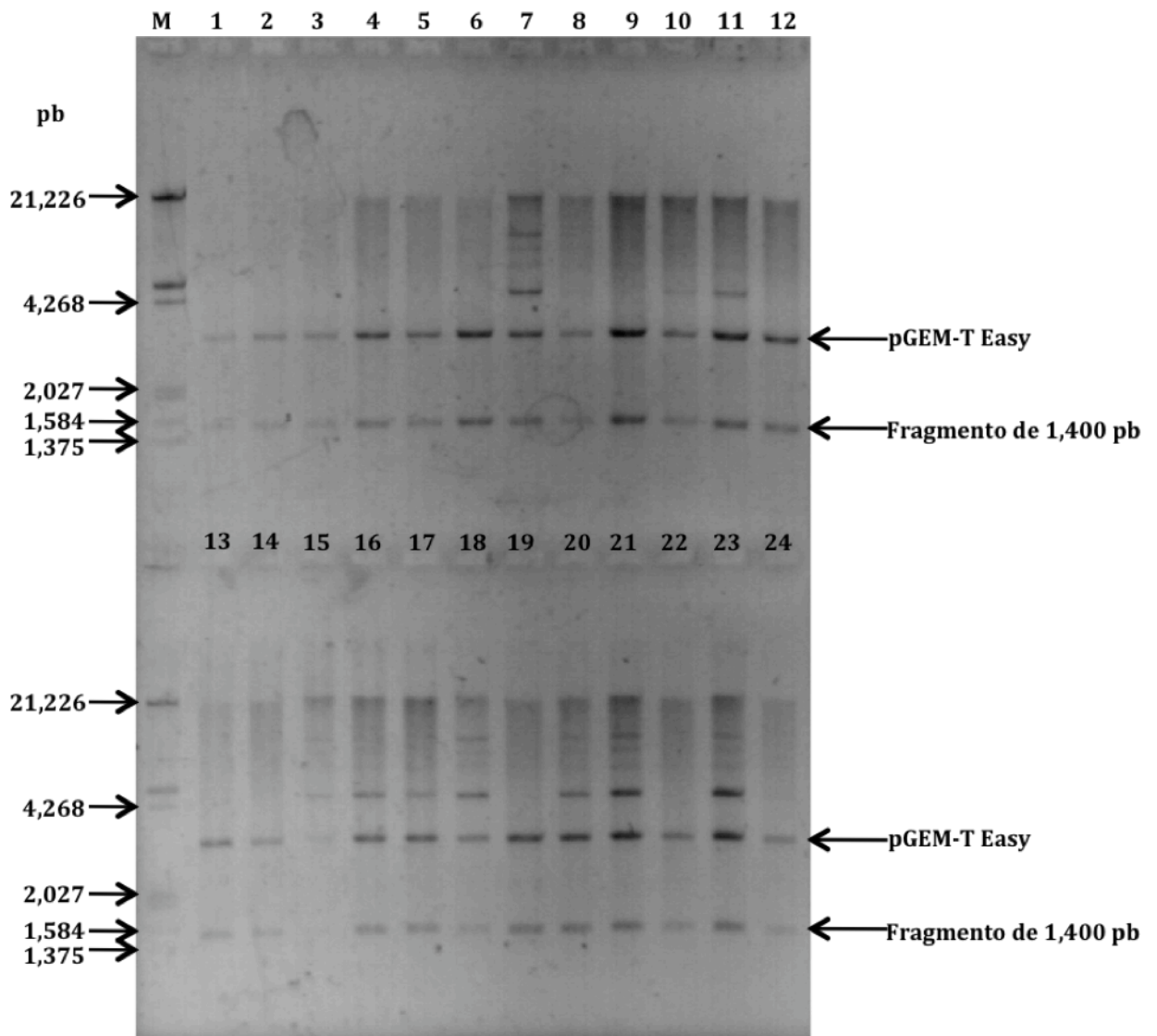


Figura 7. Gel de agarosa que muestra la digestión de los plásmidos recombinantes pGAAR con la enzima *EcoRI*. M, ADN del fago λ (*HindIII/EcoRI*); carriles 1-24, fragmentos de aproximadamente 1,400 pares de bases (pb), liberados del vector pGEM-T Easy.

7.7 Secuenciación y búsqueda de homólogos

Después de corroborar que las 24 clonas seleccionadas tenían el inserto del tamaño esperado, se aislaron nuevamente los plásmidos, se purificaron y se secuenciaron de manera parcial, utilizando el oligonucleótido M13 Forward. Las 24 secuencias parciales obtenidas conservaron la designación MAAR 1-24; el tamaño promedio de las secuencias fue de 774 nucleótidos. De las 24 secuencias, se buscaron aquellas que fueran idénticas entre sí, con la finalidad de agruparlas en unidades taxonómicas operativas (OTU's), tal como se describe en materiales y métodos. Como resultado de este análisis se obtuvieron 3 OTU's, representadas por 5 secuencias seleccionadas en base a su longitud. En el OTU 1 quedaron agrupadas 21 secuencias en total de las que se seleccionaron 2 secuencias (MAAR 2 y MAAR 13) como representativas de este grupo. El OTU 2 quedó conformado por las secuencias MAAR 16 y MAAR 17 y el OTU 3 quedó representado por una secuencia: MAAR 4. Con las 5 secuencias seleccionadas se realizó un análisis para buscar secuencias quiméricas con el programa Bellerophon (Huber et al., 2004). Como resultado se obtuvo que la secuencia MAAR 4 tenía un posible origen quimérico y por esta razón se descartó de los análisis subsecuentes.

Con las secuencias pertenecientes a los OTU's 1 y 2, se realizó la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos del GenBank (NCBI), utilizando el programa BLASTN. Los resultados de esta búsqueda mostraron que las secuencias de los genes ribosómicos pertenecientes a los microorganismos de Marítaro tuvieron identidades menores al 97% con los géneros *Acidianus* y *Thermoproteus*, respectivamente. Estos dos géneros pertenecen al dominio *Archaea* y se han encontrado en otros manantiales termales ácidos con diferentes rangos de temperatura y pH (Huber y Prangishvili, 2006; Huber et al., 2006). La figura 8 muestra la distribución de las clonas correspondientes a cada OTU.

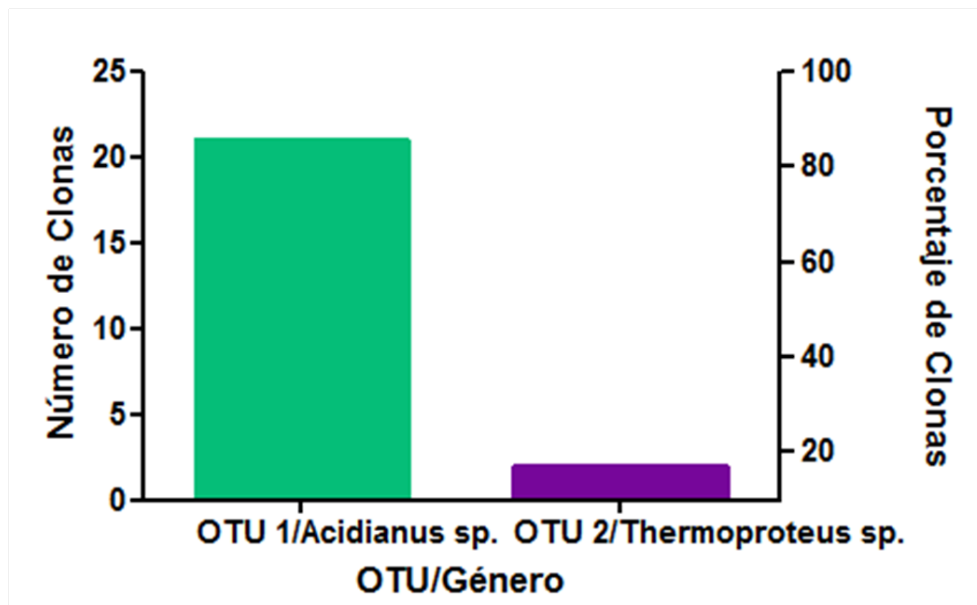


Figura 8. Gráfica que muestra el número de clonas por cada OTU. OTU 1/*Acidianus sp.*: 21 clonas (91.3%); OTU 2/*Thermoproteus sp.*: 2 clonas (8.7%).

7.8 Ensamblado de “contigs”

Mediante el alineamiento tipo BLAST de las secuencias MAAR 2, 13, 16 y 17 en nuestra base de datos local, se observó que se alinearon en los extremos terminales, formando así un área de empalme donde se encontraban nucleótidos comunes a ambas secuencias. Por esta razón, se decidió ensamblar un “contig” por cada par de secuencias como se describe en materiales y métodos y como se ilustra en la figura 9. Un “contig” es un conjunto de fragmentos de secuencia que han sido ordenados en un trecho lineal contiguo sobre la base de que las secuencias se superponen o coinciden en los extremos de cada fragmento individual (Gibson y Muse, 2009).

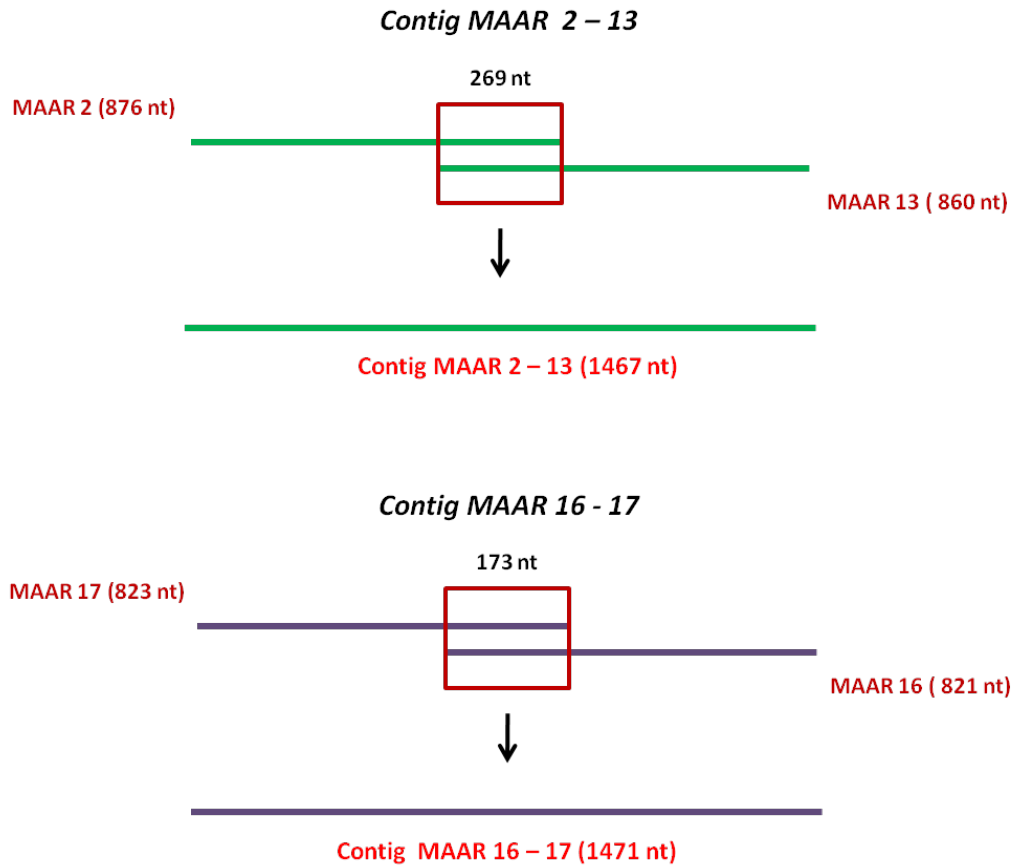


Figura 9. Ensamblado de los “contigs” MAAR 2-13 y MAAR 16-17. Las líneas en verde representan a las secuencias de nucleótidos MAAR 2 y MAAR13. Las líneas en morado representan a las secuencias de nucleótidos MAAR 17 y 16. En el recuadro rojo se muestra el área de empalme para cada par de secuencias y se indica el número de nucleótidos (nt) que comparten en cada caso. Las líneas señaladas por las flechas verticales representan los contigs ensamblados. Entre paréntesis se indica el tamaño en nucleótidos de cada fragmento y cada contig correspondiente.

Con la secuencia completa de cada contig se realizó nuevamente una búsqueda en el GenBank de secuencias homólogas mediante el programa BLASTN para seleccionar aquellas secuencias que presentaran mayor identidad y cobertura para llevar a cabo los análisis subsecuentes. En el cuadro 5 se muestran las secuencias homólogas más cercanas en términos de identidad para cada uno de los contigs analizados.

Cuadro 5. Catalogación de secuencias

OTU	No. de clonas	Secuencia representativa (tamaño)	Secuencia más cercana en NCBI-GenBank (% de identidad)
1	21	Contig MAAR 2-13 (1467 nt)	<i>Acidianus infernus</i> (92%) <i>Acidianus ambivalens</i> (92%) Unc. archaeon clone MTC-B Clone 2C (92%)
2	2	Contig MAAR 16-17 (1471 nt)	<i>Thermoproteus tenax</i> YS44 (96%) <i>Thermoproteus sp.</i> CBA1502 (96%) Unc. Thermoproteales archaeon clone YNP ObP A166 (94%)

7.9 Filogenias moleculares

Los alineamientos de los contigs MAAR 2-13 y MAAR 16-17 con las secuencias homólogas descargadas del GenBank se llevaron a cabo en la manera descrita en materiales y métodos. Las secuencias homólogas a las que se hace referencia corresponden a secuencias de genes ribosómicos 16S pertenecientes a organismos tanto cultivables como no cultivables provenientes de otros estudios ambientales similares.

La construcción de los árboles filogenéticos se realizó por tres métodos diferentes. Un método basado en la estimación de distancias evolutivas: Neighbor-Joining (NJ, vecino más cercano) y dos métodos basados en el estado de los caracteres (bases en la secuencia), también conocidos como métodos de búsqueda de árboles: Máxima Parsimonia (MP), y Maximum Likelihood (ML, máxima verosimilitud) (Holder y Lewis, 2003; Sleator, 2011). En las figuras 11 a 14 se muestran los árboles filogenéticos obtenidos por cada método de análisis. En la figura 10 se presenta un

árbol patrón construido con las secuencias homólogas descargadas del GenBank en el que se excluyeron las secuencias obtenidas en este trabajo. El propósito de este árbol es mostrar el “marco” o panorama evolutivo en el cual se incluirían posteriormente nuestras secuencias. En cada uno de los árboles, exceptuando al que se muestra en la figura 14, se utilizaron como grupos externos las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las bacterias *Aquifex pyrophilus* (M83548) y *Thermotoga hypogea* (NR_029205) para colocar la raíz.

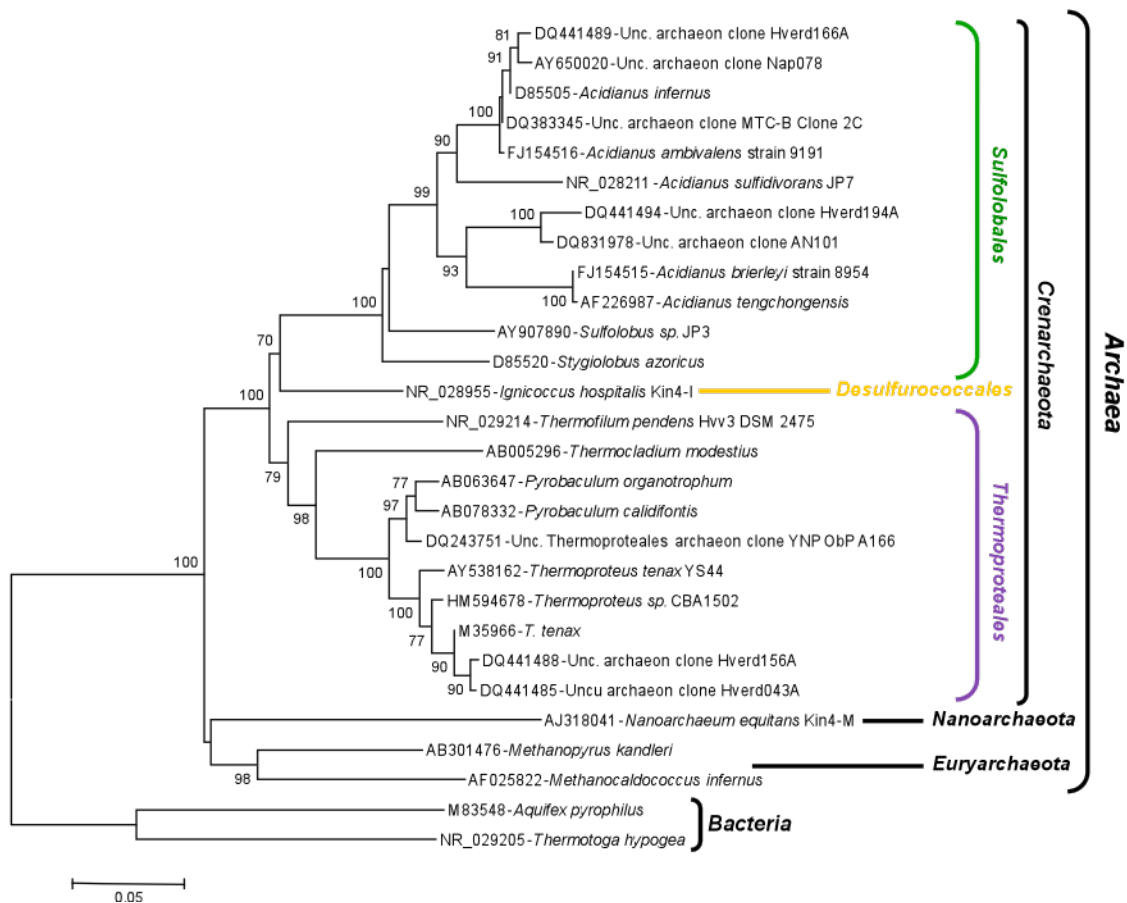


Figura 10. Árbol patrón. El árbol filogenético fue construido con el método de Neighbor-Joining. Los valores bootstrap sobre los nodos se obtuvieron a partir de 1,000 repeticiones (sólo los valores mayores al 50% están indicados). Los números en los ápices de las ramas son los números de acceso de las secuencias en GenBank. Los corchetes y las leyendas en color indican el grupo taxonómico al que pertenecen las secuencias. Las bacterias *Aquifex pyrophilus* y *Thermotoga hypogea* fueron utilizadas como grupos externos. La escala inferior indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

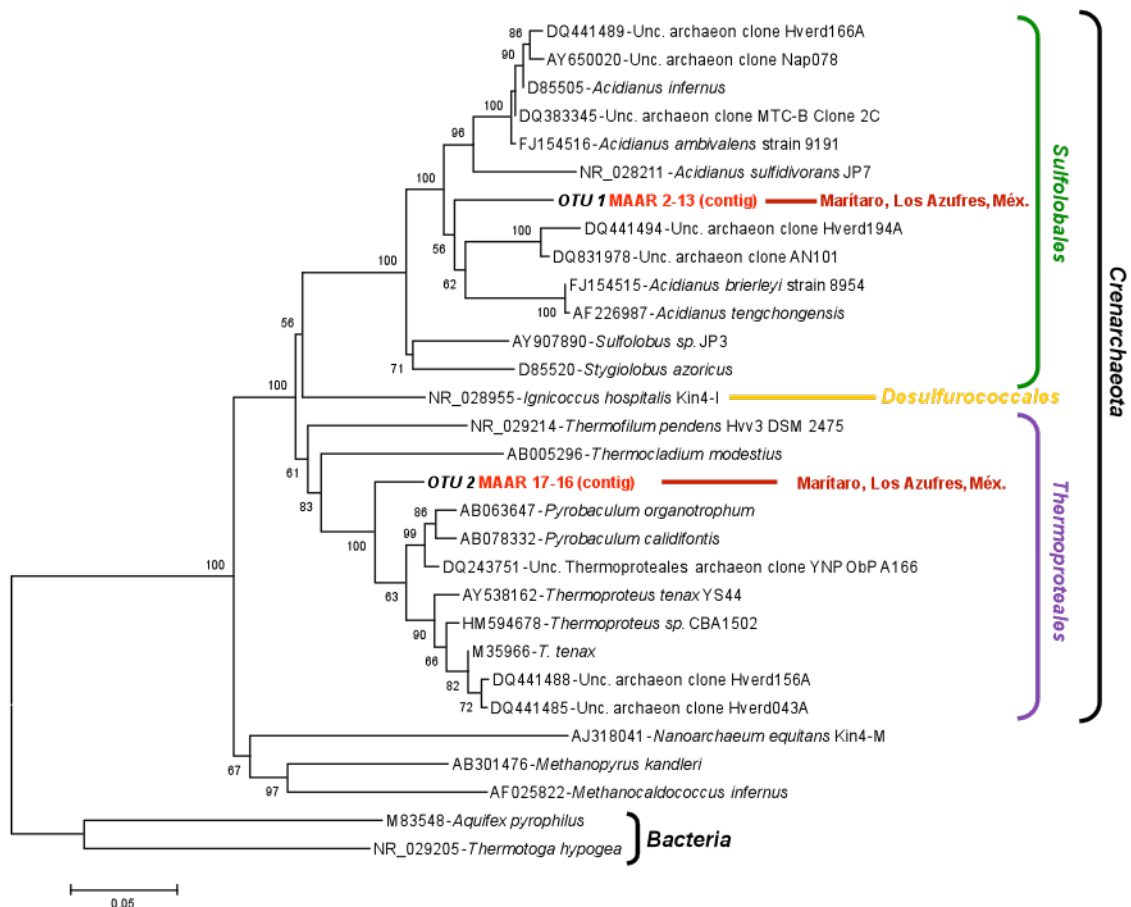


Figura 11. Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining (NJ) de las secuencias MAAR 2-13 y MAAR 17-16. El árbol muestra las relaciones filogenéticas de las secuencias de los genes ARNr 16S de las arqueas obtenidas de las muestras provenientes de Marítaro (en rojo). Los valores bootstrap sobre los nodos se obtuvieron a partir de 1,000 repeticiones (sólo los valores mayores al 50% están indicados). Los números en los ápices de las ramas son los números de acceso de las secuencias en GenBank. Los corchetes y las leyendas en color indican el grupo taxonómico al que pertenecen las secuencias. Las bacterias *Aquifex pyrophilus* y *Thermotoga hypogea* fueron utilizadas como grupos externos. La escala inferior indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

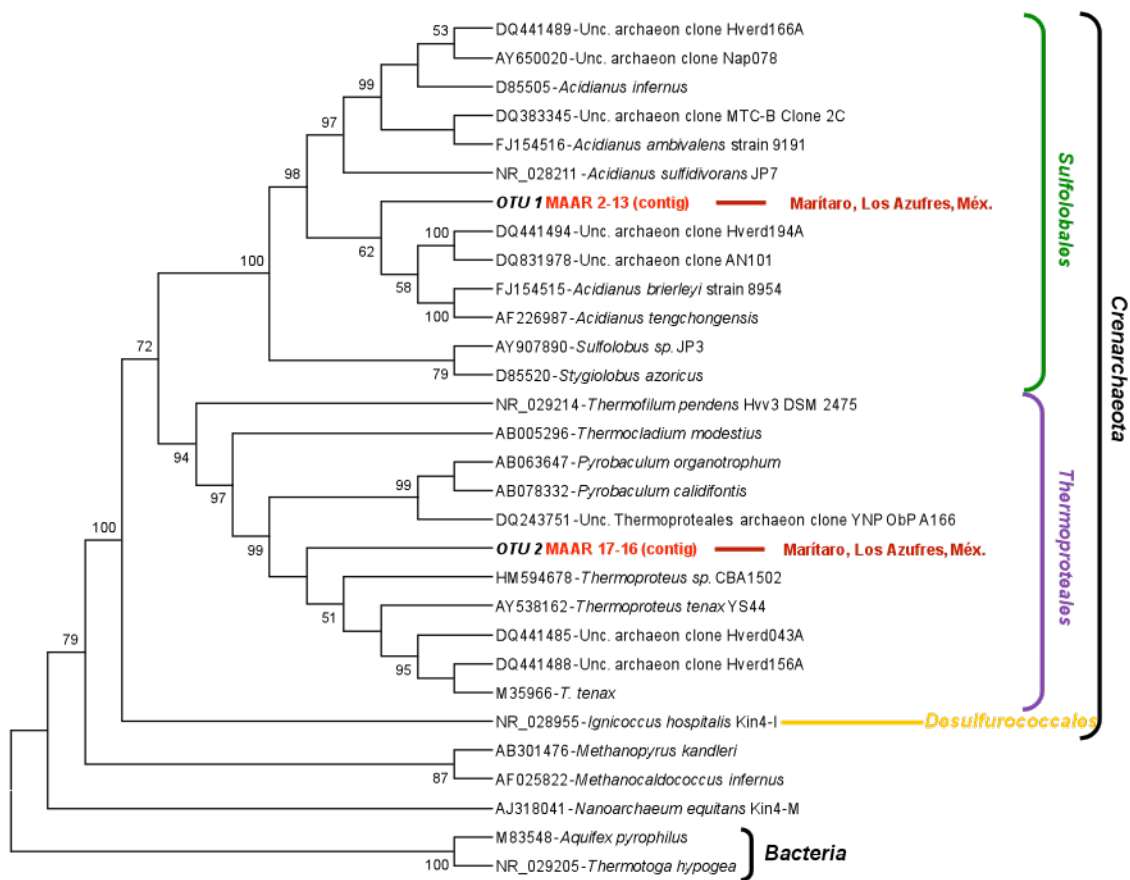


Figura 12. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia (MP) de las secuencias MAAR 2-13 y MAAR 17-16. El árbol muestra las relaciones filogenéticas de las secuencias de los genes ARNr 16S de las arqueas obtenidas de las muestras provenientes de Marítaro (en rojo). Los valores bootstrap sobre los nodos se obtuvieron a partir de 500 repeticiones (sólo los valores mayores al 50% están indicados). Los números en los ápices de las ramas son los números de acceso de las secuencias en GenBank. Los corchetes y las leyendas en color indican el grupo taxonómico al que pertenecen las secuencias. Las bacterias *Aquifex pyrophilus* y *Thermotoga hypogea* fueron utilizadas como grupos externos.

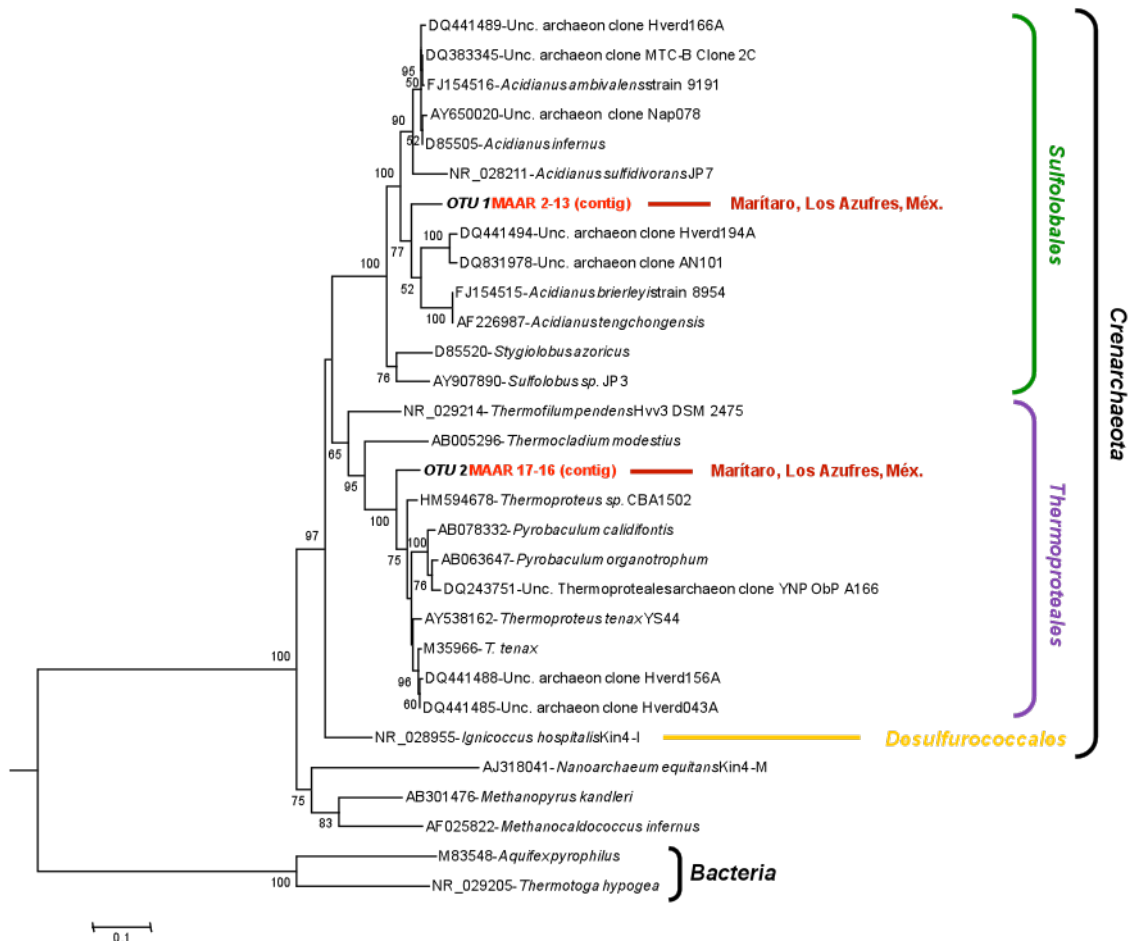


Figura 13. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) de las secuencias MAAR 2-13 y MAAR 17-16. El árbol muestra las relaciones filogenéticas de las secuencias de los genes ARNr 16S de las arqueas obtenidas de las muestras provenientes de Marítaro (en rojo). Los valores bootstrap sobre los nodos se obtuvieron a partir de 100 repeticiones (sólo los valores mayores al 50% están indicados). Los números en los ápices de las ramas son los números de acceso de las secuencias en GenBank. Los corchetes y las leyendas en color indican el grupo taxonómico al que pertenecen las secuencias. Las bacterias *Aquifex pyrophilus* y *Thermotoga hypogea* fueron utilizadas como grupos externos. La escala inferior indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

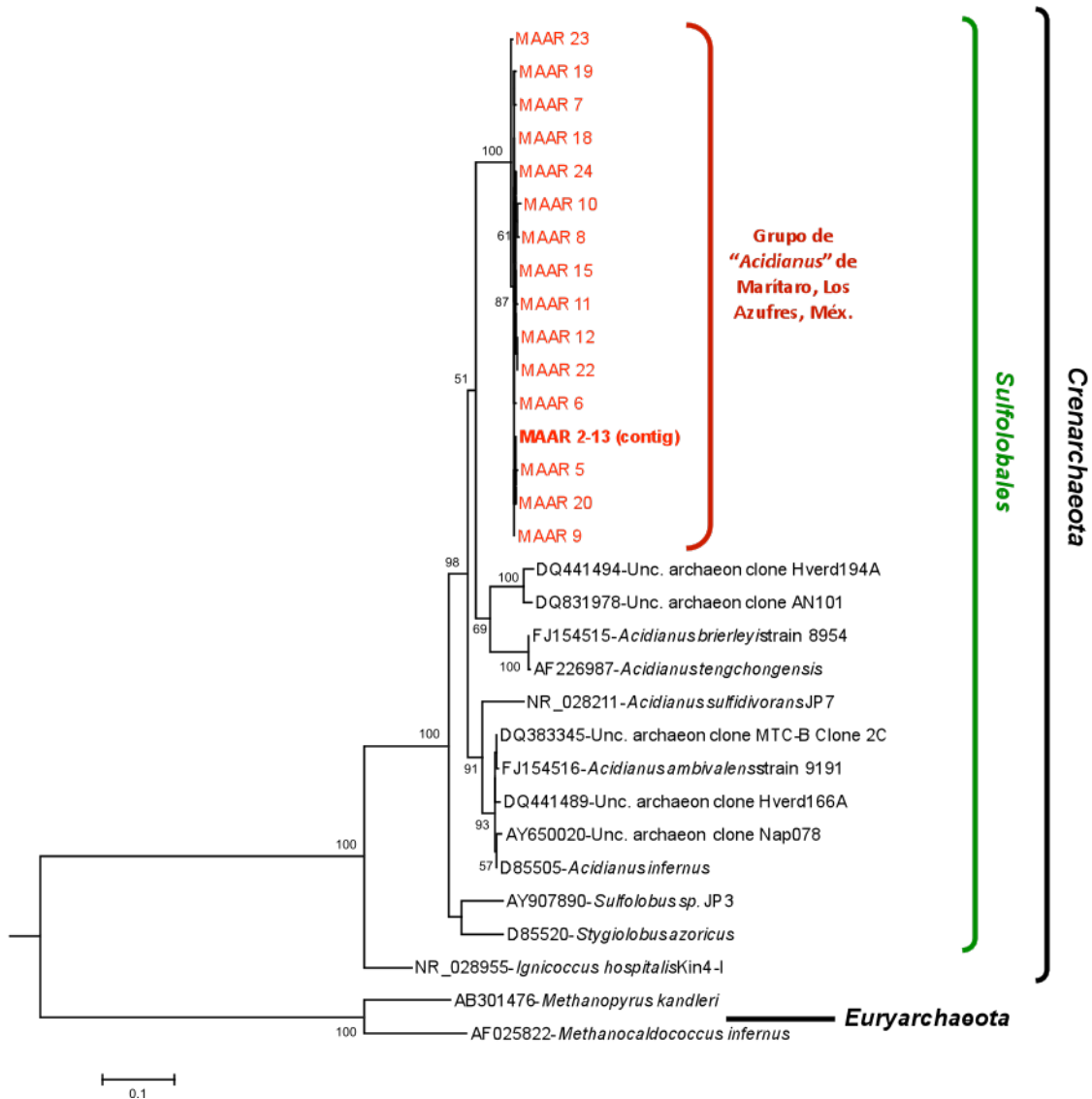


Figura 14. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) de las secuencias MAAR 2-13 y las secuencias individuales agrupadas en el OTU 1 (Grupo de "Acidianus" de Marítaro). El árbol muestra las relaciones filogenéticas de las secuencias de los genes ARNr 16S de las arqueas obtenidas de las muestras provenientes de Marítaro (en rojo). Los valores bootstrap sobre los nodos se obtuvieron a partir de 100 repeticiones (sólo los valores mayores al 50% están indicados). Los números en los ápices de las ramas son los números de acceso de las secuencias en GenBank. Los corchetes y las leyendas en color indican el grupo taxonómico al que pertenecen las secuencias. Las bacterias *Aquifex pyrophilus* y *Thermotoga hypogea* fueron utilizadas como grupos externos. La escala inferior indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

7.9.1 Árbol patrón

La figura 10 que corresponde al árbol patrón obtenido por el método de Neighbor-Joining, muestra las relaciones filogenéticas existentes entre las secuencias homólogas a MAAR 2-13 y MAAR 16-17, descargadas del GenBank con fines comparativos. Estas secuencias se agruparon de manera consistente, quedando definidos los órdenes *Sulfolobales*, *Thermoproteales* y *Desulfurococcales* del phylum *Crenarchaeota*. Las secuencias pertenecientes a los phyla *Nanoarchaeota* y *Euryarchaeota* sirvieron como un grupo externo adicional al de las secuencias bacterianas. Este árbol se utilizó como “marco evolutivo” para determinar las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas en este trabajo.

En los árboles que se muestran en las figuras 11 a 13, están incluidas las secuencias que se obtuvieron en este trabajo; éstos presentaron una topología similar, independientemente del método utilizado.

7.9.2 Secuencia MAAR 2-13

La secuencia MAAR 2-13, representativa del OTU 1, quedó agrupada con las secuencias pertenecientes a diferentes especies descritas del género *Acidianus* y con otras secuencias de origen ambiental relacionadas filogenéticamente con este género. Su posición dentro de este grupo está soportada en los tres árboles (figuras 11 a 13), por los valores de bootstrap sobre el nodo que indica que todas estas secuencias comparten un ancestro común: 100 (NJ), 98 (MP) y 100 (ML). En los árboles también se puede observar que la secuencia MAAR 2-13 está relacionada con más cercanía tanto a *Acidianus brierleyi* 8954 (FJ154515) como a la secuencia de una arquea no cultivable (clona AN101; DQ831978). Sin embargo, estas relaciones no están muy bien definidas como lo indican los bajos valores de bootstrap. Finalmente, y de manera más general, los árboles nos muestran que la secuencia MAAR 2-13 pertenece al orden *Sulfolobales* del phylum *Crenarchaeota*.

7.9.3 Secuencia MAAR 16-17

La secuencia MAAR 16-17, representativa del OTU 2, quedó agrupada con las secuencias pertenecientes al orden *Thermoproteales* del phylum *Crenarchaeota*. Esta secuencia forma un grupo monofilético al compartir un ancestro común con las arqueas cultivables de los géneros *Pyrobaculum* y *Thermoproteus*. Este grupo incluyó también, secuencias de arqueas no cultivables obtenidas a partir de muestras ambientales colectadas en pozas termales de Yellowstone (clona YNP ObP A166; DQ243761) (Meyer-Dombard et al., 2005) e Islandia (clonas Hverd043A y Hverd156A; DQ441485 y DQ441488, respectivamente) (Kvist et al., 2007). En dos de los árboles filogenéticos (figuras 11 y 13, respectivamente) la relación de la secuencia MAAR 16-17 con el grupo de secuencias antes mencionadas está soportada por los valores de bootstrap sobre el nodo que las conecta (100% en ambos casos). A su vez, este grupo comparte un ancestro común con *Thermocladium modestius* (AB005296), soportado por los valores de bootstrap para ese nodo. Esto último sugiere que la secuencia MAAR 16-17 pertenece a la familia *Thermoproteaceae*. El árbol obtenido por el método de máxima parsimonia (MP) presenta una topología diferente del clado que define al orden *Thermoproteales* al compararla con los otros métodos. En éste, la secuencia MAAR 16-17 forma un grupo con las especies del género *Thermoproteus* aunque con un valor de bootstrap inferior al 50%. Sin embargo, el valor de bootstrap sobre el nodo donde se bifurcan las secuencias de *Pyrobaculum* y *Thermoproteus* (99%), sugiere nuevamente que nuestra secuencia pertenece a la familia *Thermoproteaceae* y que la relación con alguna de las secuencias ya reportadas es incierta. En los árboles obtenidos por NJ y ML se observa que aunque la secuencia MAAR 16-17 y el grupo que incluye a las secuencias de *Pyrobaculum* y *Thermoproteus* se derivan de una secuencia ancestral común, la relación con alguna secuencia particular de ese grupo no está bien definida. En otras palabras, la secuencia MAAR 16-17 se bifurca mucho antes que el resto de las secuencias. Todo lo anterior sugiere que esta secuencia podría pertenecer a una especie o incluso a un género novedoso dentro del orden *Thermoproteales*.

7.9.4 Grupo de “*Acidianus*” de Marítaro

La figura 14 muestra el árbol filogenético que se construyó con la secuencia MAAR 2-13 y varias de las secuencias agrupadas en el OTU 1 que tuvieron la misma orientación. El árbol nos sugiere que todas las secuencias incluidas en el OTU 1 pertenecen a una población de la misma especie de arquea ya que forman un clado en el que comparten un ancestro común (nodo con valor de bootstrap del 100%). Además, el número de sustituciones nucleotídicas entre las secuencias analizadas es mínimo si se toma en cuenta la longitud de la escala (barra en la parte inferior de la figura). Esto último nos sugiere que las secuencias analizadas son casi idénticas entre sí. No obstante, las diferencias existentes entre las secuencias de los genes ribosómicos de esta población pueden atribuirse a variaciones alélicas entre los miembros de la población, a la incorporación de errores por la polimerasa utilizada en la reacción de PCR y/o a errores de secuenciación (Barns et al., 1994). Este grupo se designó como el grupo de “*Acidianus*” de Marítaro debido a que comparten un ancestro común con algunas especies de este género de arqueas (*Acidianus brierleyi* 8954 y *A. tengchongensis*; FJ154515 y AF226987, respectivamente), aunque con un valor bajo de bootstrap sobre el nodo que conecta a ambos grupos (51%). Sin embargo, este subgrupo quedó incluido en el grupo que relaciona a todas las secuencias de *Acidianus* consideradas en este análisis (nodo con valor de bootstrap de 98%). Es importante destacar que la topología de este árbol es muy similar a la que presentan los árboles donde solamente se incluyó la secuencia MAAR 2-13. Todo lo anterior sugiere que las secuencias del OTU 1 pertenecen al orden *Sulfolobales* y considerando los resultados de los análisis previos, se sugiere que la secuencia MAAR 2-13 pertenece a una especie de arquea no descrita dentro del género *Acidianus*.

7.10 Índice de diversidad de Shannon

El significado del valor numérico del índice de diversidad de Shannon se explicó en la sección de materiales y métodos. El valor numérico que se obtuvo fue de $H' = 0.29$. Dado que el valor es muy próximo a cero se puede concluir que la diversidad de arqueas en el manantial de Marítaro es baja.

VIII. DISCUSIÓN

El propósito principal de este trabajo fue estudiar la diversidad microbiana del manantial termal ácido de Marítaro ubicado en el campo geotérmico de Los Azufres, Michoacán mediante métodos independientes del cultivo. Para cumplir con los objetivos planteados, se aisló el ADN a partir de muestras ambientales tomadas en pozas de lodo con valores de pH y temperatura distintos, se amplificaron los genes que codifican para el ARN ribosómico 16S de bacterias y arqueas y se realizaron los análisis filogenéticos con las secuencias obtenidas para determinar la diversidad microbiana del lugar en base a sus relaciones evolutivas. Esta aproximación fue adoptada para nuestro trabajo ya que, en principio, permite el acceso al ADN de todos los microorganismos presentes en la muestra, sean cultivables o no (Pace 1997; Hugenholtz 2001). Sin embargo, en la práctica no siempre es posible acceder a todos los miembros que conforman una comunidad microbiana en un ambiente determinado debido a que existen limitaciones propias de la metodología en cada una de sus etapas como son: la extracción diferencial del ADN genómico o la degradación de éste, sesgos en la amplificación de los genes ribosómicos 16S por parte de los oligonucleótidos seleccionados debido a su especificidad, introducción de mutaciones y formación de secuencias quiméricas durante la reacción de PCR, diferencias en la eficiencia de la clonación de los fragmentos amplificados, entre otras (von Wintzingerode et al., 1997). Pese a estas limitaciones, la mayor virtud de esta metodología es que permite el acceso a microorganismos no cultivables que se encuentran en una muestra ambiental determinada, superando así a los métodos microbiológicos tradicionales que sólo son capaces de recuperar aproximadamente el 1% de la diversidad microbiana que reside en un ambiente particular (Amann et al., 1995; Pace 1997).

La obtención de ADN metagenómico íntegro y libre de sustancias contaminantes es un paso crucial para el éxito en este tipo de estudios. En este trabajo se confrontó desde el principio con la dificultad para obtener ADN de buena calidad utilizando el método descrito por Hetzer et al. (2007). Este método fue utilizado con éxito en la extracción de ADN a partir de muestras de agua colectadas en Champagne Pool, un manantial termal y ligeramente ácido ubicado en Waiotapu, Nueva Zelanda (pH de 5.5 y

temperatura cercana a los 75°C). En nuestro caso, no pudimos obtener ADN a partir de la muestra proveniente del punto 1 con este método y el ADN obtenido de las muestras tomadas en los puntos 2 y 2' se degradó rápidamente en varias ocasiones (figura 2). Las razones de que haya ocurrido lo anterior pudieron ser dos principalmente: (1) el ADN se degrada en condiciones ácidas debido a la depurinización de la molécula y (2) la unión del ADN a la superficie de partículas muy finas o arcillas presentes en el medio se incrementa conforme disminuye el pH, lo que dificulta su extracción o compromete su pureza debido a la coextracción de esos componentes (Herrera y Cockell, 2007; Mitchell y Takacs-Vesbach, 2008). Debido a estos problemas se optó por utilizar un kit comercial diseñado especialmente para extraer ADN a partir de muestras ambientales de agua. Con este kit se pudo obtener ADN íntegro y limpio a partir de las muestras tomadas en los puntos 2 y 2' de Marítaro (figura 3). Sin embargo, aún con este protocolo que incorpora pasos cruciales en la purificación del ADN (uso de columnas; ver métodos) no se logró obtener ADN de la muestra colectada en el punto 1 y por esta razón, no se trabajó más con esta muestra.

Con el ADN metagenómico aislado de los puntos 2 y 2' se amplificaron correctamente los genes ribosómicos 16S de las arqueas presentes en Marítaro (Figura 4). Estos genes fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y transferidos a *E. coli* y 24 clones positivos fueron seleccionados al azar de un total de 240. Los fragmentos clonados fueron secuenciados y con las secuencias se realizaron los análisis bioinformáticos correspondientes, se ensamblaron contigs con dos grupos de secuencias: MAAR 2-13 y MAAR 16-17. Con estas secuencias ensambladas se realizaron análisis filogenéticos con diferentes métodos y como resultado principal de este trabajo se encontró que la secuencia MAAR 2-13 podría pertenecer a una nueva especie de arquea dentro del género *Acidianus* (orden *Sulfolobales*), mientras que la secuencia MAAR 16-17 podría provenir de un género no reportado de arquea dentro del orden *Thermoproteales*. Estos resultados son interesantes ya que en diferentes estudios realizados en otros manantiales termales ácidos del mundo con diferentes rangos de temperatura y pH, se han encontrado secuencias relacionadas filogenéticamente con el género *Acidianus* o con otros miembros del orden *Sulfolobales* e incluso las especies cultivadas de este género se han aislado de ambientes

semejantes a Marítaro en términos fisicoquímicos (Kvist et al., 2005, 2007; Huber y Prangishvili, 2006). A su vez, también se han encontrado secuencias y aislado arqueas del orden *Thermoproteales* en otros manantiales semejantes al estudiado en este trabajo (Huber et al., 2006). Todo lo anterior sugiere que los órdenes *Sulfolobales* y *Thermoproteales* están representados en Marítaro por las dos secuencias no reportadas y de manera general sugiere que en los manantiales termales ácidos se encuentran muy a menudo organismos pertenecientes a estos dos órdenes del phylum *Crenarchaeota*. Esto último coincide con los patrones de abundancia y distribución de los miembros de estos dos órdenes encontrados en Yellowstone por Inskeep et al. (2010) quienes reportaron que en los manantiales termales ácidos con valores de pH más bajos (2.5 y 3.0) las secuencias relacionadas filogenéticamente al orden *Sulfolobales* estuvieron mejor representadas (i. e. fueron dominantes con aproximadamente un 60% del total de las secuencias obtenidas) en comparación con las secuencias relacionadas a los miembros de los órdenes *Desulfurococcales* (~12%) y *Thermoproteales* (~5%). En manantiales con valores de pH ligeramente ácidos (6.1) o neutros las secuencias relacionadas al orden *Thermoproteales* estuvieron mejor representadas (~50%) en comparación con las relacionadas al orden *Sulfolobales* (Inskeep et al., 2010). Los manantiales 2 y 2' de Marítaro estudiados en este trabajo tuvieron valores de pH de 2.5 y 3, respectivamente, al momento del muestreo y de manera semejante a los resultados reportados por Inskeep et al. (2010), los resultados de este trabajo demuestran que del total de secuencias obtenidas y analizadas el 91.3% están relacionadas al género *Acidianus* (*Sulfolobales*) y el 8.7% están relacionadas al género *Thermoproteus* (*Thermoproteales*). En otro trabajo realizado por Stout et al. (2009) se estudio la diversidad de bacterias y arqueas de diferentes manifestaciones termales con pH ácido en la isla de Santa Lucía (Antillas Menores) y se encontró, de forma semejante a lo obtenido en este trabajo, que las secuencias relacionadas al género *Acidianus* aparecieron con mayor frecuencia en la biblioteca genómica construida a partir de los genes ribosómicos 16S de arqueas, dominando sobre la presencia de otros grupos de arqueas termofílicas incluyendo a las relacionadas al orden *Thermoproteales*. La predominancia de secuencias provenientes de organismos relacionados con *Acidianus* también se ha encontrado en otras zonas

geotérmicas, por ejemplo, en una poza a 98 °C y con un pH de 3.0 en la isla de Montserrat (Galway's Soufrière) (Burton y Norris, 2000) y en solfataras ácidas del campo Pisciarelli en Nápoles, Italia (Kvist et al., 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo y los obtenidos por Burton y Norris (2000), Kvist et al. (2005) y Stout et al. (2009) muestran una tendencia que sugiere que los organismos relacionados filogenéticamente al género *Acidianus* son los miembros dominantes de la comunidad de arqueas en los manantiales termales ácidos estudiados en cada trabajo mencionado. Sin embargo, en el estudio de diversidad microbiana realizado por Siering et al. (2006) en diferentes manifestaciones termales con pH ácido localizadas en el Parque Volcánico Nacional de Lassen (California, E. U. A.) se obtuvieron diferentes secuencias provenientes de arqueas relacionadas a los órdenes *Sulfolobales* y *Thermoproteales* principalmente, pero ninguna relacionada filogenéticamente con *Acidianus* y, por lo tanto, no refleja los resultados obtenidos en éste y otros trabajos antes mencionados respecto a la dominancia de este género. Las diferencias en la diversidad de microorganismos encontrados en diferentes sistemas geotérmicos puede deberse, a su vez, a las diferencias en las características fisicoquímicas de cada región que controlan la composición de especies en una comunidad dada (Stout et al., 2009; Inskip et al., 2010). No obstante, las diferencias observadas también pueden deberse a los sesgos inherentes de la metodología utilizada en éste y en los otros trabajos mencionados como son: la amplificación preferencial de los genes ribosómicos 16S de los miembros más abundantes de la comunidad con la exclusión de los microorganismos poco abundantes o bien porque los oligonucleótidos seleccionados pueden amplificar selectivamente los genes de ciertos grupos taxonómicos con los cuales pueden hibridar más eficientemente durante la reacción de PCR (von Wintzingerode et al., 1997).

Las especies del género *Acidianus* son organismos termoacidófilos, crecen en rangos de temperatura de 45 a 96 °C y en rangos de pH de 0.35 a 6.0, son aerobios facultativos, quimiolitótrofos y autótrofos al utilizar al CO₂ como única fuente de carbono (Plumb et al., 2007). Además, los miembros de este género pueden oxidar o reducir azufre elemental (S⁰) u oxidar sulfuros metálicos y Fe²⁺ en presencia de oxígeno (Huber y Prangishvili, 2006; Plumb et al., 2007). Considerando todas estas características y en

particular la capacidad de fijar CO₂, el organismo representado por la secuencia MAAR 2-13, considerado tentativamente en este trabajo como una nueva especie de *Acidianus*, pudiera desempeñar el papel de productor primario en Marítaro tomando en cuenta que su abundancia numérica, las condiciones fisicoquímicas y la composición geoquímica de Marítaro, favorecen esta situación.

Por otro lado, los miembros del orden *Thermoproteales* son termófilos o hipertermófilos que crecen en rangos temperatura de 45 a 102 °C y en rangos de pH de 2.5 a 9.0 (rango óptimo de 4.0 a 6.0), pueden crecer anaeróbicamente o de manera facultativa y pueden ser quimiolitótrofos facultativos o heterótrofos obligados (Huber et al., 2006). El organismo representado por la secuencia MAAR 16-17, considerado aquí como un nuevo género dentro del orden *Thermoproteales*, pudiera participar en la comunidad como consumidor si fuese heterótrofo obligado o bien como productor primario y consumidor si fuese quimiolitótrofo facultativo. Esta propuesta se plantea tomando en cuenta que en Marítaro existen las condiciones para que esto ocurra, ya que además de contar con las condiciones físicas y geoquímicas pertinentes, constantemente entra al sistema materia orgánica compleja derivada principalmente de plantas.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La diversidad de Arqueas en el manantial termal de Marítaro es reducida.
2. El manantial alberga a dos especies previamente no reportadas: una dentro del género *Acidianus* (*Sulfolobales*) y la otra dentro del orden *Thermoproteales* que podrían representar géneros distintos a los ya descritos.
3. *Acidianus sp.* es dominante en el manantial de Marítaro (91.3%) y su papel ecológico principal puede ser el de productor primario.
4. El nuevo género del orden *Thermoproteales* es el menos abundante (8.7%) y su papel principal puede ser el de consumidor.

X. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en el manantial de Marítaro existen nuevas especies de arqueas hipertermofílicas endémicas pertenecientes a los órdenes *Sulfolobales* y *Thermoproteales*.

XI. PERSPECTIVAS

1. Secuenciar el metagenoma obtenido en el manantial termal de Marítaro y realizar un análisis bioinformático y funcional para determinar el potencial metabólico de los organismos presentes.
2. Cultivar y caracterizar las arqueas encontradas en este estudio.

REFERENCIAS

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

Amann, R. I., W. Ludwig y K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143-169.

Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries y N. R. Pace. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91:1609-1613.

Birkle, P., B. Merkel, E. Portugal e I. S. Torres-Alvarado. 2001. The origin of reservoir fluids in the geothermal field of Los Azufres, Mexico – isotopical and hydrological indications. *Applied Geochemistry* 16:1595-1610.

Birnboim, H. C. y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523.

Brock T. D. 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag. New York, U.S.A. p. 1-11.

Brock T.D. 1986. Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology. John Wiley & Sons. U.S.A. 1 – 16pp.

Burton, N. P. y P. R. Norris. 2000. Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis. *Extremophiles* 4:315-320.

Castorena, G., V. Mugica, S. Le Borgne, M. E. Acuña, I. Bustos-Jaimes y J. Aburto. 2006. Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated

bacterium *Burkholderia* sp. strain IMP5GC. *Journal of Applied Microbiology* 100:739-745.

Chapelle, F. H., K. O'Neill, P. M. Bradley, B. A. Methe, S. A. Ciuffo, L. L. Knobel, y D. R. Lovley. 2002. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature* 415:312–315.

Ferrari, L., V. H. Garduño, G. Pasquarè y A. Tibaldi. 1991. Geology of the Los Azufres caldera, Mexico, and its relationships with regional tectonics. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 47:129-148.

Gibson, G. y S. V. Muse. 2009. A primer of genome science. 3^a edición. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, E. U. A. p. 1-64.

Gómez-Peralta, M. 1992. Contribución al conocimiento de los líquenes del campo geotérmico Los Azufres, Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana* 18:31-53.

González-Partida, E. 2000. Evidencias de evolución de un fluido básico a ácido a partir del análisis de la alteración hidrotermal del campo geotérmico de Los Azufres, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 17:76-82.

González-Partida, E., A. Carrillo-Chávez, G. Levresse, E. Tello-Hinojosa, S. Venegas-Salgado, G. Ramirez-Silva, M. Pal-Verma, J. Tritlla y A. Camprubi. 2005. Hydro-geochemical and isotopic fluid evolution of the Los Azufres geothermal field, Central Mexico. *Applied Geochemistry* 20:23-39.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 14:95-98.

Herrera, A. y C. S. Cockell. 2007. Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods* 70:1-12.

Hetzer, A., H. W. Morgan, I. R. McDonald y C. J. Daughney. 2007. Microbial life in Champagne Pool, a geothermal spring in Waiotapu, New Zealand. *Extremophiles* 11:605-614.

Hill, T. C. J., K. A. Walsh, J. A. Harris y B. F. Moffett. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 43:1-11.

Hobel, C. F. V. 2004. Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. Ph. D. thesis, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Iceland, Reykjavik, Iceland.

Holder, M. y P. O. Lewis. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics* 4:275-283.

Huber, H., R. Huber y K. O. Stetter. 2006. Thermoproteales. En: Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer y E. Stackebrandt (editores). *The Prokaryotes*. 3^a edición. Springer. Nueva York, N. Y., E. U. A. Vol. 3:10-22.

Huber, H. y D. Prangishvili. 2006. Sulfolobales. En: Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer y E. Stackebrandt (editores). *The Prokaryotes*. 3^a edición. Springer. Nueva York, N. Y., E. U. A. Vol. 3:23-51.

Huber, R., H. Huber y K. O. Stetter. 2000. Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiology Reviews* 24:615-623.

Huber, T., G. Faulkner y P. Hugenholtz. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20:2317-2319.

Hugenholtz, P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3(2): reviews0003.1-0003.8.

Hugenholtz P., C. Pitulle, K. L. Hershberger y N. R. Pace. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology* 180:366-376.

Inskeep, W., D. B. Rusch, Z. J. Jay, M. J. Herrgard, M. A. Kozubal et al. 2010. Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. *PLoS ONE* 5(3): e9773.

Ish-Horowicz, D. y J. F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research* 13:2989-2998.

Kvist, T., A. Mengewein, S. Manzei, B. K. Ahring y P. Westermann. 2005. Diversity of thermophilic and non-thermophilic crenarchaeota at 80 °C. *FEMS Microbiology Letters* 244:61-68.

Kvist, T., B. K. Ahring y P. Westermann. 2007. Archaeal diversity in Icelandic hot springs. *FEMS Microbiology Ecology* 59:71-80.

Martín-Cuadrado, A. B., P. López-García, J. C. Alba, D. Moreira, L. Monticelli, A. Strittmatter, G. Gottschalk y F. Rodríguez-Valera. 2007. Metagenomics of the Deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. *PLoS ONE* 2(9):e914.

Mendoza-Rangel, E. y C. Hernández-Ayala. 2004. La protección ambiental en el campo geotérmico de Los Azufres, Mich. *Geotermia* 17:2-9.

Meyer-Dombard, D. R., E. L. Shock y J. P. Amend. 2005. Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology* 3:211-227.

Mitchell, K. R. y C. D. Takacs-Vesbach. 2008. A comparison of methods for total community DNA preservation and extraction from various thermal environments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1139-1147.

Navarrete-Bedolla, M., M. L. Ballesteros-Almanza, J. M. Sánchez-Yáñez, B. Valdez-Salas y G. Hernández-Duque. 1999. Biocorrosion in a geothermal power plant. *Material Performance* 38:52-56.

Notredame, C., D. G. Higgins y J. Heringa. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 302:205-217.

Pace, N. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740.

Plumb, J. J., C. M. Haddad, J. A. E. Gibson y P. D. Franzmann. 2007. *Acidianus sulfidivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1418-1423.

Prieto-Barajas, C. M., E. Valencia-Cantero y G. Santoyo-Pizano. 2011. Diversidad molecular bacteriana en tapetes microbianos de pozas termales de Araró, Michoacán. *Ciencia Nicolaita* 53:61-73.

Prol-Ledesma, R. M. 2002. El calor de la tierra. 3ª ed. FCE. México, D.F.

Quijano-León, J. L. y L. C. A. Gutiérrez-Negrín. 2003. An unfinished journey: 30 years of geothermal-electric generation in Mexico. *GRC Bulletin* 198-203.

Reysenbach, A. L. y S. L. Cady. 2001. Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends in Microbiology* 9:79-86.

Reysenbach, A. L., K. Longnecker y J. Kirshtein. 2000. Novel Bacterial and Archaeal lineages from in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3798-3806.

Satyanarayana T., C. Raghukumar y S. Shivaji. 2005. Extremophilic microbes: diversity and perspectives. *Current Science* 89:78-90.

Siering, P. L., J. M. Clarke y M. S. Wilson. 2006. Geochemical and biological diversity of acidic, hot springs in Lassen Volcanic National Park. *Geomicrobiology Journal* 23:129-141.

Skirnisdottir, S., G. O. Hreggvidsson, S. Hjorleifsdottir, V. T. Marteinson, S. K. Petursdottir, O. Holst y J. K. Kristjansson. 2000. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2835–2841.

Sleator, R. D. 2011. Phylogenetics. *Archives of Microbiology* 193:235-239.

Stamatakis, A., P. Hoover y J. Rougemont. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57:758-771.

Stout, L. M., R. E. Blake, J. P. Greenwood, A. M. Martini y E. C. Rose. 2009. Microbial diversity of boron-rich volcanic hot springs of St. Lucia, Lesser Antilles. *FEMS Microbiology Ecology* 70:402-412.

Suarez-Arriaga, M. C., M. R. Tello L. y F. Samaniego V. 2000. Geochemical evolution of the Los Azufres, Mexico, geothermal reservoir. Part II: non-condensable gases. *Proceedings World Geothermal Congress 2000*. p. 2227-2233.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Tello-López, M. R. y M. C. Suarez-Arriaga. 2000. Geochemical evolution of the Los Azufres, Mexico, geothermal reservoir. Part I: water and salts. *Proceedings World Geothermal Congress 2000*. p. 2257-2262.

Torres-Sánchez, R., A. Magaña-Vázquez, J. M. Sánchez-Yáñez y L. Martínez-Gómez. 1997. High temperature microbial corrosion in the condenser of a geothermal electric power unit. *Material Performance* 36:43-46.

von Wintzingerode, F., U. B. Göbel y E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21:213-229.

Wicander R. y J. S. Monroe. 2000. Fundamentos de geología. 2ª ed. International Thomson Editores. México, D.F.