



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO-BIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



*FLUCTUACIÓN ESTACIONAL DE LA DIVERSIDAD  
MICROBIANA EN LOS MANANTIALES TERMALES DE ARARÓ,  
MICHOACÁN*

*TESIS*

que presenta

**BIÓL. CRISTINA MARIANA PRIETO BARAJAS**

Como requisito para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Experimental**

Asesor:

Doctor en Ciencias

**Dr. Gustavo Santoyo Pizano**

Co-asesor:

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas

**Dr. Eduardo Valencia Cantero**

Enero de 2014

*"Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución"*

*Theodosius dobzhansky*

## *Dedicatoria*

Tu y yo no hablamos el mismo idioma, ni entendemos con las mismas señales sin embargo, tu eres el objeto de mi fascinación, curiosidad, asombro y entrega...

A ti que jamás leerás estas líneas

A ti que nos albergas en tu seno

A ti que no nos pides nada a cambio y nos lo das todo

A ti...Tierra, a ti...Vida, a ti...

A ti que día a día con tus misterios taladras nuestras mentes humanas

A ti que ni el viento ni el fuego ni el agua te derrotan

A ti...

## *Agradecimientos*

A mi amada *Madre* por su apoyo incondicional, en las buenas, en las malas y en las peores siempre brindándome su amor y ejemplo, porque a pesar de la distancia tu abrigo siempre me acompaña y sin lugar a dudas mi fortaleza, para mi amada y respetada *Consuelo*.

A *Roberto* por tu comprensión, amor y confianza desmesurada, por ser mi bastón en los momentos más difíciles, por ser mi confidente y mi terapeuta personal, por ser mi guía y mi igual en este difícil pero bello camino que día con día construimos juntos. Por una vida juntos llena de éxitos, buenos momentos y anécdotas para la eternidad. Con todo mi amor te agradezco desde el fondo de mi sistema límbico.

Al *Dr. Gustavo Santoyo Pizano*, por aceptarme en su grupo de trabajo, por apoyarme y guiarme en esta etapa de formación académica, por sus consejos profesionales, por sus regaños y por su confianza durante la realización del proyecto, que ambos hemos hecho tan nuestro. Gracias también por su amistad, por sus consejos y anécdotas que siempre hacen más sencillos los momentos difíciles.

Al *Dr. Eduardo Valencia Cantero* por sus muchas y buenas observaciones, por sus revisiones y aportaciones al proyecto, porque con su ayuda hemos logrado pulir este bello trabajo. Gracias también por su acondicionamiento psicológico, porque día a día subía mis niveles de estrés de manera significativa, por las buenas charlas y los chantajes testísticos.

Al Comité tutorial, conformado por los *doctores Martha Isela Ramírez Díaz, Carlos Cervantes Vega y Jesús Campos García*, por su tiempo, excelentes observaciones, la revisión del trabajo en incontables ocasiones, por

su apoyo moral y por aportar sus conocimientos tanto al proyecto como a mi formación académica.

A la *Dra. Ruth Alfaro* y al Laboratorio de espectrofotometría de absorción atómica por su apoyo para la medición de los parámetros fisicoquímicos.

A mis amigos de la generación 2011-2013: *Sofía, Edith, Claudia, Milagros, Sandra, Lorena, Erika, Aarón, Edgar, Marco, Omar, Ricardo, Raúl, y Mario*, por los buenos momentos, por ser tan maravillosos compañeros de generación, porque todos nos acoplamos como engranes e hicimos de los momentos de mayor cansancio y estrés, también los momentos más memorables de este trayecto que al inicio parecía no tener fin, y hoy nos enfrentamos al cierre de este maravilloso caminar.

A mis amigos del laboratorio que hicieron mi estancia por demás amena y divertida, con miles de anécdotas caóticas que jamás olvidaré, miles de reclamos, chantajes, risas, carcajadas, pasteles que casi nos volvieron diabéticos, bullying que parecía casi interminable, traumas psicológicos, desmadre sin igual, a ustedes que son (sin importar lo que ustedes piensen) mi FamilyLab, con problemas pero con soluciones y apoyo ilimitado... con cariño para: *Carmen, Sofía, Rocío, Julie, Lys, Idolina, Diana, Nancy, Christian, Vicente, Daniel y Miguel*.

A quienes me acompañaron y ayudaron en Campo, viajando horas y horas a Araró o a Irapuato: *Benjamín, Sofía, Roberto, Fernando, Rocío* (Por los viajes inesperados), *Rafa y Julie*.

A mis amiguis, que me dieron apoyo emocional, psicológico, físico y alcohólico durante esta etapa de mi vida, a ustedes que no me dejaron caer en

la negación y que me preguntaron hasta el hartazgo sobre mi tesis, a ustedes que me sacaron una sonrisa, una carcajada o un buen coraje, a ustedes que me chantajejan pero no me dejan sola... los quiero: *Sebastián, Roberto, Mayte, María, Diandra, Llanet, Fernando, Salomón, Goreti, Sofía, Lila.*

Finalmente aunque ustedes budoques no pueden leer, hicieron que los momentos malos se borrarán con sus caras chatas y su inocencia... *Maya e Isis* mis gordas queridas.

A CONACYT por la beca otorgada, para la realización de este proyecto.

Al programa de Maestría en Ciencias en Biología Experimental, al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 BIODIVERSIDAD .....	1
1.2 DIVERSIDAD PROCARIOTA .....	2
1.3 TAPETES MICROBIANOS .....	6
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>10</b>
<b>3. ÁREA DE ESTUDIO: ARARÓ, MICHOACÁN DE OCAMPO</b> .....	<b>13</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
6.1. GENERAL .....	17
6.2. ESPECÍFICOS .....	17
<b>7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
8.1 TOMA DE LA MUESTRA BIOLÓGICA .....	19
8.2 TOMA DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE AGUA .....	19
8.3 AISLAMIENTO MICROBIANO POR CULTIVO PURO .....	20
8.3.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (CFU) .....	20
8.3.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO .....	20
8.4 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO .....	21
8.4.1 ELECTROFORESIS EN AGAROSA .....	21
8.5 RAPDs (RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA/ AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DE DNA POLIMÓRFICO) .....	22
8.6 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES RIBOSOMALES RNAR 16S .....	23
8.6.1 PURIFICACIÓN DE LOS GENES DE rDNA 16S Y SECUENCIACIÓN .....	23
8.6.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE rDNA 16S .....	24
8.7 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA .....	24
8.8 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD ESPECÍFICA .....	25
8.9 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA .....	25
8.10 CORRELACIONES DE LOS PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS CON CAMBIOS EN LA DIVERSIDAD .....	25
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
9.1 PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS .....	26
9.2 AISLAMIENTO MICROBIANO .....	26
9.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS .....	34
9.3.1 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS GENES DE rRNA 16S .....	34
9.3.2 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA .....	36

9.4 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD .....	39
9.4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	39
9.4.2 DIVERSIDAD ESPECÍFICA .....	40
9.4.2.1 CURVAS DE RAREFACCIÓN .....	40
9.4.2.2 ÍNDICES DE DIVERSIDAD .....	40
9.4.2.3 ABUNDANCIA Y OCURRENCIA .....	41
9.5 CORRELACIONES DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS CON CAMBIOS EN LA DIVERSIDAD.....	44
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>11. RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>12. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>13. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>14. LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>56</b>
<b>15. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>57</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** HISTORIA EVOLUTIVA DE LA DIVERSIDAD PROCARIÓTICA. ÁRBOL FILOGENÉTICO ACTUAL A NIVEL DE DIVISIONES BACTERIANAS, ASÍ COMO, EL NÚMERO DE ESPECIES DE CADA DIVISIÓN BACTERIANA, EL ANÁLISIS DE RELOJ MOLECULAR EN CADA NODO (A) Y EN LA PARTE INFERIOR NOTA DE LOS MAYORES ACONTECIMIENTOS OCURRIDOS EN LOS EONES TERRESTRES (B). GRUPOS I Y II, AGRUPACIONES DE DIVISIONES BACTERIAS PROVENIENTES DE AMBIENTES TERRESTRES Y ACUÁTICOS, RESPECTIVAMENTE. TOMADO Y MODIFICADO DE BATTISTUZZI Y HEDGES 2009. .... 3
- FIGURA 2.** PASOS DEL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA. A PARTIR DE UNA MUESTRA DE ORIGEN AMBIENTAL SE PUEDEN ANALIZAR LA DIVERSIDAD PROCARIÓTICA CULTIVABLE Y NO CULTIVABLE, MANEJANDO CULTIVOS MICROBIANOS, CÉLULAS BACTERIANAS POR MICROSCOPIA O BIEN A TRAVÉS DEL DNA METAGENÓMICO Y EL USO DE TÉCNICAS MOLECULARES COMO LA TRANSFORMACIÓN MICROBIANA, DGGE, SECUENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLONAS. TOMADO Y MODIFICADO DE HEAD ET AL. 1998..... 5
- FIGURA 3.** TAPETES MICROBIANOS DE DIFERENTES AMBIENTES. REGIÓN COSTERA TÚNEZ, POZA HIPERSALINA Y SEDIMENTOS INTERMAREALES EN AUSTRALIA, MANANTIALES TERMALES DEL PARQUE NACIONAL DE YELLOWSTONE Y ARARÓ, MICHOACÁN, Y POR ÚLTIMO LAGO LOCALIZADO EN DE LA ANTÁRTIDA. .... 7
- FIGURA 4.** . MODELO GENERAL DE LA ESTRUCTURA DE LOS TAPETES MICROBIANOS. EN LA CAPA SUPERIOR ENCONTRAMOS A LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS OXIGÉNICOS, ES DECIR, LAS CIANOBACTERIAS Y A LAS BACTERIAS AEROBIAS, SEGUIDAS DE UNA MEZCLA DE FOTOSINTÉTICOS ANOXIGÉNICOS, COMO SON LAS BACTERIAS VERDES-PÚRPURAS AZUFROSAS ASÍ COMO LAS CHLOROFLEXI (ROESELERS *ET AL.* 2008), FINALMENTE SE ENCUENTRAN LAS METANÓGENAS, LAS REDUCTORAS DE SULFATO Y LAS HETERÓTROFAS ANOXIGÉNICAS (COMAN *ET AL.* 2013)..... 8
- FIGURA 5.** DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA EN MANANTIALES TERMALES DE LA PATAGONIA. LA GRÁFICA MUESTRA LOS PORCENTAJES DE LAS SECUENCIAS DE RRNA 16S DE CADA GRUPO BACTERIANO, EN LOS TRES SITIOS DE MUESTREO (P= MANANTIAL PORCELANA, C=MANANTIAL CAHUELMÓ Y G=GEISER), SE MUESTRAN LAS MEDICIONES DE LA TEMPERATURA EN °C, Y SEÑALADO CON S LOS MUESTREOS DE VERANO Y CON W LOS DE INVIERNO. TOMADO DE MACKENZIE *ET AL.* 2013. .... 11
- FIGURA 6.** UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ZONA GEOTERMAL DE ARARÓ, MICHOACÁN. MÉXICO PRESENTA LA FAJA VOLCÁNICA TRANSMEXICANA (RESALTADA EN GRIS OSCURO), ESTA ATRAVIESA EL PAÍS POR EL CENTRO, DESDE EL PACÍFICO HASTA EL GOLFO DE MÉXICO. LA PARTE NORTE DE MICHOACÁN SE HALLA DENTRO DE LA FAJA Y PRESENTA ALTA ACTIVIDAD VOLCÁNICA O BIEN REMINISCENCIAS DE ESTA, LA ZONA GEOTERMAL DE ARARÓ SE UBICA AL NORESTE DEL ESTADO, CERCA DE LA CAPITAL MORELIA. .... 13
- FIGURA 7.** ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL DEL PRESENTE TRABAJO ..... 18
- FIGURA 8.** UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS. CONTEO DE UFCs PARA LOS DOS MANANTIALES ANALIZADOS ASÍ COMO, PARA CADA ESTACIÓN MUESTREADA. CRECIDAS EN MEDIO LB, TODA LA NOCHE A 37°C. .... 29
- FIGURA 9.** CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CINÉTICAS BACTERIANAS A 37°C. LA LÍNEA EN NEGRO SEÑALA EL CRECIMIENTO DE E.COLI DH5A. CRECIDAS EN MEDIO LB EN AGITACIÓN CONSTANTE (N=1). .... 30

<b>FIGURA 10.</b> CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO A 50°C. .EN NEGRO SE INDICA LA CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> DH5A. CRECIDAS EN MEDIO LB EN AGITACIÓN CONSTANTE (N=1).....	30
<b>FIGURA 11.</b> DNA GENÓMICO EXTRAÍDO DE LOS AISLADOS MICROBIANOS, UTILIZANDO EL PROTOCOLO DE MAHUKU. EN LA PARTE SUPERIOR SE INDICA EL NÚMERO DEL AISLADO AL QUE PERTENECE EL DNA. CON FLECHAS VERDES SE INDICA LA ALTURA A LA QUE SE ENCUENTRAN LAS BANDAS, Y POR ENCIMA EL POZO DE CARGA.....	31
<b>FIGURA 12.</b> PATRONES DE BANDEO DE RAPD DE LOS 105 AISLADOS BACTERIANOS ANALIZADOS. EL NÚMERO INDICA EL AISLADO, EL PRIMER CARRIL EN CADA GEL CORRESPONDE AL MARCADOR DE TAMAÑO MOLECULAR DE 1Kb.....	32
<b>FIGURA 13.</b> DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS MICROBIANOS DE LA ZONA GEOTERMAL DE ARARÓ. A LA DERECHA SE MUESTRA UN CÓDIGO DE COLORES. LA PRIMERA COLUMNA CORRESPONDIENTE A LAS ESTACIONES MUESTREADAS: ROSA=PRIMAVERA, VERDE=VERANO, AMARILLO=OTOÑO, AZUL=INVIERNO, Y LA SEGUNDA COLUMNA EL MANANTIAL MUESTREADO: NEGRO=BONITA, ROJO=TINA. ....	33
<b>FIGURA 14.</b> AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE rRNA 16S. ELECTROFORESIS EN AGAROSA AL 1%. BANDA ÚNICA DE TAMAÑO MOLECULAR APROXIMADO A 1,500PB CORRESPONDIENTE AL GEN COMPLETO. EN LA PARTE SUPERIOR DE CADA CARRIL SE ANOTA EL NÚMERO DEL AISLADO, Y CON L SE SEÑALA EL MARCADOR DE TAMAÑO MOLECULAR 1Kb. ....	34
<b>FIGURA 15.</b> ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS DEL GEN rRNA 16S CON NEIGHBOR-JOINING. AISLADOS CORRESPONDIENTES A LA DIVISIÓN FIRMICUTES. EN LA BASE DE CADA NODO LA MEDIDA DE SOPORTE BOOTSTRAP DE 1000 REPETICIONES.....	37
<b>FIGURA 16.</b> ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS DEL GEN rRNA 16S CON NEIGHBOR-JOINING. AISLADOS CORRESPONDIENTES A LA DIVISIÓN PROTEOBACTERIA. EN LA BASE DE CADA NODO LA MEDIDA DE SOPORTE BOOTSTRAP CON 1000 REPETICIONES. ....	38
<b>FIGURA 17.</b> ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS DEL GEN rRNA 16S CON NEIGHBOR-JOINING. AISLADOS CORRESPONDIENTES A LA DIVISIÓN ACTINOBACTERIA. EN LA BASE DE CADA NODO LA MEDIDA DE SOPORTE BOOTSTRAP CON 1000 REPETICIONES. ....	38
<b>FIGURA 18.</b> ANÁLISIS DE RAREFACCIÓN DE LOS MUESTREOS REALIZADOS A LA TINA Y LA BONITA. EN NEGRO SE MUESTRA LA CURVA DE RAREFACCIÓN PARA AMBOS MANANTIALES, Y EN GRIS SE MUESTRA EL INTERVALO DE CONFIANZA EN CADA CASO. ....	40
<b>FIGURA 19.</b> ESQUEMA QUE MUESTRA EL ÍNDICE DE SORENSEN. EL CÍRCULO INTERIOR REPRESENTA LA COMPARACIÓN TOTAL DE LAS COMUNIDADES DE LA TINA Y LA BONITA. EN LOS PEQUEÑOS CÍRCULOS A LA IZQUIERDA, SE MUESTRA EL PORCENTAJE DE SIMILITUD DE LOS MANANTIALES PARA I-INVIERNO, P-PRIMAVERA, V-VERANO Y O-OTOÑO. ....	42
<b>FIGURA 20.</b> ABUNDANCIAS DE CADA UNA DE LAS ESPECIES POR MANANTIAL.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> COMPOSICIÓN GEOQUÍMICA DE LAS AGUAS DE ZIMIRAO. ANÁLISIS DE CUATRO MUESTRAS, REPORTADAS EN PARTES POR MILLÓN. TOMADO Y MODIFICADO DE VIGGIANO-GUERRA Y GUTIÉRREZ-NEGRÍN 2005. ....	14
<b>TABLA 2.</b> ESPECIES Y CEPAS DE REFERENCIA UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO. ....	24
<b>TABLA 3.</b> FACTORES AMBIENTALES MEDIDOS EN LA BONITA. ....	27
<b>TABLA 4.</b> FACTORES AMBIENTALES MEDIDOS EN LA TINA.....	28
<b>TABLA 5.</b> IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS, LA DIVISIÓN A LA QUE PERTENECEN ASÍ COMO EL TAMAÑO DE LAS SECUENCIAS DEL GEN DE rRNA16S. ....	35
<b>TABLA 6.</b> ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD HAPLOTÍDICA Y NUCLEOTÍDICA. ....	39
<b>TABLA 7.</b> ÍNDICES DE DIVERSIDAD: SHANNON Y SIMPSON PARA DIVERSIDAD ALFA. ....	41
<b>TABLA 8.</b> OCURRENCIA DE LAS ESPECIES EN LOS MUESTREOS ESTACIONALES Y LAS POZAS TINA Y BONITA. ....	43
<b>TABLA 9.</b> CORRELACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS CON LAS DIVERSIDADES DE CADA ESTACIÓN MUESTREADA.....	44

## Resumen

En este trabajo se analizó la diversidad de microorganismos heterótrofos cultivables durante las estaciones anuales (invierno, primavera, verano y otoño) en dos manantiales de la zona geotermal de Araró denominados La Tina y La Bonita. Se obtuvieron 105 aislados microbianos que fueron identificados como miembros de 17 especies de las cuales la mayor proporción pertenece a la división Firmicutes (76%), seguida de las Proteobacterias (18%) y, finalmente, las Actinobacterias (6%). Los géneros representativos más abundantes fueron *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Exiguobacterium*, y en menor proporción se encontraron especies de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Microbacterium*. Se estimó la diversidad alfa utilizando los índices de Shannon (H) y Simpson (D), así como la diversidad beta mediante el índice de Sorensen ( $I_s$ ), mostrando que la diversidad va de moderada a baja. Es interesante que en los muestreos de primavera e invierno se encontró una mayor diversidad, mientras que otoño se presentó como la estación con menor diversidad y, a la vez como la de menor similitud biológica entre los manantiales analizados. Las curvas de rarefacción indican que los muestreos fueron significativos y representativos de la diversidad analizada en ambos manantiales. Durante los muestreos se determinaron, de manera simultánea, los factores fisicoquímicos como temperatura, pH, DBO (Demanda Biológica de Oxígeno), así como la concentración de sulfatos, cloruros, calcio, magnesio y arsénico, entre otros. Posteriormente, se llevaron a cabo análisis de correlación entre los factores fisicoquímicos y la diversidad en cada estación y cada manantial, observándose una correlación de forma diferencial para cada uno de los sitios analizados. Para el manantial La Tina se observó que las sales (magnesio, cloruros, sulfatos, calcio y sodio) son los principales moduladores de la diversidad, mientras que para La Bonita la temperatura, pH y arsénico presentaron las más altas correlaciones. Por último, nuestro análisis sugiere que los factores abióticos influyen de manera diferencial en cada una de las pozas, las cuales presentan variaciones durante el año tanto en su abundancia como en la diversidad microbiana.

,

## **Abstract**

### **Seasonal fluctuation of microbial diversity in the hot springs from Araró, Michoacán.**

In this study we analyzed the diversity of cultivable heterotrophic microorganisms during the four seasons (winter, spring, summer and autumn) from two hot springs of the geothermal zone of Araró, Michoacán named as The Tina and The Bonita. We obtained 105 microbial isolates, with 17 species identified. The majority corresponded to Firmicutes (76%), followed by Proteobacteria (18%) and finally Actinobacteria (6%). *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Exiguobacterium* were the most representative, however we also found in lower proportion *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Microbacterium*. The alpha diversity was estimated using Shannon (H) and Simpson (D) indexes and the beta diversity using Sorensen index (IS), which showed that the diversity is medium to low. Interestingly, spring and winter had the highest diversity, while autumn had the lowest and at same time the less beta diversity between the analyzed hot springs. Rarefaction curves indicated a representative sampling of both microbial communities. Simultaneously we evaluated physicochemical parameters at each sampling: Temperature, pH, DBO (Biochemical oxygen demand), salts (calcium, chloride, magnesium, sodium and sulfates) and arsenic. Then, we did a correlation analysis between physicochemical parameters with diversity changes per season and per hot spring (Bonita and Tina), we observed correlation between salts and diversity fluctuations for Tina hot spring and temperature, pH and arsenic with Bonita's hot spring diversity change. Our analysis suggest that abiotic factors have influence in a different way in each community, which have variations during the year in both abundance and microbial diversity.

## 1. Introducción

### 1.1 Biodiversidad

La biodiversidad se define como la variedad de la vida en todos sus niveles de organización (Colwell 2009) y comprende tres tipos de diversidades: la genética, la de especies y la de ecosistemas (Biggs *et al.* 2008). La diversidad a nivel genético ó intraespecífica reside dentro de cada especie, en esta se encuentran incluidas las variaciones genéticas dentro de las poblaciones y entre las mismas. La diversidad específica o interespecífica es frecuentemente conocida como la riqueza de especies, es decir, el número de especies de una comunidad. Finalmente, la diversidad a nivel de ecosistemas refiere a la variedad de ecosistemas que se encuentran presentes en una región dada (Biggs *et al.* 2008, Dirzo y Mendoza 2008).

Para su análisis la diversidad biológica se divide en alfa ( $\alpha$ ), comprende la riqueza de especies de una comunidad o hábitat dado,  $\beta$  (beta), el recambio de especies entre dos o más comunidades y  $\gamma$ , riqueza específica de una región o una unidad espacial mayor (Colwell 2009). La principal forma de medirla es con el uso de índices ecológicos que expresen la diversidad a diferentes escalas espaciales.

Un índice de diversidad se define como la expresión matemática que combina la riqueza de especies y la equitabilidad como una medida de la diversidad presente (Colwell 2009). Magurran (1988) ordenó los índices en tres categorías: índices de riquezas de especies, índices basados en las abundancias proporcionales de las especies (medidas de equitabilidad y dominancia) y modelos de abundancia de las especies.

Los índices ecológicos más utilizados para estimar la diversidad alfa son los de Shannon y Simpson, y para la beta Sorensen y Jaccard, que se encuentran incluidos en las dos primeras categorías de Magurran. Estos estimadores no solo nos permiten obtener un dato cuantitativo de la diversidad de una comunidad sino que también tienen la ventaja de permitir la comparación de las distintas comunidades y hábitats en función de esta información.

## ***1.2 Diversidad procariota***

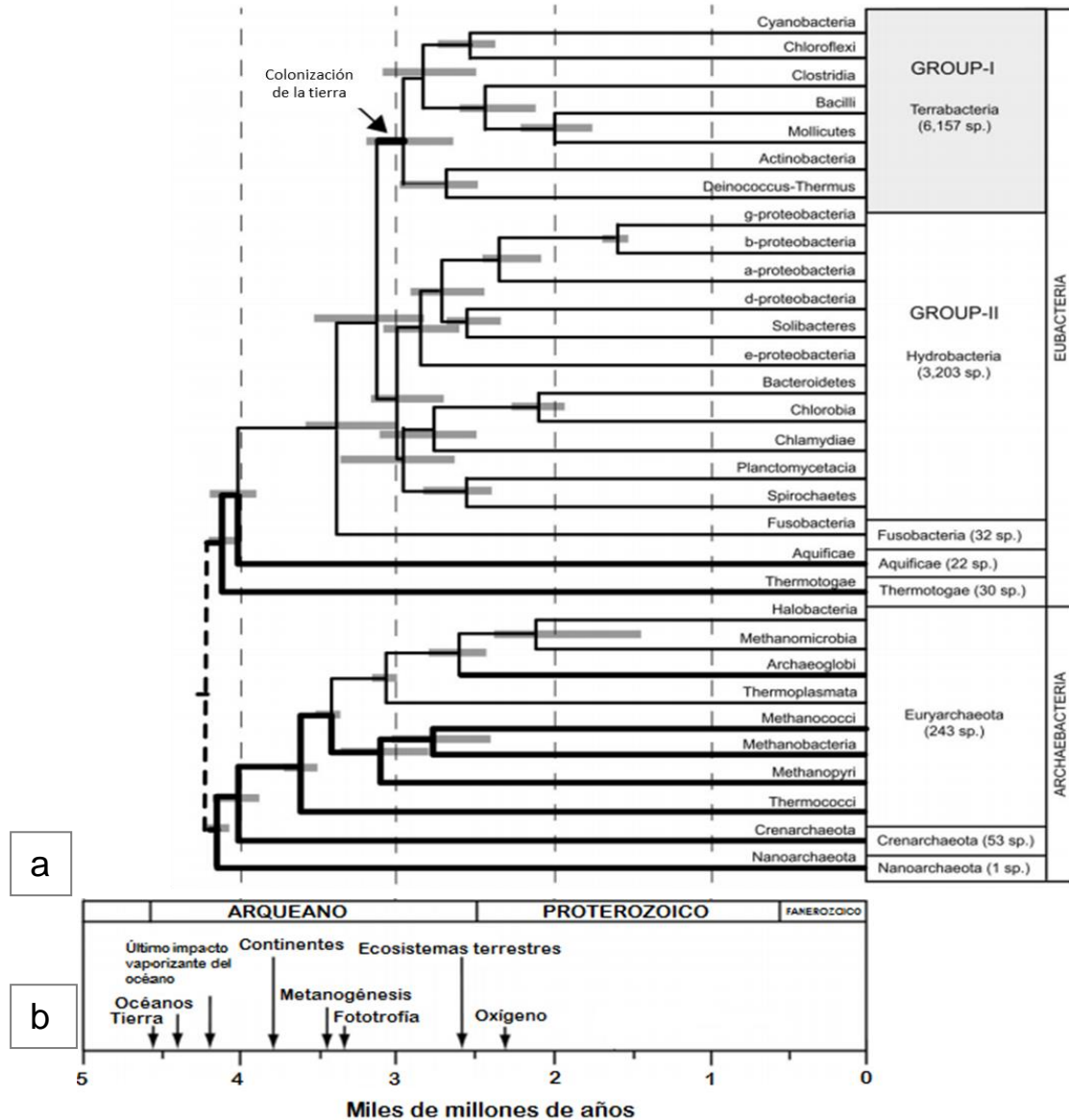
Los dominios Archaea y Bacteria representan la diversidad procariótica actual, producto de 3,800 millones de años de evolución (Torsvik *et al.* 2002), por lo que se ha sugerido sea extraordinaria. A la fecha el total de especies procariotas registradas es de 9740, de las cuales 9443 corresponde a las eubacterias y solo 297 son arqueas (Battistuzzi y Hedges 2009). Sin embargo, con respecto a la abundancia de los microorganismos en la biósfera, el número estimado es exorbitante, ostentando predicciones de hasta  $5 \times 10^{30}$  células procarióticas, lo que constituye la mayor proporción de biomasa sobre la Tierra (Madigan *et al.* 2004). A manera de resumen se muestran las actuales divisiones bacterianas, sus relaciones filogenéticas y el tiempo de divergencia entre cada una de ellas, en el cladograma de la Fig. 1.

Históricamente la diversidad procariótica ha sido subestimada debido a las complicaciones para el cultivo de los microorganismos, la determinación quimiotaxonómica y la caracterización morfológica de los mismos. No fue hasta el surgimiento de las técnicas moleculares que su identificación se ha facilitado, de manera que se han descubierto un gran número de nuevos grupos microbianos, antes desconocidos para la ciencia (Coleman y Whitman 2005).

Entre las técnicas utilizadas actualmente para el análisis de la diversidad microbiana se encuentran la secuenciación del RNAr, la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE), construcción de bibliotecas metagenómicas, Fragmentos de Restricción de longitud polimórfica (RFLP), Fragmentos de Restricción terminal de longitud Polimórfica (T-RFLP) (Coleman y Whitman 2005), Análisis de restricción de amplificadores de DNAr (ARDRA), Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE) y el Análisis de los espaciadores intergénicos ribosomales (RISA).

La gran mayoría de estas metodologías se basan en el análisis del RNAr 16S, el cual fue propuesto por primera vez por Carl Woese, como un gen marcador ideal para obtener las relaciones filogenéticas entre los distintos linajes de seres vivos, consiguiendo

así la actual división de los tres grandes dominios de la vida: Eubacteria, Archaea y Eucarya (RNAr 18S) (Woese y Fox 1977), además de ser un preciso cronómetro molecular (Woese 1987).



**Figura 1.** Historia evolutiva de la diversidad procariótica. Árbol filogenético actual a nivel de divisiones bacterianas, así como, el número de especies de cada división bacteriana, el análisis de reloj molecular en cada nodo (a) y en la parte inferior nota de los mayores acontecimientos ocurridos en los eones terrestres (b). Grupos I y II, agrupaciones de divisiones bacterias provenientes de ambientes terrestres y acuáticos, respectivamente. Tomado y modificado de Battistuzzi y Hedges 2009.



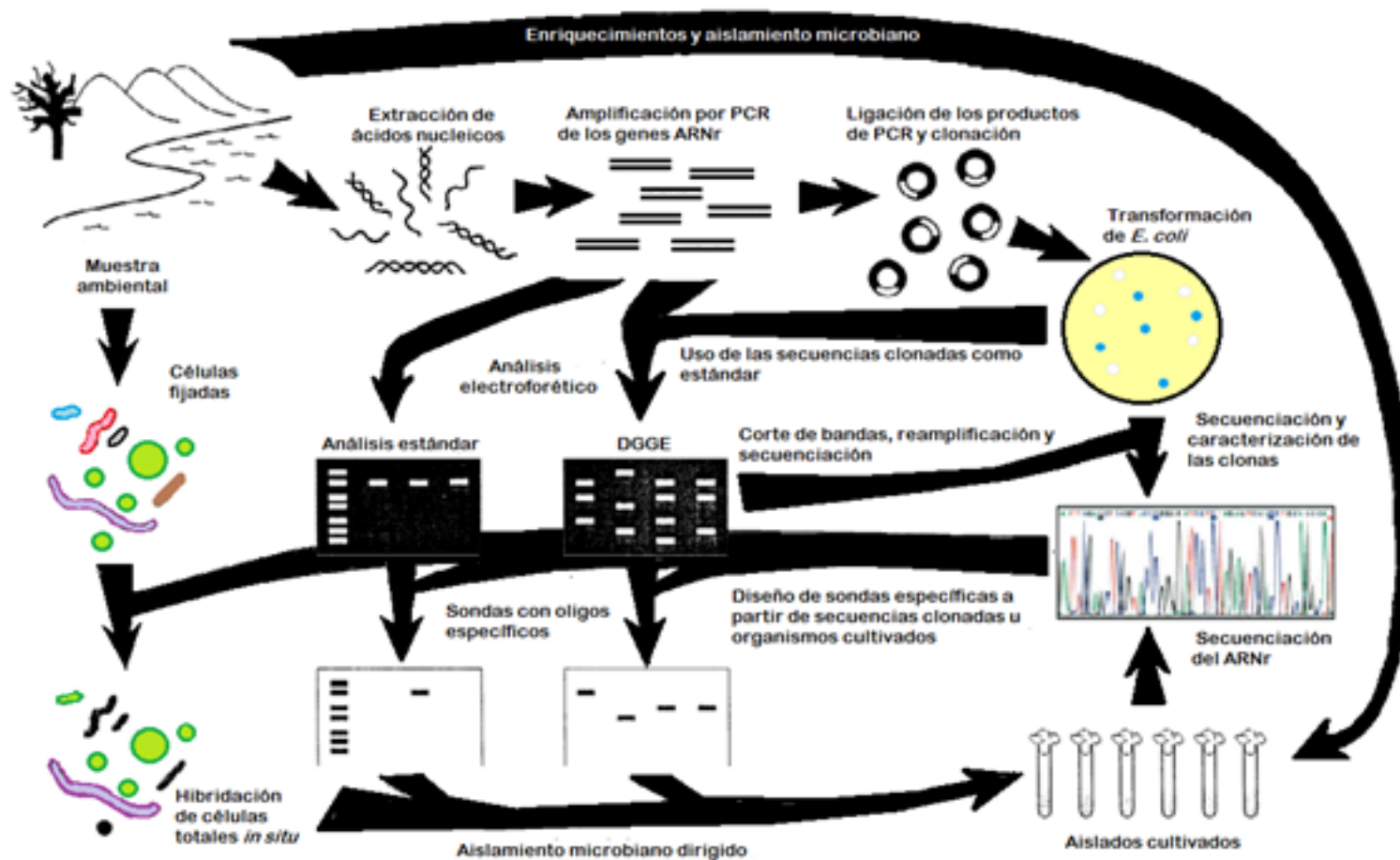
A la fecha, el RNAr 16S sigue siendo el gen más utilizado para identificación microbiana e inferencias evolutivas (Pace 2009), por sus propiedades intrínsecas:

- ✓ Es un gen conservado entre los distintos grupos biológicos (alta grado de identidad) (Woese 1987).
- ✓ Está presente en todos los seres vivos (con su homólogo: RNAr 18S en Eucarya) (Woese 1987).
- ✓ La transferencia horizontal no lo afecta de manera significativa (Pace 2009).
- ✓ Las bases de datos con secuencias de RNAr 16S tanto de microorganismos cultivables como no cultivables provenientes de muestras ambientales, entre otras, son muy grandes (Pace 2009).

El proceso para el estudio de las comunidades microbianas, se lleva a cabo utilizando los genes ribosomales y se esquematiza a continuación, donde a partir de una muestra de origen ambiental o cultivos puros se aplican distintas técnicas que involucran el RNAr 16S para la identificación y censado de las comunidades (Fig. 2) (Head *et al.* 1998).

De manera adicional, cuando se explora la diversidad microbiana uno de los aspectos más interesantes es conocer las relaciones filogenéticas (Woese y Fox 1977), la comparación de las secuencias de RNAr 16S es una herramienta poderosa al inferir relaciones evolutivas (Weisburg *et al.* 1991)

Las dificultades en el estudio de los microorganismos comprenden desde su pequeño tamaño, hasta el desconocimiento de los requerimientos químicos, físicos y biológicos para su cultivo, entre otras. Sin embargo ¿Cuál es la importancia de su estudio?. Los microorganismos, particularmente los procariotas son pieza clave para el mantenimiento del delicado equilibrio que sostiene la vida sobre la Tierra (Torsvik *et al.* 2002).



**Figura 2.** Pasos del análisis de la diversidad microbiana. A partir de una muestra de origen ambiental se pueden analizar la diversidad procariótica cultivable y no cultivable, manejando cultivos microbianos, células bacterianas por microscopía o bien a través del DNA metagenómico y el uso de técnicas moleculares como la transformación microbiana, DGGE, secuenciación y caracterización de clonas. Tomado y modificado de Head et al. 1998.

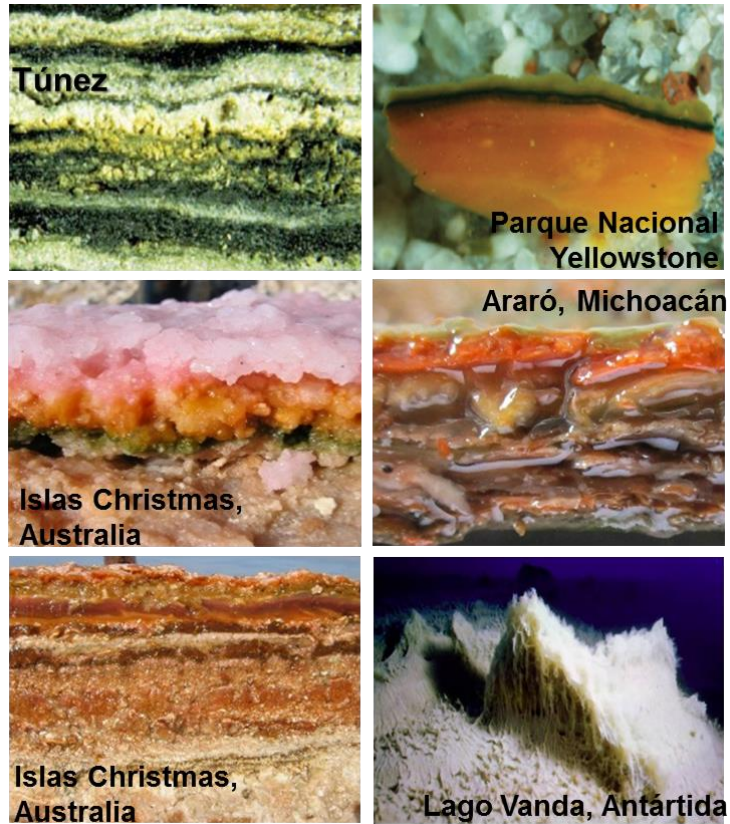
Los microorganismos son centrales para el buen funcionamiento de las interacciones ecológicas en las aguas superficiales, océanos y suelos, tratamiento de aguas negras, (Curtis *et al.* 2002), además participan en distintos ciclos biogeoquímicos, como ejemplo los del nitrógeno, azufre, hierro y manganeso, entre otros, regulan la composición de la atmósfera, reciclan nutrientes, y descomponen contaminantes ambientales (Huse *et al.* 2008). Sus capacidades tienen un fuerte impacto sobre la vida humana: algunos como agentes etiológicos de enfermedades, otros beneficiando la agricultura, la industria alimenticia y la biotecnología, entre otras (Madigan *et al.* 2004).

Todos los eucariotes estamos rodeados e invadidos por miles de microorganismos, los podemos encontrar prácticamente en cualquier hábitat sobre la Tierra, ya sea en asociación con plantas como habitantes internos (endófitos) ó en la rizósfera, en los tractos digestivos de los animales, como patógenos o parásitos, en las comunidades de suelo, en las aguas de arroyos, ríos, mares, océanos, lagos enterrados en la Antártida o bien en las muchas y variadas manifestaciones superficiales del calor interno de la Tierra como en fumarolas, ventanas hidrotermales, y manantiales termales.

Estos últimos han sido motivo de estudio desde hace ya varias décadas, principalmente han llamado la atención aquellos que presentan interesantes comunidades microbianas, que se exhiben a simple vista y reciben el nombre de Tapetes microbianos.

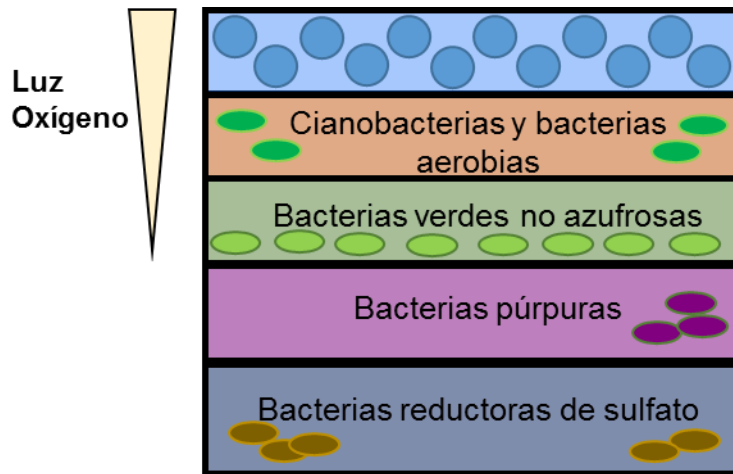
### ***1.3 Tapetes microbianos***

Los tapetes microbianos son comunidades estratificadas formadas por capas de microorganismos que alteran los microgradientes ambientales (Gerdes 2010), en donde podemos encontrar microorganismos heterótrofos, quimioautótrofos y fotoautótrofos (Pinckney *et al.* 1995). Éstas comunidades se pueden desarrollar en una gran variedad de ambientes desde manantiales termales, pozas hipersalinas, desiertos cálidos y secos, lagos alcalinos y sedimentos costeros (Villanueva 2011) (Fig. 3).



**Figura 3.** Tapetes microbianos de diferentes ambientes. Región costera Túnez, Poza hipersalina y sedimentos intermareales en Australia, manantiales termales del Parque Nacional de Yellowstone y Araró, Michoacán, y por último lago localizado en de la Antártida.

Los tapetes microbianos comparten características que los unifican, así como una estructura general básica, esta consiste en una estructura multicapa, donde el estrato superior se encuentra en íntimo contacto con la columna de agua, la mayor cantidad de oxígeno y de energía luminosa, mientras que la capa más profunda es anóxica y con escasa luminosidad, en la cual se llevan a cabo procesos metabólicos anaerobios estrictos (Villanueva 2011) (Fig. 4).



**Figura 4.** . Modelo general de la estructura de los tapetes microbianos. En la capa superior encontramos a los microorganismos fotosintéticos oxigénicos, es decir, las cianobacterias y a las bacterias aerobias, seguidas de una mezcla de fotosintéticos anoxigénicos, como son las bacterias verdes-púrpuras azufrosas así como las chloroflexi (Roeselers *et al.* 2008), finalmente se encuentran las metanógenas, las reductoras de sulfato y las heterótrofas anoxigénicas (Coman *et al.* 2013).

Las características que unifican a todos los distintos tapetes microbianos son (Gerdes 2010):

- I) Cooperatividad fisiológica de los organismos.
- II) Presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) así como sus capacidades adhesivas, que unen a las células entre ellas y a la materia orgánica al sustrato.
- III) La afinidad a las interfaces y sustratos.
- IV) La agregación microbiana.
- V) Alto contenido de agua.

Los tapetes microbianos son los ecosistemas más antiguos conocidos a la fecha y datan de hace 3.48 mil millones de años (Noffke *et al.* 2013), su éxito ecológico es el reflejo de su versatilidad metabólica, y su adaptabilidad fisiológica dada por sus principales integrantes: Bacteria y Archaea (Franks y Stolz 2009). Debido a esto, los tapetes

microbianos han sido propuestos por distintos grupos de trabajo como modelos biológicos: de consorcios microbianos (Paerl *et al.* 2000), ecología microbiana (Ward *et al.* 1998), evolución microbiana y de astrobiología, así como, representantes análogos de la vida primitiva (Des marais 2003).

Hoy en día los tapetes no son solo de interés para el sector científico, sino también, su aplicación es centro de atención en distintos procesos antropogénicos como son en el tratamiento de aguas negras, biorremediación, acuicultura, producción de biohidrógeno, entre otros (Roeselers *et al.* 2008).

Muchos estudios sobre los tapetes de diferentes ambientes con distintos enfoques se han llevado a cabo, sin embargo, la primera pieza en la ardua tarea de entender estas interesantes comunidades microbianas es el recuento de sus habitantes, es decir, los análisis de la diversidad presente son fundamentales en el entendimiento de la dinámica, estructura y composición microbiana.

## 2. Antecedentes

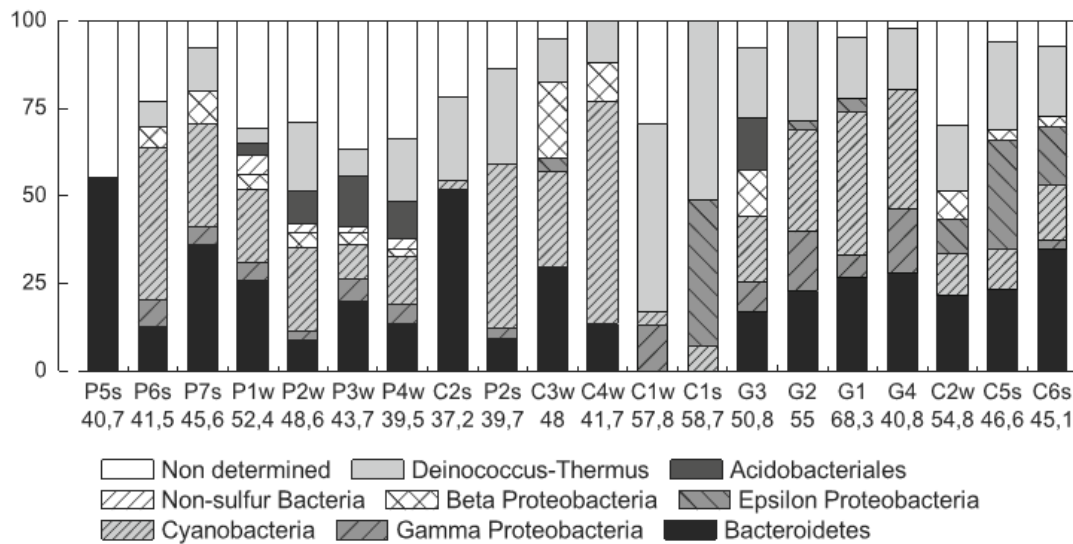
De los parámetros que se han buscado en los análisis de los tapetes microbianos son patrones de distribución de la diversidad, y su relación ya sea con la estratificación vertical, estacionalidad o cambios en los factores ambientales.

De entre estos, podemos señalar el trabajo de Portillo y colaboradores del 2009, donde buscan la relación de distintas pigmentaciones como resultado de la composición, y estructura de la comunidad microbiana, o de su actividad metabólica. Utilizando DGGE toman la “huella digital” para los tapetes rojos, amarillos y verdes, de manera simultánea analizan el RNA ribosomal como indicador metabólico. Ellos encuentran distribuciones desiguales para cada uno de los diferentes tapetes examinados, de tal manera que las diversas coloraciones, son el reflejo de distintas comunidades bacterianas que además, presentan grupos bacterianos particulares que están metabólicamente activos.

Uno de los primeros trabajos que abordaron la estacionalidad como un factor que ejerce un fuerte impacto sobre las comunidades bacterianas de tapetes, fue el llevado a cabo por Pinckney y colaboradores. En este trabajo de 1995, analizan la fracción de microorganismos fotosintéticos de cuatro tapetes durante doce meses, utilizando pigmentos como indicadores quimiotaxonómicos (clorofila a [todos los microorganismos fotosintéticos oxigénicos], bacterioclorofila a [fotosintéticos anoxigénicos], fucoxantina [diatomeas] y zeaxantina [cianobacterias]). Ellos observaron cambios en los pigmentos, sin embargo, ningún patrón estacional regular fue identificado.

Ferris y Ward en 1997, utilizando la técnica DGGE, evaluaron la distribución estacional de las poblaciones de tapetes microbianos del manantial Octopus (Parque Nacional de Yellowstone, EUA), definidas por los genes de RNAr 16S a lo largo de un gradiente termal, hipotetizando cambios en la estructura de la comunidad. Ellos observaron ligeros cambios, con respecto al rango de temperaturas al cual se encuentran las poblaciones microbianas en cada estación, sin embargo, no lograron discernir patrones estacionales, y discuten el uso de otros parámetros ambientales a tomar en consideración, como la intensidad luminosa.

Mackenzie y colaboradores en 2013, analizaron la variación estacional de tres tapetes microbianos al norte de la Patagonia, donde toman en consideración cambios en la temperatura de las aguas de los manantiales, en las estaciones de verano e invierno. Ellos observaron cambios de la composición bacteriana de estas comunidades; esta información está resumida en la Figura 5, donde las variaciones de las temperaturas tienen influencia sobre la estructura de la comunidad, permitiendo que distintos grupos bacterianos florezcan y otros disminuyan.



**Figura 5.** Distribución de la diversidad bacteriana en manantiales termales de la Patagonia. La gráfica muestra los porcentajes de las secuencias de rRNA 16S de cada grupo bacteriano, en los tres sitios de muestreo (P= manantial Porcelana, C=manantial Cahuelmó y G=geiser), se muestran las mediciones de la temperatura en °C, y señalado con S los muestreos de verano y con W los de invierno. Tomado de Mackenzie *et al.* 2013.

Todos estos trabajos incluyen el uso de técnicas moleculares para censar las comunidades de microorganismos, sin embargo, el uso de técnicas tradicionales como el cultivo microbiano sigue vigente y nos otorga información adicional, además de la oportunidad de analizar con mayor profundidad aspectos genéticos y fisiológicos de los microorganismos.

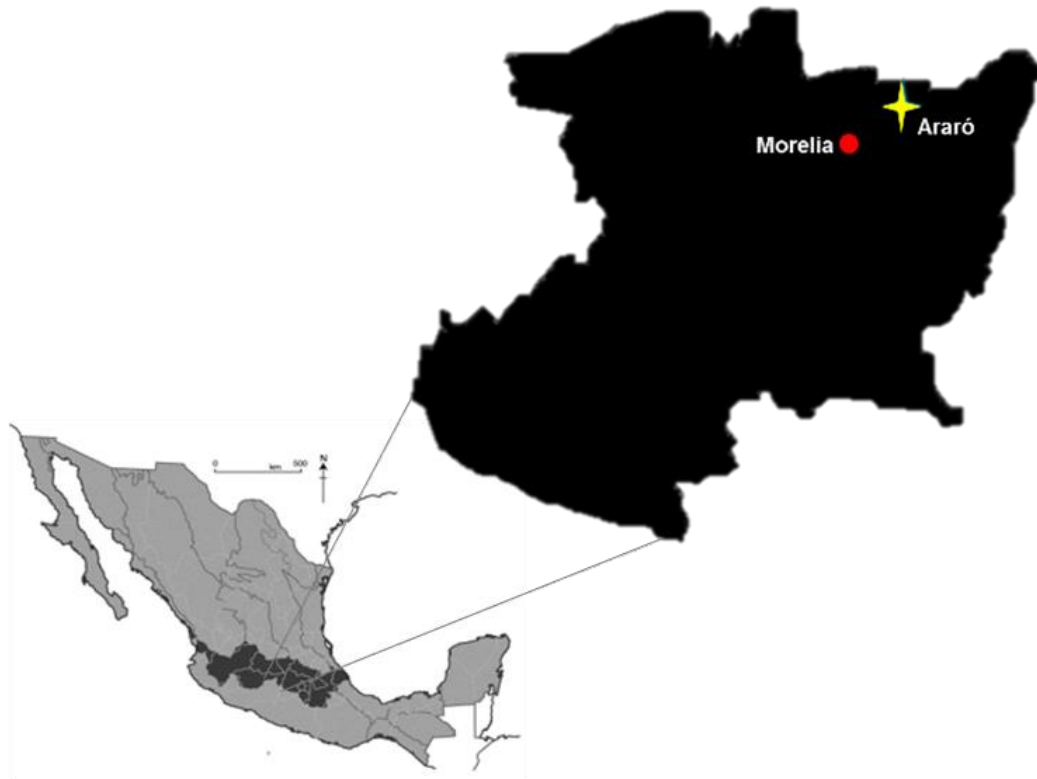


La importancia de las técnicas tradicionales, como el cultivo microbiano se pone de manifiesto en estudios de diversidad como es el trabajo de Nold y colegas (1996), en el cual se analiza la comunidad de bacterias heterótrofas aerobias, aisladas por cultivo enriquecido, utilizando distintas fuentes de carbono y diluciones seriadas muy altas (para eliminar a los microorganismos más abundantes). Este análisis se llevó a cabo en el manantial Octopus, el cual es uno de los más estudiados en Yellowstone, varias técnicas moleculares han sido empleadas para examinar la composición microbiana, sin embargo, ellos encontraron bacterias aerobias pertenecientes a las divisiones Firmicutes y Proteobacteria cuyas secuencias jamás habían sido detectadas, y cuyos hallazgos arrojan información complementaria para la reconstrucción de las comunidades microbianas presentes en estos hábitat.

Finalmente, en nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo un análisis preliminar de la comunidad bacteriana de un tapete microbiano proveniente de un manantial termal de Araró Michoacán usando un enfoque metagenómico. En este estudio, se analizaron 39 secuencias, la mayoría correspondieron a las cianobacterias *Synechococcus* y *Cyanobium* (54%) y el resto a bacterias y cianobacterias no cultivables (Prieto-Barajas *et al.* 2011).

Esto muestra que la diversidad de los tapetes bacterianos termófilos es mucho mayor a lo antes pensado, por lo que el uso de distintas técnicas que permitan recuperar la diversidad del lugar es imperativo.

### 3. Área de estudio: Araró, Michoacán de Ocampo



**Figura 6.** Ubicación geográfica de la zona geotermal de Araró, Michoacán. México presenta la Faja Volcánica Transmexicana (resaltada en gris oscuro), esta atraviesa el país por el centro, desde el Pacífico hasta el Golfo de México. La parte norte de Michoacán se halla dentro de la faja y presenta alta actividad volcánica o bien reminiscencias de esta, la zona geotermal de Araró se ubica al noreste del estado, cerca de la capital Morelia.

El campo geotermal de Araró se ubica en la porción nororiental del Estado de Michoacán de Ocampo, en la parte central de México, dentro de la Faja Volcánica Transmexicana (Hiriart Le Bert 2011), a unos 40Km de la ciudad de Morelia (Fig. 6). La zona se localiza al interior de la cuenca tectónica de Cuitzeo, y presenta 3 fallas geológicas de tipo normal: al Norte Huingo, al Centro Araró-Zimirao y al Sur El Caracol (Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín 2005), las dos primeras son las más relevantes y actúan como conductos para el movimiento de fluidos hidrotermales, con temperaturas de 31-98°C (Hiriart Le Bert 2011).

En la zona se encuentran manantiales con escape de gas agrupados en varias áreas, la más importante es Zimirao, donde concurren manantiales con temperaturas de 48-99°C y sus aguas son de tipo sódico-cloruradas (con 2340 ppm de NaCl) (Hiriart Le Bert 2011, Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín 2005), la composición química de las mismas se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición geoquímica de las aguas de Zimirao. Análisis de cuatro muestras, reportadas en partes por millón. Tomado y modificado de Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín 2005.

Lugar	Fecha	T (°C)	pH	Na	K	Ca	Mg	Li	HCO <sub>3</sub>	Cl	SO <sub>4</sub>	SiO <sub>2</sub>	B	Rb	Cs
Zimirao	Nov. 1990	71	7.78	693	47.5	31.7	2.0	5.4	165.4	825.3	102.5	207.5	55.5	0.62	1.35

Geológicamente Zimirao está situado sobre una cama de sedimento lacustre, cuando las fallas la intersectan, la rompen y permiten la mezcla de los fluidos geotermales salinos con el agua del acuífero, emergiendo a la superficie para formar los manantiales termales con un flujo de alrededor de 10-20 L por minuto (Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín 2005).

Esta zona ha sido analizada desde el punto de vista geológico, y con miras a la producción de energía eléctrica a partir de la energía geotérmica del lugar, por parte de la Comisión Federal de Electricidad (CFE) (Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín 2005). La zona no solo presenta interesantes particularidades geológicas, sino que también ostenta manantiales con tapetes microbianos que no han sido analizados.

#### **4. Justificación**

México es un país con un gran número de manifestaciones superficiales del calor interno de la tierra. En particular, el Estado de Michoacán se ubica dentro del cinturón volcánico transmexicano, por lo que cuenta con numerosas zonas geotermales, entre las cuales encontramos los manantiales termales de Araró. Estos ecosistemas representan un excelente modelo de estudio de las comunidades microbianas termófilas. Determinar qué factores abióticos influyen sobre la estructura y la diversidad de la comunidad microbiana a través de las diferentes épocas del año, ayudará a descifrar sus roles ecológicos y posibles mecanismos de sobrevivencia en estos ambientes extremos.

## **5. Hipótesis**

Los tapetes microbianos de los manantiales termales de Araró son comunidades dinámicas que reaccionan de forma diferencial a los estímulos ambientales

## **6. Objetivos**

### ***6.1. General***

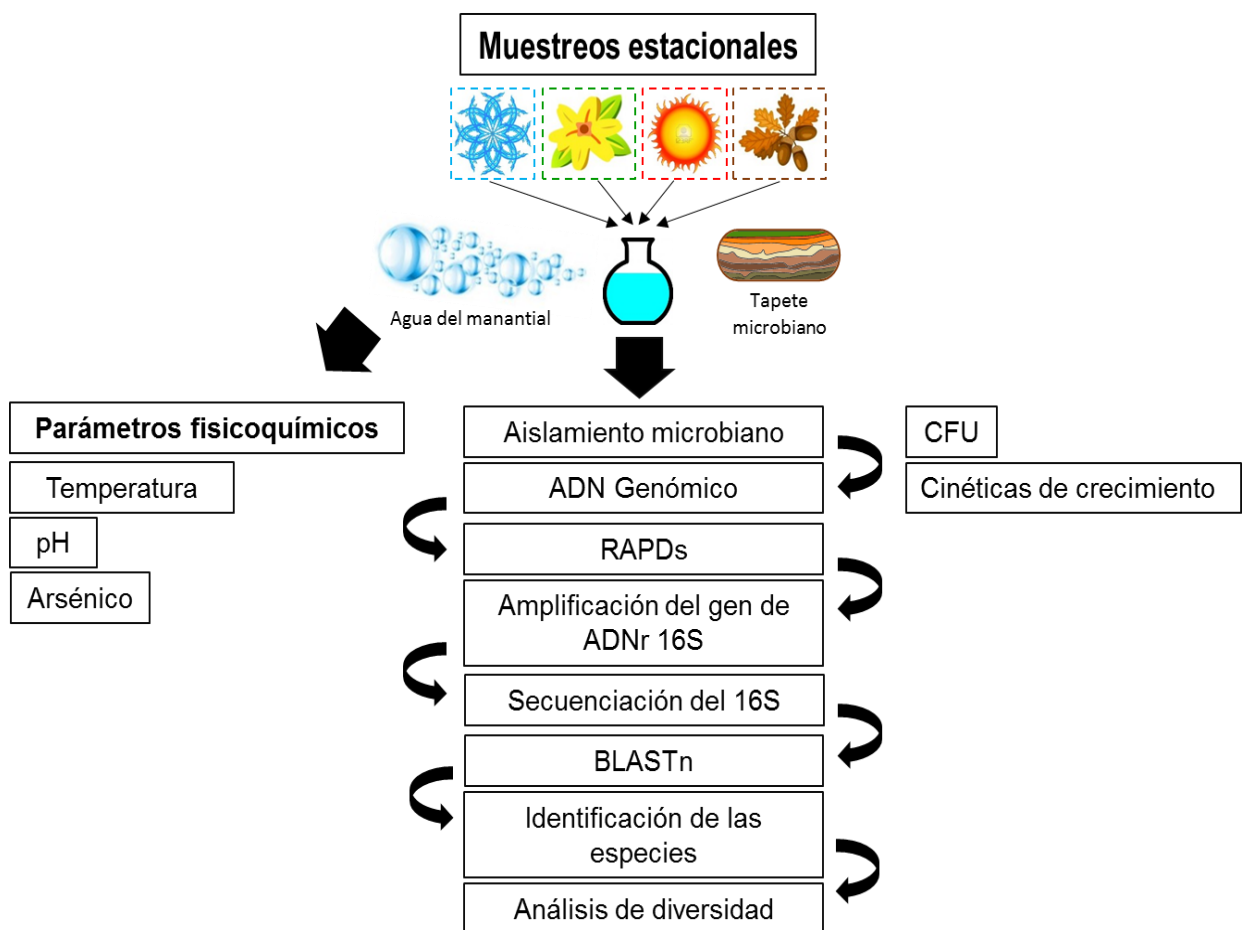
Determinar la diversidad microbiana cultivable en los manantiales termales de Araró durante las estaciones del año así como su correlación con los cambios de los factores ambientales

### ***6.2. Específicos***

- I. Caracterizar la diversidad genética de aislados bacterianos cultivables.
- II. Identificar la especie de los aislados bacterianos obtenidos.
- III. Estimar la diversidad y riqueza de especies bacterianas cultivables en las cuatro estaciones.
- IV. Determinar la correlación entre los parámetros fisicoquímicos y la diversidad bacteriana encontrada.

## 7. Estrategia experimental general

La estrategia experimental general consistió en llevar a cabo muestreos estacionales en invierno, primavera, verano y otoño, tomando tanto el material biológico, como medidas de los parámetros fisicoquímicos. A partir del tapete y el agua del manantial, obtener aislados microbianos, los cuales fueron identificados con el uso del gen de RNAr 16S, su diversidad a nivel genético fue obtenida utilizando la técnica RAPDs, con esta información se realizó el análisis de diversidad de la comunidad bacteriana de Araró (Fig. 7).



**Figura 7.** Estrategia experimental general del presente trabajo

## **8. Materiales y métodos**

### ***8.1 Toma de la muestra biológica***

Se llevaron a cabo 4 muestreos en dos de los manantiales termales localizados en la localidad de Zimirao en Araró, Michoacán. Para la selección de los sitios de muestreo se utilizaron dos criterios: 1. El manantial menos perturbado, ya que en la región son empleados por la comunidad para usos diversos, 2. Manantiales con características distintivas y únicas que representen sistemas distintos.

Los muestreos abarcaron las cuatro estaciones ya que se realizaron el 2 de febrero (invierno), 5 de junio (primavera), 6 de octubre (verano) y 5 de diciembre (otoño) del año 2012, todos alrededor de las 11 am en días soleados y despejados.

Las muestras de material biológico de tapete microbiano, se tomaron utilizando cajas Petri, y espátulas estériles, con las cuales se obtuvieron muestras de 5-10cm de largo por 0.5-1cm de ancho, mismas que se mantuvieron en oscuridad en una caja aislante con hielo hasta su procesamiento. Para la toma del agua se usaron frascos kimax de 500 ml estériles (se colectaron cerca de 500ml de agua por manantial y por muestreo), la muestra se conservó en oscuridad y hielo.

### ***8.2 Toma de la muestra para el análisis de agua***

Las mediciones de los parámetros fisicoquímicos se llevaron a cabo de manera simultánea al muestreo del material biológico. Los parámetros temperatura (°C), conductividad eléctrica, salinidad, pH, y oxígeno disuelto fueron medidos *in situ*.

Mediante análisis químicos convencionales con la colaboración de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: DBO (demanda biológica de oxígeno), color, turbiedad, sólidos sedimentables, sólidos totales, sólidos suspendidos totales, sólidos totales disueltos, cloruros, sulfatos, dureza total, dureza de calcio, dureza de magnesio, alcalinidad total, carbonatos, bicarbonatos, calcio, magnesio, sodio, nitrógeno amoniacal, y coliformes fecales. La determinación del arsénico se obtuvo por espectrofotometría de absorción atómica (AAS) y la medición de fluoruros utilizando un fluorómetro convencional.



### ***8.3 Aislamiento microbiano por cultivo puro***

Una vez obtenidas las muestras, tanto de agua como de tapete microbiano se procedió a la obtención de cultivos axénicos de microorganismos procedentes de tales materiales biológicos. Para ello se utilizaron los medios de cultivo generales: agar nutritivo y Luria-Bertani (LB) por su alto contenido en nutrientes, que permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias.

El medio Agar nutritivo (Bioxon: 23g/L); tiene la siguiente composición: peptona (5g), extracto de carne (3g), agar (15g).

El medio Luria-Bertani tiene la siguiente composición para un litro: peptona de caseína (10g), Extracto de levadura (5g), NaCl (10g), Agar bacteriológico (15g).

Se hicieron diluciones seriadas a partir del agua de los manantiales y los tapetes microbianos, se plaquearon en LB y agar nutritivo las diluciones  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , y se les dejó crecer toda la noche en una incubadora a 37°C. A la mañana siguiente, se resembraron todas las colonias observadas en medio LB (ya que en este medio crecieron mejor todas las muestras). Los cultivos puros fueron obtenidos por la resiembra de colonias aisladas y con ellos se trabajó en el presente estudio.

#### ***8.3.1 Unidades formadoras de colonias (CFU)***

Para el conteo de células viables se midieron las unidades formadoras de colonias CFU (colony forming units, por sus siglas en inglés), con las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , ya que a mayores diluciones no se registró crecimiento microbiano. Para su estimación, se utilizó la fórmula: CFU/ml o CFU/g= Número de colonias por placa X Factor de la dilución /ml de la muestra sembrada.

#### ***8.3.2 Cinéticas de crecimiento***

Se hicieron cinéticas a 37°C (temperatura a la cual se aislaron las bacterias), y a 50°C para corroborar su carácter termofílico. Para tales cinéticas se utilizaron 23 aislados (ZAP001-ZAP020), y *Escherichia coli* DH5a como control positivo a 37°C y control negativo a 50°C. Las cinéticas partieron de un inóculo a una densidad óptica de 0.05

medida a 590nm. Las mediciones se hicieron cada hora por 8 horas en total, tomando 1ml del cultivo líquido (LB), y medido en un espectrofotómetro con una celdilla de plástico a una longitud de onda de 590nm. Los datos para obtener las curvas fueron procesados en Microsoft Excel 2010.

#### ***8.4 Extracción de DNA genómico***

Para la caracterización genética e identificación de los aislados microbianos, se extrajo el DNA genómico de cada uno de los mismos, utilizando el protocolo propuesto por Mahuku en 2004, para extracción de DNA de bacterias, hongos y plantas. El protocolo parte de un cultivo ya sea líquido o en medio sólido, cuyas células fueron suspendidas en el buffer TES (tris-HCl 0.2M pH 8.0, EDTA 10mM pH 8.0, NaCl 0.5M y SDS 1%). Estas fueron sometidas a fricción mecánica en el vortex, y tratadas con proteinasa K (concentración final 50µg/ml) a una temperatura de 65°C por 30 min, una vez transcurrido el tiempo a las muestras se les adicionó acetato de amonio (7.5M) y se mantuvieron en hielo por 10min, posteriormente las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo al cual se le añadió isopropanol (1vol) y se mantuvo en refrigeración a -20°C por 2h, centrifugando a 14,000rpm y lavado con etanol al 70%, centrifugación final y la pastilla se dejó secar completamente, posteriormente se resuspendió con agua desionizada estéril o buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8.0). Por último se les trató con RNasa por 5-15min a temperatura ambiente.

Una vez extraído el DNA de cada aislado bacteriano se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

##### ***8.4.1 Electroforesis en agarosa***

Se hicieron geles de agarosa al 1-1.5% y, se usó TAE 1X (Tris 1M pH 8.0, Ácido acético glacial, EDTA 500mM pH 8.0) como buffer de corrida. Las muestras de DNA se cargaron con 1µl de Gelred® para cada pozo para visualizar el DNA. Se dejaron correr las muestras a 80-100V de 40-60min.

### **8.5 RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNA/ Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico*)**

La técnica de biología molecular RAPD, consiste en el uso de un único oligonucleótido pequeño diseñado aleatoriamente, para lo cual no se requiere del conocimiento previo de la secuencia, que se utilizará en una reacción de PCR, en la cual se espera que este oligonucleótido se alinee en distintas regiones del genoma con el que presente complementariedad, si dos genomas contienen polimorfismos en su secuencia esto se ve reflejado en la ausencia o presencia de distintos patrones de bandeo, que son observados en una electroforesis. Esta técnica, es útil en el análisis de la diversidad genética de los microorganismos, no obstante, solo se utiliza en microorganismos cultivables, por lo que no puede ser utilizada en estudios metagenómicos.

Para nuestro análisis, utilizamos el oligonucleótido OPA02 (5´-TGC CGA GCT G-3´) (Samal *et al.* 2003) cuyas condiciones para la PCR son las siguientes:

<b>Condiciones</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	1	94	5
<b>Desnaturalización</b>	35	94	1
<b>Alineamiento</b>	35	38	1
<b>Extensión</b>	35	72	1
<b>Extensión final</b>	1	72	5

Una vez terminada la reacción de PCR se prosiguió a realizar una electroforesis en agarosa al 1.5%, para la visualización de los patrones de bandeo de cada aislado. Con esta información se creó una matriz de presencia/ausencia de bandas para su posterior análisis.

La matriz fue analizada con el programa MVSP versión 3.13p. Para la elaboración del dendrograma, se utilizó el coeficiente de Nei & Li de 1979 para reflejar distancias genéticas, además del método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

## **8.6 Amplificación de los genes ribosomales RNAr 16S**

Con el DNA genómico extraído de cada uno de los aislados se procedió a amplificar los genes de RNAr 16S, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos fD1 (5´CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3´) y rD1 (5´AAG GAG GTG ATC CAG CC 3´) (Weisburg *et al.* 1991), las condiciones para su amplificación fueron las siguientes:

<b>Condiciones</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	1	95	3
<b>Desnaturalización</b>	35	95	1
<b>Alineamiento</b>	35	53	1
<b>Extensión</b>	35	72	2
<b>Extensión final</b>	1	72	10

Una vez obtenidos los productos de PCR se visualizaron en agarosa al 1% para verificar el tamaño de banda aproximado de 1500 pb, para posteriormente purificarlos.

### **8.6.1 Purificación de los genes de rDNA 16S y secuenciación**

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up system®, siguiendo las indicaciones del proveedor. El cual consiste en unir los productos de PCR a una membrana y posteriormente hacer repetidos lavados con las soluciones que proporciona el kit para eliminar el exceso de nucleótidos y oligonucleótidos, hasta que el DNA finalmente se eluye en agua y puede posteriormente ser usado en otras técnicas moleculares.

Los productos purificados fueron secuenciados en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en CINVESTAV Unidad Irapuato.

### 8.6.2 Análisis de las secuencias de rDNA 16S

Una vez obtenidas las secuencias de los genes ribosomales se ensamblaron utilizando el programa Codon code aligner y los electroferogramas de la secuenciación. Una vez ensambladas las secuencias, se hicieron búsquedas de tipo BLASTn en la base de datos del GenBank del NCBI. Se tomó el punto de corte para nuestras secuencias en 98% para considerar las identidades de la secuencia como la especie asignada.

### 8.7 Reconstrucción filogenética

Para asignar las secuencias obtenidas a sus relativas especies bacterianas conocidas, se hizo una reconstrucción filogenética tomando las secuencias de referencia de los organismos mostrados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Especies y cepas de referencia utilizadas en el análisis filogenético.

<b>Cepas de referencia</b>	<b>Número de acceso</b>
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG19562	<u>NR_042155.1</u>
<i>Aeromonas media</i> ATCC 33907	<u>X60410.2</u>
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 33658T	<u>X74681.1</u>
<i>Aeromonas sobria</i> ATCC 43979T	<u>X74683.1</u>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5036	<u>NC_020410.1</u>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<u>NR_075005.1</u>
<i>Bacillus aquimaris</i> 12-4	<u>FJ607044.1</u>
<i>Bacillus boroniphilus</i> YNA54	<u>JN867119.1</u>
<i>Bacillus cereus</i> F837/76	<u>NC_016779.1</u>
<i>Bacillus cereus</i> JN156	<u>KF150409.1</u>
<i>Bacillus foraminis</i> CV53	<u>NR_042274.1</u>
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<u>NC_006270.3</u>
<i>Bacillus licheniformis</i> CICC10102	<u>DQ171712.1</u>
<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A	<u>NC_021362.1</u>
<i>Bacillus megaterium</i> WSH-002	<u>NC_017138.1</u>
<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	<u>CP001982.1</u>
<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	<u>NR_074290.1</u>
<i>Bacillus oceanisediminis</i> CCMM B618	<u>JN208067.1</u>
<i>Bacillus pumilus</i> APT37	<u>KC519409.1</u>
<i>Bacillus pumilus</i> M1-9-1	<u>AB048252.1</u>
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168	<u>NR_102783.1</u>
<i>Bacillus subtilis</i> BAB-2489	<u>KC443094.1</u>
<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6	<u>JQ799104.1</u>
<i>Escherichia coli</i> DH1	<u>NC_017638.1</u>
<i>Escherichia coli</i> DH5α	

<i>Exiguobacterium profundum</i> 10C	<u><b>AY818050.1</b></u>
<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15	<u><b>NR_075006.1</b></u>
<i>Microbacterium halophilum</i> 76	<u><b>NR_028601.1</b></u>
<i>Microbacterium oleivorans</i> DSM 16091	<u><b>NR_042262.1</b></u>
<i>Microbacterium oleivorans</i> MS25	<u><b>KF311081.1</b></u>
<i>Microbacterium paraoxydans</i> C57-33	<u><b>AJ581908.1</b></u>
<i>Microbacterium profundum</i> Shh49	<u><b>NR_044321.1</b></u>
<i>Paenibacillus favisporus</i> T2	<u><b>JN867753.1</b></u>
<i>Paenibacillus favisporus</i> GMP01	<u><b>NR_029071.1</b></u>
<i>Paenibacillus lautus</i> NE3B01	<u><b>JX273779.1</b></u>
<i>Paenibacillus pabuli</i> MSB13	<u><b>FJ189794.1</b></u>
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> XIL14	<u><b>NR_029109.1</b></u>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	<u><b>NC_008463.1</b></u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PC17	<u><b>AY538263.1</b></u>
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36	<u><b>NR_042191.1</b></u>
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	<u><b>NR_074829.1</b></u>

### ***8.8 Análisis de la Diversidad específica***

El análisis de diversidad se realizó con las identidades de los aislados, para lo cual se obtuvieron los índices de Shannon y Simpson para diversidad alfa, con el programa PAST, y Sorensen para diversidad beta. Se produjeron curvas de rarefacción para ambos manantiales (PAST).

### ***8.9 Análisis de la Diversidad genética***

Con las secuencias de rRNA 16S de cada especie y el programa DnaSP 5.10 se sacaron las diversidades haplotídicas y nucleotídicas, dos parámetros que nos permiten conocer el estado de las poblaciones detectadas así como la clonalidad de los aislados.

### ***8.10 Correlaciones de los parámetros fisicoquímicos con cambios en la diversidad***

Se calcularon los coeficientes de determinación de Pearson ( $r^2$ ) existentes entre cada uno de los parámetros fisicoquímicos medidos en cada manantial termal y estación del año y los índices de diversidad de Shannon calculados para el mismo manantial y tiempo de muestreo. De esta forma se obtuvieron cuatro puntos para cada correlación parámetro fisicoquímico-índice de diversidad. A partir de la  $r^2$  se sacó raíz cuadrada obteniéndose el parámetro r (o coeficiente de correlación) que posteriormente se multiplicó por 100 para obtener los porcentajes de correlación. Las correlaciones superiores a 80% se consideraron altas.

## 9. Resultados

### 9.1 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros ambientales se midieron en cada estación en campo y en el laboratorio. Cabe destacar que todos presentaron cambios, sin embargo, algunos fueron casi imperceptibles. Entre los parámetros que vale la pena destacar se encuentran la temperatura, el pH, el arsénico, el magnesio, sodio, cloruros, sulfatos y calcio, así como la búsqueda de coliformes totales por la CONAGUA (Tablas 3-4).

### 9.2 Aislamiento microbiano

Se obtuvieron 105 aislados microbianos, para el caso del manantial termal Bonita se lograron aislar 9, 11, 14 y 11 mientras que para el manantial Tina 14, 15, 12 y 11 correspondientes a los muestreos de invierno, primavera, verano y otoño respectivamente.

El primer paso para su análisis fue obtener cultivos puros por medio del cultivo repetitivo estriado en caja Petri. Sin embargo, como una medida del número de células viables en el tapete microbiano se llevó a cabo el conteo de UFCs bajo las condiciones de cultivo utilizadas, el tapete La Bonita presentó más UFCs que el tapete proveniente de La Tina (Fig. 8).

De los 105 aislados bacterianos obtenidos se hicieron cinéticas de crecimiento a las condiciones de aislamiento (37°C) y a 50°C para probar su termofilia. Se tomó una muestra de 23 aislados (ZAP001, ZAP002, ZAP003-1, ZAP003-2, ZAP004, ZAP005, ZAP006, ZAP007, ZAP008, ZAP009, ZAP010, ZAP011, ZAP012, ZAP013, ZAP014-1, ZAP0014-2, ZAP015, ZAP016, ZAP017, ZAP018-1, ZAP018-2, ZAP019, ZAP020) y a *Escherichia coli* DH5α como control positivo en las cinéticas a 37°C y control negativo de las cinéticas a 50°C. Las curvas de su crecimiento se muestran en la Fig. 9:

**Tabla 3.** Factores ambientales medidos en La Bonita.

Parámetros Fisicoquímicos	Unidades	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Conductividad Eléctrica	µmhos/cm	3650	3801	3670	3650
<b>Temperatura</b>	<b>°C</b>	<b>50</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>
<b>pH</b>	<b>Unidades</b>	<b>6.75</b>	<b>7.03</b>	<b>7.49</b>	<b>7.78</b>
Oxígeno disuelto	mg/L	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DBO5	mg/L	0.6	0.8	0.4	2.6
Sólidos totales	mg/L	2896	3184	2398	2502
Sólidos suspendidos totales	mg/L	18	22	22	16
sólidos totales disueltos	mg/L	2878	3162	2376	2486
Cloruros	mg/L	928	951	917	910
Sulfatos	mg/L	239	245	237	239
Dureza total	mg/L	574	626	598	593
Alcalinidad total	mg/L	310	337	328	328
Calcio	mg/L	230	202	187	158
Magnesio	mg/L	22	29	32	48
Sodio	mg/L	533	586	569	567
Nitrógeno amoniacal	mg/L	0	0	0	0
Coliformes fecales	NMP/100ml	0	0	0	0
<b>Arsénico</b>	<b>mg/L</b>	<b>3.7±0.03</b>	<b>4±0.01</b>	<b>2.9±0.003</b>	<b>2.7±.01</b>
Fluoruros	ppm	8.6	8.6	3.2	4.05

N.D.= No determinado

NMP=Número más probable

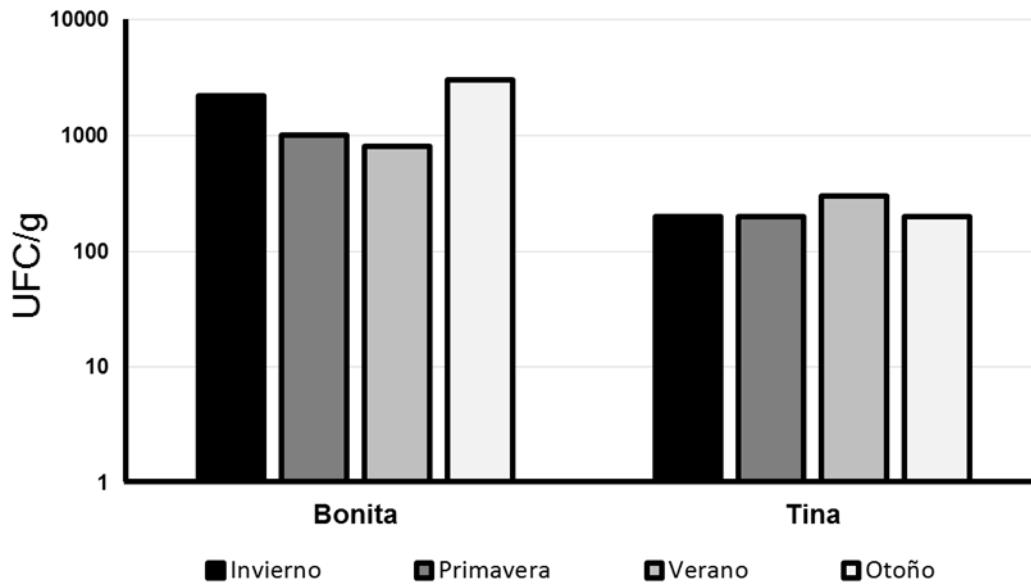


**Tabla 4.** Factores ambientales medidos en La Tina

Parámetros Fisicoquímicos	Unidades	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Conductividad Eléctrica	µmhos/cm	3860	3840	3950	3510
<b>Temperatura</b>	<b>°C</b>	<b>63</b>	<b>66</b>	<b>78</b>	<b>74</b>
<b>pH</b>	<b>Unidades</b>	<b>7.35</b>	<b>7.64</b>	<b>6.95</b>	<b>7.07</b>
Oxígeno disuelto	mg/L	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DBO5	mg/L	0.80	0.60	0.60	3
Sólidos totales	mg/L	2423	3722	2616	2410
Sólidos suspendidos totales	mg/L	26	26	36	30
sólidos totales disueltos	mg/L	2397	3196	2580	2380
Cloruros	mg/L	977	960	976	867
Sulfatos	mg/L	246	245	252	228
Dureza total	mg/L	572	632	649	570
Alcalinidad total	mg/L	330	338	347	330
Calcio	mg/L	188	207	209	153
Magnesio	mg/L	25	28	30	45
Sodio	mg/L	625	581	610	545
Nitrógeno amoniacal	mg/L	0	0	0	0
Coliformes fecales	NMP/100ml	0	0	0	0
<b>Arsénico</b>	<b>mg/L</b>	<b>4.9±0.01</b>	<b>4.7±0.006</b>	<b>6.6±0.01</b>	<b>6.1±0.004</b>
Fluoruros	ppm	7	7.4	3.9	2.9

N.D.= No determinado

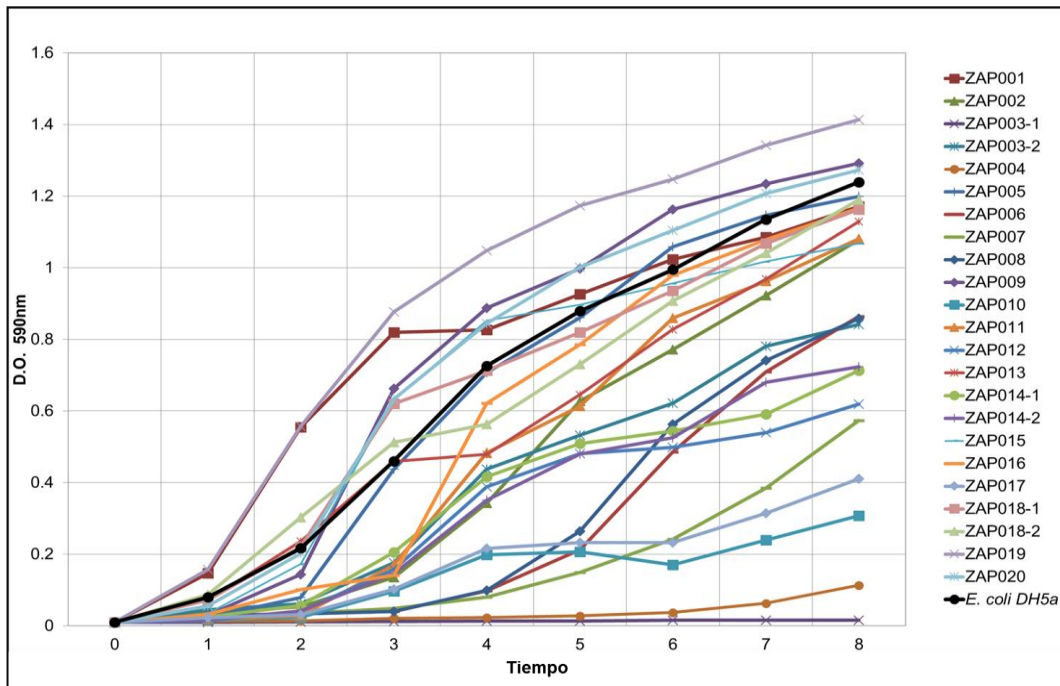
NMP=Número más probable



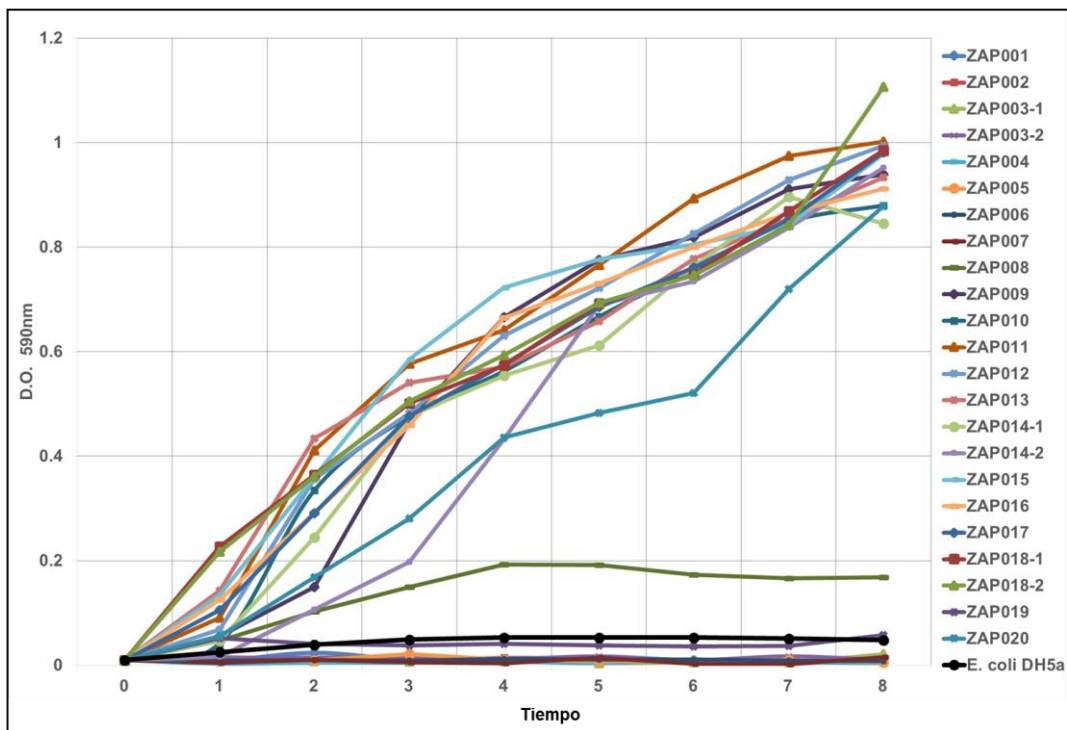
**Figura 8.** Unidades formadoras de colonias. Conteo de UFCs para los dos manantiales analizados así como, para cada estación muestreada. Crecidas en medio LB, toda la noche a 37°C.

El crecimiento de los aislados a 37°C lo vemos dividido en dos grupos: un conjunto que crece de manera óptima a esta temperatura (parte superior) y el segundo conjunto que crece de manera más lenta (Fig. 9). Cuando se llevaron a cabo las cinéticas a 50°C, se observó (Fig. 10) que la mayoría de los aislados crecieron óptimamente, un comportamiento esperado de microorganismos provenientes de una fuente hidrotermal, mientras que *E. coli* DH5α no creció a esta temperatura ya que se encuentra por encima de su rango de crecimiento.

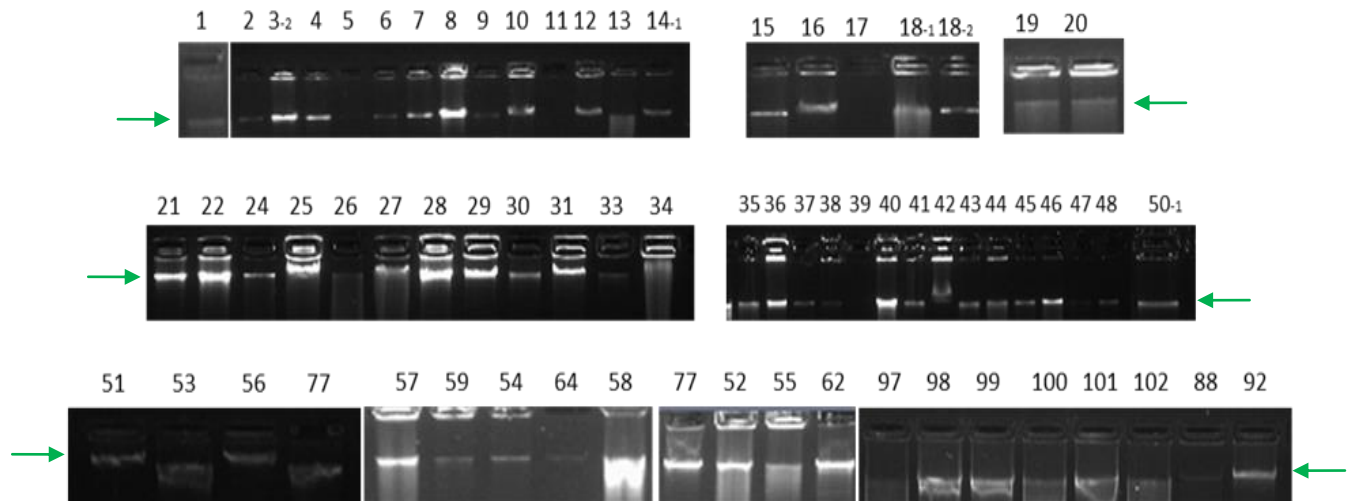
Los aislados microbianos fueron purificados hasta obtener colonias aisladas con morfología única, para ello se hicieron varias resiembras por estriado, con lo que se obtuvieron 105 cultivos puros. A partir de ellos se extrajo el DNA con el protocolo de Mahuku (Fig. 11), podemos observar una banda única correspondiente al ADN genómico.



**Figura 9.** Curvas de crecimiento de las cinéticas bacterianas a 37°C. La línea en negro señala el crecimiento de *E. coli* DH5α. Crecidas en medio LB en agitación constante (n=1).



**Figura 10.** Cinética de crecimiento bacteriano a 50°C. .En negro se indica la curva de crecimiento de *E. coli* DH5α. Crecidas en medio LB en agitación constante (n=1).

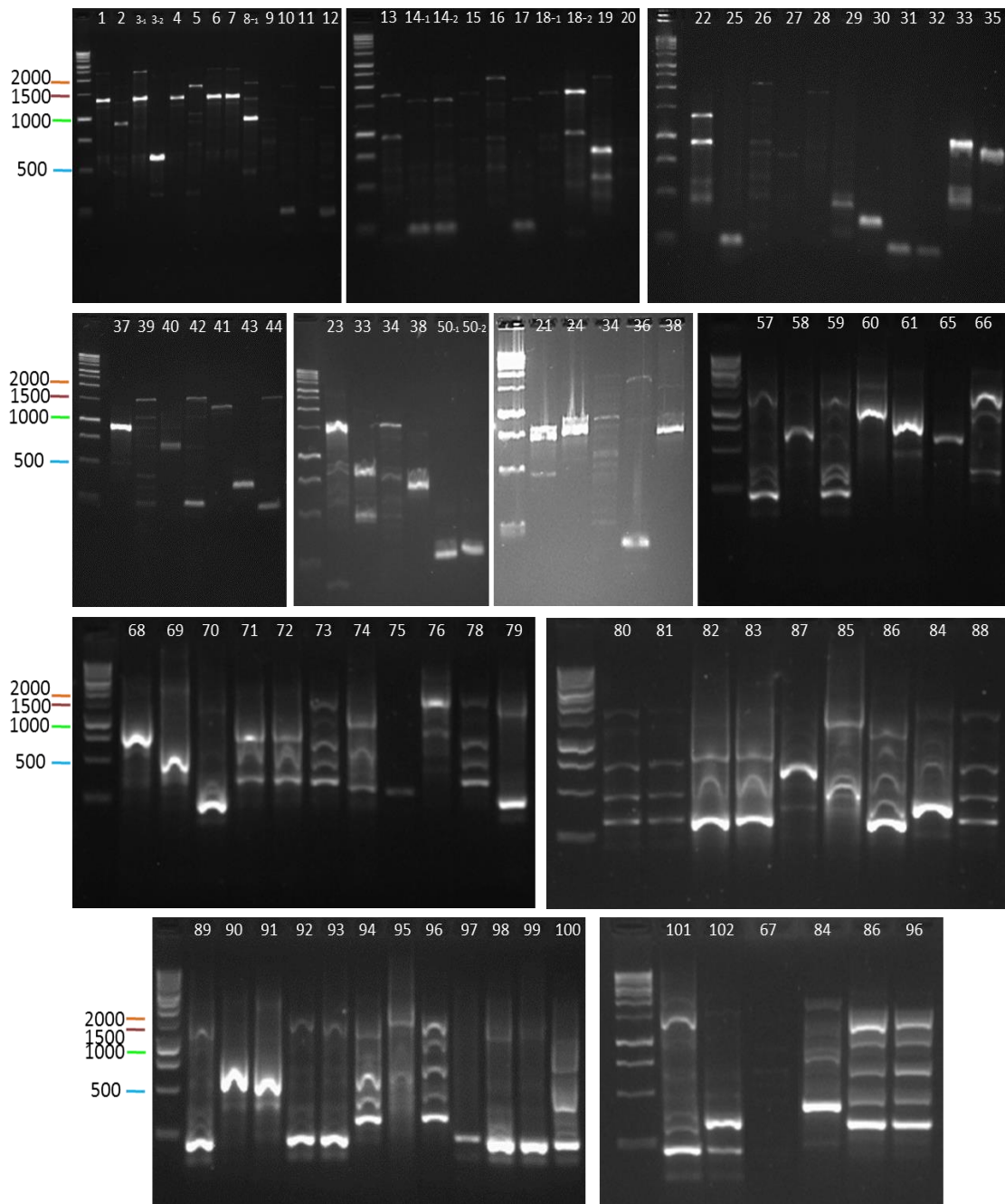


**Figura 11.** DNA genómico extraído de los aislados microbianos, utilizando el protocolo de Mahuku. En la parte superior se indica el número del aislado al que pertenece el DNA. Con flechas verdes se indica la altura a la que se encuentran las bandas, y por encima el pozo de carga.

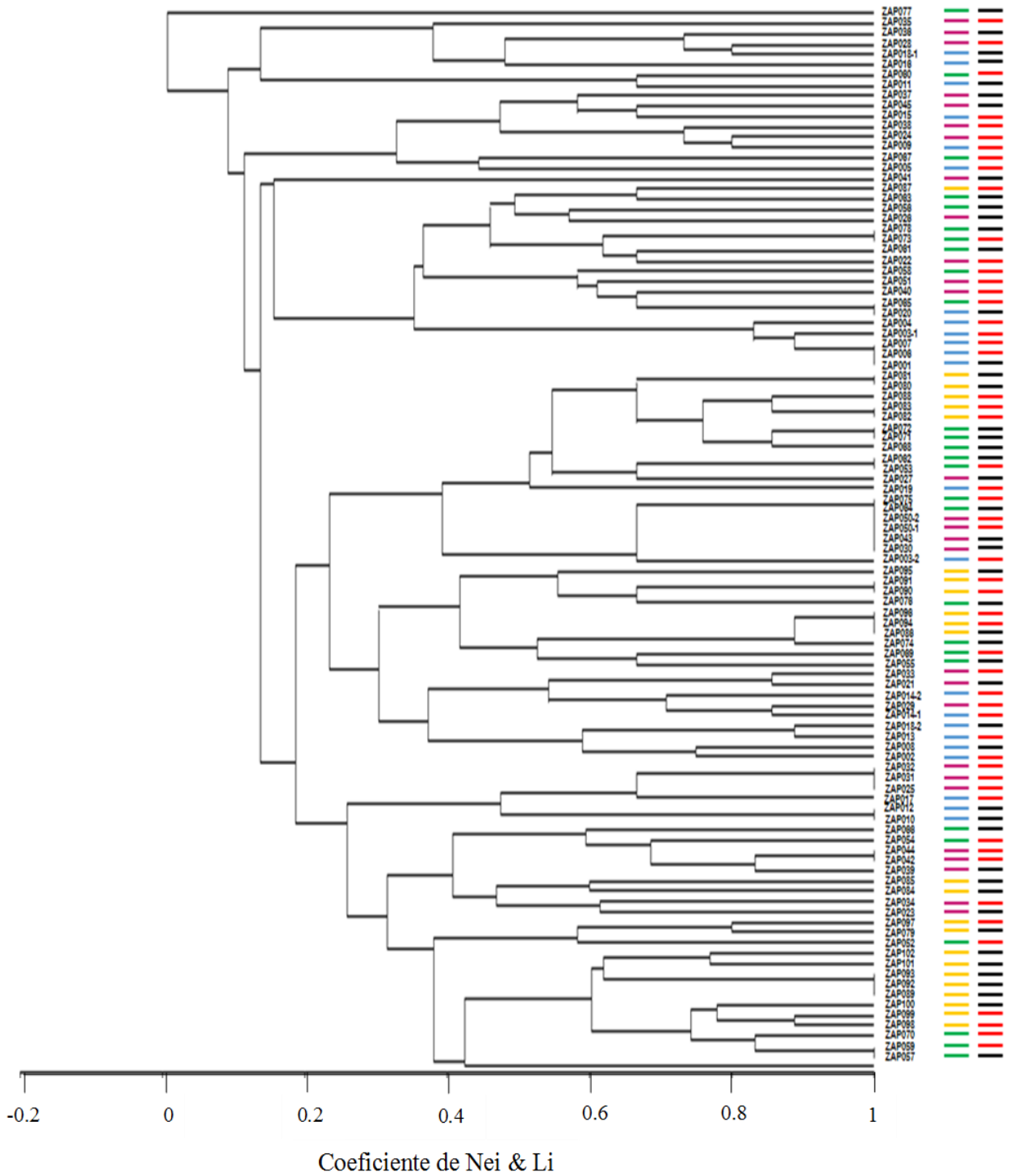
Este DNA extraído fue utilizado como templado para la técnica molecular RAPD, para lo cual se utilizó el oligo Opa02. De los 105 aislados bacterianos analizados, se encontraron 79 haplotipos que mostraron patrones de bandeo únicos, exponiendo una alta diversidad genética entre ellos (Fig. 12).

Para observar la diversidad genética de los aislados de forma gráfica construimos un dendrograma con el programa MVSP (MultiVariate Statistical Package) (Kovach 1999) y el método de agrupamiento UPGMA, así como el coeficiente de Nei & Li como un modelo matemático para la variación genética a nivel de nucleótidos (Nei y Li 1979).

En el dendrograma, se muestra la gran diversidad genética entre cada aislado, de manera que muy pocos grupos se concentran en el mismo haplotipo. De manera peculiar los aislados ZAP075, ZAP064, ZAP050-2, ZAP050-1, ZAP043, ZAP030 presentaron exactamente el mismo haplotipo, no obstante fueron aislados en diferentes estaciones (primavera y verano) y en los dos manantiales (La Bonita y La Tina). Sin embargo, no se observó alguna relación entre la diversidad de haplotipos y la estación y/o poza (Fig. 13.)



**Figura 12.** Patrones de bandeo de RAPD de los 105 aislados bacterianos analizados. El número indica el aislado, el primer carril en cada gel corresponde al marcador de tamaño molecular de 1Kb.

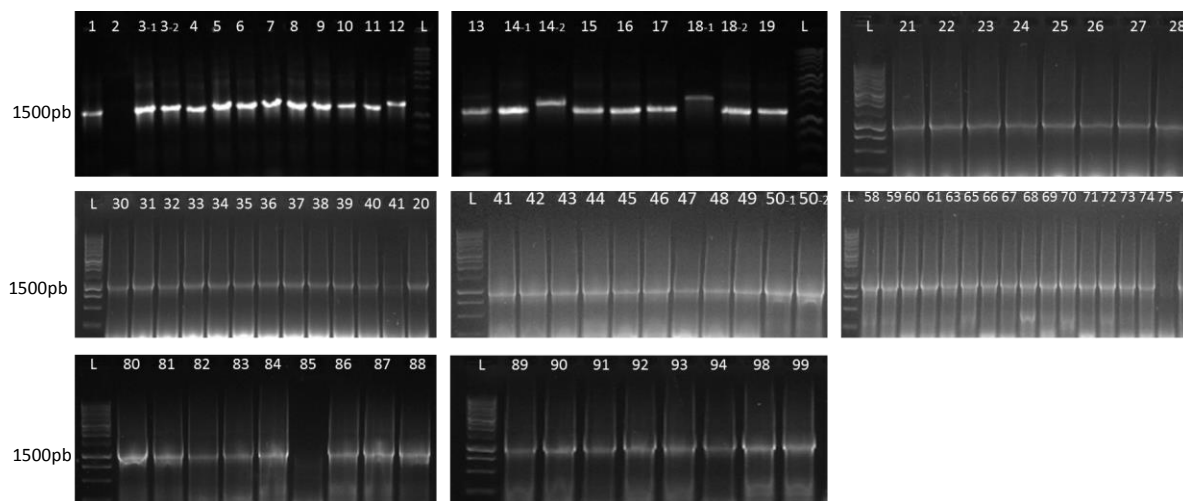


**Figura 13.** Diversidad genética de los aislados microbianos de la zona geotermal de Araró. A la derecha se muestra un código de colores. La primera columna correspondiente a las estaciones muestreadas: rosa=primavera, verde=verano, amarillo=otoño, azul=invierno, y la segunda columna el manantial muestreado: Negro=Bonita, Rojo=Tina.

### 9.3 Identificación de las especies bacterianas

#### 9.3.1 Amplificación y secuenciación de los genes de rRNA 16S

La identificación de los aislados bacterianos se llevó a cabo con la secuenciación de los genes marcadores de rRNA 16S. Para ello se seleccionaron con la técnica RAPD aquellos aislados no redundantes. Se amplificaron estos genes de 79 aislados (aquellos que mostraron haplotipos únicos) utilizando los oligonucleótidos fD1 y rD1 (Fig. 14), y se obtuvieron bandas de aproximadamente 1,500pb (tamaño del gen completo), mismas que se purificaron y mandaron secuenciar.



**Figura 14.** Amplificación de los genes de rRNA 16S. Electroforesis en agarosa al 1%. Banda única de tamaño molecular aproximado a 1,500pb correspondiente al gen completo. En la parte superior de cada carril se anota el número del aislado, y con L se señala el marcador de tamaño molecular 1Kb.

Se obtuvieron 74 secuencias de entre 517-1449pb. Realizamos búsquedas de tipo BLASTn en la base de datos “Collection nucleotide (nr/nt)” del NCBI, para inquirir la identidad de las secuencias y fijamos el punto de corte en 98%. Se identificaron 17 especies, del dominio Bacteria, pertenecientes a tres divisiones Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes (Tabla 5).

La división Firmicutes agrupó la mayoría de las especies con los géneros *Paenibacillus*, *Exiguobacterium* y *Bacillus*, siendo este último el mejor representado con 9

especies. Los representantes de la división Proteobacteria se concentraron en dos géneros de la subdivisión gamma proteobacteria, *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Por último, solo se recuperó un aislado de una especie de la división Actinobacteria, *Microbacterium oleivorans*.

**Tabla 5.** Identificación de las especies bacterianas, la división a la que pertenecen así como el tamaño de las secuencias del gen de rRNA16S.

	ESPECIE IDENTIFICADA	DIVISIÓN BACTERIANA	AISLADOS	TAMAÑO PROMEDIO DE LAS SECUENCIAS (pb)
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Proteobacteria	ZAP019,082,083	1037-1339
2	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	Proteobacteria	ZAP069	1342
3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	ZAP090,091	1341
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Firmicutes	ZAP018-2,027	673-1286
5	<i>Bacillus boroniphilus</i>	Firmicutes	ZAP002,008,022,038	605-1433
6	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	ZAP009,015,030,034,040,043,050,058,064,067,075,077,087,102	817-1438
7	<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	ZAP010,012,014-1,014-2,017,025,031,032,036,039,042,044,054,057,059,070,073,078,079,080,081,086,088,094,095,096,097,098,099,101	575-1449
8	<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes	ZAP005,020,065,066	1037-1386
9	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	Firmicutes	ZAP021	1300
10	<i>Bacillus pumilus</i>	Firmicutes	ZAP016,026,028,053,055,061,062,068,071,072	1194-1436
11	<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	ZAP013,018-1,023,033,052,100	1274-1411
12	<i>Bacillus vietnamensis</i>	Firmicutes	ZAP001,003-1,004,006,007,041,060	517-1437
13	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	Firmicutes	ZAP024,035,037,045	1238-1315
14	<i>Exiguobacterium profundum</i>	Firmicutes	ZAP076,084	1392-1438
15	<i>Paenibacillus pabuli</i>	Firmicutes	ZAP003-2	1397
16	<i>Paenibacillus favisporus</i>	Firmicutes	ZAP029	1309
17	<i>Microbacterium oleivorans</i>	Actinobacteria	ZAP074	1299

La información desglosada del análisis de las secuencias se proporciona en el **ANEXO I**.



### 9.3.2 Reconstrucción filogenética

Para confirmar la identidad de las secuencias así como sus relaciones evolutivas, se hizo el análisis filogenético. Para ello se produjeron 3 árboles, uno por cada división bacteriana encontrada, con el programa MEGA 5.0, el método de agrupamiento Neighbor-joining y como medida de soporte Bootstrap con 1000 repeticiones.

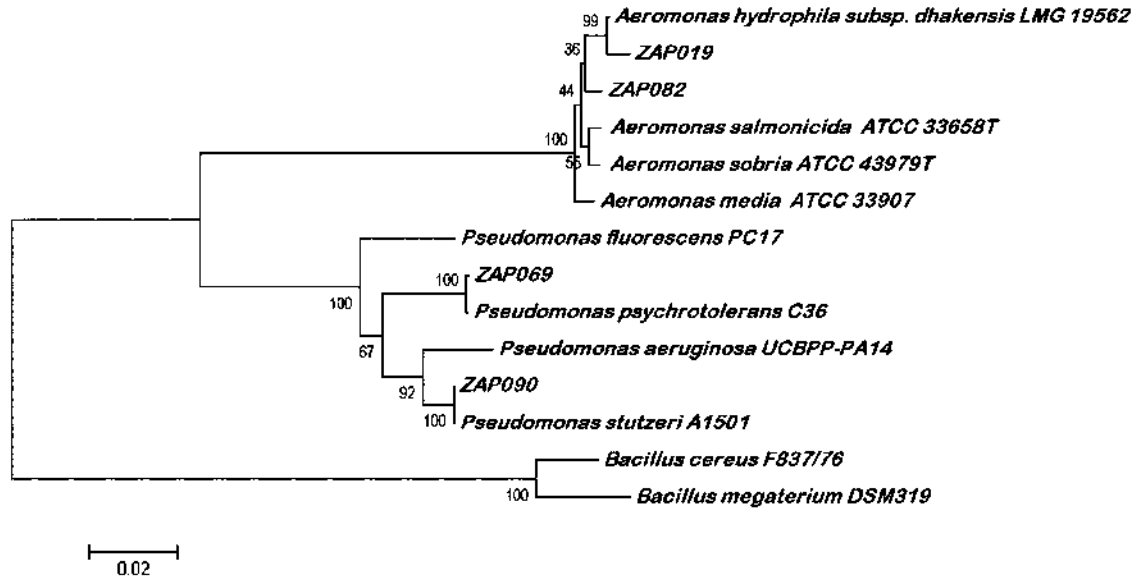
Los Firmicutes son la división mejor representada con el 76% de las especies, repartidas en tres géneros *Bacillus*, *Exiguobacterium* y *Paenibacillus*. Para la reconstrucción filogenética de los aislados, se utilizaron todas las secuencias obtenidas así como secuencias de cepas de referencia, de acuerdo a las especies identificadas por BLASTn. Como grupo externo se usó una gamma proteobacteria *Escherichia coli* (las cepas DH1 y DH5 $\alpha$ ) (Fig. 15).

Las Proteobacterias (18%) por su parte están representadas por los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Las secuencias de las especies identificadas fueron utilizadas para su ubicación filogenética, como grupo externo se utilizaron a las bacterias gram positivas *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium*. El árbol resultante se muestra en la Figura 16.

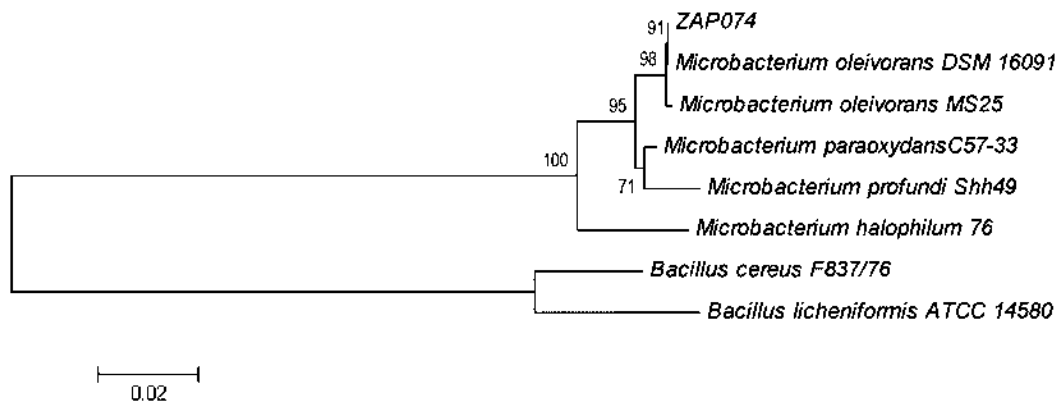
Por su parte la filogenia de un único aislado de la división Actinobacteria (6%) *Microbacterium oleivorans* se muestra en la Figura 17. Este se agrupa perfectamente con cepas de esta especie, como grupo externo se utilizó a las Firmicutes *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*.



**Figura 15.** Análisis filogenético de las secuencias del gen rRNA 16S con Neighbor-joining. Aislados correspondientes a la división Firmicutes. En la base de cada nodo la medida de soporte Bootstrap de 1000 repeticiones.



**Figura 16.** Análisis filogenético de las secuencias del gen rRNA 16S con Neighbor-joining. Aislados correspondientes a la división Proteobacteria. En la base de cada nodo la medida de soporte Bootstrap con 1000 repeticiones.



**Figura 17.** Análisis filogenético de las secuencias del gen rRNA 16S con Neighbor-joining. Aislados correspondientes a la división Actinobacteria. En la base de cada nodo la medida de soporte Bootstrap con 1000 repeticiones.

## 9.4 Análisis de diversidad

### 9.4.1 Diversidad genética

Las diversidades haplotídicas y nucleotídicas fueron obtenidas, utilizando las secuencias del gen de rRNA 16S para 10 especies (Tabla 6). Seis especies: *B. licheniformis*, *B. cereus*, *E. profundum*, *B. megaterium*, *B. vietnamensis*, *B. pumilus* y *Aeromonas hydrophila*, mostraron altas diversidades haplotídicas, cercanas a 1, siendo estas la probabilidad de tomar dos haplotipos de una población y que sean diferentes, todas estas especies pertenecen a poblaciones con alto grado de diversidad genética, aún en un gen tan conservado como el 16S. Esta diversidad se corresponde con la nucleotídica en la cual *A. hydrophila*, *B. licheniformis*, *B. vietnamensis* y *B. cereus* presentaron las más altas, indicando que las poblaciones analizadas tienen baja clonalidad entre sus integrantes.

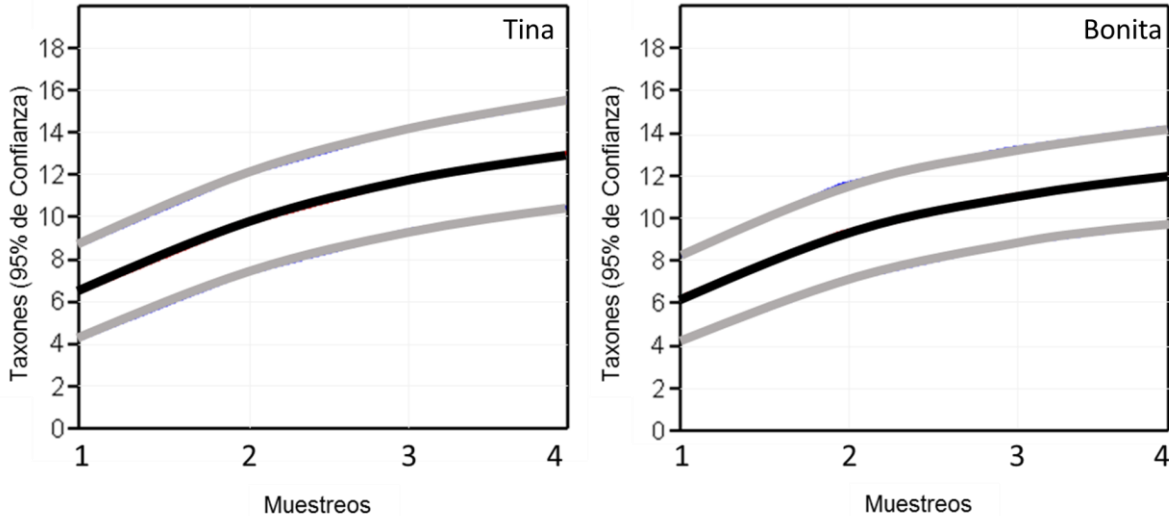
**Tabla 6.** Análisis de la diversidad Haplotídica y Nucleotídica.

Especies	No. de Secuencias	Sitios polimórficos	No. de Haplotipos	Diversidad haplotídica	Diversidad nucleotídica
<i>Bacillus licheniformis</i>	8	34	7	0.964	0.00853
<i>Bacillus cereus</i>	9	11	5	0.833	0.00297
<i>Exiguobacterium profundum</i>	2	2	2	1.000	0.00144
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	4	1	2	0.500	0.00040
<i>Bacillus megaterium</i>	3	3	3	1.000	0.00150
<i>Bacillus vietnamensis</i>	6	11	5	0.933	0.00333
<i>Bacillus boroniphilus</i>	2	0	1	0.000	0.00000
<i>Bacillus subtilis</i>	4	2	2	0.500	0.00118
<i>Bacillus pumilus</i>	5	4	3	0.700	0.00134
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	15	2	1.000	0.01449

## 9.4.2 Diversidad específica

### 9.4.2.1 Curvas de rarefacción

La curva de rarefacción se hizo una vez que se identificaron las especies de cada muestreo. Con ello se produjo una base de datos que se importó al programa PAST con el cual se obtuvieron dos curvas propias de La Tina y La Bonita (Fig. 18). Para ambos casos las curvas de rarefacción tienden a la meseta o asíntota mostrando que los muestreos son representativos de las comunidades de bacterias heterótrofas aerobias provenientes de los tapetes microbianos, y que por lo tanto el número de especies nuevas en un quinto muestreo sería muy bajo.



**Figura 18.** Análisis de rarefacción de los muestreos realizados a La Tina y La Bonita. En negro se muestra la curva de rarefacción para ambos manantiales, y en gris se muestra el intervalo de confianza en cada caso.

### 9.4.2.2 Índices de diversidad

El análisis de la diversidad alfa (es decir aquella propia de un hábitat dado), se realizó al obtener los índices de Shannon, que pondera principalmente la riqueza de especies y, el índice de Simpson que le da mayor peso a la dominancia de las especies comunes (Tabla 7).

Para el caso de La Tina la estación con mayor diversidad fue la primavera, seguida del invierno, el verano y finalmente el otoño, de manera complementaria el índice de Simpson muestra la mayor dominancia en otoño. La Bonita por su parte, mostro un patrón similar con la mayor diversidad según Shannon en invierno seguido de la primavera, verano y otoño. Con respecto al índice de Simpson, de igual manera que La Tina el otoño presentó la mayor dominancia.

**Tabla 7.** Índices de diversidad: Shannon y Simpson para diversidad alfa.

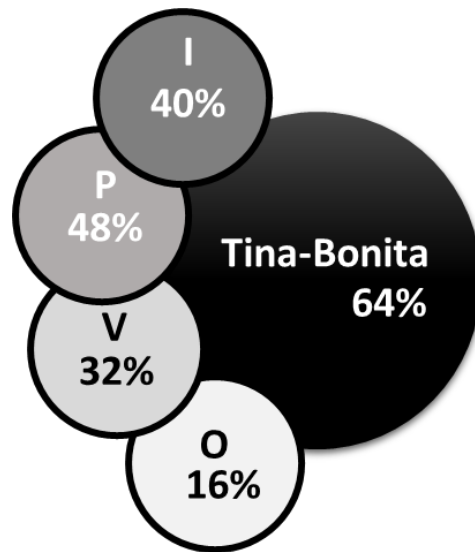
	Simpson (D)		Shannon (H)	
	Tina	Bonita	Tina	Bonita
<b>Invierno</b>	0.1563	0.1735	1.906	1.909
<b>Primavera</b>	0.1405	0.2	2.02	1.767
<b>Verano</b>	0.2653	0.2083	1.537	1.748
<b>Otoño</b>	0.4375	0.3719	1.074	1.169

Para el análisis de la diversidad beta se aplicó el índice de Sorensen, que nos permite comparar la comunidad bacteriana de La Tina con la de La Bonita (Fig. 19). La similitud total entre las comunidades fue del 64%, sin embargo, cuando se desglosa para cada una de las estaciones, se observa que cada una presenta composición y estructura característica, y que estas dos comunidades no son subsistemas una de la otra.

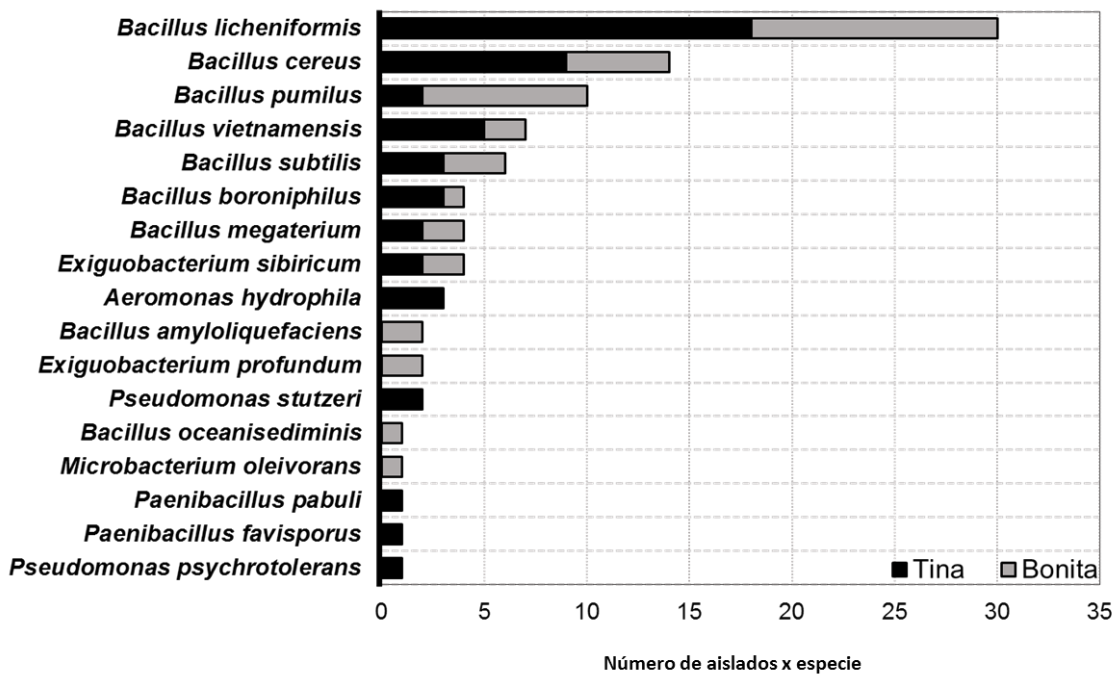
#### **9.4.2.3 Abundancia y ocurrencia**

Algunas especies mostraron altas abundancias, con un gran número de aislados, mientras que el grueso de las poblaciones presentó abundancias medias, y por último algunas especies raras también fueron recuperadas de los manantiales (Fig. 20).

La especie más abundante en ambas pozas fue *B. licheniformis* con 30 aislados en total, seguida por *B. cereus*. Entre las especies raras podemos mencionar las de los géneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Microbacterium*.



**Figura 19.** Esquema que muestra el Índice de Sorensen. El círculo interior representa la comparación total de las comunidades de La Tina y La Bonita. En los pequeños círculos a la izquierda, se muestra el porcentaje de similitud de los manantiales para I-invierno, P-primavera, V-verano y O-otoño.



**Figura 20.** Abundancias de cada una de las especies por manantial.

El inventario de las especies también consistió en ver la ocurrencia de las especies en los diferentes muestreos. En total, se pueden dividir tres grupos de bacterias: las *dominantes*, es decir las que estuvieron presentes en 3 ó 4 de los muestreos y que caracterizamos como habitantes permanentes del tapete, las *frecuentes* que se encontraron en 2 de los 4 muestreos y las *ocasionales* que solo se recuperaron en un muestreo (Tabla. 8).

**Tabla 8.** Ocurrencia de las especies en los muestreos estacionales y las pozas Tina y Bonita.

Especies bacterianas	TINA				BONITA				
	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	
<i>B. licheniformis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	Dominantes
<i>B. cereus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>B. subtilis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>B. pumilus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>B. megaterium</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	Frecuentes
<i>B. vietnamensis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>B. boroniphilus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>A. hydrophila</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>B. amyloliquefaciens</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	Ocasionales
<i>E. profundum</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>P. pabuli</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>P. favisporus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>E. sibiricum</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	Ocasionales
<i>B. oceanisediminis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>P. psychrotolerans</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>M. oleivorans</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>P. stutzeri</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	

\*Categorización de los grupos bacterianos detectados: dominantes, frecuentes y ocasionales.

\*Las bandas de color indican la presencia de las especies.



### 9.5 Correlaciones de los parámetros fisicoquímicos con cambios en la diversidad

Los parámetros fisicoquímicos fueron correlacionados con la diversidad en términos del índice de Shannon para cada estación. Algunos parámetros arrojaron correlaciones bajas y medias, mientras que algunos mostraron altas correlaciones. En la Tabla 9, se muestran aquellos con altas correlaciones, por encima del 80%.

**Tabla 9.** Correlación de los parámetros fisicoquímicos con las diversidades de cada

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	% CORRELACIÓN*	
	Tina	Bonita
Conductividad eléctrica	92.0	60.4
Temperatura	50.1	90.5
pH	42.5	91.7
DBO	95.4	78.9
Solidos totales	29.1	81.8
Cloruros	97.9	87.0
Sulfatos	89.8	55.8
Calcio	82.3	87.9
Magnesio	99.4	90.7
Sodio	91.3	6.8
Arsénico	47.4	94.4
Fluoruros	77.4	83.0

estación muestreada.

\*Índice de correlación de Pearson

Ambas comunidades mostraron correlaciones altas a los cambios en los parámetros ambientales. La Tina por su parte, se correlacionó con cambios en el contenido de sales de

sus aguas tales como cloruros, sulfatos, calcio, magnesio y sodio así como. a la DBO y la conductividad eléctrica está relacionada al contenido de iones en suspensión. El caso de la Bonita fue bastante diferente. En este ambiente, cambios en la temperatura, pH, arsénico y algunas sales como cloruros, magnesio y calcio se vieron de manifiesto al influenciar la diversidad microbiana. Estos dos manantiales presentan características propias que las distinguen, mientras que la Tina es un sistema abierto con flujo constante de agua y que se encuentra sobre una cama de sedimentos minerales, la Bonita semeja más bien un sistema cerrado con baja emanación de agua, sin salientes cuyas temperaturas van de un ambiente mesófilo a un ambiente termófilo durante el año.

## 10. Discusión

Los tapetes microbianos durante mucho tiempo se consideraron ambientes sencillos y sumamente estables (Ward *et al.* 1998). Los análisis de diversidad indican que estos hábitats son más diversos de lo antes reportado. Un gran número de especies es reportado en cada trabajo, donde podemos observar que cada comunidad aunque muestre similitudes con otras es única e irrepetible.

Es por ello que la comparación de la diversidad comprende el uso de índices ecológicos y sin bien, estos son ampliamente aplicados a comunidades de suelo (García-Salamanca 2012), para los tapetes hay pocos trabajos que los presentan haciendo que la comparación entre estas comunidades sea una tarea complicada.

En la provincia de Yunnan, China, el análisis de 17 manantiales termales les permitió hacer un análisis de diversidad significativo que incluye índices ecológicos, la mayoría de sus muestras van de 1-3 en el índice de Shannon ( $H'$ ) y algunas extraordinarias de 5 (Hou *et al.* 2013). En manantiales de Tailandia el estimado se muestra más conservador con  $H'$  de 2.1-2.4 (Purcell *et al.* 2007), y en manantiales del Tibet  $H'$  1.5-3 (Yim *et al.* 2006), comparando nuestros estimados que van de 1-2 para Araró, éste parece un ambiente menos diverso. Una diferencia importante entre los estudios mencionados y el presente trabajo son las técnicas utilizadas. En el caso de los estudios de manantiales termales chinos, todas las técnicas empleadas fueron moleculares y los índices se obtuvieron a partir de OTUs y no de especies, lo cual sobreestima el resultado de la diversidad. En el presente trabajo, se identificaron 79 haplotipos (equiparables a OTUs) que correspondieron a solo 17 especies.

Por otro lado, las curvas de rarefacción, que permiten conocer la representatividad de los muestreos, son prácticamente inexistentes en otros análisis de los tapetes de manantiales termales. En nuestro caso, ambas curvas se dirigen a la meseta lo que nos indica que el esfuerzo de muestreo fue el adecuado.

Hasta donde sabemos la alta diversidad identificada de Firmicutes no ha sido encontrada en ningún otro manantial termal. Y la proporción de Firmicutes, Proteobacterias y Actinobacterias solo se descubrió al analizar comunidades microbianas de fumarolas del

volcán Parícutín en el estado de Michoacán (Comunicación personal con Miguel Medrano). En otros lugares del mundo, se ha visto que Firmicutes y Proteobacterias son los grupos dominantes de heterótrofos en tapetes (Huang *et al.* 2011).

De las 13 especies de Firmicutes, solo *B. megaterium* (Baker *et al.* 2001) y *E. profundum* (Crapart *et al.* 2007) y una especie de *Paenibacillus* (Mead *et al.* 2012) han sido aisladas de ambientes termales.

Los *Bacillus* son bacterias Gram positivas con bajo contenido de G+C, aerobias o anaerobias facultativas, formadoras de endosporas, que son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos por lo que se les puede encontrar en gran variedad de ambientes (Alcaraz *et al.* 2010).

Los *Bacillus* comúnmente encontrados en suelo *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. megaterium* (Slepecky y Hemphill 2006) tienen la capacidad de crecer a altas temperaturas (Slepecky y Hemphill 2006, Yakimov *et al.* 1995), sin embargo, solo *B. megaterium* ha sido detectada por técnicas moleculares y cultivo microbiano en manantiales de Indonesia (Baker *et al.* 2001), además de presentar enzimas termoestables (Kuhn y Fortnagel 1993).

*Bacillus boroniphilus* es una especie cuya cepa tipo fue aislada de suelo contaminado del área de Hisarcik, Turquía, y presenta alta tolerancia a grandes concentraciones de Boro e incluso las requiere para su crecimiento óptimo (Ahmed *et al.* 2007). En este trabajo obtuvimos un par de aislados de esta especie y aunque no se ha reportado su aislamiento de ambientes termófilos, las aguas de ambos manantiales (Tina y Bonita) en Araró presentan altos contenidos de boro (Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín 2005), uno de los nutrientes que limitan o favorecen el crecimiento de esta especie.

*Bacillus vietnamensis* fue descrita como una especie moderadamente halotolerante, formadora de endosporas, aislada de lugares tan diferentes como salsa de pescado en Vietnam y el Golfo de México. Algunas cepas presentan mayor rango de temperatura (Noguchi *et al.* 2004), sin embargo, esta especie no ha sido reportada previamente en manantiales, este el primer reporte de ello.

*Bacillus oceanisediminis* fue aislada de sedimento marino al sur de China (Zhang *et al.* 2010), la cepa aislada en este trabajo corresponde al primer reporte de su aislamiento de un ambiente geotermal.

*B. licheniformis*, generalmente encontrado en suelo, fue detectado como una especie dominante en las comunidades analizadas. Aunque no hay reportes de esta especie en ambientes similares ni con técnicas moleculares ni tradicionales, nosotros la recuperamos en todos los muestreos con una alta abundancia, por lo que sugerimos que se trata de una especie importante para este sistema biológico. Ningún *Bacillus* de linaje termofílico fue encontrado en este trabajo, sin embargo, en otros manantiales, por ejemplo en el Octopus de Yellowstone (EUA) si se han recuperado aislados termofílicos de este género (Nold *et al.* 1996).

Las especies de *Exiguobacterium* han sido aisladas de muy diferentes fuentes desde hielo glaciar, manantiales termales en Yellowstone (EUA), y rizósferas y son frecuentemente recuperadas de ambientes extremos (Vishnivetskaya *et al.* 2009). El género comprende especies y cepas, psicofílicas, mesofílicas y moderadamente termofílicas (Vishnivetskaya *et al.* 2005).

*E. profundum* es una bacteria halotolerante, moderadamente termófila aislada de ventanas hidrotermales del océano Pacífico, a unos 2600 m de profundidad (Crapart *et al.* 2007). *E. sibiricum* fue inicialmente aislada de permafrost de Siberia y múltiples análisis lo sitúan en el grupo de las psicofílicas (Vishnivetskaya *et al.* 2009), siendo este el primer reporte de su aislamiento de un manantial termal.

*Paenibacillus* es un género de bacterias Gram positivas íntimamente relacionadas a *Bacillus*, las cuales han sido aisladas de suelo, la Antártida y cavidades orales de animales (Mead *et al.* 2012). En nuestro análisis logramos aislar 2 especies *P. favisporus* y *P. pabuli*, y aunque estas especies no están muy relacionadas a manantiales termales la especie hermana *P. lautus* fue recuperada del manantial Obsidiana en Yellowstone (Mead *et al.* 2012); sin embargo, nuestros aislados no muestran cercanía filogenética con esta especie.

El 18% de los aislados correspondió a las Proteobacterias, una de las divisiones más grandes y con mayor diversidad metabólica del dominio Bacteria, dividida en cinco grandes

linajes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - y  $\epsilon$ -Proteobacteria (Kersters *et al.* 2006). Seis aislados pertenecen a los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*, ambas gammaproteobacterias. Esta subdivisión también se ha localizado en la Patagonia, Chile, en pozas hidrotermales como un importante constituyente de la comunidad (Mackenzie *et al.* 2013), e incluso se han reportado hasta el 80% de Proteobacterias de una comunidad geotermal (Moyer *et al.* 1995).

*Aeromonas hydrophila* es una bacteria patógena de humanos y otros animales tanto de sangre fría como caliente, sin embargo, se encuentra ampliamente distribuida de manera natural en el ambiente, particularmente, en cuerpos de agua como ríos, lagos, pozos, estuarios, agua potable, corrientes subterráneas y aguas residuales (Farmer *et al.* 2006, Janda y Abbott 2010). Crece además en una amplia gama de condiciones ambientales, aunque no se le asocia a cuerpos de agua termal (Janda y Abbott 2010). Se han obtenido clonas cercanamente relacionadas a *A. salmonicida* (Huang *et al.* 2011), y *A. sobria* (Yim *et al.* 2006) de manantiales del Tibet, China, extendiendo en conjunto con el presente trabajo el rango de ambientes en los cuales habita este género.

El género *Pseudomonas* comprende muchas especies con gran versatilidad metabólica y plasticidad genética, mismas que le permiten hacer uso de un vasto número de compuestos orgánicos e inorgánicos y vivir bajo muy diversas condiciones ambientales. *Pseudomonas* presenta requerimientos nutricionales sencillos, alta adaptabilidad metabólica, por lo que se le encuentra existiendo de manera silvestre en suelos y agua así como tejidos animales y vegetales, bajo condiciones aerobias, mesofílicas y con pH neutros (Moore *et al.* 2006). Es un género muy rico en especies, pero éstas no están coligadas a manantiales termales, no obstante, en nuestro aislamiento microbiano inventariamos dos especies: *P. psychrotolerans* y *P. stutzeri*. *P. psychrotolerans* aislada de una granja veterinaria (Hauser *et al.* 2004) no ha sido reportada de manantiales termales. *P. stutzeri* es del grupo de las no fluorescentes, de amplia distribución en suelo y agua, y muy vigorosa como desnitrificante (Palleroni *et al.* 1970). Este es el primer trabajo en el cual se aíslan estas bacterias de ambientes geotermales.

Un aislado se identificó como *Microbacterium oleivorans* la cual es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta que no forma esporas. Se caracterizó por primera vez como

degradadora de hidrocarburos en contenedores de petróleo (Schippers *et al.* 2005), y aunque esta especie no ha sido relacionada a ambientes termales y su crecimiento ronda en el rango mesofílico otras especies de actinobacterias han sido detectadas en manantiales termales en China, Rusia y EUA (Song *et al.* 2009).

Encontrar grupos microbianos más relacionados a aquellos principalmente habitando suelos pareciera una inconsistencia, sin embargo, es un hecho no solo reportado en este trabajo, sino también en manantiales de China, Rusia y EUA (Song *et al.* 2009, Huang *et al.* 2011) Por otro lado, se ha observado que microorganismos de la misma especie e idénticos rRNA 16S pueden presentar distintas características fisiológicas, que les confieren la capacidad de ocupar distintos nichos ecológicos en ambientes iguales o diferentes (Jaspers y Overmann 2004).

Adicionalmente, encontramos alta diversidad genética entre los aislados analizados tanto por la técnica RAPDs, que nos desglosó un total de 79 haplotipos, hasta en un análisis más fino a nivel del gen 16S en términos de diversidades haplotídicas y nucleotídicas.

A nuestro entender, actualmente no hay otros trabajos que hayan explorado la diversidad genética intraespecífica de los integrantes de un mismo manantial, de muchas de las especies revisadas en este estudio (*A. hydrophila*, *B. boroniphilus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. vietnamensis*, *E. profundum*, *E. sibiricum*), que permitan comparar los resultados del presente trabajo, excepto por las bacterias *B. cereus* y *B. licheniformis*. En el caso de *B. cereus*, Daffonchio *et al.* (1998) utilizando distintas técnicas moleculares observaron una gran diversidad genética, sin embargo, ésta fue principalmente atribuida a elementos extracromosomales. Por su parte, para *B. licheniformis* se ha encontrado una alta diversidad genética, de manera general sus cepas se agrupan en dos o tres clusters dependiendo del análisis (Porwal *et al.* 2009). Esto se ha atribuido a la capacidad extraordinaria de intercambiar material genético con otros microorganismos, por ejemplo con *B. subtilis* (Daffonchio *et al.* 1998). Nuestro trabajo concuerda con estas observaciones, aunque de manera complementaria, ya que estas dos especies se encontraron entre las que presentaron mayor variación genética pero no en elementos extracromosomales o genes de fácil intercambio horizontal, sino en el gen ribosomal de 16S, prácticamente no

intercambiable. Ambos bacilos tienen altas diversidades genéticas entre sus integrantes, lo que nos indica un bajo nivel de clonalidad entre los aislados de Araró.

Con cada trabajo de diversidad microbiana nuestro entendimiento de la distribución de los microorganismos en la biosfera y en los ambientes terrestres se esclarece. En este caso, observamos que las comunidades microbianas de cada manantial, Bonita y Tina, están adaptadas a las condiciones fisicoquímicas circundantes, sin embargo, ambas pozas representan de buena manera dos sistemas hidrotermales diferentes, cuyas cualidades biológicas se ven regidas por ello.

La Bonita representa comunidades microbianas muy estables que se ven reflejadas en el grosor del tapete, ya que este ronda el centímetro de ancho, sin embargo, también constituye un sistema cerrado en el cual la emanación de agua es muy baja, y esta permanece estancada, no presenta corrientes salientes ni entradas de agua superficiales exceptuando las precipitaciones. Su comunidad microbiana se ve afectada en gran medida por cambios en la temperatura, que van de 45-55°C, pasando de un ambiente mesófilo a uno termófilo. Se ha explorado la influencia de la temperatura sobre las comunidades microbianas, donde cambios de temperatura abruptos, ligeros o en gradiente modifican la diversidad (Ferris y Ward 1997, Ward *et al.* 1998, Yim *et al.* 2006, Purcell *et al.* 2007, Mackenzie *et al.* 2013,). Incluso experimentos en mesocosmos de tapetes de Cuatro Ciénegas (Coahuila, México) han demostrado la sorprendente influencia sobre la diversidad de los cambios de temperatura a corto y largo plazo (Pajares *et al.* 2012, Pajares *et al.* 2013).

Otro parámetro importante fue el pH, cuyos ligeros cambios mostraron su influencia. De manera general se ha visto que éste es un factor importante que moldea las comunidades microbianas (Fierer y Jackson 2006), sin embargo, este no muestra gran correlación en algunos casos (Mackenzie *et al.* 2013), y en otros sí llega a haber correlación (Purcell *et al.* 2007). En la Bonita, la percepción de estos ligeros cambios nos puede indicar el delicado equilibrio en el que se encuentra dicha comunidad. Los cambiantes contenidos de arsénico parecen también influir, así como cambios en las concentraciones de algunas sales como magnesio, calcio y cloruros.



En el caso de la Tina, sus cualidades son un tanto diferentes y a este manantial se le asignó “sistema abierto”. Este se encuentra en un estado permanente de emanación de grandes cantidades de agua, que forman canales efluentes, sus temperaturas son más elevadas y por lo tanto representa un ambiente meramente termófilo. Cambios en la temperatura, pH y arsénico no influyen en la comunidad, a diferencia de lo que se observó en la Bonita.

En este sistema, la mayor afectación fueron los cambios en el contenido de sales de magnesio, sodio, calcio, cloruros y sulfatos. De éstos la mayoría de los manantiales presentan cantidades considerables, ya sea en China, la Patagonia o Rumania, (Coman *et al.* 2013, Hou *et al.* 2013, Mackenzie *et al.* 2013), Particularmente los sulfatos, se ha demostrado que afectan tanto a las comunidades de arqueas y bacterias en combinación con altas temperaturas, por lo que se sugiere que éstos en conjunto regulan la diversidad en ambientes termófilos (Purcell *et al.* 2007). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cuántos y cuáles son los factores que determinan las comunidades termófilas de los ambientes geotermales, aunque se sugiere que es un conjunto de parámetros (Hjorleifsdottir *et al.* 2001).

## 11. Resumen de resultados

- ✓ Con el técnica RAPDs se encontraron 79 haplotipos en los 105 aislados bacterianos analizados de ambos manantiales, Tina y Bonita.
- ✓ Se identificaron 17 especies que pertenecen a los géneros *Bacillus* (9), *Paenibacillus* (2), *Exiguobacterium* (2), *Pseudomonas* (2), *Microbacterium* (1) y *Aeromonas* (1).
- ✓ La estructura y diversidad de la comunidad bacteriana fue diferente en las distintas estaciones muestreadas.
- ✓ El índice de Shannon mostró una diversidad de especies de moderada-baja.
- ✓ El índice de Sorensen mostró que la comunidad microbiana de la Tina y la Bonita comparten un 64% de similitud en su composición bacteriana. Esta similitud varía en las diferentes estaciones analizadas
- ✓ Se encontraron diferentes correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos y la diversidad bacteriana de acuerdo al manantial analizado: mientras que para la Tina se correlacionaron los cambios en la diversidad con el magnesio, calcio, sodio, cloruros y sulfatos, es decir con las sales, para la Bonita las más altas correlaciones se presentaron con la temperatura, pH y arsénico.

## **12. Conclusión**

Los manantiales termales Tina y Bonita presentan comunidades bacterianas diversas y diferencialmente influenciadas por las fluctuaciones de temperatura, pH, arsénico, y contenido de sales.

### **13. Perspectivas**

- El análisis de la comunidad bacteriana de los manantiales termales de Araró sigue siendo nuestro objetivo de estudio, por lo que el uso de técnicas moleculares que nos permitan explorar la diversidad no cultivable tanto de bacterias como de arqueas desde un punto de metagenómico se plantea como la meta más próxima.
- Metatranscriptómica de las comunidades bacterianas de la Tina y Bonita para estudiar la expresión de genes relacionados a estos ambientes extremos.
- Búsqueda de mecanismos de resistencia a las condiciones ambientales de los manantiales Tina y Bonita como son: la presencia de proteínas de choque térmico, y elementos genéticos que confieran resistencia a arsénico, entre otros.

## **14. Lista de anexos**

**Anexo I** Tabla de Identidades específicas de los genes de rRNA 16S

## 15. Literatura citada

Ahmed I, A Yokota y T Fujiwara 2007. **A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth** *Extremophiles* 11:217-224

Alcaraz LD, G Moreno-Hagelsieb, LE Eguiarte, V Souza, L Herrera-Estrella y G Olmedo 2010. **Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics** *BMC Genomics* 11:332

Baker GC, S Gaffar, DA Cowan y AR Suharto 2001. **Bacterial community analysis of Indonesian hot springs** *FEMS Microbiology Letters* 200:103-109

Battistuzzi FU y SB Hedges 2009. **A major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land** *Molecular Biology and Evolution* 26(2):335-343

Biggs A, WC Hagins, WG Holliday, CL Kapicka, L Lundgren, AH MacKenzie, WD Rogers, MB Sewer, D Zike 2008. **Biodiversity and Conservation** In: Biology Mc Graw-Hill EUA 114-118

Colwell RK 2009. *Chapter III.1 Biodiversity: Concepts, Patterns and Measurement* **Princeton Guide to Ecology** 257-263

Coleman DC y WB Whitman 2005. **Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems** *Pedobiologia* 49: 479-497

Coman C, B Druga, A Hegedus, C Sicora y N Dragos 2013. **Archaeal and bacterial diversity in two hot spring microbial mats from a geothermal region in Romania** *Extremophiles* 17:523-534

Crapart S, M-L Fardeau, J-L Cayol, P Thomas, C Sery, B Ollivier y Y Combet-Blanc 2007. **Exiguobacterium profundum sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:287-292

Curtis TP, WT Sloan y JW Scannell 2002. **Estimating prokaryotic diversity and its limits** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(16): 10494-10499

Daffonchio D, S Borin, G Frova, PL Manachini y C Sorlini 1998. **PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraespecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*** *International Journal of systematic Bacteriology* 48:107-116

Des marais DJ 2003. **Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere** *Biological bulletin* 204:160-167

Dirzo R y E Mendoza 2008. **Biodiversity** *In: Encyclopedia of Ecology* Jorgensen SE, BD Fath (eds) Elsevier Países bajos 3839

Farmer JJ, MJ Arduino y FW Hickman-Brenner 2006. **The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*** *Prokaryotes* 6:564-596

Ferris MJ y DM Ward 1997. **Seasonal Distributions of Dominant 16S rRNA-Defined Populations in a Hot Spring Microbial Mats Examined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis** *Applied and Environmental Microbiology* 63(4): 1375-1381

Fierer N y RB Jackson 2006. **The Diversity and Biogeography of soil bacterial communities** *Proceedings of national Academy of Sciences* 103(3):626-631

Franks J y J Stolz 2009. **Flat laminated microbial mat communities** *Earth-Science Reviews* 96:163-172

García-Salamanca A, MA Molina-Henares, P van Dillewijn, J Solano, P Pozarro-Tobías, A Roca, E Duque y JL Ramos 2012. **Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil** *Microbial Biotechnology* 6:36-44

Gerdes G, 2010. **What are microbial mats?** En: Seckbach J, Oren A, *Microbial Mats Modern and Ancient Microorganisms in stratified systems* Springer

Hammer Ø, Harper, DAT, Ryan, P.D. 2001. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.** *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.  
[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

Hauser E, P Kampfer y H-J Busse 2004. *Pseudomonas psychrotolerans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1633-1637

Head IM, JR Saunders y RW Pickup 1998. **Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms** *Microbial Ecology* 35:1-21

Hiriart Le Bert, G 2011. **Evaluación de la Energía Geotérmica en México Informe para el Banco Interamericano de Desarrollo y la Comisión Reguladora de Energía** 33-36

Hjorleifsdottir S, S Skirnisdottir, GO Hregvidsson, O Holst y JK Kristjansson 2001. **Species composition of cultivated and noncultivated bacteria from short filaments in an Icelandic hot spring at 88.1°C** *Microbial Ecology* 42: 117–125

Hou W, S Wang, H Dong, H Jiang, BR Briggs, JP Peacock, Q Huang, L Huang, G Wu, X Zhi, W Li, JA Dodsworth, BP Hedlund, C Zhang, HE Hartnett, P Dijkstra y BA Hungate 2013. **A comprehensive Census of microbial Diversity in Hot Springs of Tengchng, Yunnan Province China Using 16S rRNA Gene Pyrosequencing** *Plos One* 8(1): e53350. doi:10.1371/journal.pone.0053350

Huang Q, CZ Dong, RM Dong, H Jiang, S Wang, G Wang, B Fang, X Ding, L Niu, X Li, C Zhang y H Dong 2011. **Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China** *Extremophiles* DOI 10.1007/s00792-011-0386-z

Huse SM, L Dethlefsen, JA Huber, DM Welch, DA Relman y ML Sogin 2008. **Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing** *PLoS Genetics* 4:1-10

Janda JM, SL Abbott 2010. **The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection** *Clinical Microbiology Reviews* 23(1):35-73



Janssen PH 2006. **Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes** *Applied and Environmental Microbiology* 72(3):1719-1728

Jaspers E y J Overmann 2004. **Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can Be Found in Bacteria with Highly Divergent Genomes and Ecophysologies** *Applied and Environmental Microbiology* 70(8):4831-4839

Kerstens K, P de Vos, M Gillis, J Swings, P Vandamme y E Stackebrandt 2006 **Introduction to the Proteobacteria** *Prokaryotes* 5:3-37

Kovach WL 1999. **MVSP – A MultiVariate Statistical Package for Windows**, ver. 3.1

Kuhn S y P Fortnagel 1993. **Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a calcium-dependent exoproteinase from *Bacillus megaterium* ATCC 14581** *Journal of Genetic Microbiology* 139:39-47

Librado P y J Rozas 2009. **DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data** *Bioinformatics* 25:1451-1452

Mackenzie R, C Pedrós-Alió y B Díez 2013. **Bacterial composition of microbial mats in hot springs in Northern Patagonia: variations with seasons and temperature** *Extremophiles* 17:123-136

Madigan MT, JM Martinko y J Parker 2004. **Brock. Biología de los microorganismos** 10a ed. Pearson Educación S.A., Madrid 1096

Mead DA, S Lucas, A Copeland, A Lapidus, J-F Cheng, DC Bruce, LA Goodwin, S Pitluck, O Chertkov, X Zhang, JC Detter, CS Han, R Tapia, M Land, LJ Hauser, Y-J Chang, NC Kyrpides, NN Ivanova, G Ovchinnikova, T Woyke, C Brumm, R Hochstein, T Schoenfeld y P Brumm 2012. **Complete Genome Sequence of *Paenibacillus* strain Y4.12MC10, a novel *Paenibacillus lautus* strain isolated from Obsidian Hot Spring in Yellowstone National Park** *Standards in Genomic Sciences* 6:366-385

Moore ERB, BJ Tindall, VAP Martins Dos Santos, DH Pieper, J-L Ramos y NJ Palleroni 2006. **Nonmedical: *Pseudomonas* Prokaryotes** 6:646-703

Moyer CL, FC Dobbs y DM Karl 1995. **Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii** *Applied and Environmental Microbiology* 61(4):1555

Nei M y W-H Li 1979. **Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases** *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 76(10):5269-5273

Noffke N, D Christian, D Wacey y RM Hazen 2013. **Microbially Induced Sedimentary Structures Recording an Ancient Ecosystem in the ca. 3.48 Billion-Year-Old Dresser Formation, Pilbara, Western Australia** *Astrobiology* 13(12):1-21

Noguchi H, M Uchino, O Shida, K Takano, LK Nakamura y K Komagata 2004. ***Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:2117-2120

Nold SC, ED Kopczynski y DM Ward 1996. **Cultivation of Aerobic Chemoorganotrophic Proteobacteria and Gram-Positive Bacteria from a Hot Spring Microbial Mat** *Applied and Environmental microbiology* 62(11): 3917-3921

Pace NR 2009. **Mapping the Tree of Life: Progress and Prospects** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73(4):565-576

Paerl HW, JL Pinckney y TF Steppe 2000. **Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments** *Environmental Microbiology* 2(1):11-26

Palleroni NJ, M Doudoroff y RY Stanier 1970. **Taxonomy of the Aerobic Pseudomonads: the properites of the *Pseudomonas stutzeri* Group** *Journal of genetic Microbiology* 60:215-231

Pajares S, G Bonilla-Rosso, M Travisano, LE Eguiarte y V Souza 2012. **Mesocosms of Aquatic Bacterial Communities from the Cuatro Ciénegas Basin (Mexico): A tool to Test Bacterial Community Response to Environmental Stress** *Microbial Ecology* 64:346-358

Pajares S, LE Eguiarte, G Bonilla-Rosso y V Souza 2013. **Drastic changes in aquatic bacterial populations from the Cuatro Ciénegas Basin (Mexico) in Response to long-term environmental stress** *Antonie van Leeuwenhoek* doi:10.1007/s10482-013-0038-7

Pinckney J, HW Paerl y M Fitzpatrick 1995. **Impacts of seasonality and nutrients on microbial mat community structure and function** *Marine Ecology Progress Series* 123:207-216

Portillo MC, V Sririn, W Kanoksilapatham y JM Gonzalez 2009. **Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand** *Extremophiles* 13:321-331

Porwal S, S Lal, S Cheema, VC Kalia 2009. **Phylogeny in Aid of the Present and Novel Microbial Lineages: Diversity in *Bacillus*** *Plos One* 4(2):e4438. doi:10.1371/journal.pone.0004438

Prieto-Barajas CM, 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

Purcell D, U Sompong, LC Yim, TG Barraclough, Y Peerapornpisal y SB Pointing 2007. **The effects of temperature, pH and sulphide on the community structure of hyperthermophilic streamers in hot springs of northern Thailand** *FEMS Microbial ecology* 60:456-466

Roeselers G, MCM van Loosdrecht y G Muyzer 2008. **Phototrophic biofilms and their potential applications** *Journal of Applied Phycology* 20:227-235

Samal S, GR Rout, S Nayak, RM Nanda, PC Lenka y P Das 2003. **Primer screening and optimization for RAPD analysis of cashew** *Biologia Plantarum* 46(2): 301-302

Schippers A, K Bosecker, C Sproer y P Schumann 2005. ***Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:655-660

Slepecky RA y HE Hemphill 2006. **The Genus *Bacillus*-Nonmedical** *Prokaryotes* 4:530-562

Song Z, H Jiang, X Zhi, C Zhang, H Dong y W Li 2009. **Actinobacterial diversity in hot springs in Tengchong (China), Kamchatka (Russia) and Nevada (USA)** *Geomicrobiology J* 26:256-263

Tamura K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei, y S Kumar 2011. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods** *Molecular Biology and Evolution*

Torsvik V, L Ovreas y TF Thingstad 2002. **Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors** *Science* 296:1064-1066

Viggiano-Guerra JC y LCA Gutiérrez-Negrín 2005. **The Geothermal System of Araró, Mexico, as an Independent System of Los Azufres** *Proceedings World Geothermal Congress 2005* 24-29

Villanueva L 2011. **Microbial Mats: Description & sampling guide** *Dep. Marine Organisms Biogeochemistry*. NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research 1-30

Vishnivetskaya TA, R Ramaley, DF Rodrigues, JM Tiedje, S Kathariou 2005. ***Exiguobacterium* from frozen subsurface sediments (Siberian permafrost) and from other sources have growth temperature ranges reflective of the environmental thermocline of their origin.** In: *The joint international symposia for subsurface microbiology (ISSM 2005) and environmental biogeochemistry (ISEB XVII)*, WY, 254

Vishnivetskaya TA, S Kathariou y JM Tiedje 2009. **The Exiguobacterium genus: biodiversity and biogeography** *Extremophiles* 13:541-555

Ward DM, MJ Ferris, SC Nold y MM Bateson 1998. **A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4):1353-1370

Weisburg WG, SM Barns, DA Pelletier y DJ Lane 1991. **16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study** *Journal of Bacteriology* 173(2): 697-703

Woese CR y GE Fox 1977. **Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(11):5088-5090

Woese CR 1987. **Bacterial Evolution** *Microbiological Reviews* 51(2):221-271

Yamikov MM, KN Timmis, V Wray y HL Fredrickson 1995. **Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50** *Applied and environmental Microbiology* 61(5):1706-1713

Yim LC, J Hongmei, JC Aitchison y SB Pointing 2006. **Highly diverse community structure in a remote central Tibetan geothermal spring does not display monotonic variation to thermal stress** *FEMS Microbial Ecology* 57:80-91

Zhang J, J Wiang, C Fang, F Song, Y Xin, L Quin y K Ding 2010. ***Bacillus oceanisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment** *International of systematic and evolutionary Microbiology* 60:2924-2929

Anexo I Tabla de Identidades específicas de los genes de rRNA 16S

Aislado microbiano	Sitio	Tamaño de la secuencia en pb	% Identidad	# Acceso	Identidad
ZAP001	B	1432	99	<a href="#">JQ799104.1</a>	<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6 16S
ZAP002-a (fD1)	T	605	91	<a href="#">JN867119.1</a>	<i>Bacillus boroniphilus</i> YNA54 16S
ZAP002-b (rD1)		613	94	<a href="#">NR_042274.1</a>	<i>Bacillus foraminis</i> CV53
ZAP003-1	T	1422	99	<a href="#">JQ799104.1</a>	<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6 16S
ZAP003-2	T	1397	99	<a href="#">FJ189794.1</a>	<i>Paenibacillus pabuli</i> MSB13 16S
ZAP004	T	1437	99	<a href="#">JQ799104.1</a>	<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6 16S
ZAP005	T	1386	99	<a href="#">CP001982.1</a>	<i>Bacillus megaterium</i> DSM319
ZAP006	T	1433	99	<a href="#">JQ799104.1</a>	<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6 16S
ZAP007-a	T	517	97	<a href="#">JQ799104.1</a>	<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6 16S
ZAP007-b		639	100	<a href="#">AB262736.1</a>	<i>Bacillus aquimaris</i>
ZAP008	B	1433	99	<a href="#">JN867119.1</a>	<i>Bacillus boroniphilus</i> YNA54
ZAP009	T	1434	99	<a href="#">CP003187.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> F837/76
ZAP010-a (fD1)	B	613	93	<a href="#">CP000002.3</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 1458
ZAP010-b (rD1)		737	96		
ZAP012-a (fD1)	B	603	94	<a href="#">CP000002.3</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580
ZAP012-b (rD1)		590	98		
ZAP013	T	1411	99	<a href="#">AL009126.3</a>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168
ZAP014-1	T	1449	98	<a href="#">DQ171712.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> CICC10102
ZAP014-2	T	1356	98	<a href="#">DQ171712.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> CICC10102
ZAP015	T	1407	99	<a href="#">CP001186.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> G9842, complete genome

ZAP016		B	1436	99	<a href="#">AB048252.1</a>	<i>Bacillus pumilus</i> M1-9-1
ZAP017-a (fD1)		T	616	92	<a href="#">CP000002.3</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580
ZAP017-b (rD1)			680	97		
ZAP018-1		B	1412	99	<a href="#">AL009126.3</a>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168
ZAP018-2-a (fD1)		B	673	95	<a href="#">CP000560.1</a>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42
ZAP018-2-b, (RD1)			659	99	<a href="#">HE774679.1</a>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2
ZAP019		T	1037	99	<a href="#">NR_042155.1</a>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> : LMG 19562
ZAP020		B	1360	99	<a href="#">CP003017.1</a>	<i>Bacillus megaterium</i> WSH-002
ZAP021		B	1300	99	<a href="#">JN208067.1</a>	<i>Bacillus oceanisediminis</i> CCMM B618
ZAP022		T	1301	99	<a href="#">JN867119.1</a>	<i>Bacillus boroniphilus</i> YNA54.
ZAP023		B	1275	99	<a href="#">CP003329.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 6051-HGW.
ZAP024		T	1265	99	<a href="#">CP001022.1</a>	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15,
ZAP025 (rD1)		T	834	99	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
ZAP026		B	1194	99	<a href="#">KC692175.1</a>	<i>Bacillus pumilus</i> ML484
ZAP027		B	1286	99	<a href="#">HF563562.1</a>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5036
ZAP028		T	1325	100	<a href="#">KC519409.1</a>	<i>Bacillus pumilus</i> strain APT37
ZAP029		T	1309pb	99	<a href="#">NR_029071.1</a>	<i>Paenibacillus favisporus</i> GMP01
ZAP030						
fD1		B	892	99	<a href="#">JN252098.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> B53
rD1			860	99	<a href="#">CP003747.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> FRI-35
ZAP031		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
ZAP032		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
ZAP033		T	1274	99	<a href="#">CP003329.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 6051-HGW.

ZAP034		T	1256	99	<a href="#">CP003187.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> F837/76
ZAP035		T	1315	99	<a href="#">CP001022.1</a>	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15
ZAP036 rD1		B	820	97	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
ZAP037		B	1242	99	<a href="#">CP001022.1</a>	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15
ZAP038 fD1			543	90	<a href="#">DQ447793.1</a>	Uncultured bacterium MSFC_2M4Q
rD1		T	932	99	<a href="#">JN867119.1</a>	<i>Bacillus boroniphilus</i> YNA54 16S
ZAP039		B	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
ZAP040		T	1275	100	<a href="#">CP003187.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> F837/76
ZAP041		B	1289	99	<a href="#">JQ799104.1</a>	<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6 16S
ZAP042		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
ZAP043		B	1236	99	<a href="#">CP003747.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> FRI-3
ZAP044		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
ZAP045		B	1238	99	<a href="#">NR_075006.1</a>	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15
ZAP050		T	-	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
ZAP052		T	1287	99	<a href="#">KC443094.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> BAB-2489
ZAP053		T	-	-	-	<i>Bacillus pumilus</i>
ZAP054		T	1273	99	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
ZAP055		B	1329	99	<a href="#">KC692175.1</a>	<i>Bacillus pumilus</i> ML484
ZAP057 rD1		B	860	98	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
ZAP058		T	1390	99	<a href="#">CP003187.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> F837/76
ZAP059		T	1346	98	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
ZAP060		T	1316	100	<a href="#">JQ799104.1</a>	<i>Bacillus vietnamensis</i> KJ-W6 16S
ZAP061		B	-	-	-	<i>Bacillus pumilus</i>
ZAP062		B	1421	99	<a href="#">HQ858060.1</a>	<i>Bacillus pumilus</i> MB4 NIOT
ZAP064		B				



<b>fd1</b>			817	99	<a href="#">KC708565.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> Y12
<b>rD1</b>			698	95	<a href="#">CP003747.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> FRI-35
<b>ZAP065</b>		T	-	-	-	<i>Bacillus megaterium</i>
<b>ZAP066</b>		B	1331	99	<a href="#">CP001982.1</a>	<i>Bacillus megaterium</i> DSM319
<b>ZAP067</b>		T	1345	100	<a href="#">KF150409.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> JN156
<b>ZAP068</b>		B	1415	99	<a href="#">HQ858060.1</a>	<i>Bacillus pumilus</i> MB4 NIOT
<b>ZAP069</b>		T	1342	99	<a href="#">NR_042191.1</a>	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36
<b>ZAP070 rD1</b>		T	900	97	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP071</b>		B	1344	100	<a href="#">KC692175.1</a>	<i>Bacillus pumilus</i> ML484
<b>ZAP072</b>		B	-	-	-	<i>Bacillus pumilus</i>
<b>ZAP073</b>		T	1312	99	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP074</b>		B	1299	99	<a href="#">NR_042262.1</a>	<i>Microbacterium oleivorans</i> DSM 16091
<b>ZAP075</b>		T	-	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
<b>ZAP076</b>		B	1392	99	<a href="#">JX112643.1</a>	<i>Exiguobacterium profundum</i> B09
<b>ZAP077</b>		B	1379	99	<a href="#">CP001186.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> G9842
<b>ZAP078</b>		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
<b>ZAP079</b>		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
<b>ZAP080</b>		B	1330	99	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945
<b>ZAP081</b>		B	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
<b>ZAP082</b>		T	1339	99	<a href="#">NR_042155.1</a>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>
<b>ZAP083</b>		T	-	-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>
<b>ZAP084</b>		B	1438	99	<a href="#">NR_043204.1</a>	<i>Exiguobacterium profundum</i> 10C
<b>ZAP086</b>		B	1441	99	<a href="#">NR_074923.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 14580
<b>ZAP087</b>		T	1438	99	<a href="#">CP003187.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> F837/76

<b>ZAP088</b>		T	1327	99	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP090</b>		T	1341	99	<a href="#">NR_074829.1</a>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501
<b>ZAP091</b>		T	-	-	-	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<b>ZAP094</b>		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
<b>ZAP095</b>		B	1324	99	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP096</b>		T	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
<b>ZAP097 rD1</b>		T	575	95	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP098 rD1</b>		T	684	96	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP099</b>		T	776	95	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP100 fD1</b>		B	738	98	<a href="#">HM470251.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> shu-3
<b>ZAP101 rD1</b>		B	850	97	<a href="#">CP005965.1</a>	<i>Bacillus licheniformis</i> 9945A
<b>ZAP102</b>		B	1417	99	<a href="#">CP003747.1</a>	<i>Bacillus cereus</i> FRI-35

\*(-) Asignación de especies por identidad de haplotipos (RAPD).

\*Manantial del cual fueron aislados B (Bonita) y T (Tina).