



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DIVERSIDAD BACTERIANA DE LOS HERVIDEROS DE APASEO,
GUANAJUATO, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CHRISTIAN NEFTALI VILLASEÑOR OROZCO

COMITÉ TUTORAL:

DR. HUGO BRUNO BERARDI CAMPESI, INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM (TUTOR)

DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA, INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

DRA. ROSA LUZ TAVERA SIERRA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CUBIERTA (HOJA EN BLANCO)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DIVERSIDAD BACTERIANA DE LOS HERVIDEROS DE APASEO,
GUANAJUATO, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CHRISTIAN NEFTALI VILLASEÑOR OROZCO

COMITÉ TUTORAL:

DR. HUGO BRUNO BERARDI CAMPESI, INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA, INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
DRA. ROSA LUZ TAVERA SIERRA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2016

COPIA DE OFICIO DE EMPASTE

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer en primera instancia al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por haberme dado la oportunidad de aceptarme en sus aulas y hacerme parte de una comunidad tan arraigada al conocimiento.

Por otro lado, reconocer al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca (288288) que me permitió llevar a cabo mis estudios de maestría.

Además, para los miembros del Comité Tutoral, quienes me han brindado orientación, apoyo técnico e intelectual; así como sus espacios de trabajo para el desarrollo de las etapas de trabajo en este proyecto. Quisiera comenzar por mencionar al Dr. Hugo Beraldi, quién en su calidad de tutor principal estuvo al pendiente de mi aprendizaje y siempre con el mejor consejo para dirigir nuestro trabajo. A la Dra. Pilar Ortega, responsable del laboratorio de microcosmos bioedáfico del Instituto de Geología por brindarme su espacio de trabajo al inicio del proyecto.

Finalmente, agradezco a la Dra. Rosa Luz Tavera su disposición en todo momento y sus comentarios siempre críticos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a mis padres María Luisa Orozco Altamirano y Jesús Villaseñor López, quienes formaron mis enseñanzas. A mi hermano Jonathan, quien a través de sus ojos he aprendido a reconocer los diferentes matices de la vida. De manera muy especial a la memoria de Karen Jael, esencia que me recuerda que solo hay una vida y hay que vivir.

Al maestro Ignacio Ruiz Pineda, quien a través de sus años de esfuerzo logró la gran tarea de revertir lo difícil que parecía el camino y ayudarme a concluir una etapa, además de que con su experiencia de vida ha llenado de consejos.

También quiero agradecer a Brenda Amaro y a mi hijo André, quien motiva nuevos retos por delante.

No paso por alto las charlas y bohemias con Augusto, Adrián y a todos los integrantes de la casa de la risa.

Quiero dar gracias a Mario Lover y a Claudia Pérez e hijos, por brindarme un hogar cuando mas lo necesité, y a las tantas personas que han influenciado en mi vida.

A ti chinita, por motivarme a continuar y apoyarme en cada paso, a tu paciencia y comprensión. Gracias por acompañarme todo este tiempo.

Quiero también dar mi reconocimiento a la M. en C. Iris Suárez Quijada, quien me proporcionó ayuda en el procesamiento de las muestras en el laboratorio de microcosmos bioedáfico. Así mismo, hacer mención de la Dra. Sylvie Le Borgne, investigadora de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) en la División de Ciencias Naturales e Ingeniería, quien contribuyó de forma importante al darnos la posibilidad de llevar a cabo en su laboratorio parte importante de los experimentos y columna vertebral de esta tesis. Al mismo tiempo agradecer también a Adriana Espino del Castillo Rodríguez, estudiante de doctorado en esa misma institución y quien incondicionalmente siempre estuvo al frente con la disposición para sacar adelante el trabajo, además de su buen criterio científico.

Quiero reconocer también al Dr. José Alberto Cano, investigador del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; así mismo, externar el agradecimiento al Dr. Roberto Garibay, investigador del instituto de biología, quien nos proporcionó el espacio del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas. Finalmente agradecer a la Dra. Lucy Mora del instituto de Geología y al Dr. Gabriel Gutiérrez, investigador del Laboratorio de Biotecnología de la UAM Xochimilco; así como al Mtro. Adrián Romero por su apoyo en los muestreos en campo, sin su ayuda el trabajo de colecta hubiese sido extenuante.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1.- Introducción	9
1.1. Sistemas hidrotermales subaéreos	9
1.2. Los microorganismos de ambientes hidrotermales subaéreos	12
1.3. Aproximación molecular a los microorganismos, una nueva manera de conocerlos	20
1.4. Electroforesis en gel por gradiente de desnaturalización (DGGE) como herramienta molecular en el estudio de las comunidades microbianas	22
2. Objetivo general	26
2.1 Objetivos particulares	26
3. Hipótesis	26
4.- Métodos	27
4.1. Área de estudio	27
4.2. Recolección de muestras	34
4.3. Extracción de DNA	37
4.4. Amplificación del DNA y DGGE	37
5.- Resultados y discusión	39
5.1. Observaciones sobre el sínter	39
5.2. Biopelículas y tapetes microbianos	41
5.3. Diversidad de la comunidad bacteriana de Los Hervideros de Apaseo	45
5.4. Consideraciones y limitaciones de la técnica PCR-DGGE	52
5.5. Perspectivas futuras	54
6. Conclusiones	55

REFERENCIAS:	56
APÉNDICES	75
APÉNDICE I	75
APÉNDICE II	77
APÉNDICE III	78

RESUMEN

DIVERSIDAD BACTERIANA DE LOS HERVIDEROS DE APASEO, GUANAJUATO, MÉXICO

Los ambientes hidrotermales subaéreos son importantes desde el punto de vista económico, biológico, evolutivo y astrobiológico. Por ello, es importante conocer la biodiversidad asociada a estos ambientes, sobre todo la microbiana (que es la más relevante en estos ambientes), para entender las relaciones que pudieran existir entre la biología y las condiciones fisicoquímicas del sistema. A pesar de ello, en México prácticamente no existen este tipo de estudios. De manera preliminar, en esta tesis se han utilizado técnicas de ecología molecular (PCR-DGGE) para analizar la composición de las comunidades bacterianas que habitan a diferentes temperaturas en las fuentes termales del campo hidrotermal “Los Hervideros de Apaseo” en Guanajuato, México (abreviado LH) y así conocer más acerca sobre el número de filotipos presentes y su distribución. Fragmentos del gen 16S ribosomal (16S rRNA) de bacterias en biopelículas y tapetes microbianos, presentes en fuentes hidrotermales con pH alcalino (7.1-9.2) y a diferentes temperaturas (50 a 94 °C), fueron amplificados y analizados por electroforesis en un gel con gradiente desnaturizante o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). La repetición de algunos grupos de bandas en el DGGE en muestras que oscilaron de 50 a 80 °C, sugiere que algunos tipos de bacterias habitan en un amplio gradiente térmico. En general se observó un menor número de bandas a temperaturas más elevadas y mayor número a temperaturas más bajas. Esto sugiere que la temperatura es un factor que influencia el patrón de bandeo de las comunidades bacterianas de estas fuentes hidrotermales.

Este trabajo representa una contribución al conocimiento de la biodiversidad microbiana de los ambientes hidrotermales en México.

ABSTRACT

BACTERIAL DIVERSITY OF LOS HERVIDEROS DE APASEO, GUANAJUATO, MEXICO

The subaerial hydrothermal environments are important from an economic, biological, evolutive and astrobiological point of view. It is important then to know the biodiversity associated to these environments, especially to describe the microbial component which is (the most relevant in these environments), in order to understand the relationships that may exist between the biological composition and the physicochemical conditions of the system. However, in Mexico there are practically no such studies. In this thesis, molecular ecology techniques have been used to preliminarily analyze the composition of the bacterial communities inhabiting hydrothermal hot springs from "Los Hervideros Apaseo" in Guanajuato, Mexico (abbreviated LH) at different temperatures and get to know more about the number of present phylotypes and their distribution. Fragments of bacterial 16S ribosomal gene (16S rRNA) from biofilms and microbial mats, present in alkaline pH (7.1-9.2) and at different temperatures (50-94 °C), were amplified and processed by DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). The banding pattern observed in the DGGE showed that bacteria are abundant in the pools and their abundance varies depending on the temperature. Repeating groups of DGGE bands in the samples ranged from 50 to 80 °C, suggesting that some types of bacteria inhabit a large thermal gradients. In general, it was observed that a smaller band diversity was present at higher temperatures and increased at lower temperatures. This suggests that temperature is a factor influencing the pattern band of bacterial communities of these hydrothermal vents.

This work is a contribution to the knowledge of microbial biodiversity of hydrothermal environments in Mexico.

1.- Introducción

1.1. Sistemas hidrotermales subaéreos

Los sistemas hidrotermales son producto de la circulación y convección del agua (marina, meteórica, asociada al magma o a cuerpos metamórficos, etc.), promovida por una fuente de calor (ej. cámaras y plumas magmáticas) en los kilómetros más superficiales de la corteza terrestre, ya sea oceánica o continental (Pirajno, 2010) (Figura 1). Los fluidos hidrotermales generalmente disuelven minerales de las rocas encajonantes por donde fluyen y terminan por ser eyectados en la superficie de la corteza. Al ser eyectados, los fluidos saturados de solutos promueven la precipitación y acumulación de nuevos minerales en los alrededores de las superficies de descarga (Pirajno, 2010). En los ambientes marinos profundos y someros, estas descargas se denominan como ‘ventilas o chimeneas hidrotermales’ y SEDEX (*Sedimentary exhalative deposits*), respectivamente; y en sus alrededores pueden encontrarse una gran variedad de precipitados minerales (Canet et al., 2005; Pirajno, 2010; Mehay et al., 2013).

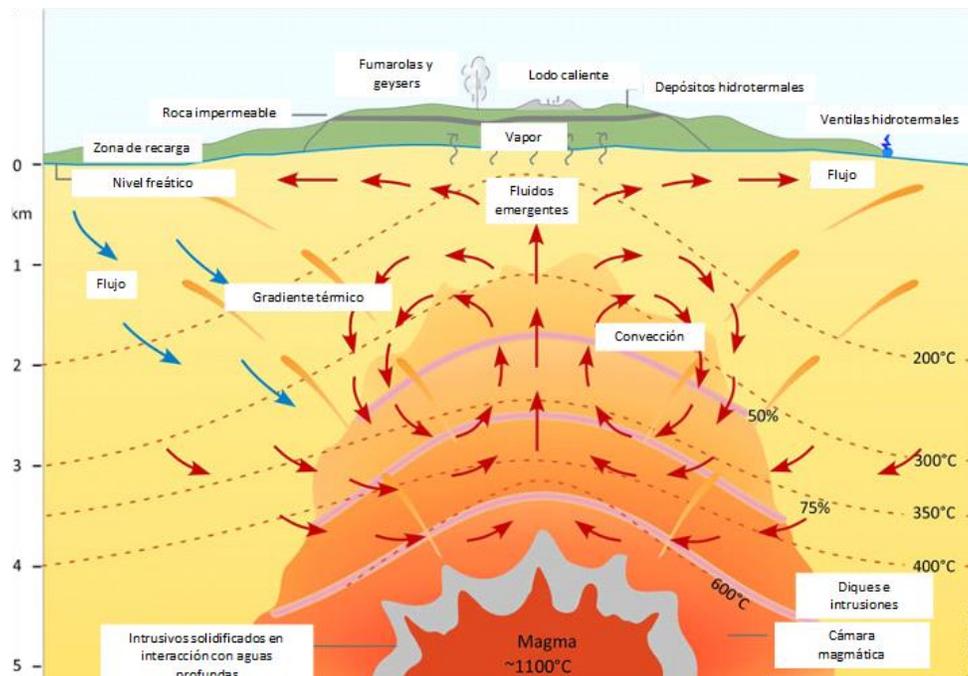


Figura 1. Esquema de un sistema hidrotermal subaéreo. La fuente de calor (magma) calienta el agua meteórica y se genera un gradiente térmico (en este caso de 400 a 200° C). Los fluidos son expulsados hacia la superficie. En ocasiones se forman depósitos sedimentarios asociados al hidrotermalismo (sínter, travertino). Imagen modificada de United Nations University (<http://www.unugtp.is>)

A diferencia de los sistemas hidrotermales subacuáticos en donde la descarga de fluidos ocurre debajo del agua, la descarga de fluidos (agua o vapor) en los sistemas hidrotermales continentales o terrestres ocurre 'debajo del aire' o expuestos a la atmósfera, de ahí su denominación de 'subaéreos'. En esta tesis se estudió un sistema hidrotermal subaéreo. Estos sistemas han sido explorados mayoritariamente desde el punto de vista económico (formación de minerales explotables, generación de energía geotérmica), aunque poco se ha investigado acerca de la participación biológica en la formación de estructuras mineralizadas en las pozas. Por otra parte, en las últimas décadas el número de estudios llevados a cabo en estos ambientes se ha incrementado considerablemente (Reysenbach et al., 2002; Roeselers et al., 2007; Ross et al., 2012; Sahm et al., 2013).

Actualmente, las principales zonas de actividad hidrotermal subaérea existen en las fronteras entre placas tectónicas, aunque no son exclusivas de estas regiones y pueden encontrarse también al interior de los continentes, generalmente asociadas a plumas magmáticas o *hot spots* (Pirajno, 2010). En estos sistemas, los minerales predominantes son el sílice amorfo, el carbonato de calcio, los sulfuros metálicos, los óxidos (principalmente de Fe y Mn) y una gran variedad de arcillas (Pirajno, 2010). Esta mineralogía depende de la composición de la roca encajonante, la temperatura del fluido, el pH del fluido y su potencial de óxido reducción (Pantoja y Gómez, 2004). Además de múltiples factores, como son la procedencia del agua, la fuente de calor, su profundidad y temperatura mínima, el tipo de sustrato que atraviesan los fluidos, las reacciones químicas locales y los patrones de flujo, conducen al desarrollo de variadas expresiones hídricas en la superficie (pozas o albercas de agua y lodo, canales, fumarolas, geysers), morfológicas y topográficas (cascadas, terrazas, terracetas, montículos, albercas, crestas, ventilas y fisuras, etc.), e incluso llegan a alterar los suelos de los alrededores (llamados suelos geotérmicos) (Pirajno, 2010). Así, las características que se observan en la superficie de un sistema hidrotermal varían según su contexto geológico, espacial y temporal en el que ocurren (Farmer y Des Marais, 1999; Fouke et al., 2000; Konhauser et al., 2001, 2003, 2007; Kyle et al., 2007; Heasler et al., 2009; Hammed et al., 2001; Pirajno, 2010).

Aunque los sistemas hidrotermales subaéreos son localizados y suelen ser poco extensos, ocurren en todos los continentes. Los más famosos incluyen los de Taupo (Nueva Zelanda), Yellowstone (Estados Unidos), El Tatio (Chile), Kamchatka (Rusia), y varios sitios en Islandia, Japón, Indonesia y las islas Azores (Staley y Reysenbach, 2002 y referencias ahí citadas; Fernández et al., 2005; Cody, 2007; Ross et al., 2012) (Figura 2).



Figura 2. Localización de los principales sistemas hidrotermales subaéreos del mundo. 1. Meager Mt.; 2. Los Geysers; 3. Yellowstone; 4. Salton Sea; 5. Cerro Prieto; 6. Los Humeros; 7. La Primavera; 8. Los Azufres; 9. Ahuachapan; 10. Momotombo; 11. Bouillante; 12. El Tatio; 13. Krafla; 14. Namafjal; 15. Svartsengi; 16. Larderello; 17. Makhshcala; 18. Kizildere; 19. Puga; 20. Aluto; 21. Langan; 22. Olkaria; 23. Puzhetskii; 24. Matzukawa; 25. Otake; 26. Tatun; 27. Makban; 28. Tiwi/Bacman; 29. Tongonan/Palinpinon; 30. Dieng; 31. Kawah Kamodjang; 32. Broadlands; 33. Wairakei. (Imagen tomada de Prol-Ledesma, 2002).

En México, la historia tectónica y volcánica del territorio ha producido variados sistemas hidrotermales a lo largo del tiempo, de los cuales algunos continúan activos, especialmente en la Faja Volcánica Transmexicana (Prol-Ledesma, 2002; Aragón, 2003; Camprubí y Albinson, 2007; Clark y Fitch, 2009; Santoyo-Gutiérrez y Torres-Alvarado 2010; Hiriart, 2011) (Figura 3). Uno de ellos, el campo hidrotermal de Los Hervideros de Apaseo (de ahora en adelante denominado LH), ha sido muy poco estudiado. De éste se ignora completamente la microbiología, a pesar de contar con un magnífico

afloramiento para su estudio, razón por la cual ha servido como área de estudio para el presente trabajo.

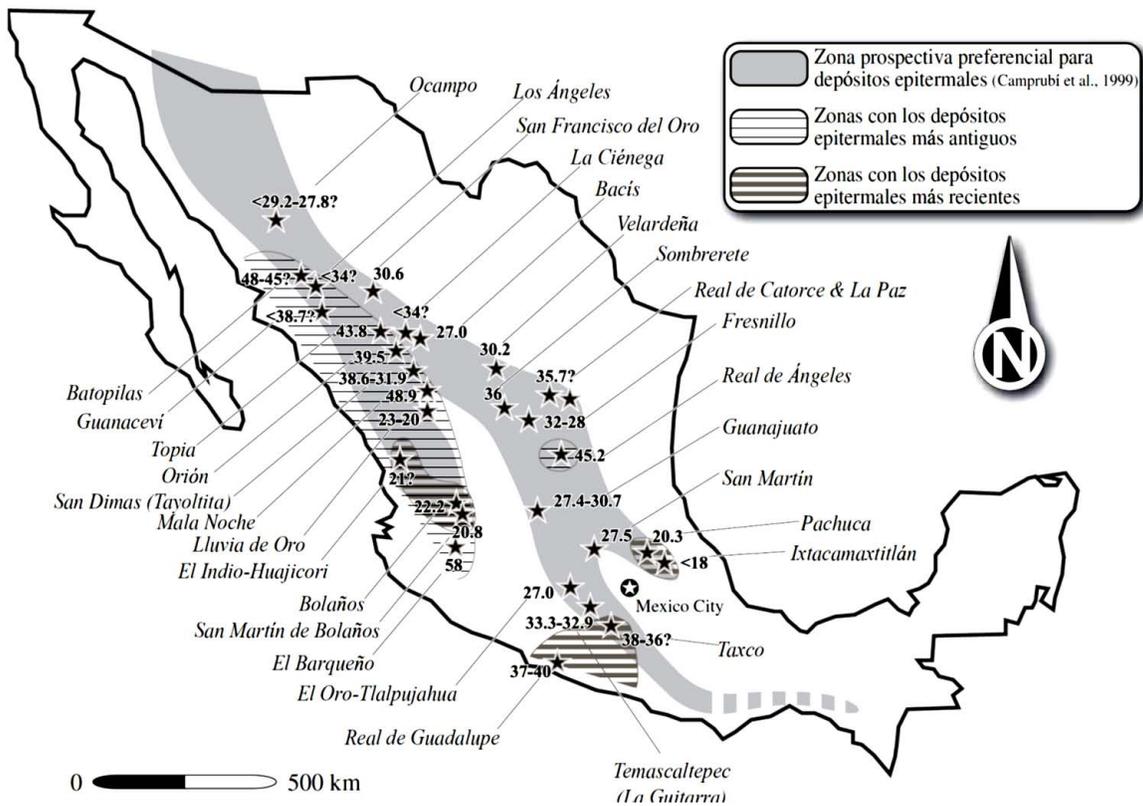


Figura 3. Distribución y edad de los principales sistemas epitermales en México. Todos los sistemas epitermales implican hidrotermalismo. Los números indican su antigüedad en millones de años. El contorno rojo punteado indica la distribución aproximada de la Faja Volcánica Transmexicana. Imagen modificada de Camprubí y Albinson, 2007.

1.2. Los microorganismos de ambientes hidrotermales subaéreos

La presencia de microorganismos en sistemas hidrotermales subaéreos es bien conocida (Reysenbach et al., 2001 y referencias ahí citadas) y su influencia en la formación y/o precipitación de minerales y desarrollo de estructuras sedimentarias (ej. sínTERS y travertinos), aunque todavía en estudio, se ha observado en numerosos ambientes hidrotermales con variables fisicoquímicas completamente distintas entre sí (ej. Jones y Renaut, 2006; Konhauser et al., 2003, 2004; Bonny y Jones, 2008; Pirajno, 2010). Algunos de los procesos microbianos que se han observado en estos ambientes incluyen la precipitación de minerales (Konhauser y Ferris, 1996; Konhauser et al., 1998; Guidry y Chafetz 2003; Pentecost, 2005), la formación pasiva de minerales a partir de la

nucleación sobre estructuras celulares y orgánicas (Cady y Farmer, 1996; Konhauser et al., 1998; Farmer, 1999), la disolución de minerales (Phillips et al., 2014), y el desarrollo de fábricas y texturas particulares en los depósitos, como la porosidad (Konhauser et al., 2004), el desarrollo de depósitos laminados (Konhauser et al., 2004; Pirajno, 2010), la fragmentación y brechamiento de clastos que luego pueden ser cementados *in situ* (Pirajno, 2010), el desarrollo de rugosidad superficial (Jones y Renaut, 2006; Pirajno, 2010), y el desarrollo de bulbos y estructuras estromatolíticas (Jones y Renaut, 2006). Estas observaciones aplicadas en un contexto geológico, permiten entender los procesos actuales de biomineralización y patrones de crecimiento que pudieran ser análogos a la formación de estructuras biosedimentarias en la Tierra temprana (Konhauser et al., 2001), así como de evidencia de primeras formas de vida en rocas antiguas e incluso la presencia de estos depósitos fuera de la Tierra. El estudio de estos sistemas en la Tierra es relevante porque permiten hipotetizar los hábitats y las condiciones ambientales en que posiblemente las primeras formas de vida se desarrollaron en el planeta, y porque la vida incluso pudo originarse en ese tipo de escenarios hace millones de años (Russell et al., 2013). El reconocimiento de la mediación microbiana en estos procesos y la caracterización de las estructuras sedimentarias que se desarrollan en estos ambientes con relación a las especies que las forman, resulta entonces esencial para poder reconocer procesos similares, asociados a la mediación biológica de depósitos de origen hidrotermal, en el pasado remoto de la Tierra y en otros planetas (Cady et al., 2003; Konhauser et al., 2004; Squyres, et al., 2008), de ahí su importancia para la Geobiología y la Astrobiología. Además, el estudio de las comunidades microbianas en este tipo de ambientes también es una fuente importante de investigación médica y biotecnológica.

Las altas temperaturas implican desafíos para las células, pues puede ocurrir la desnaturalización de biomoléculas. A temperaturas elevadas normalmente las proteínas y los ácidos nucleicos se desnaturalizan, la fluidez de la membrana incrementa, la mayoría de los pigmentos, como la clorofila, se degradan cerca de los 75 °C, y procesos metabólicos importantes, como la fotosíntesis, no ocurren (Rothschild y Mancinelli, 2001). Además, la solubilidad de los gases en el agua está correlacionada con el gradiente termal, siendo estos menos disponibles cuanto más aumenta la temperatura y comprometiendo a los organismos acuáticos que requieren O₂ o CO₂. Sin embargo, los

termófilos están adaptados a estas condiciones. Los microorganismos mejor caracterizados que habitan a temperaturas > 100 °C son las arqueas *Pyrolobus fumarii* y *Methanopyrus kandleri*, organismos quimiolitotóxicos, oxidadores de H₂ y reductores de NO₃⁻ y CO₂, respectivamente. También están las bacterias *Aquifex pyrophilus* y *Thermotoga maritima*, que crecen a temperaturas de 95 y 90 °C, respectivamente (Madigan y Oren 1999; Stetter, 1999; Rothschild y Mancinelli, 2001). Los eucariontes termófilos (hongos, algas, protozoarios) son menos comunes y crecen generalmente en temperaturas máximas de 65 °C (Mehta y Satyanarayana, 2013).

La habilidad de los organismos termófilos para crecer óptimamente en temperaturas mayores a las del rango mesófilo, se ha explicado con hipótesis que tratan sobre la termoestabilidad de los componentes celulares (Vásquez et al., 1984). Entre las más importantes destacan la teoría lipídica (Brock, 1978), que establece que la membrana plasmática puede proteger la integridad de estructuras intracelulares, modificando las cadenas de fosfolípidos y originando un decremento de su fluidez (Kogut, 1980); y la teoría macromolecular (Koffler, 1957), que propone que existen diferencias físico-químicas en la estructura de proteínas y ácidos nucleicos en termófilos con respecto a los mesófilos. En los lípidos, por ejemplo, puede haber un cambio en la composición de sus ácidos grasos; las cadenas de ácidos grasos de los termófilos poseen mayor longitud y se encuentran más saturadas, proporcionando puntos de desnaturalización más elevados y ocasionando menor fluidez de la membrana (Kogut, 1980). Además, las diferencias en la composición lipídica entre algunas bacterias y arqueas termófilas, tiene repercusiones en la estabilidad de la membrana contra la hidrólisis a altas temperaturas (Stetter, 1999).

En cuanto a las proteínas, algunos termófilos acumulan ciertos compuestos orgánicos de bajo peso molecular que producen una respuesta osmótica para acumular solutos compatibles (termosolutos) dentro de la célula que ayudan a la estabilización de proteínas. Por ejemplo, el di-*myo*-inositol fosfato incrementa la estabilidad de las enzimas y disminuye el rango de inactivación termal (Grogan, 2013). El aumento en la termoestabilidad en proteínas está generalmente asociada a las proporciones ácido-base de algunos residuos, el incremento de residuos de arginina en ciertas regiones, un

mayor número de puentes disulfuro y reducción en la longitud de las cadenas polipeptídicas (Lieph et al., 2006). Estudios estructurales de proteínas termoestables apuntan a que núcleos apolares, reducción en la relación superficie-volumen, decremento en el contenido de glicina y un gran número de interacciones iónicas, están relacionados con la termoestabilidad. Estas características proporcionan a las proteínas mayor resistencia a su desnaturalización, aumentan la compactación e incrementan la rigidez de la proteína. La termoestabilidad en las proteínas también se ve favorecida por factores extrínsecos. El termosoma, un conjunto de chaperoninas que han sido caracterizadas en *Methanopyrus kandleri* y *Pyridictium occultum*, unen proteínas desnaturalizadas, previniendo su agregación y replegándolas a su forma activa (Madigan y Oren, 1999). Además, enzimas purificadas de termófilos son estables al calor y a agentes desnaturalizantes, con insignificante pérdida de actividad en un rango de temperatura de 60-80 °C. Con respecto a los ácidos nucleicos, el estudio de los ribosomas y del RNA de transferencia han revelado la presencia de bases modificadas, las cuales confieren estabilidad termal a la molécula (Singleton y Ameluxen, 1973; Vásquez et al., 1983). La resistencia del DNA a temperaturas elevadas puede deberse a la girasa reversa, una topoisomerasa tipo I que causa superenrollamiento del DNA, confiriéndole estabilidad a altas temperaturas. Algunas arqueas termófilas poseen histonas que están relacionadas filogenéticamente con las de eucariontes. Estudios *in vitro* han demostrado que la adición de histonas a DNA purificado incrementa drásticamente su temperatura de desnaturalización (Madigan y Oren, 1999; Stetter, 1999). Conocer cuál es el límite máximo de temperatura que permite la existencia de vida es aún incierto, pero seguramente depende en gran medida de la estabilidad de las moléculas que componen a las células.

Por estar adaptados a vivir en aguas con alta temperatura, los microorganismos de ambientes hidrotermales se han denominado “extremófilos” (Madigan y Oren, 1999; Albers et al., 2006), y existen en los tres dominios de la vida (Fujiwara, 2002). La temperatura mínima de crecimiento de bacterias termófilas es de ~50 °C (Brock, 1978; Madigan y Oren, 1999) y la máxima pudiera llegar hasta ~150 °C (Madigan y Marrs, 1997). Dependiendo de sus rangos óptimos de crecimiento a diferentes temperaturas, estos microorganismos se han dividido en termófilos moderados (40-60 °C), termófilos

extremos (60-85 °C), e hipertermófilos (>85 °C) (Mehta y Satyanarayana, 2013). Algunos de estos ejemplos se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de microorganismos termófilos según Mehta y Satyanarayana (2013)

Categoría	Temperatura óptima (°C)	Ejemplos
Termófilos moderados	40-60	Arquea: <i>Thermoplasma</i> Bacteria: <i>Tepidibacter, Clostridium, Exiguobacterium, Caminibacter, Lebetimonas, Hydrogenimonas, Nautilia, Desulfonauticus, Sulfurivirga, Caminicella, Vulcanibacillus, Marinotoga, Caldithrix, Sulfobacillus, Acidimicrobium, Hydrogenobacter, Mahella, Thermoanaerobacter, Desulfovibrio</i>
Termófilos extremos	60-85	Arquea: <i>Methanocaldococcus, Thermococcus, Palaeococcus, Methanotorris, Aeropyrum, Methanothermococcus, Acidianus, Metallosphaera</i> Bacteria: <i>Thermovibrio, Thermosipho, Caloranaerobacter, Thermodesulfobacterium, Thermodesulfatator, Deferribacter, Desulfurobacterium, Persephonella, Kosmotoga, Rhodothermus, Desulfurobacterium, Balnearium, Thermovibrio, Marinithermus, Oceanithermus, Petrotoga, Vulcanithermus, Carboxydobrachium, Thermaerobacter, Thermosulfidibacter,</i>
Hipertermófilos	>85	Arquea: <i>Geogemma, Archaeoglobus, Methanopyrus, Pyrococcus, Sulfolobus, Thermoproteus, Methanothermus, Acidianus, Ignisphaera, Ignicoccus, Geoglobus</i>

Metabólicamente, los termófilos pueden ser fotoautótrofos oxigénicos, fotoautótrofos anoxigénicos, fotoheterótrofos, quimiolitautótrofos y quimioorganoheterótrofos (Vásquez et al., 1984; Brock, 2012) (Cuadro 2). Ello habla de la diversidad de hábitats y condiciones ambientales (incluyendo la luminosidad y la disposición de compuestos orgánicos e inorgánicos, la fisicoquímica del medio acuoso y las características geológicas y geoquímicas) a las que estos organismos pueden estar adaptados (Reysenbach et al., 2002).

Cuadro 2. Ejemplos de bacterias y arqueas de ambientes hidrotermales subaéreos

	Especie	Localización	Temp (°C)	pH	Metabolismo y otras características	Referencias
Reino						
Filo						
Bacteria						
Aquificae	<i>Calderobacterium hydrogenophilum</i>	Kamchatka, Rusia	50-82	5	Quimioautotrofo obligado, oxidador de hidrógeno	Kryukov et al., 1983
	<i>Hydrogenobacter acidophilus</i>	Tsumagoi, Japón	50-70	3-4	Quimiolitoautotrófico obligado, aerobia, oxidadora de hidrógeno	Shima y Suzuki, 1993
	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Tsumagoi, Japón	70-75	7	Autotrófico facultativo, oxidadora de hidrógeno	Kawasumi et al., 1984
	<i>Calderobacterium hydrogenophilum</i>	Kamchatka, Rusia	50-82	6-7	Oxidadores de H ₂	Kryukov et al., 1983
Beta-Proteobacteria	<i>Thermothrix azorensis</i>	Isla San Miguel; Azores	60-87	6-8.5	Aeróbico	Odintsova et al., 1996
Chloroflexi	<i>Heliobacterium oregonensis</i>	Reserva India, Oregón	45-55	8	Bacterioclorofila a y carotenoides; aerotolerante, fotosíntesis anoxigénica	Pierson et al., 1985
	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Sokokura, Japón	35-65	7	Bacterioclorofila a y c; carotenoides, fotosíntesis anoxigénica	Pierson y Castenholz, 1974
Deinococcus-Thermus	<i>Thermus aquaticus</i>	Parque Nacional Yellowstone	40-79	6-9.5	Pigmentación amarilla	Brock y Freeze, 1969
Dyctioglomi	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	Tsumagoi, Japon	51-80	5.4-8.9	Quimioorganotrofo, anaerobio obligado	Saiki et al., 1985
Firmicutes	<i>Clostridium fervidus</i>	Nueva Zelanda	37-80	5-9	Fermentación, productos finales son acetato, H ₂ , CO ₂ . Quimioheterótrofo	Patel et al., 1987
	<i>Thermobrachium celere</i>	Norte América y Sudamérica, Europa, África	37-75	5-10	Forma H ₂ y CO ₂ . Anaerobio termofílico obligado	Svetlichny et al., 1991

		y Nueva Zelanda				
	<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i>	Kamchatka, Rusia	39-78	5-8	Anaerobio, reducción de Fe (III)	Slobodkin et al., 1999
	<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	Parque Nacional Yellowstone	40-80	5-9	Anteriormente denominado <i>Thermoanaerobium brockii</i>	Zeikus et al., 1979; Lee et al., 1993
	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Parque Nacional Yellowstone	37-78	4-10	Etanol, CO ₂ , lactato y acetato como productos finales	Wiegel y Ljungdahl, 1981
	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	Islandia	50-75	5-9	Etanol como producto final	Larsen et al., 1997
	<i>Thermoanaerobium acetigenum</i>	Islandia	50-78	5-8.5	Productos finales: acetato, CO ₂ , H ₂ , etanol, ácido isobutírico	Nielsen et al., 1993
	<i>Ammonifex degensii</i>	Fuente termal neutral	57-77	7	Reduce NO ₃ ⁻ a NH ₃ , capas de fermentar piruvato	Huber et al., 1996
	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Taupo, Nueva Zelanda	45-80	5-8	Acetato y lactato como productos de la fermentación	Rainey et al., 1994
	<i>Thermobacterium ferrireducens</i>	Parque Nacional Yellowstone	50-74	5-8	Quimioorganoheterotrofo	Slobodkin et al., 1997b
Spirochaeta	<i>Spirochaeta thermophila</i>	Isla Raoul, Archipiélago de Kermadec; Nueva Zelanda	40-73	6-8	Anaerobio estricto	Aksenova et al., 1992
	<i>Spirochaeta thermophila</i>	Isla Raoul, Archipiélago de Kermadec, Nueva Zelanda	66-68	6-8	Estrictamente anaerobio	Aksenova et al., 1992
Thermotoga	<i>Thermotoga maritima</i>	Italia y Azores	55-90	6-9	Quimioorganotrofo, reductor de Fe (III)	Huber et al., 1986
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	Lucrino, Italia	55-90	6-9	Reductora de azufre	Jannasch et al., 1988

	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	Nueva Zelanda	41-79	6-8	Quimioorganotrofo, anaerobio estricto, fermentadora	Patel et al., 1985
	<i>Synechococcus</i> sp.					
	<i>Mastigocladus</i> sp.				Fotoautótrofo, aerobio.	
Cianobacteria	<i>Calothrix</i> sp.	Argentina	39-68	5-8.5	Quimiotrofas.	Mackenzie y Pedrós-Alió, 2013
	<i>Leptolyngbia</i> sp.				Procesos de fotosíntesis y quimiosíntesis	
	<i>Oscillatoria</i> sp.					

Los microorganismos de ambientes hidrotermales subaéreos generalmente forman tapetes microbianos (Cady y Farmer, 1996) de espesor centimétrico (a diferencia de las biopelículas que sólo alcanzan unos pocos milímetros de espesor (O'Toole et al., 2000; Harrison et al., 2005) y se encuentran generalmente estratificados en respuesta a los gradientes energéticos y sus necesidades metabólicas (luz, nutrientes, difusión de gases, etc.) (Al-Najjar et al., 2012; Coman et al., 2013). De manera típica, las capas más externas de estos tapetes son verdes y se encuentran dominadas por fotótrofos oxigénicos, como cianobacterias y diatomeas, seguidas por una capa de tonalidad rojiza de fotótrofos anoxigénicos, como bacterias verdes (Chlorobi) y púrpuras del azufre (Chromatiales), seguidas de capas basales de apariencia negruzca y conformada por heterótrofos anaerobios y metanogénicos (Coman et al., 2013). En este tipo de sistemas, las cianobacterias son los principales productores primarios y juegan un papel primordial en la estructura inicial del tapete microbiano (Severin y Stal, 2010). Su actividad fotosintética impulsa una variedad de procesos metabólicos y es fuente de nutrientes para bacterias heterótrofas y litótrofas (Roeselers et al., 2007), pues fijan CO₂ y N₂, producen O₂, fermentan de manera anaerobia y producen grandes cantidades de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*).

Recientemente, análisis morfométricos y genotípicos de comunidades de cianobacterias en tapetes microbianos, han demostrado la importancia de este grupo de microorganismos debido a su presencia y distribución a lo largo de un amplio gradiente de temperaturas en los sistemas hidrotermales. Por ejemplo, Sompong y colaboradores (2005), identificaron morfométricamente que el género *Synechococcus* fue el grupo de

cianobacterias más predominante en tapetes a temperaturas >40 y <80 °C en manantiales termales al norte de Tailandia; mientras que Klatt y colaboradores (2011) determinaron a través de secuenciación masiva que *Synechococcus* fue el filotipo más abundante en tapetes a temperaturas entre $60-65$ °C, en afluentes de dos manantiales termales en el Parque Nacional Yellowstone.

También, las cianobacterias juegan un papel importante en la formación de estructuras estromatolíticas de ambientes hidrotermales actuales, como es el caso de los géneros *Chlorogloeopsis* y *Fischerella*, las cuales se han encontrado involucradas en procesos de litificación y formación de estromatolitos en fuentes hidrotermales saturadas con sílice a temperaturas de ~ 56 °C en el Parque Nacional Yellowstone (Pepe-Ranney et al., 2012).

Además de la estratificación vertical mencionada, también existen cambios horizontales de la biota según los gradientes energéticos, que en los ambientes hidrotermales están dominados por la temperatura. Por ejemplo, en el Lago Yellowstone (Wyoming, Estados Unidos), las bacterias del grupo Aquificales (*Sulfurihydrogenibium* sp.) se encuentran en las aguas más calientes (>100 °C), mientras que a temperaturas más bajas (~ 60 ° C) se encuentran miembros del grupo de Gammaproteobacteria (*Thiovirga* sp.), y en aguas a temperatura ambiente (<20 °C) dominan las actinobacterias de distribución cosmopolita (Yang et al., 2011). Es probable que en campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo estén ocurriendo procesos similares asociados a los gradientes de temperatura hidrotermal local, además del posible papel que las cianobacterias podrían estar llevando a cabo en la formación de estructuras a escala micrométrica en los procesos de litificación del sílice en la superficie de las fuentes.

1.3. Aproximación molecular a los microorganismos, una nueva manera de conocerlos

La ecología microbiana estudia la biodiversidad de los microorganismos en la naturaleza, así como sus actividades y sus efectos sobre los ecosistemas (Atlas y Bartha, 1998). Antes del descubrimiento de la estructura del DNA y del desarrollo de las técnicas moleculares, esta disciplina dependió del aislamiento en cultivo de los microorganismos para su estudio, lo cual supone limitaciones debido a la incapacidad de crecer en medios

de cultivo a los microorganismos de los que se desconocen sus propiedades fisiológicas (Amann et al., 1995). Recientemente la ecología microbiana se ha estudiado aplicando técnicas de genética y biología molecular.

En bacterias, los genes rRNA son transcritos a partir del operón ribosomal como un precursor 30S rRNA y posteriormente dividido por una RNasa tipo III en moléculas rRNA 16S, 23S y 5S (Rajendhran y Gunasekaran, 2011). Las subunidades 16S y 18S, en procariotas y eucariotas, respectivamente, al ser moléculas muy conservadas evolutivamente y lo suficientemente variables como para distinguirse (Woese y Fox, 1977; Weisburg et al., 1991; Huys et al., 2008) (Figura 4), son catalogadas como un “reloj evolutivo” que permite deducir las relaciones filogenéticas y evolutivas entre bacterias, arqueas y eucariontes (Weisburg et al., 1991).

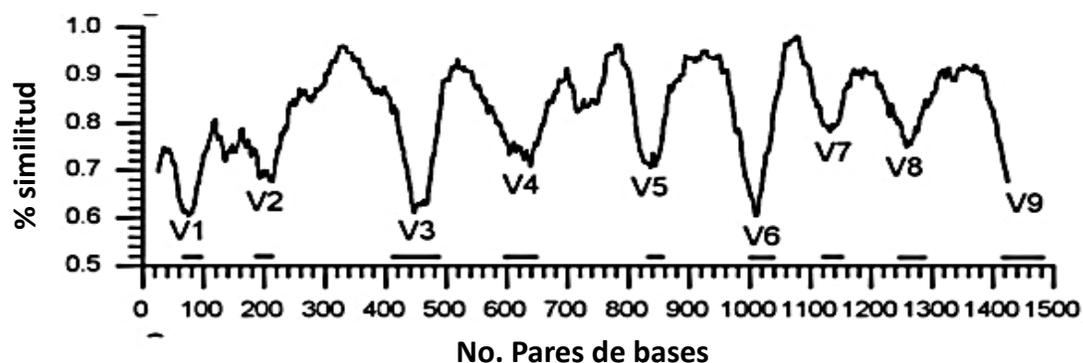


Figura 4. Variabilidad del gen 16S en bacterias. Las regiones con variabilidad se denotan con una V (9 regiones). Las regiones conservadas muestran un mayor porcentaje de similitud entre ellas. Imagen tomada de la Universidad de Edimburgo (<https://genomics.ed.ac.uk>).

La ecología molecular ha revelado que la diversidad microbiana es mucho mayor que las 5000 especies descritas utilizando características fenotípicas en el esquema taxonómico de Bergey (Bergey's 2001) y que además, estas comunidades son mucho más complejas en términos de su estructura de lo que se pensaba anteriormente (Huse et al., 2008). El análisis de las secuencias 16S rRNA en varios nichos ambientales ha revelado que menos del 10% de todos los microorganismos han sido aislados y cultivados en el laboratorio (Fink y Grant, 1998; Bing-Ru, et al., 2006).

1.4. Electroforesis en gel por gradiente de desnaturalización (DGGE) como herramienta molecular en el estudio de las comunidades microbianas

La amplificación de genes ribosomales comúnmente se llevan a cabo a través del proceso de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki et al., 1988), para lo cual es necesario usar 'primers' (también llamados 'cebadores' u 'oligonucleótidos') los cuales corresponden a pequeñas secuencias de nucleótidos específicos y complementarios a la región del DNA del área que quiere amplificarse (Saiki et al., 1988; Weisburg et al., 1991). Debido a que el DNA extraído del ambiente se compone de una mezcla de varios organismos, es necesario separar los distintos fragmentos amplificados por PCR según su secuencia genómica única antes de poder secuenciarlos. Un método ampliamente utilizado para estos fines es la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer y Smalla, 1998). Esta técnica ha sido utilizada exitosamente en el estudio de comunidades microbianas (Ferris et al., 1996; Muyzer y Smalla, 1998, 1999; Ercolini, 2004; Nakatsu, 2007) y tiene tres ventajas principales. La primera es que se pueden separar los fragmentos amplificados del rRNA (los cuales pueden ser teñidos y vistos en un gel); la segunda es que los fragmentos amplificados dan una idea de la abundancia de los genomas amplificados y de sus diferencias genéticas dada su posición espacial en el gel; y la tercera es que se puede secuenciar por separado cada una de las bandas del gel (Muyzer y Smalla, 1998, 1999). Brevemente, esta técnica se basa en el hecho de que moléculas de DNA con la misma longitud, pero que difieren al menos en un nucleótido en el orden de su secuencia, pueden ser separadas por electroforesis (en un gel de poliacrilamida) a través de un gradiente lineal y creciente de desnaturalizantes químicos (como la urea y formamida). A medida que los fragmentos de DNA migran a través del gel, la desnaturalización y frenado del DNA (en forma de bandas visibles en el gel) ocurre al disociarse los nucleótidos con menos puentes de hidrógeno (2 puentes; adenina y timina). Esta técnica solo puede resolver fragmentos de DNA de hasta 500 pares de bases. Para evitar la separación completa de las dos cadenas y lograr una óptima resolución, se une una cadena de 30-50 pares de bases G y C (que requieren condiciones drásticas de desnaturalización), la grapa G-C se encuentra en el extremo 5' de uno de los iniciadores que se coamplifica con el segmento de DNA a analizar.

A partir de la década de 1990, la utilización de los genes ribosomales en el análisis de las comunidades microbianas incrementó el conocimiento de la diversidad y distribución de los microorganismos en el ambiente.

A principios de esa década, Ward y colaboradores (1990) realizaron la amplificación y secuenciaron los genes 16S rRNA de las comunidades presentes en tapetes microbianos procedentes de fuentes del campo hidrotermal de Yellowstone. Los filotipos identificados se relacionaron con miembros como la arquea *Methanobacterium thermoautotrophicum* y las bacterias *Chloroflexus aurantiacus*, *Spirochaeta halophila*, *Clostridium thermoautotrophicum*, *Synechococcus lividus* y *Anacystis nidulans*. Este estudio fue uno de los primeros en emplear los genes ribosomales en la identificación de los miembros de una comunidad microbiana en un ambiente termal.

Por su parte, Muyzer y colaboradores (1993) utilizaron por primera vez la técnica de DGGE para determinar la diversidad genética de poblaciones microbianas de tapetes y biopelículas a partir de muestras procedentes de diferentes ambientes. El análisis del perfil del gel demostró la presencia de un variado número de bandas. Los resultados de la hibridación de las secuencias mostraron la presencia de la bacteria sulfato reductora *Desulfovibrio desulfuricans*. Este procedimiento permitió identificar directamente la presencia y la abundancia relativa de diferentes especies y de esta manera generar un perfil de las poblaciones microbianas de una manera cualitativa y semicuantitativa.

Ferris y colaboradores (1996), estudiaron tapetes microbianos situados a diferentes temperaturas (48-72 °C) en fuentes hidrotermales del Parque Yellowstone, mediante DGGE. Los autores encontraron que a pesar de que un número de bandas migraban a la misma posición en las diferentes muestras, existían bandas con posiciones únicas a diferentes temperaturas, sugiriendo que la temperatura influenciaba la estructura de la comunidad.

Con el nuevo enfoque de abordar el estudio de las comunidades microbianas, los análisis moleculares demostraron que muchos de los filotipos encontrados en estas comunidades eran diferentes a aquellas reportadas en estudios a base de cultivos. Por ejemplo, Ward y colaboradores (1998) estudiaron un tapete microbiano establecido a 50-55 °C en el

campo hidrotermal de Yellowstone mediante clonación y DGGE, encontrando que ninguna de las secuencias observadas fue idéntica a las secuencias de los microorganismos ya caracterizados previamente en cultivo de ese mismo tapete microbiano. Además, varias de las secuencias obtenidas estaban relacionadas con cianobacterias, pero ninguna con *Synechococcus lividus*, cuya presencia ya había sido reportada mediante métodos de cultivo. Como en el caso de las cianobacterias, se detectaron numerosas secuencias relacionadas filogenéticamente con bacterias verdes no del azufre; sin embargo, ninguna relacionada con *Chloroflexus aurantiacus*, previamente reportada. Finalmente, algunas secuencias estuvieron relacionadas filogenéticamente con α y β proteobacterias, espiroquetas, *Leptospirillum* y *Nitrospira*.

Purcell y colaboradores (2007), estudiaron los llamados “Streamers” a través de un gradiente de temperatura (75-90 °C), pH y concentración de sulfuros en fuentes hidrotermales de la provincia de Chiang Mai, al norte de Tailandia, mediante PCR-DGGE. Los filotipos pertenecientes a los *Aquificales* y miembros del género *Thermus* se encontraron mayoritariamente en todas las fuentes estudiadas, demostrando la ubicuidad de estos filotipos. En menor proporción, la presencia de secuencias relacionadas con taxas bacterianas como *Bacillus*, *Thermotoga* y algunos miembros de *Betaproteobacteria* (89 °C). Por otro lado, un estudio de la diversidad de streamers a través de un gradiente temporal en Japón, concluyó que la temperatura y la concentración de sulfuros fueron factores clave al determinar la estructura de una comunidad bacteriana (Nakagawa y Fukui, 2003).

Portillo y colaboradores (2009) reportaron la presencia de microorganismos fototróficos como Chloroflexi y Cyanobacteria, a temperaturas alrededor de 50-57 °C en fuentes termales al oeste de Tailandia. Por su parte, Mackenzie y Pedrós-Alió (2013) en un estudio para medir las variaciones en la diversidad en base a los cambios de estacionalidad, reportaron la presencia de secuencias del filo Cyanobacteria afiliadas al género *Synechococcus*., *Mastigocladus*, *Calothrix*, *Leptolyngbia* y *Oscillatoria*, recolectadas a temperaturas de entre 39-68 °C en fuentes hidrotermales en la Patagonia Argentina. También reportaron la presencia de *Chloroflexus* y *Thermonema* (Bacteroidetes); y *Meiothermus*.

Sahm y colaboradores (2013), reportaron la presencia de *Caldicellulosiruptor*, *Dictyoglomus*, *Fervidobacterium* y *Sulfurihydrogenibium* como los géneros bacterianos más abundantes a temperaturas de 51-92 °C, en las islas Azores.

A pesar del avance ingenieril para el aprovechamiento de los sitios geotermales de México, los estudios sobre diversidad microbiana en ambientes específicamente de sistemas hidrotermales subaéreos son escasos, con solo unos estudios en sistemas hidrotermales de la Faja Volcánica Transmexicana (Bernard, 2008), en donde se han reportado poblaciones de fotótrofos anoxigénicos relacionados con el género *Rhodobacter*, oxidadores de azufre como *Acidithiobacillus* sp., y *Lyzobacter* sp.; también reductores de sulfato y azufre relacionados con el género *Thermodesulfobium* y *Desulfurella*; algunos de estos géneros relacionados con los ciclos del hierro y el azufre, (Brito et al, 2014); así como *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium* y *Burkhoderia* (Torres-Sanchez et al., 1996). Finalmente, López-Sandoval (2006) identificó morfométricamente la presencia de 12 diferentes generos de cianobacterias habitando en manantiales con temperaturas de ~22 a 85 °C, en Los Hervideros, en Michoacán.

En este trabajo se utilizó la técnica de PCR-DGGE para conocer de manera preliminar la diversidad de filotipos (a saber por el número de bandas) de origen hidrotermal de la localidad de Los Hervideros, en el municipio de Apaseo el Grande, en el Estado de Guanajuato, México.

2. Objetivo general

Conocer la diversidad de filotipos presentes en diversas pozas del campo hidrotermal de Los Hervideros de Apaseo (LH) utilizando técnicas independientes de cultivo.

2.1 Objetivos particulares

- Describir las condiciones físicas actuales de las fuentes del campo hidrotermal.
- Conocer la diversidad de secuencias del gen 16S rRNA en un gradiente de temperatura (50-94 °C) mediante el análisis del patrón de bandeo por DGGE.
- Identificar los filotipos más dominantes presentes a diferentes temperaturas.

3. Hipótesis

El número de filotipos bacterianos dominantes será menor entre mayores sean las temperaturas de las fuentes hidrotermales del campo Los Hervideros de Apaseo, y los filotipos aumentarán conforme disminuya el gradiente térmico.

4.- Métodos

4.1. Área de estudio

El campo hidrotermal conocido como 'Los Hervideros' (LH) está ubicado en el flanco norte de la Faja Volcánica Transmexicana, en el municipio de Apaseo el Grande, al sureste del estado de Guanajuato, cerca del límite con el estado de Querétaro, entre las coordenadas geográficas 20.54208° , -100.54979° y 20.53323° , -100.54757° , a una altitud aproximada de 1,800 m (Figura 5). El clima de la región es semiseco-templado a subhúmedo, con lluvias en verano (precipitación media anual de 500-800 mm) y una temperatura media anual de 19°C (INEGI, 2010).

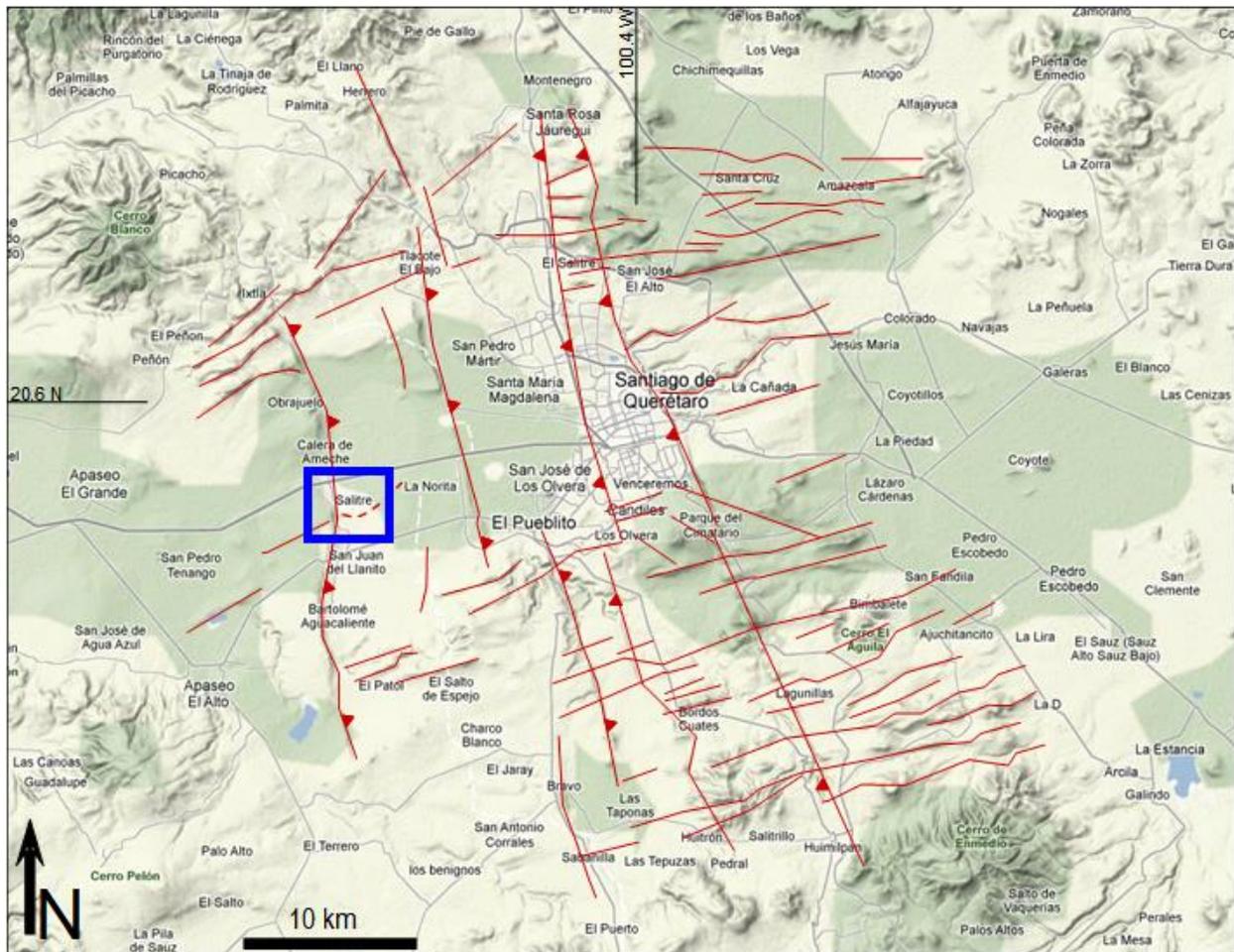


Figura 5. Mapa estructural del graben de Querétaro y localización del campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo (recuadro), así como las zonas aledañas con hidrotermalismo (Marroquín y San Bartolomé Agua Caliente). Modificado de Aguirre-Díaz y colaboradores (2000) y Xu y colaboradores (2011).

Hay tres principales áreas de afluencia hidrotermal en la zona, conocidas como Laguna El Salitre (junto a LH), Marroquín y San Bartolomé Agua Caliente, todas ellas asociadas a fallas geológicas pertenecientes al sistema de fallas del Graben de Querétaro (Aguirre-Díaz, et al 2000; Xu et al, 2011) (Figuras 5-6). Las aguas de los manantiales son de tipo clorurado sódico (bicarbonatadas sódicas), con temperaturas superficiales que van de los 20 °C a los 95 °C y temperaturas de fondo, según un geotermómetro de potasio-sodio, entre 160 y 180 °C (Comisión Federal de Electricidad, 1980), lo cual es consistente con otros modelos que predicen temperaturas mínimas de 175 °C a profundidad para que se deposite sílice opalino en la superficie (Rimstidt y Cole, 1983).

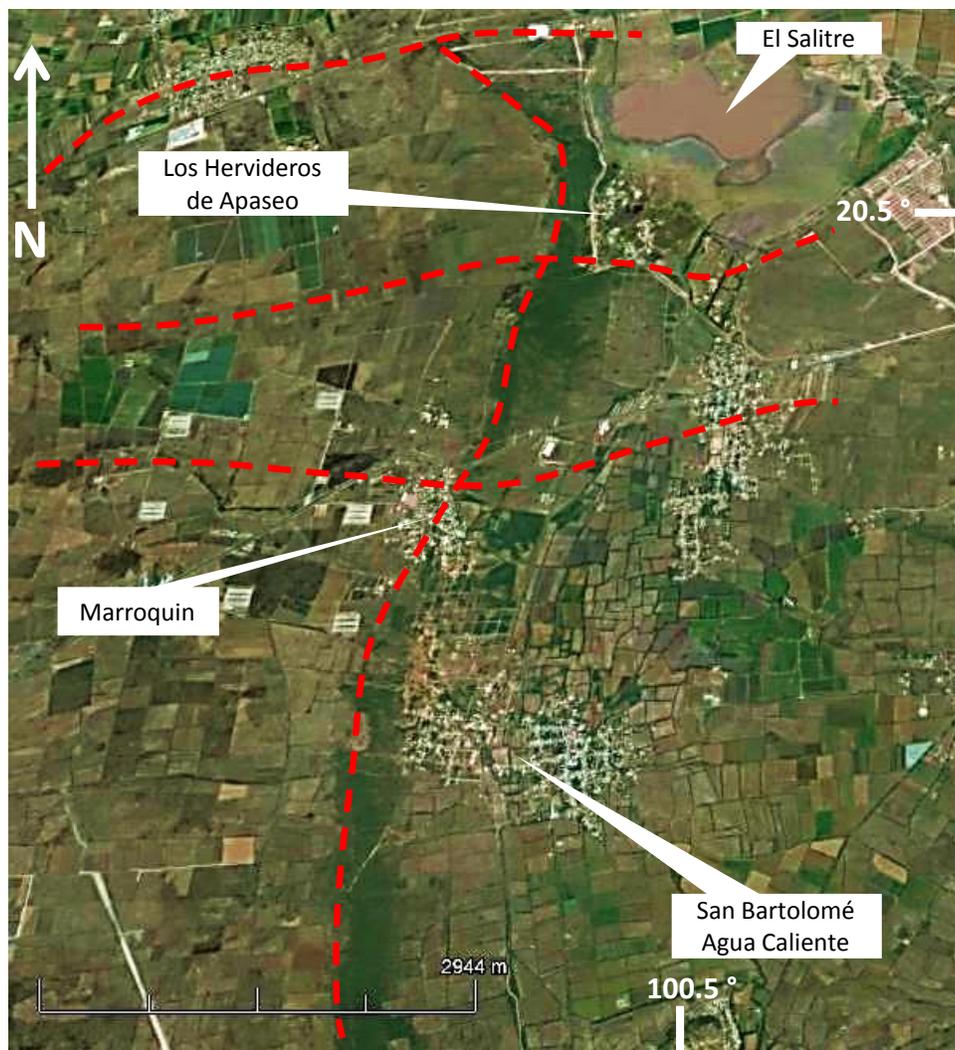


Figura 6. Mapa de las principales localidades con actividad hidrotermal en los alrededores del campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo. Las líneas rojas indican las principales fallas geológicas de la zona. La falla que corre de Norte a Sur es parte del sistema del Graben de Querétaro (Aguirre-Díaz et al. 2000).

En el campo hidrotermal se encuentran variadas expresiones morfológicas superficiales (pequeñas cascadas, terrazas y terracetas, montículos, albercas, crestas, ventilas cónicas y circulares, fisuras y escurrimientos) (Figuras 7, 8, 9). Estas formaciones están compuestas de sílice amorfo (sínter), que se han formado a partir del depósito del sílice a través del tiempo. La extensión de los depósitos de sínter del LH, desde el más antiguo hasta el más reciente comprende un área de aproximadamente 1200 m x 1200 m, aunque signos de hidrotermalismo ocurren ampliamente en los alrededores (hasta ~15 km a la redonda). Es probable que los minerales que forman el sínter de sílice amorfo (opalino) en el LH, provengan de la disolución de materiales volcánicos, como derrames de lava de basaltos, andesitas, y dacitas, que se observan en los alrededores de esta porción de la Faja Volcánica Transmexicana (Alaniz-Álvarez et al., 2001).





Figura 7. Depósitos de sínter del campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo, Guanajuato, México. A) Vista general de terrazas y ventilas (ancho de la foto en la base = ~5 m). B) Ventilas y terrazas sin actividad hidrotermal. C) y D) Vista de las pozas más calientes del campo (~95 °C). E) Ventilas sin actividad hidrotermal. Una de ellas (parte inferior de la foto) con pronunciado relieve en su contorno, el cual ha sido parcialmente erosionado. F) Ventila sin actividad hidrotermal y con el depósito del contorno muy erosionado. G) Ventila con caudal reducido de alta temperatura (>80 °C). Nótese el contorno erosionado hacia la salida del desagüe (flecha). H) Sistema de ductos (flecha) con y sin actividad hidrotermal. I) Poza de considerables dimensiones con capas de los depósitos de sínter hacia su interior. J) Poza activa con sínter depositado en su contorno y su característico desagüe (flecha). K) Terrazas y pozas de baja temperatura. L) y M) Pozas de baja temperatura (probablemente en proceso de extinción) con terrazas bien desarrolladas.





Figura 8. Depósitos de sínter del campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo. A) Poza con prominente depósito de sínter en su contorno. B) Ventila (diámetro = 27 cm) con depósito de bajo relieve. El sínter quedó depositado demarcando el paleoflujo (líneas). C) Ejemplo de poza con relieve positivo y desagüe. D) Ejemplo de poza con relieve positivo sin desagüe. E) Sistema de pozas con ductos subterráneos que han sido parcialmente cubiertos por suelo de formación reciente. La ventila de la parte inferior mide 95 cm de diámetro. F) Poza con una alberca bien desarrollada. El suelo que la rodeaba hasta su superficie ha sido erosionado, por lo que actualmente posee un relieve positivo considerable. G) y H) Ejemplos de pozas con anillos y montículos de sílice que se precipitaron alrededor de la ventila. La ventila en G desarrolló un desagüe (flecha), ausente en H. La ventila en H mide 32 cm de diámetro. I) Ventila de 10 cm de diámetro y considerable relieve positivo. J) y K) Ejemplos de ventilas con terrazas (flechas), producto del escurrimiento sin desagüe de los fluidos concentrados en sílice. L) y M) Ejemplos de pozas que fueron completamente selladas con sínter. Se aprecian crecimientos anillados alrededor de lo que fue la ventila en L (flechas). N) Poza inactiva cuya ventila central (52 cm de diámetro) fue sellada por lodo parcialmente silicificado donde han crecido plantas. O) Poza activa (45 °C) en cuya orilla se observan rastros de descarga incipiente de fluidos (flechas) que no desarrollaron ventilas maduras. Diámetro aproximado de la poza = 1.35 m. P) Explanada de sínter (área aproximada de 120 x 75 cm) donde se observan huellas de la descarga incipiente de fluidos (flechas) que no llegaron a formar ventilas maduras.

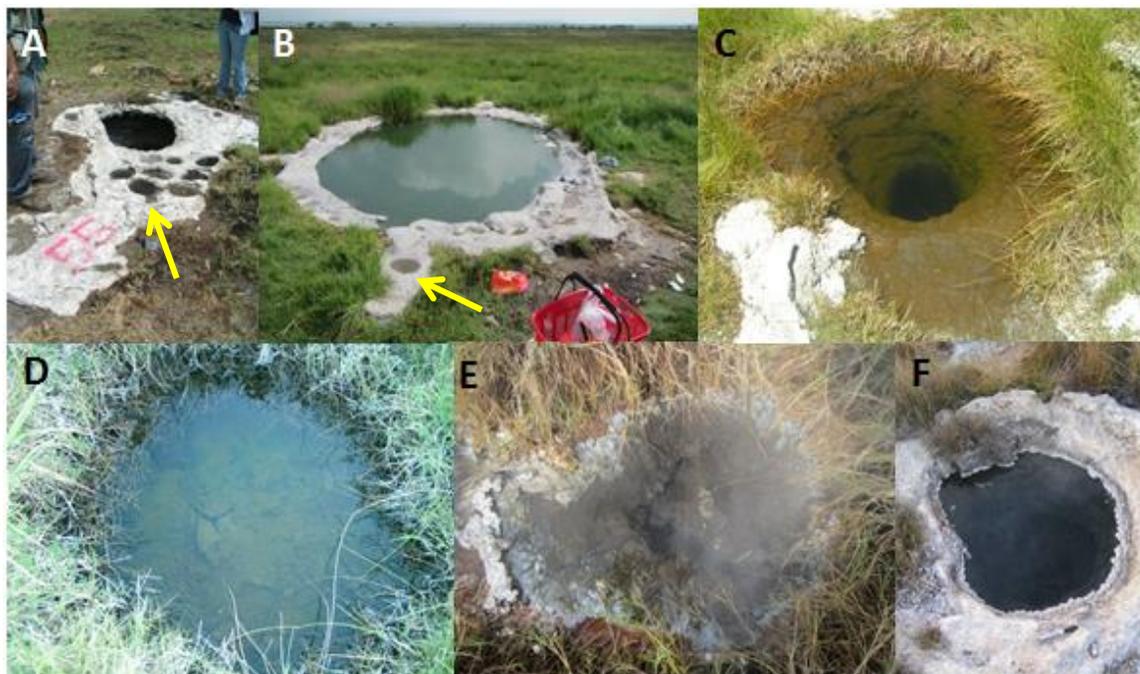




Figura 9. Grados de formación de sínter en el campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo, Guanajuato, México. A) Ventila relativamente bien desarrollada junto a huellas de descarga incipiente de fluidos (flecha). B) Poza bien desarrollada y con un contorno de sínter bien desarrollado a su alrededor. Se aprecian huellas de descarga incipiente de fluidos (flecha). C) y D) Pozas (75 y 45 cm de diámetro respectivamente) con ventilas bien desarrolladas (65 y 45 °C respectivamente), pero que no han formado depósitos de sínter en la orilla. E) Poza (45 cm de diámetro mayor y 75 °C) con formación incipiente de sínter en la orilla. F) y G) Ejemplos de pozas (75 y 52 °C) con un desarrollo avanzado del depósito de sínter en sus contornos. H) Poza somera (<50 cm de profundidad y 3.25 m de diámetro) con un desarrollo de gruesos tapetes microbianos en su interior y formación parcial de sínter en la orilla. Desagües en extremos opuestos (flechas) indican probable alteración humana. I) Poza con sínter de diferentes consistencias. El menos denso y más frágil se encuentra en la orilla, en contacto con el agua (recuadro), mientras que el resto es más denso y duro. Nótese el desagüe característico de muchas de las pozas (flecha). J), K), L) Ejemplos de pozas con formación de sínter en la orilla, con distintas densidades, interpretado como diferentes estadios de precipitación (de antigua a reciente).

Cabe mencionar que LH es un sitio fuertemente impactado por actividades antropogénicas, como lo son el uso y extracción del agua, el pastoreo, el uso de pozas de agua como baños, así como lugar de desecho de basura dentro y fuera de las pozas. Ello ha afectado a la turbidez del agua de muchas pozas y seguramente también al desarrollo de microorganismos autóctonos y alóctonos del sistema natural.

4.2. Recolección de muestras

Un gran número de fuentes a diferentes temperaturas fueron censadas para evaluar su potencial térmico (de 50 a 94 °C) (Figura 10). Este gradiente de temperatura fue seleccionado debido a que los microorganismos termófilos poseen temperaturas óptimas de crecimiento entre 50 y 110 °C (Aravalli et al., 1998; Fujiwara, 2002; López-López et al., 2013).

La recolección de muestras se llevó a cabo durante la temporada de lluvias y el criterio de muestreo se basó en la presencia de tapetes microbianos y biopelículas que estuvieran sumergidos en el agua de fuentes que no se encontraran drásticamente perturbadas por contaminantes exógenos (desperdicios de carácter antropogénico). Algunos controles comparativos se recolectaron de la orilla de las pozas o del suelo cercano a estas. Se registró la temperatura y el pH de cada una de las fuentes muestreadas con un potenciómetro Oakton Multi PT Tester 35 (Oakton Inc. Illinois, USA). No se tomaron datos de conductividad y salinidad, y tampoco se realizó análisis químico del agua de las pozas muestreadas.

Se recolectaron tapetes microbianos y biopelículas que se encontraban sumergidos en el agua en 50 pozas (Apéndice I) con la ayuda de un nucleador metálico de 4 mm de diámetro (Figura 11), esterilizado con alcohol y flama antes de cada recolección. Con la idea de obtener una apreciación general de la diversidad total de cada sitio de muestreo, de cada poza se tomaron de 3 a 7 muestras (dependiendo de la variedad de pigmentación y tipos de crecimiento observados), las cuales fueron combinadas y guardadas en tubos Falcon de 15 mL (Thermo-Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y tubos Eppendorf de 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany) y almacenadas inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar cambios en la composición de la

comunidad (Rothrock y Garcia-Pichel, 2004). Una vez en el laboratorio las muestras fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

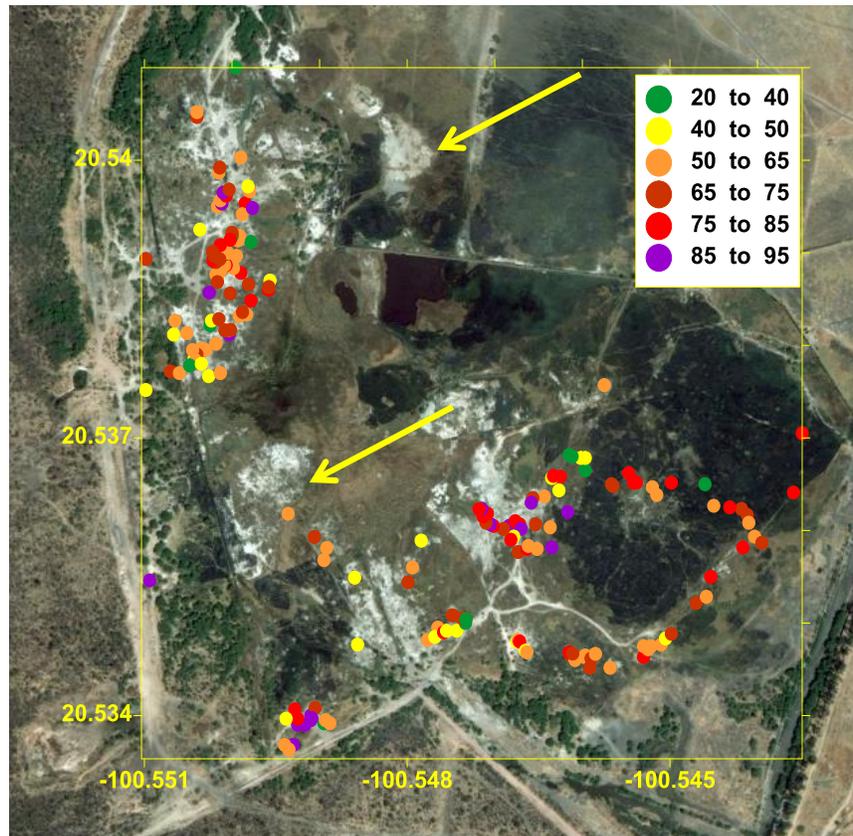


Figura 10. Mapa de Los Hervideros de Apaseo mostrando la distribución y temperatura de las pozas activas que se muestrearon. Se recolectaron tapetes microbianos y biopelículas en 50 pozas que cubrieran un rango de temperatura de $50\text{--}94\text{ }^{\circ}\text{C}$. Extensiones de terrazas y pozas inactivas se aprecian de color blanco en la fotografía (algunos ejemplos se indican con flechas).

En este trabajo, se decidió no llevar a cabo observaciones al microscopio ni la realización de medios de cultivo, ya que si bien por un lado la visualización al microscopio permite la identificación de determinados grupos de microorganismos, una de las limitantes es el problema del tamaño relativamente pequeño y la apariencia no distintiva de estos. Por otro lado, los cultivos puros son esenciales para caracterizar a los microorganismos y tener conocimiento sobre su genética y fisiología. Sin embargo, la limitante que presentan los estudios a través de los métodos de cultivo, es la carencia de un análisis más detallado de las poblaciones dentro de comunidades naturales, por lo cual si se carece de un medio adecuado para detectar a las poblaciones microbianas nativas predominantes de un ambiente (ej., herramientas moleculares), el estudio de las

comunidades microbianas se ve reducido solo a análisis ecofisiológicos de algunos procesos microbianos.

Por tal motivo, recurrimos a la aplicación de métodos moleculares, ya que a través de estos es posible observar los patrones de ocurrencia de poblaciones individuales sobre las cuales se basa la estructura de las comunidades microbianas. De manera específica, se decidió trabajar con secuencias del gen 16S rRNA de los microorganismos con la finalidad de detectar su presencia y cuantificar su distribución en las comunidades.

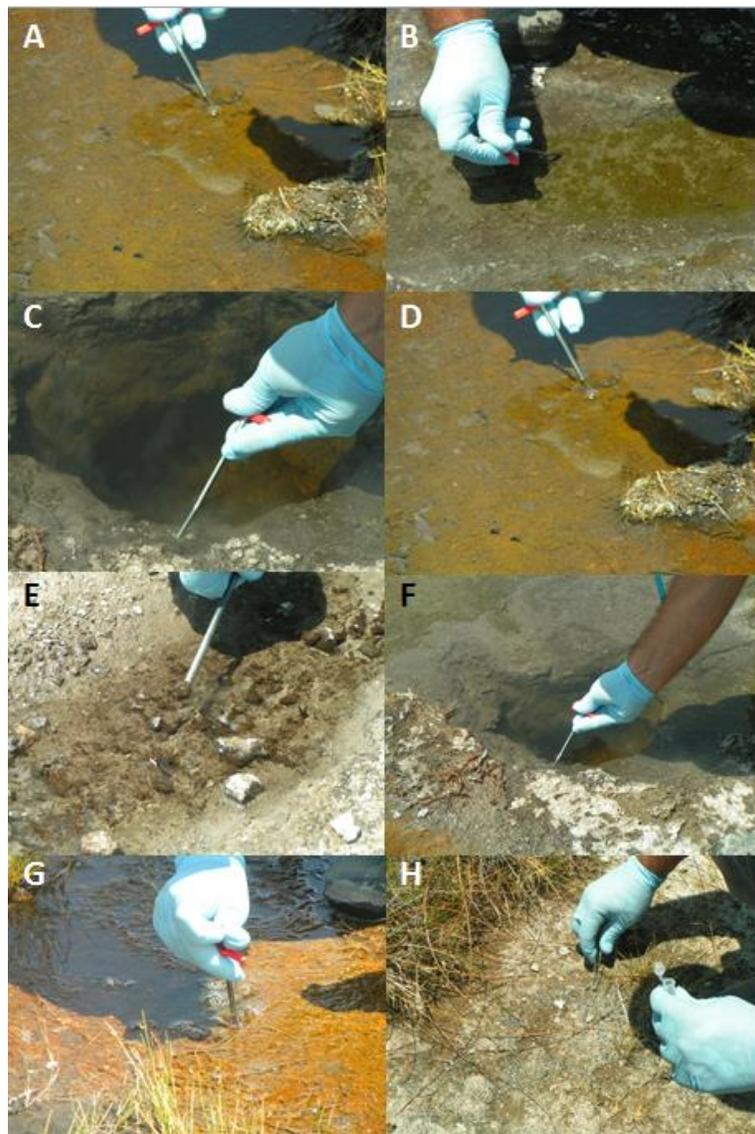


Figura 11. Toma de muestras con nucleador. (A, B, D y G) Recolección de biopelículas de diferente pigmentación en cauces de las fuentes. (C y F) Recolección de biopelículas adheridas a las paredes de la fuente. H) Toma de muestras control del suelo adenaño a las fuentes.

4.3. Extracción de DNA

Las muestras fueron pre-lavadas antes de la extracción de DNA para evitar interferencias provocadas por sales y compuestos orgánicos solubles. Para ello, 10 g de cada muestra macerada fue diluida en 10 mL de agua destilada estéril, agitada en vórtex y centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm para recuperar la pastilla de muestra, descartando el sobrenadante saturado con sales. Este procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y utilizando campana de flujo laminar para minimizar la contaminación. Las pastillas de biomasa se procesaron según el protocolo de un kit comercial de extracción de DNA (UltraCleanSoil DNA, MoBioLaboratories Inc., Carlsbad CA), y las concentraciones de DNA extraído fueron determinadas con un espectrofotómetro (Nano Drop spectrophotometer ND-2000, Thermo-Scientific, Wilmington DE) (Apéndice II).

4.4. Amplificación del DNA y DGGE

El DNA obtenido en las extracciones fue purificado utilizando un kit comercial (Wizard Genomic Purification Kit, Promega Inc., Madison, WI) y posteriormente amplificado por PCR, utilizando la región hipervariable V3-V5 (Figura 4) del gen 16S rRNA (~569 pb), con los primers GC-338f (5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAG GCAGCAG-3') y 907r (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' (Muyzer et al., 1993; Fierer et al., 2007), siguiendo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 15 min, 10 ciclos "Touch Down" en 3 etapas: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 30 segs, 1 ciclo de alineamiento de 56-51 °C por 30 segs con un decremento de -0.5 °C y 1 ciclo de extensión a 72 °C por 1 min. 25 ciclos en 3 etapas: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 30 segs, 1 ciclo de alineamiento a 51 °C por 30 segs, 1 ciclo de extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 10 mins.

De cada una de las muestras se hizo una reacción de PCR por triplicado y las tres alícuotas fueron combinadas.

Trece muestras más un grupo control (subaéreo) (aproximadamente 155 ng de DNA por muestra) cuyas temperaturas abarcaron un gradiente térmico que comprendió desde los 50 °C a los 94 °C (Figura 12), fueron procesados en un DGGE (poliacrilamida al 8%, un

gradiente de 40 a 60% de urea-formamida y electroforesis a 55 V durante 15 horas (Muyzer et al., 1993). Un estándar comercial (NipponGene LTD, Japan) fue utilizado como referencia. El gel fue teñido con nitrato de plata para revelar la posición de las bandas y visualizado a simple vista. El gel fotografiado fue analizado con el software ImageJ (Schneider et al., 2012) para conocer su relación horizontal y convertirlo en una matriz numérica con la información de su presencia-ausencia y su intensidad relativa (Schäfer y Muyzer, 2001) (Apéndice III). Con esta matriz se generó un dendrograma usando el paquete estadístico PAST (Hammer et al., 2001). Para obtener el dendrograma se utilizó el método de Ward, que asume la menor varianza de cada conjunto de datos y un bootstrap de 100 repeticiones para obtener un consenso.

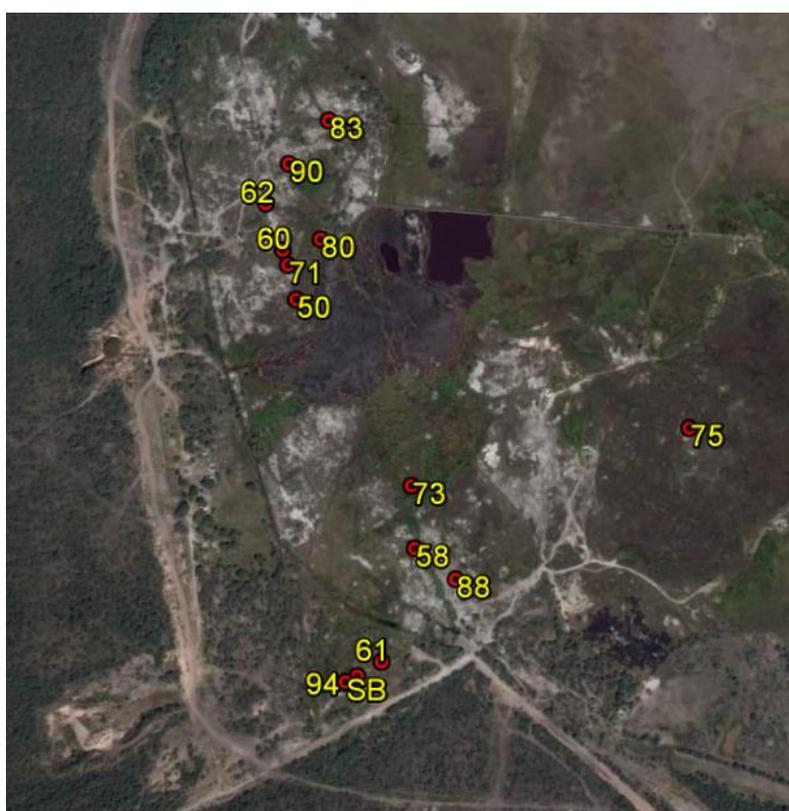


Figura 12. Localización de las muestras seleccionadas para el DGGE. Se muestran las temperaturas de cada poza. SB) Muestra subaérea.

Para conocer la relación que pudiera existir entre las variables ambientales medidas (temperatura y pH) y el número de bandas presentes por cada carril en el gel del DGGE, se realizó un análisis de correlación lineal, utilizando el software estadístico *Wolfran Mathematica* versión 7.0.

5.- Resultados y discusión

5.1. Observaciones sobre el sínter

Muchos patrones morfológicos se observaron en los depósitos de sílice de LH, incluidos la extensión de las terrazas y explanadas formadas por escurrimientos que se presumen de larga duración, la forma, diámetro y altura de las pozas, los montículos y anillos formados alrededor de las ventilas. Se observaron distintos patrones en el depósito del sínter que pudieran deberse a diferencias en el régimen hídrico, la concentración de sílice en los fluidos hidrotermales a través del tiempo, el caudal de la descarga, u otros fenómenos asociados con los procesos superficiales (ej. intensidad de calor de los cuerpos magmáticos profundos). Algunos de esos patrones están representados en la morfología de los depósitos que se encuentran directamente alrededor de las pozas y ventilas observadas. Por ejemplo, los montículos, albercas y anillos formados alrededor de las pozas (Figuras 7-9) no son iguales en espesor, ni extensión, ni en altura (relieve positivo), lo cual indica que la duración del desagüe, la cantidad de sílice depositado, y el caudal del flujo no fueron iguales en todos los casos. Así mismo, se observaron huellas de descargas incipientes que no lograron formar ventilas, sino que fueron obstruidas de alguna manera, tal que no formaron grandes depósitos a su alrededor, excepto en casos donde una ventila alternativa cercana logró formarse (Figura 8 L-P).

Los suelos alrededor de las pozas (Figura 13 K-O), que se han llamado 'suelos geotermales' (Jones y Renaut, 2006), pudieron observarse en distintas etapas de formación, a juzgar por la consistencia del sílice precipitado *in situ*. En algunos casos se observó que el sílice no estaba consolidado y podía ser removido fácilmente haciendo presión sobre él (Figura 13 D-E), mientras que en otros casos el sílice estaba totalmente consolidado y duro, pero guardaba todavía el patrón morfológico del suelo donde se precipitó (Figura 13 K-N). Estos patrones pudieran ser importantes para reconocer procesos edáficos en un momento dado, lo cual podría hablar de las condiciones de formación (clima, proveniencia mineral, etc.) del suelo circundante al depósito en cuestión, e incluso posibles influencias de la biota, dado que la formación de los suelos está determinada en parte por las condiciones ambientales (sobre todo el clima, que se relaciona con las tasas de intemperismo), el tipo de sustrato donde se forma, e incluso

el tipo de biota (Meadow y Zabinski, 2012). En el caso de LH no se observaron detalles que permitieran hacer este tipo de inferencias, excepto en el caso de formaciones de sínter alrededor de pozas, en las que podía inferirse que el suelo que las rodeaba había sido erosionado, exponiendo parte del depósito por encima de la superficie actual del suelo (Figura 8 F).

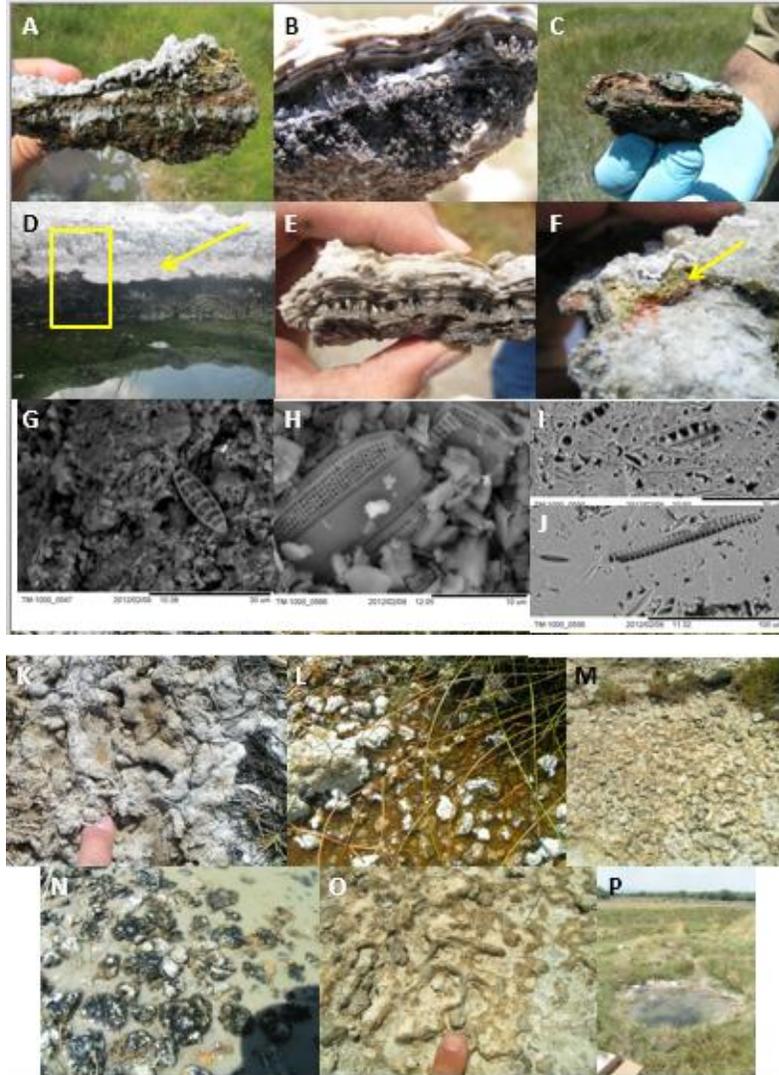


Figura 13. Biopelículas y tapetes microbianos silicificados. A), B) y C) Distintas vistas de fragmentos de tapetes microbianos que han sido silicificados e incorporados a la estructura del sínter. Nótese la estratificación y la variedad de fábricas que presentan. D) Orilla de una poza con formación incipiente de sínter (flecha). Nótese la diferencia entre el sínter recientemente formado en la parte superior y parte del sínter más antiguo (más duro y denso) en la parte inferior (recuadro). E) Fragmento de sínter de reciente formación. F) Acercamiento a un fragmento de sínter de reciente formación, mostrando una zona que fue rascada para revelar las colonias de microorganismos (pigmentadas) que se desarrollaron a unos pocos milímetros de profundidad de la superficie (flecha). G), H), I), J) Fotografías al microscopio electrónico mostrando ejemplos de diatomeas embebidas en la estructura del sínter. K) Suelo geotermal de consistencia deleznable (en proceso de litificación), desarrollado alrededor de pozas y ventilas activas. L) Suelo geotermal desarrollado alrededor de escurrimientos de pozas activas. Los fragmentos son relativamente duros, pero la mayoría no están cementados al sustrato. M), N), O) Ejemplos de las diferentes texturas y consistencias de los suelos geotermales que se desarrollaron alrededor de las pozas y ventilas de LH. Estos suelos están totalmente litificados y son duros, sin fragmentos sueltos. P) Vista general de una poza activa en cuyos alrededores se formaron suelos geotermales.

Es posible que estudios futuros provean datos complementarios importantes para la reconstrucción paleoambiental del sitio, utilizando parámetros como la erosión del suelo o particularidades de las formaciones de sínter. Todas estas observaciones podrían complementarse con estudios sedimentológicos y mineralógicos que pudieran ayudar en reconstrucciones acerca del paleoambiente y la antigüedad del campo hidrotermal. Además de los indicadores geológicos, también podrían utilizarse indicadores biológicos (ej. polen, algas, otros organismos sensibles a cambios ambientales) para estas reconstrucciones. A este respecto cabe mencionar que en fragmentos de sínter se observaron frústulas de diatomeas (Figura 13 G-H), que también han sido observadas en suelos geotermales recientes de Yellowstone (Meadow y Zabinski, 2012). A pesar de que éstas no fueron identificadas, su preservación es suficientemente buena como para rescatar caracteres de diagnóstico que pudieran ser usados para determinar especies y por lo tanto relacionarlas con parámetros ambientales específicos, tal y como se hace para un gran número de especies actuales (Smol y Stoermer, 2010).

5.2. Biopelículas y tapetes microbianos

Varios tapetes microbianos se observaron desarrollándose dentro de las pozas, excepto en las más calientes ($>90\text{ }^{\circ}\text{C}$) y más comúnmente en pozas con temperaturas de $45\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$, generalmente sobre sustratos arcillosos (Figura 14). En las pozas más calientes, los tapetes se observaron exclusivamente en las orillas de las fuentes donde continuamente están en contacto con el agua; en ocasiones, las biopelículas se desarrollaron en las zonas permanentemente salpicadas en la orilla de estas pozas pero fuera del agua (Figura 14 O). Otras veces, los tapetes se encontraron silicificados en mayor o menor grado (Figura 13) y generalmente formando intrincadas morfologías, resultado de la precipitación mineral alrededor de colonias bacterianas, algales (ej. diatomeas; Figura 13 G-H), vegetales y otros organismos. En algunos casos, cuando la temperatura a profundidad sobrepasa los $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rimstidt y Cole, 1983), puede depositarse sílice en la superficie. Cuando esto sucede, los tapetes microbianos pueden silicificarse (encontrarse) dado que las estructuras y secreciones celulares sirven como superficies de nucleación (Konhauser, 2003; Kyle, 2007). Así, los microorganismos influyen en el desarrollo de las estructuras (fábricas y texturas) de los depósitos de sínter (Cady-

Farmer, 1996; Konhauser et al., 2003; Westall et al., 2006). Sin embargo, falta cuantificar de manera experimental cuáles son los efectos a detalle que se generan en dichos depósitos con y sin microorganismos.



Figura 14. Biopelículas y tapetes microbianos. A) Poza a 45 °C con una biopelícula continua de color verde recubriendo la superficie sólida subacuática. La biopelícula se engrosa en el fondo donde el sustrato es arcilloso. B) Poza a 65 °C con tapetes microbianos pigmentados. C) Acercamiento de los tapetes en B donde se observa un corte transversal al tapete microbiano, cuya base blanca (flecha) revela el depósito de sílice. La parte superior muestra la zona pigmentada. D) Poza a 70 °C con tapetes de pigmentación verde y anaranjada en el fondo. E) Acercamiento a los tapetes de la poza mostrada en D. (F, G, H, I) Ejemplos de tapetes microbianos sobre sustratos arcillosos. Nótese la clara separación entre los tapetes y el sustrato, dada por la diferencia en composición y cohesividad de unos y otros materiales. J), K), L) Ejemplos de biopelículas en donde se mezclan microbios presumiblemente fotosintéticos (verdes) y microbios presumiblemente oxidadores de azufre (color blanco; mundialmente conocidos como 'streamers'; ej. Nakagawa y Fukui, 2003). M) Poza dominada por una biopelícula de bacterias presumiblemente oxidadoras de azufre. N) Biopelícula de bacterias presumiblemente oxidadoras de azufre colectadas de la poza mostrada en M. O) Biopelícula de cianobacterias en la orilla de una poza a 95 °C. La orilla es continuamente salpicada por pequeñas gotas del agua de la poza, lo que mantiene hidratadas a las colonias microbianas.

A pesar de que el espesor centimétrico de los tapetes microbianos fue variable, todos desplegaron algún tipo de estratificación al interior (generalmente milimétrica), la cual se evidenció por cambios de coloración (Figura 14). Igual que en otros tapetes microbianos de distintos ambientes, incluidos los hidrotermales (Reysenbach et al., 2001, 2002), dicha estratificación seguramente se debe al arreglo que van adquiriendo los microorganismos según sus necesidades metabólicas, tales como su capacidad de absorción electromagnética para hacer fotosíntesis, la disponibilidad de materia orgánica soluble y nutrientes inorgánicos, el potencial de óxido-reducción, la presión parcial de oxígeno y la concentración de gases que son tóxicos para algunos organismos (ej. H₂S) y benéficos para otros (ej. CO₂) (Konhauser, 2007; Franks y Stolz, 2009; Madigan et al., 2010).

Además de los tapetes microbianos, varios crecimientos de biopelículas, visibles por sus pigmentos (verdes y rojos) fueron también observados a unos pocos milímetros por debajo de la superficie del sínter silíceo de reciente formación (a juzgar por su frágil y poco densa consistencia; Figura 13 F). Por otro lado, las biopelículas y tapetes fueron observados en combinación a lo largo de canales o escurrimientos que fluyen desde las pozas más calientes a otras de menor temperatura (Figura 15), particularmente en dos sitios donde la temperatura del agua de las pozas fue mayor o cercana a los 90 °C.

A lo largo de estos canales o desagües, el crecimiento de los distintos microorganismos fue evidente dados los cambios en la pigmentación y morfología de las colonias que ahí se desarrollaron, así como por sus hábitos de crecimiento (bentónicos o flotantes). Es probable que los pigmentos más evidentes, como los verdes, sean propios de organismos fotosintéticos (ej. Proteobacterias tipo Chlorobi o cianobacterias), mientras que algunos muy blancos sean oxidadores de azufre. Estos últimos son mundialmente conocidos como 'streamers' (ej. Nakagawa y Fukui, 2003) porque forman largos filamentos que se fijan al sustrato (ej. rocas, vegetación, el fondo del cuerpo de agua) y oscilan siguiendo el flujo del agua (Figuras 13 L, 15).

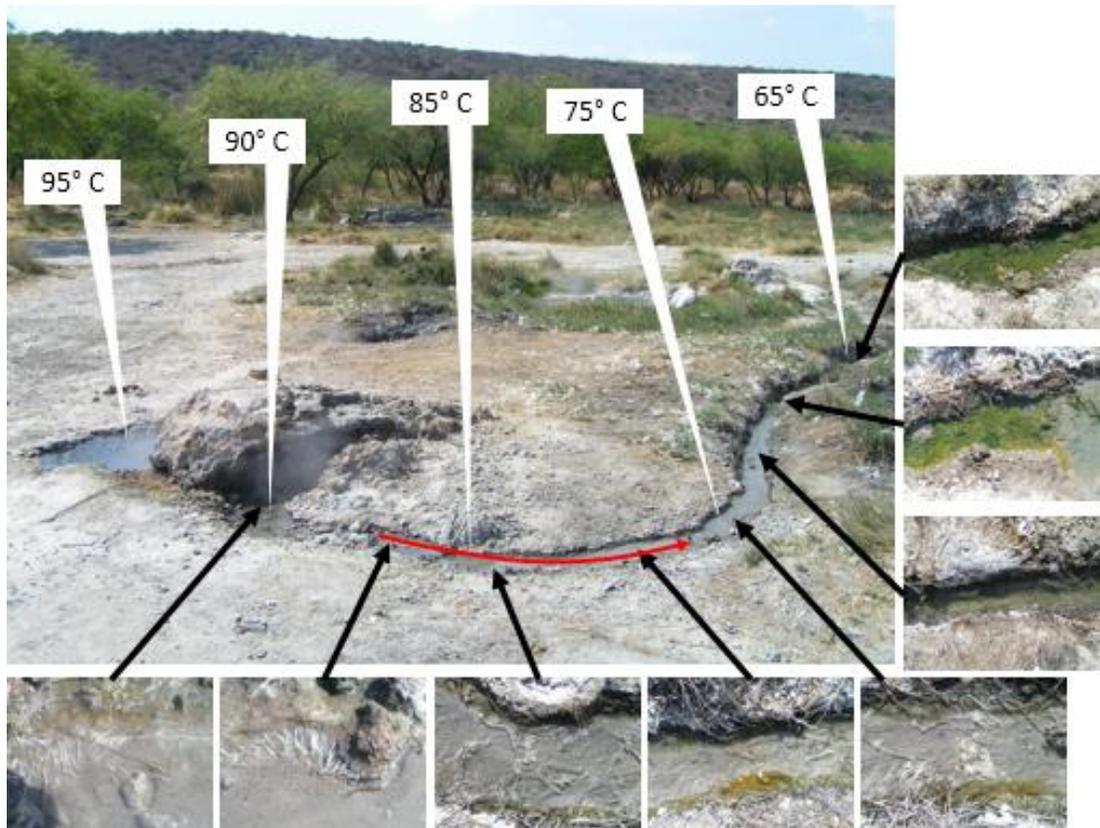


Figura. 15. Distribución de colonias microbianas según el gradiente de temperatura. Se muestra un escurrimiento de agua que proviene de una poza a 95 °C. El flujo se indica con una flecha roja. La temperatura del agua va disminuyendo a lo largo del escurrimiento. El cambio en las colonias microbianas ocurre de manera gradual: sin pigmentos hacia la zona proximal y pigmentadas (coloraciones verdes y marrones) hacia la zona distal. El canal del desagüe mide ~15 cm de ancho.

Los cambios colorimétricos y morfológicos de las bacterias en los desagües que partían de las pozas más calientes (>80 °C) se observaron asociados a cambios en la temperatura del agua (Figura 15). A mayor temperatura (87 °C, zona proximal a la poza), menos biomasa y menos colonias pigmentadas fueron observadas. En cambio, filamentos blancos (streamers) pudieron observarse. A temperaturas de 80-75 °C, colonias de pigmentación verde y filamentos blancos flotantes (streamers) eran abundantes. A partir de los 65 °C, colonias amarillas, anaranjadas, marrones y verdosas fueron más abundantes. A temperaturas menores a 60 °C, las colonias verdes fueron más abundantes y alcanzaron mayores espesores (más biomasa), aunque en combinación con otras colonias de coloración anaranjada y marrón. Los cambios en pigmentación de estas últimas pudieron deberse simplemente a la producción de aceites y pigmentos accesorios o secundarios (ej. carotenoides), más que a cambios en la

composición de las especies que las conforman. Esto ha sido observado en tapetes microbianos y biopelículas de diversos ambientes, incluidos los hidrotermales subaéreos (Walker et al., 2005).

La abundancia de tapetes microbianos y biopelículas en LH es indicativo de la abundancia de microorganismos que habitan estos ambientes y de la diversidad de formas y metabolismos que ahí se han desarrollado, lo cual es consistente con lo observado en otros ecosistemas similares de otros lugares del mundo. Esto es importante porque los tapetes microbianos suponen tipos de comunidades microbianas análogas a las que pudieron existir en la Tierra primitiva, y por tanto son relevantes para la geobiología y la astrobiología, en caso de que se hallasen sistemas parecidos en otros planetas. A este respecto cabe mencionar que en Marte se han encontrado depósitos de sílice que pudieran representar sínter hidrotermal (Preston et al., 2008; Squyers et al., 2008). A pesar de que hasta ahora no se han detectado biofirmas microbianas en éstos (pocas observaciones a detalle se han hecho de estos depósitos), aún cabe la posibilidad de que existan ahí laminaciones o estructuras intrincadas que semejen fábricas de sínTERS donde la participación microbiana es evidente, tal como ocurre en ejemplos terrestres (ej. Figura 13 A-F). Es por ello que hacer este tipo de observaciones es esencial en análogos terrestres que después pueden servir para reconocer este tipo de estructuras en el registro geológico de la Tierra y otros planetas.

5.3. Diversidad de la comunidad bacteriana de Los Hervideros de Apaseo

Los fragmentos del gen 16S rRNA han sido amplificados por PCR a partir de muestras recolectadas en fuentes termales con temperaturas de 50-94 °C, para conocer la diversidad bacteriana presente a diferentes temperaturas.

Este estudio se enfocó en el análisis del patrón de bandeo del DGGE, el cual es considerado una “imagen” de la comunidad bacteriana dominante. Cada una de las bandas es referida como una secuencia única o filotipo (Muyzer et al., 1995; van Hannen et al., 1999). El patrón de bandeo fue analizado como sigue: primero, el número total de bandas diferentes presentes en cada carril y representante de cada muestra del

gradiente de temperatura. Luego, de acuerdo a la presencia o ausencia de cada banda por carril, se comparó con el perfil de cada uno de los carriles.

La intensidad de las diferentes bandas del DGGE no permitió conclusiones cuantitativas de la abundancia de diferentes bacterias.

El análisis del perfil del DGGE, correspondiente a cada una de las muestra ordenadas por temperatura, reveló la presencia de un variado número de bandas distribuidas en el gradiente térmico estudiado (~50-94 °C) (Figura 16). El número total de bandas (denominado también “riqueza de bandas”) en cada una de las muestras está relacionado con el número de filotipos dominantes y puede ser utilizado con propósitos comparativos (Fromin et al., 2002) (Figura 17).

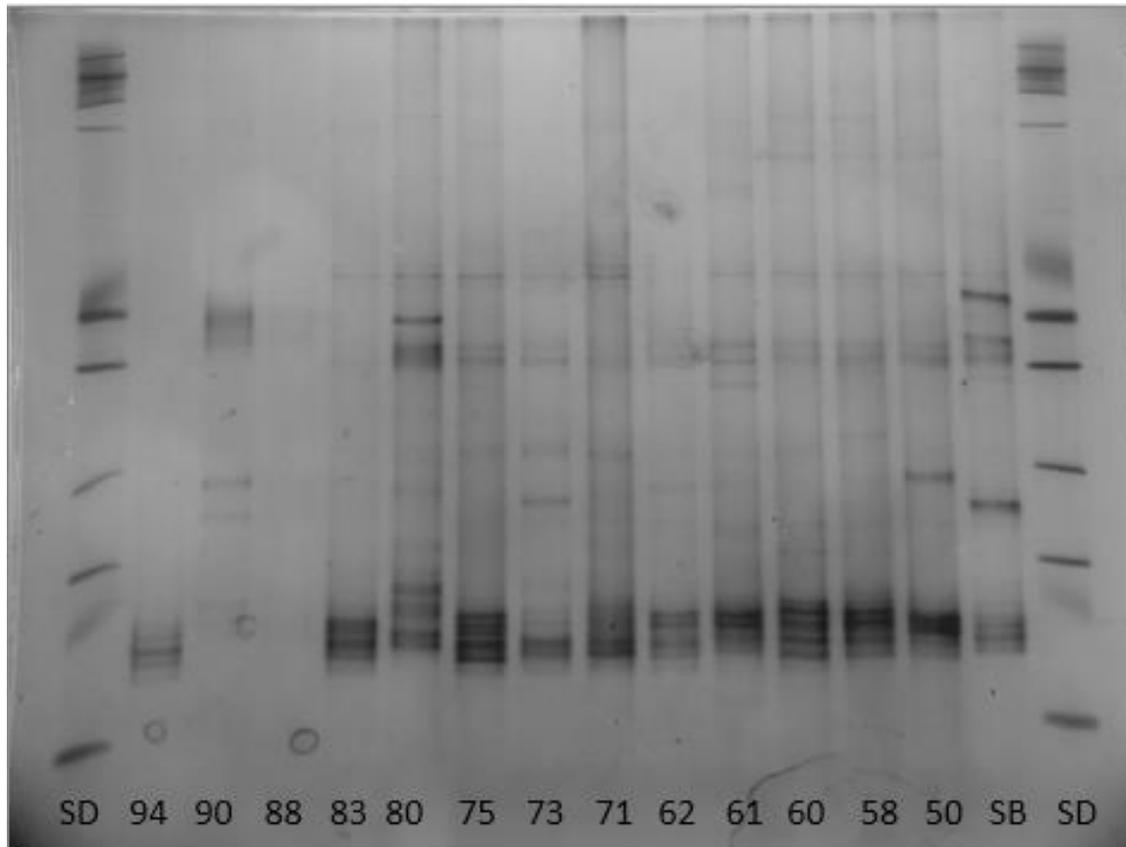


Figura 16. Gel de electroforesis (DGGE) mostrando 14 muestras (una por cada carril) que representan un gradiente hidrotérmico de 50 °C a 94 °C. Las temperaturas se indican para cada carril en la parte inferior (ver la figura 12 para su localización geográfica). SB = Subaéreo (muestra tomada de la orilla, no sumergida en el agua de una poza). SD = estándar.

Sin embargo, a la hora de la interpretación de la riqueza se debe tener en cuenta que muchas veces el número de bandas individuales de cada carril (vertical) del DGGE, no corresponden necesariamente a un solo filotipo, sino que varias bandas pueden pertenecer a un solo organismo (Sekiguchi et al., 2001; Muhling et al., 2008; Cleary et al., 2012). Esto se debe al gran número de genes duplicados del 16S rRNA que puede tener una sola bacteria en su genoma y plásmidos (Rappe et al., 1997), así como también a la migración simultánea de secuencias disímiles a una misma posición (Vallaeyts et al., 1997). De la misma manera, la formación de DNA heteroduplex (Dahllöf et al., 2000) o quimeras (Lindström, 1998) que se generan durante la amplificación por PCR. Si bien el DGGE permite tener una estimación rápida, cualitativa y semicuantitativa de una comunidad microbiana, se debe tener cuidado al momento de interpretar los perfiles de bandeado, considerando los sesgos metodológicos que pueden generar secuencias que sobreestimen la riqueza real de la muestra.

Debido a que las muestras fueron tratadas de la misma manera en este trabajo (ej., usando un mismo par de cebadores y un gen tan conservado como el 16S rRNA), es válido hacer un análisis comparativo de los sitios muestreados. Entonces, un mayor número de bandas corresponde a un mayor número de filotipos dominantes en la muestra (Muyzer y Smalla, 1998). En este sentido, se observó una relación entre el número de bandas visibles por DGGE y la temperatura, siendo mayor en pozas de menor temperatura y menor en pozas de mayor temperatura. Esta correlación lineal mostró un coeficiente $R^2 = 0.58619$ (Figura 18).

Por otro lado, la correlación existente entre el número de bandas y el pH de las pozas analizadas fue nula, con un coeficiente de correlación de cero, $(R^2) = 0$ (Figura 19). Esto demuestra que el pH parece no influir de manera directa con el número de las bandas en el gradiente térmico estudiado.

Probablemente, al tratarse de valores de pH cercanos entre ellos y no variar considerablemente a lo largo del gradiente de temperatura estudiado, no es posible predecir un comportamiento que relacione la manera en la que influye el pH en la distribución de filotipos (número de bandas).

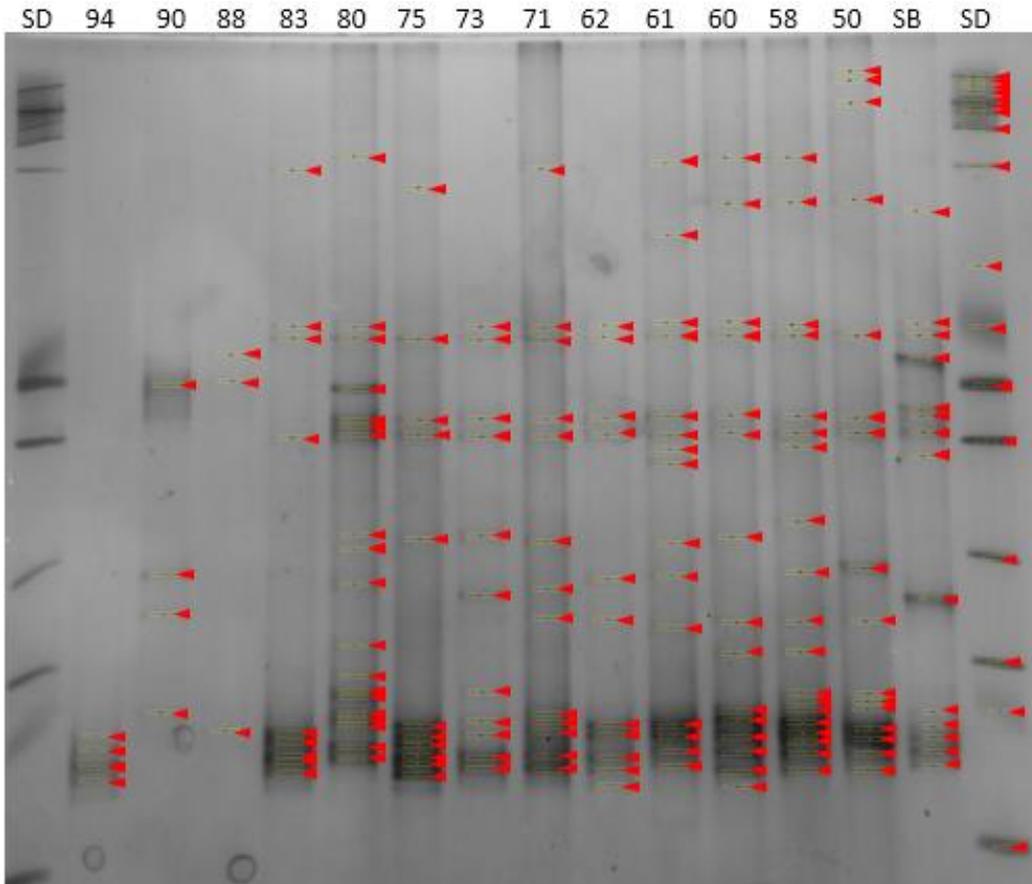


Figura 17. Cuantificación del número de bandas a partir del patrón de bandeo del DGGE. El número de bandas por carril (flechas) se estima como la riqueza de filotipos presentes en la muestra (Muyzer y Smalla, 1998). La posición horizontal de las bandas se relaciona generalmente con la similitud en la secuencia genómica de las mismas. Los números en la parte superior de cada carril indican la temperatura (°C) de cada poza. SB = subaéreo (muestra tomada de la orilla, no sumergida de una poza). SD = estándar. NOTA: uno de los estándares no se cuantificó por asumir igualdad con su análogo.

Este patrón es consistente con lo que se observó directamente en el campo, donde menor o nula cantidad de biomasa (y colonias microbianas pigmentadas) fue detectada en las pozas más calientes, mientras que gruesos tapetes microbianos estuvieron presentes en pozas de menor temperatura (ver sección 5.2). A pesar de ello, hubieron muestras que no cumplieron necesariamente con esta correlación. Las muestras de las pozas a 58 y 80 °C fueron las más alejadas de esta relación, pues presentaron mayor número de bandas que el resto de las muestras, independientemente de la temperatura.

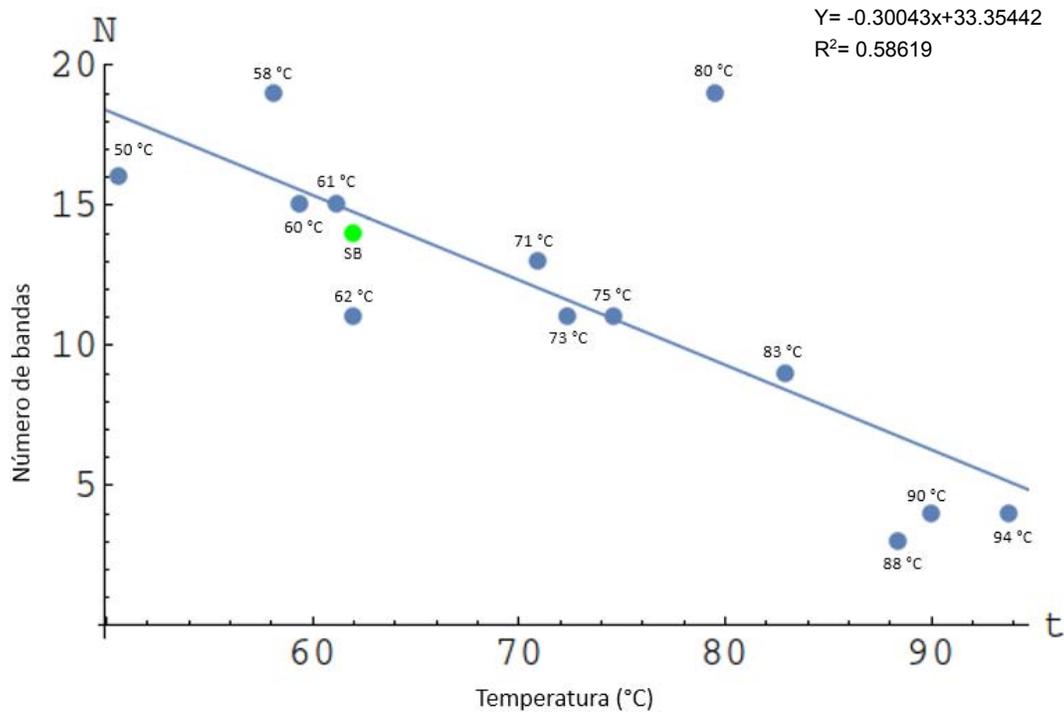


Figura 18. Diagrama de dispersión entre la temperatura en diferentes pozas y el número de filotipos 16S rRNA detectados por DGGE. En el eje X se denota la temperatura de la poza, y en el eje Y el número de bandas detectadas por DGGE. El punto en verde pertenece a la muestra subaérea (SB). (Ver Figura 17). La tendencia lineal se calculó sin los estándares. El valor de $R^2 = 0.58619$, $Y = -0.30043x + 33.35442$.

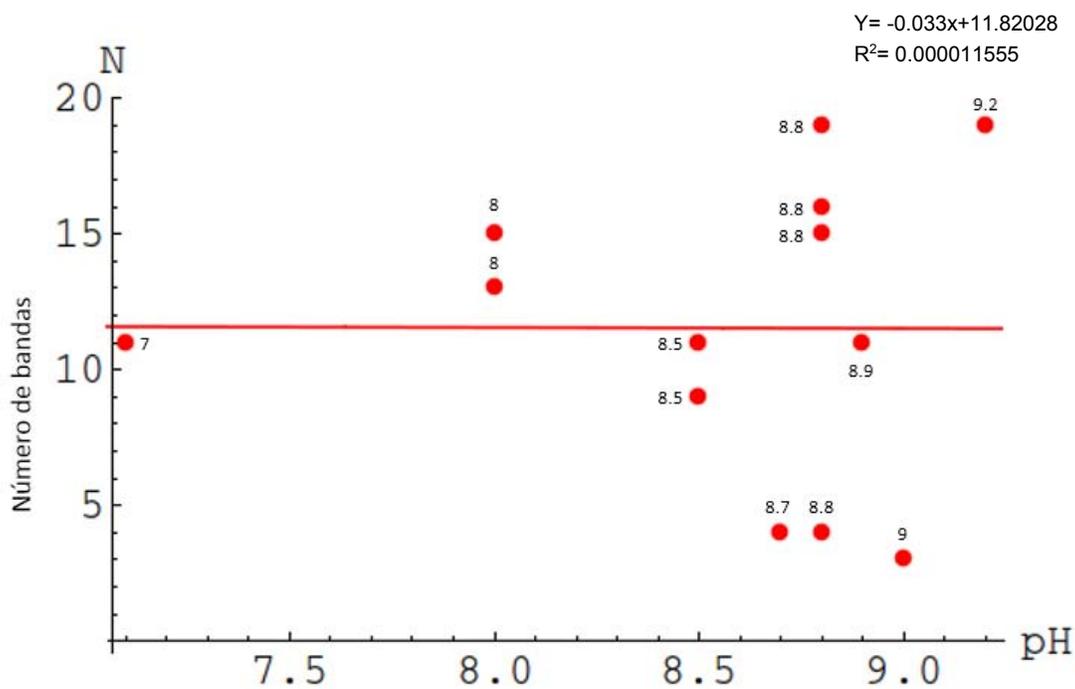


Figura 19. Diagrama de dispersión entre el valor de pH en diferentes pozas y el número de filotipos 16S rRNA detectados por DGGE. En el eje X se denota el pH del agua de la poza, y en el eje Y el número de bandas detectadas por DGGE (Ver Figura 17). La tendencia lineal se calculó sin los estándares. El valor de $R^2 = 0$, $Y = -0.033x + 11.82028$.

En los sistemas naturales existen diversos parámetros ambientales que en su conjunto determinan el desarrollo de las comunidades microbianas. Consecuentemente, la temperatura por sí sola no puede considerarse un factor de influencia definitivo en la diversidad de los microorganismos en los ambientes hidrotermales. Existen otros factores como el pH y la salinidad que afectan dicha diversidad (López et al., 2013); sin dejar de considerar factores de perturbación, como la incorporación de materia orgánica exógena que podría contribuir también a las variaciones en las comunidades microbianas. Además, los cambios de estacionalidad (Ej., lluvias y secas) pueden tener efectos directos en la diversidad.

El patrón de bandeo del DGGE mostró además que muchas bandas se correlacionaron horizontalmente, lo cual sugiere que varios filotipos están compartidos entre todas las pozas. Solamente las muestras de pozas con temperaturas $>80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostraron bandas en posiciones únicas (Figura 17), probablemente porque a esas temperaturas la comunidad es distinta. Mientras que a temperaturas $\leq 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ muchos filotipos fueron compartidos.

Cuando se considera la presencia-ausencia de las bandas y las similitudes entre los patrones de bandeo, estos pueden ser expresados numéricamente como valores en un coeficiente de distancias. Para observar la tendencia dentro del patrón de bandeo del DGGE, se elaboró una matriz de presencia-ausencia (ver metodología; Apéndice III) y se computó un modelo de 'clustering' o agrupamiento. El dendrograma obtenido (Figura 20), agrupó de manera general las muestras según sus rangos de temperatura: en tres grupos principales: i) un grupo para temperaturas de $50\text{-}75\text{ }^{\circ}\text{C}$, ii) otro para temperaturas de $70\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y iii) otro para temperaturas $>85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, no se observó una relación directa entre el pH y el gradiente térmico, ya que sus valores se encontraron distribuidos igualitariamente sin importar la temperatura de la muestra analizada.

Esto reafirma que los filotipos que habitan las pozas (representados en el patrón de bandeo del DGGE) pueden discriminarse según el gradiente térmico estudiado. Aunque los valores de soporte de los grupos de $50\text{-}75\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $70\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ es bajo (14%), existe una clara distinción con el grupo $>85\text{ }^{\circ}\text{C}$ (63% de soporte). Es decir, que los organismos están adaptados a vivir en temperaturas particulares y por ello su distribución en LH está determinada por la temperatura del agua de las pozas.

Sería recomendable hacer repeticiones del DGGE con las mismas muestras y muestras de pozas a la misma temperatura, para corroborar que una poza de alta temperatura (~80 °C) tenga más riqueza de bandas que pozas de menor temperatura. También es probable que la poza haya sido contaminada por la afluencia de fluidos superficiales, no-hidrotermales, derivados de escurrimientos que están en contacto con desechos animales y humanos. Igualmente, la composición de las comunidades microbianas puede estar influenciada por interacciones entre hábitats acuáticos y terrestres, siendo algunas especies bacterianas transportadas de un lugar a otro (Urakawa et al., 2000). Más estudios son necesarios para profundizar en la ecología microbiana de LH.

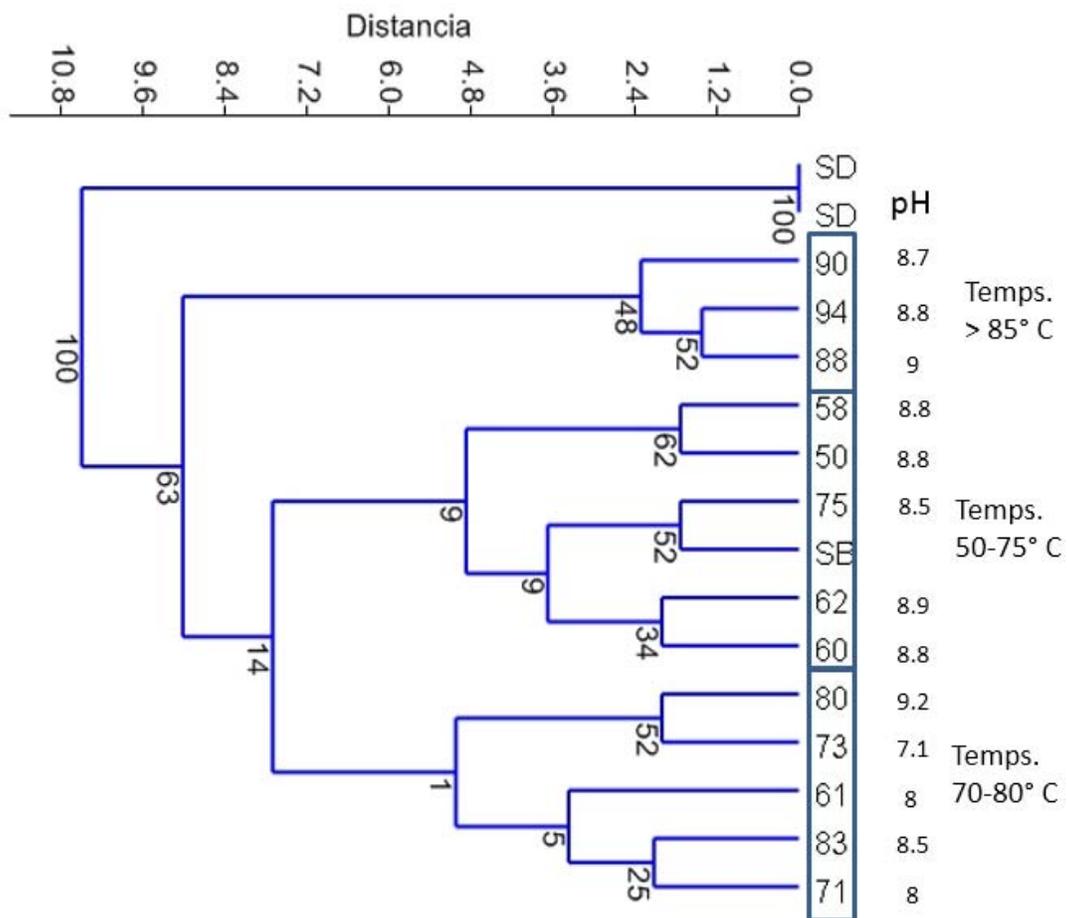


Figura 20. Dendrograma que muestra la similitud entre muestras de las pozas analizadas en el DGGE, con base en su patrón de bandeo. A mayor distancia, menor parecido. Los números en los nodos del dendrograma se obtuvieron con un bootstrap de 100 repeticiones. Tres conjuntos principales separan a las muestras por su temperatura (recuadros). El círculo rojo denota una muestra desigual a la mayoría de su conjunto.

Cabe mencionar que la composición de las comunidades bacterianas no ha podido ser determinada en este trabajo, ya que solo se lograron reamplificar 9 de las 78 bandas recortadas del gel del DGGE. Las nueve bandas fueron secuenciadas y comparadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). De los resultados obtenidos, se encontró que 8 secuencias presentan una homología del 99% con el género *Propionibacterium* y una con *Geitlerinema* sp., con un porcentaje de homología del 90%. Dado que se requiere a nivel genérico un porcentaje de similitud de al menos el 95%, no es posible conocer de manera certera el género de esta última.

Dados estos resultados, es probable que las muestras hayan sido contaminadas durante el proceso metodológico de reamplificación, ya que al menos 8 de las 9 secuencias presentan homología con una actinobacteria mesófila que normalmente afecta al humano. Por su parte *Geitlerinema* sp., es una cianobacteria que se ha encontrado habitando en sistemas hidrotermales (~40-55 °C), tanto en Rumania (Coman et al., 2013) como en Argelia (Amorouche-Yala et al., 2014). Sin embargo, no es posible realizar conclusiones precisas cuando no se cuenta con resultados concretos.

5.4. Consideraciones y limitaciones de la técnica PCR-DGGE

Las técnicas moleculares generan invaluable información acerca de la diversidad microbiana y la estructura de las comunidades en cualquier ambiente, tomando en cuenta las fracciones de microorganismos no cultivables. Aunque las limitaciones asociadas a la aplicación de métodos moleculares no han sido bien resueltas, estas parecen encontrarse menos limitadas que los métodos basados en cultivos.

Sin embargo, ninguna técnica molecular se encuentra exenta de limitaciones. Una de las principales limitantes del DGGE es que puede ser difícil conseguir geles con bandas bien resueltas, dependiendo de las características de los fragmentos de DNA amplificados o del gradiente desnaturante empleado. También puede conllevar problemas asociados con la reacción de PCR, como bajos rendimientos en muestras con baja biomasa y/o contaminadas con ácidos húmicos u otros compuestos que inhiben la PCR. Adicionalmente, la alta concentración de amplicones que resultan de la amplificación

(Suziki y Giovannoni, 1996), incrementan la diversidad de genes en los productos de PCR de muestras ambientales.

Existen muchas razones posibles por las cuales las poblaciones microbianas no pueden ser detectadas con precisión mediante DGGE. Se puede argumentar en este sentido que el número de bandas en el gel del DGGE puede ser una representación sobreestimada de la diversidad real presente en una muestra, debido a la formación de heteroduplex (Dahllöf et al., 2000) o quimeras durante la amplificación por PCR (Lindström, 1998), y también por heterogeneidad de copias diferentes y en el número de copias del gen 16S rRNA (Rappe et al., 1997). Aunque aparecen como una sola banda, esta puede incluir una pequeña cantidad de DNA heterogéneo. Esto significa que una sola banda del DGGE no siempre representa una única cepa bacteriana. El DGGE también puede ser una representación subestimada si se considera que algunos organismos están en los límites inferiores de detección de la técnica, por lo que consideramos que se estudia la comunidad dominante. De esta forma, las imágenes de DGGE capturan una mezcla de la diversidad real y de artefactos de una microheterogeneidad natural introducida por PCR y por la técnica misma (Sekiguchi, 2001; Burr et al 2006).

El análisis por PCR-DGGE de comunidades microbianas frecuentemente puede demostrar una pobre resolución al nivel de especie (von Wintzingerode et al., 1997). Una razón de una baja resolución tiene que ver con la secuencia de nucleótidos, y es la ocurrencia de fragmentos de 16S rRNA con múltiples dominios de desnaturalización (*Multiple melting domains*, MMD). Cuando un fragmento de DNA con dos o más dominios diferentes de desnaturalización es separado por electroforesis en un gel de DGGE, el fragmento se detendrá en la posición del gel donde la concentración de desnaturalizante disocia el dominio con menor punto de desnaturalización. Como la movilidad decrece, el fragmento no puede alcanzar la posición en el gel donde el segundo dominio de desnaturalización se separa (Kisand y Wikner, 2002). Este fenómeno solo ha complicado la interpretación de los patrones del DGGE derivados de las comunidades microbianas. Además, el límite del tamaño del fragmento del DNA es de alrededor de 500 pb, lo cual limita las inferencias filogenéticas que pueden requerir mayor información o el gen 16S rRNA completo con aproximadamente 1500 pb.

Adicionalmente a los problemas de amplificación de la PCR, algunas veces el DNA de una especie específica da como resultado dos bandas en lugar de una, o fragmentos de diferentes especies pueden tener la misma temperatura de desnaturalización y dar como resultado una banda en lugar de dos (Lindström, 1998). Aunque el análisis de las poblaciones basadas en los genes amplificados del 16S rRNA permite tener un punto de vista comprensible a cerca de la diversidad bacteriana, los resultados deben ser interpretados con cautela debido a las limitaciones propias del método.

5.5. Perspectivas futuras

Estudios posteriores son necesarios para conocer las variaciones en la diversidad y en la estructura de las comunidades microbianas en las fuentes hidrotermales en Los Hervideros de Apaséo con respecto a la estacionalidad, ya que se desconoce la dinámica de sus cambios en una escala temporal. En este estudio, se cuenta sólo con el análisis de una colecta, y por ello no se conocen las variaciones que pudieran ocurrir a lo largo del tiempo, influenciadas por el impacto antropogénico y otros fenómenos a considerarse como las sucesiones ecológicas y la propia evolución de las comunidades a través del intercambio genético.

Además, se requiere contar con registros de las variables ambientales, como por ejemplo salinidad, composición elemental del agua, etc; para determinar el grado de influencia que los parámetros ambientales tienen sobre la diversidad y la estructura de las comunidades bacterianas.

Aún falta estudiar los principios que rigen la estructura de las comunidades microbianas en Los Hervideros de Apaséo, la función que desempeña cada una de ellas y su evolución en el tiempo. Es decir, que no es suficiente conocer la diversidad del sitio en un momento determinado de la historia, sino ahondar en la relación que existe entre los diferentes organismos y los ciclos biogeoquímicos asociados a estos (reciclaje de nutrientes, fijación de metales, precipitación y disolución de minerales, liberación de iones al medio, etc.). A pesar de no conocer aún esos detalles, este trabajo resulta un punto de partida en el entendimiento de la composición y la dinámica de la microbiota residente en aguas termales en México

6. Conclusiones

1) La diversidad microbiana de los tapetes microbianos y biopelículas del campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo (LH) puede apreciarse visualmente en una primera aproximación por las variaciones de pigmentación formas de crecimiento de los mismos.

2) La diversidad de filotipos (número de bandas) cuantificada en este estudio por DGGE aumentó con la disminución de temperatura de las pozas, y disminuyó con el aumento de la temperatura.

3) La identificación mayoritaria de *Propionibacter sp.* en las bandas secuenciadas, sugiere una contaminación durante el proceso metodológico de reamplificación, la cual no refleja la diversidad microbiana en los tapetes de LH.

REFERENCIAS:

Aguirre-Díaz, G., McDoweel, F. 2000. Volcanic evolution of the Amealco caldera, central Mexico. *Geol Soc Am.* 334: 1-14.

Al-Najjar MA, de Beer D, Kühl M, Polerecky L. 2012. Light utilization efficiency in photosynthetic microbial mats. *Environ Microbiol.* 14: 982-992.

Alaniz-Álvarez, S., Nieto-Samaniego, A., Reyes-Zaragoza, M., Orozco- Esquivel, M., Ojeda-García, A., Vassallo, L. 2001. Estratigrafía y deformación extensional en la región San Miguel de Allende-Querétaro, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas.* 18: 129-148.

Albers, S., Konings, W., Driessen, A. 2006. Membranes of thermophiles and other extremophiles. *Method Microbiol.* 35: 161-171.

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

Amarouche-Yala, A., Benouadah, A., Ouahab, A., López-García., P. 2014. Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles.* 18: 1035-1047.

Anguita, F., Verma, S., García cacho, L., Milán, M., Samaniego, D. 1991. Mazahua, una nueva caldera en el Cinturón Volcánico Mexicano. *Geofis Int.* 30: 136-148.

Atlas, R.M. and Bartha, R. (1998) *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*, 4th edn, Benjamin/Cummings

Aragón, L. 2003. El flujo de energía térmica en México. Características de la industria eléctrica mexicana. El modelo británico en la industria eléctrica mexicana. Ed. Siglo XXI. 128.

Aravalli, R., She, Q., Garrett, R. 1998. Archaea and the new age of microorganisms. *Trends Ecol Evol.* 13: 190-194.

- Bae, H., Moe, W., Yan, J., Tiago, I., da Costa, M., Rainey, F. 2006. *Brooklawniacerciae* gen.nov.,sp.nov., a propionate-forming bacterium isolated from chlorosolvent-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56: 1977-1983.
- Baker, G., Smith, J., Cowan, D. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* 55: 541-555.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. 2001. Segunda edición. Garrity, G.M. y otros (eds.). Springer. 1.
- Bernard, R. 2008. Nuevos datos geoquímicos de yacimientos geotermales de alta temperatura del Cinturón Volcánico Mexicano: isótopos de helio, boro, nitrógeno y elementos traza. Tesis de maestría, UNAM. 5.
- Bing-Ru, L., Guo-Mei, J., Jian, C., Gang, W. 2006. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere.* 16: 18-24.
- Blankenship, R. 2002. Molecular mechanism of photosynthesis. Wiley on line book. Blackwell Science.
- Bonny, S. y Jones B., 2008. Controls on the precipitation of barite (BaSO₄) crystals in calcite travertine at Twitya Spring, a warm Sulphur spring in Canada's Northwest Territories: *Sediment Geol.* 203: 36-53.
- Brito, E., Villegas, N., Sotelo, I., Caretta, C., Goñi, M., Gassie, C., Hakil, F., Colin, Y., Duran, R., Gutiérrez, F., Piñón, H., Cuevas, G., Malm, O., Torres, J., Fahy, A., Reyna, G., Guyoneaud, R. 2014. Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers. *Extremophiles.* 18: 385-398.
- Brock, T., Freeze, H. 1969. *Thermus acuaticus* gen. nov. and sp. nov., a non sporulating extreme thermophile. *J Bacteriol.* 98: 289-297.
- Brock, T. 1978. Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures. Springer-Verlag, New York.

Burgess, E., Unrine, J., Mills, G., Romanek, C., Wiegel, J. 2012. Comparative geochemical and microbiological characterization of two thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka, Russia. *Microb. Ecol.* 63: 471-489.

Burr, M., Clark, S., Spear, C., Camper, A. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microb. Ecol.* 51: 479-486.

Cady y Farmer, 1996, Fossilization processes in siliceous thermal springs, Trends in preservation along thermal gradients. 150-173. In Gregory Bock and Jamie Goode (ed) Evolution of Hydrothermal Ecosystems on Earth.

Cady S, Farmer JD, Grotzinger JP, Schopf JW, Steele A. 2003. Morphological Biosignatures and the Search for Life on Mars. *Astrobiology.* 3: 351-368.

Camprubí, A., Prol-Ledesma, R.M., Tritlla, J., 1999, Comments on 'Metallogenic evolution of convergent margins: selected ore deposit models' by S.E. Kesler: *Ore Geol Rev.* 14: 71-76.

Camprubí, A., Albinson, T., 2007. Epithermal deposits in México—an update of current knowledge, and an empirical reclassification. *Geol Soc Am.* 422: 377-415.

Canet, C., y Prol-Ledesma, R. 2005. Procesos de mineralización en manantiales hidrotermales submarinos someros. Ejemplos en México. *Bol Soc Geol Mex.* 1: 83-102.

Capra, L., Bernal, J., Carrasco-Núñez, G., Roverato, M. 2013. Climatic fluctuations as a significant contributing factor for volcanic collapses. Evidence from Mexico during the Late Pleistocene. *Glob Planet Change.* 100: 194-203.

Case, R., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W., Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 278-288.

Castenholz, R. W. 1971. Low temperature acclimation and survival in thermophilic *Oscillatoria terebriformis*. In: T. V. Desikachary (ed.), Proc. 1st Internat.Symp. on Taxonomy and Biology of Blue-green algae.

Clark, K., Fitch, D. 2009. Evolución de los depósitos metálicos en el tiempo y el espacio en México. In: Clark KF, Salas-Pizá GA, Cubillas-Estrada R (eds) Geología Económica de México, 2nd ed. Asoc de Ing de Minas, Metalurgistas y Geólogos de México. *Serv Geol Mex*, 62–133.

Cleary, D., Smalla, K., Mendonca-Hagler, L., Gomes, N. 2012. Assessment of Variation in Bacterial Composition among Microhabitats in a Mangrove Environment Using DGGE Fingerprints and Barcoded Pyrosequencing. *PLoS One*. 71: 1-8.

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

Comisión Federal de Electricidad. 1980. Tomo I. Geología general, geohidrología, yacimientos carboníferos y geofísica. Memoria de la III Reunión Nacional de Geotecnia y Geotermia.

Dahllöf, I., Baillie, H., Kjelleberg, S. 2000. *Rpo B*- based microbial community analysis avoids limitations inherent in the 16S rRNA gene intraspecific heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3376-3380.

Denniston C, 1974. An extension of the probability approach to genetic relationships: One locus. *Theor Popul Biol.* 6: 58-75.

Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, J. 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.* 39: 2207-2218.

Eguiarte, L., Souza, V., Aguirre, X. (Eds.) 2007. Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México DF.

Eguiarte L., Souza V. 2007. Introducción a la Ecología Molecular. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X (Eds.) Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México DF. 1-6.

Escalante, A. 2007. Capítulo 12. Ecología molecular en el estudio de comunidades Bacterianas. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X (Eds.) Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México DF. 393-424.

Estradas, A., Prol-Ledesma, R., Zamudio-Resendiz, M. 2009. Relación de las características geoquímicas de fluidos hidrotermales con la abundancia y riqueza de especies del fitoplancton de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Bol Soc Geol Mex.* 61: 87-96.

Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods.* 56: 297-314.

Farmer, J., Des Marais, D. 1999. Exploring for a record of ancient Martian life. *J. Geophys Res.* 104: 26977–26995.

Fernandez, J., Garcia, M., Gimeno, D., Saavedra, J., Martínez, S. 2005. The hot spring and geyser sinters of El Tatio, Northern Chile. *Sediment Geol.* 180: 125-147.

Ferris, M., Muyzer, G., Ward, D. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a host spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 340-346.

Fink, K., Grant, W. 1998. Where are the limits of life? Extremophiles: microbial life in extreme environments. 322.

Fouke B., Farmer J., Des Marais D., Pratt L, Sturchio N., Burns P., Discipulo, M. (2000) Depositional facies and aqueous-solid geochemistry of travertine-depositing hot springs (Angel Terrace, Mammoth Hot Springs, Yellowstone National Park, USA). *J Sediment Res.* 70: 265–285.

Franks J, Stolz JF. 2009. Flat laminated microbial mat communities. *Earth-Sci Rev.* 96: 163–172.

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P. 2002. Statistical analysis of

denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol.* 4: 634-643.

Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *J Biosci Bioeng.* 94: 518-525.

Gargaud, M., Amils, R., Cernicharo, J., James H., II, C., Irvine, W., Pintini, D., Viso, M. 2011. Encyclopedia of Astrobiology. Springer Heidelberg Dordrecht London New York.

Goin, J., Cady, S. 2009. Biosedimentological processes that produce hot spring sinter biofabrics: Examples from the Uzon Caldera, Kamchatka, Russia. *From Fossils to Astrobiology.* 159-179.

Grogan, D. 2013. Extreme thermophiles. eLS. John Wiley y sons, Ltd. 1-9.

Guidry, S., Chafetz, H. 2003. Anatomy of siliceous hot springs: examples from Yellowstone National Park, Wyoming, USA. *Sediment Geol.* 157: 71-106.

Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica.* 4: 9.

Harrison, J., Turner, R., Ceri, H. 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 7: 981-994.

Heasler, H., Jaworowski, C., Foley D. 2009. Geothermal systems and monitoring hydrothermal features. *The Geological Society of America.* 105-140.

Hiriart, G. 2011. Evaluación de la energía geotérmica en México. Informe para el banco Interamericano de Desarrollo y la Comisión Reguladora de Energía. 9.

Hou W, Wang S, Dong H, Jiang H, Briggs B., Peacock J. 2013. A Comprehensive Census of Microbial Diversity in Hot Springs of Tengchong, Yunnan Province China Using 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *PLoS ONE.* 8: e53350.

Huang, Q., Jiang, H., Briggs, B., Wang, S., Hou, W., Li, G., Wu, G., Solis, R., Arcilla, C., Abrajano, T., Dong, H. 2013. Archaeal and bacterial diversity in acidic to circumneutral hot springs in the Philippines. *FEMS Microbiol Ecol.* 85: 452- 464.

Huber, R., Lanworthy, T., Koning, H., Thomm, M., Woese, C., Sleytr, K., Stetter, K. 1986. *Thermotoga maritime* sp. nov., represent a new genus of unique extremely thermophilic Eubacteria growing up to 90°C. *Appl Environ Microb.* 144: 324-332.

Huber, R., Rossnagel, P., Woese, C., Rachel, R., Langworthy, T., Stetter, K. 1996. Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov., sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 19: 40-49.

Huse, S., Dethlefsen, L., Huber, J., Mark Welch, D., Relman, D., Sogin, M. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet.* 4: e100025.

Huys, G., D'Haene, K., Danielsen, M., Mättö, J., Egervärn, M., VanDamme, P. 2008. Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in *Lactobacillus paracasei* strains of food origin. *J Food Protect.* 71: 339-344.

Jannasch, H., Huber, R., Belkin, S., Stetter, K. 1988. *Thermotoga neapolitana* sp. nov. of the extremely thermophilic, eubacterial genus *Thermotoga*. *Arch Microbiol.* 150: 103-104.

Jones, B., Renaut, R., Rosen, M., 1998, Microbial biofacies in hot-spring sinters: a model based on Ohaaki Pool, North Island, New Zealand. *J Sediment Res.* 68: 413-434.

Jones B, Renaut R. 2006. Growth of siliceous spicules in acidic hot springs, Waiotapu geothermal area, North Island, New Zealand. *Palaios.* 21: 406-423.

Kawasumi, T., Iguarashi, Y., Kodama, T., Minoda, Y. 1984. *Hydrogenobacter thermophiles* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 34: 5-10.

- Kashefi K, Lovley, D. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science*. 301. 934.
- Kisand, V., Wikner, J. (2003) Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J Microbiol Methods*. 54: 183-191.
- Klatt, C., Wood, J., Rusch, D., Bateson, M., Hamamura, N., Heidelberg, J., Grossman, A., Bhaya, D., Cohan, F., Köhl, M., Bryant, D., Ward, D. 2011. Community ecology of hot spring cyanobacterial mats: predominant populations and their functional potential. *ISME J*. 5: 1262-1278.
- Kogut, M. 1980. Are there strategies of microbial adaptation to extreme environments? *TIBS*. 15-18.
- Konhauser K., Ferris F. 1996. Diversity of iron and silica precipitation by microbial mats in hydrothermal waters, Iceland: Implications for Precambrian iron formations. *Geology*. 24: 323–326.
- Konhauser K., Fisher Q., Fyfe W., Longstaffe F., Powell M. 1998. Authigenic mineralization and detrital clay binding by freshwater biofilms: The Brahmani river, India, *Geomicrobiol J*. 15: 209-222.
- Konhauser, K., Jones, B., Reysenbach, A., Renault, W. 2003. Hot spring sinters: keys to understanding Earth's earliest life forms. *Can. J. Earth Sci*. 40: 1713-1724.
- Konhauser, K., Phoenix, V., Bottrell, S., Adams, D., Head, I. 2001. Microbial-silica interactions in Iceland hot spring sinter: possible analogues for some Precambrian siliceous stromatolites. *Sedimentology*. 48: 415-433.
- Konhauser, K. 2007. Introduction to geomicrobiology. *Blackwell Science Ltd*. 236-254.
- Kryokov, V., Savelyeva, N., Pushueva, M. 1983. *Calderobacterium hydrogenophilum* nov. gen., nov. sp., an extreme thermophilic bacterium and its hydrogenase activity. *Mikrobiologiya*. 52: 781-788.

Kyle, J., Schroeder, P., Wiegel, J. 2007. Microbial silification on sinters from two terrestrial hot springs in the Uzon Caldera, Kamchatka, Russia. *Geomicrobiol J.* 24: 627-641.

Larsen, L., Nielsen, P., Ahring, B. 1997. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch Microbiol.* 168: 114-119.

Lee, Y., Jain, M., Lee, C., Lowe, S., Zeikus, J. 1993. Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification *Thermoanaerobium Brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter Brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Int J Syst Bacteriol.* 43: 41-51.

Lee, D., Lee, S. 2008. *Tessaracoccus flavescens* sp. nov. isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 785-789.

Lieph, R., Veloso, F., Holmes, D. 2006. Thermophiles like hot T. *Trends Microbiol.* 14: 423-426.

Lindström, E. 1998. Bacterioplankton community in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol Ecol.* 27: 163-174.

Ljundahl, L. 1979. Physiology of thermophilic bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 19: 149-243.

López, O., Cerdán, M., González, M. 2013. Hot spring metagenomics. *Life.* 2: 308-320.

López-Sandoval, O. 2006. Efecto del gradiente de temperatura en la distribución de las algas en un manantial termal en la región central de México. Facultad de Ciencias, UNAM.

Macías, J. 2005. Geología e historia eruptiva de algunos de los grandes volcanes activos de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana.* 57: 379-424.

Madigan, M., Mairs, B. 1997. Extremophiles. *Sci Am.* 82-87.

Madigan, M., Oren, A. 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr opin Microbiol.* 2: 265-269.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. 2012. *Brock Biology of microorganisms.* Ed. Pearson.13.

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

Meadow J., Zabinski C. 2012. Spatial heterogeneity of eukaryotic microbial communities in an unstudied geothermal diatomaceous biological soil crust: Yellowstone National Park, WY, USA. *FEMS Microbiol Ecol.* 82: 182-191.

Méhay S, Früh-Green G., Lang S., Bernasconi S., Brazelton W., Schrenk M., Schaeffer P., Adam P. 2013. Record of archaeal activity at the serpentinite-hosted Lost City Hydrothermal Field. *Geobiology.* 11: 570-592.

Mehta, D., Satyanarayana, T. 2013. Diversity of hot environments and thermophilic microbes. Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: *Biotechnology of thermophiles.* 3-60.

Milán, M., Yáñez, C., Navarro, I., Verma, S., Carrasco-Núñez, G. 1992. Geología y geoquímica de elementos mayores de la Caldera de Huicahapan, Hidalgo, México. *Geofis Int.* 32: 261-276.

Miller, S., Strong, A., Jones, K., Ungerer, M. 2009. Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4565-4572.

Molecular Microbial Ecology Manual, 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Muhling M, Woolven-Allen J, Murrell J., Joint, I. 2008 Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* 2: 379-392.

Muyzer, G., De Waal, E., Uitterlinden, A. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb.* 1: 695-700.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C., Jannasch, H. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol.* 164: 165–172.

Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73: 127-141.

Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr opin microbiol.* 2: 317-322.

Nakagawa T, Fukui M. 2003. Molecular Characterization of Community Structures and Sulfur Metabolism within Microbial Streamers in Japanese Hot Springs. *Appl Environ Microbiol.* 69: 7044–7057.

Nakutsa, C. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci Soc Am J.* 71: 562-571.

Nielsen, P., Mathrani, I., Ahring, B. 1993. *Thermoanaerobium acetigenum* spec. nov., a new anaerobic, extremely thermophilic, xylanolytic non-spore forming bacterium isolated from an Icelandic hot spring. *Appl Environ Microb.* 159: 460-464.

Odintsova., E., Jannasch, H., Mamone, J., Lanworthy, T. 1996. *Thermothrix azorensis* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing, thermophilic bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 46: 422-428.

- O'Toole, G., Kaplan, H., Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54: 49-79.
- Pantoja, J., Gómez, J. 2004. Los sistemas hidrotermales y el origen de la vida. *Ciencias.* 75: 14-22.
- Patel, B., Monk, C., Littleworth, H., Morgan, H., Daniel, R. 1987. *Clostridium fervidus* sp. nov., a new chemoorganotrophic acetogenic thermophile. *Int J Syst Bacteriol.* 37: 123-126.
- Pater, B., Morgan, H., Daniel, R. 1985. *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldactive, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol.* 141: 63-69.
- Pepe-Ranney, C., Berelson, W., Corsetti, F., Treants, M., Spear, J. 2012. Cyanobacterial construction of hot spring siliceous stromatolites in Yellowstone National Park. *Environ Microbiol.* 14: 1182-1197.
- Pentecost, A. 2005. Travertine. Springer, Netherlands.
- Phillips-Lander, C., Fowle, D., Taunton, A., Hernandez, W., Mora, M., Moore, D., Shinogle, H., Roberts, J. 2014. Silicate Dissolution in Las Pailas Thermal Field: Implications for Microbial Weathering in Acidic Volcanic Hydrothermal Spring Systems. *Geomicrobiol J.* 31: 23-41.
- Pierson, B., Giovannoni, S., Stahl, D., Castenholz, R. 1985. *Heliothrix oregonensis*, gen. nov., sp. nov., a phototrophic filamentous gliding bacterium containing bacteriochlorophyll *a*. *Arch Microbiol.* 142: 164-167.
- Pierson, B., Castenholz, R. 1974. A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus*, gen. and sp. nov. *Arch Microbiol.* 100: 5-24.
- Pirajno, F. 2010. Hydrothermal processes and mineral systems. *Springer Netherlands.* Perth, Australia.

- Portillo, M., Sririn, V., Kanoksilapatham, González, J. 2009. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles*. 13: 321-331.
- Preston, L., Benedix, G., Genge, M., Sephton, M. 2008. A multidisciplinary study of silica sinter deposits with applications to silica identification and detection of fossil life on Mars. *Icarus*. 198. 331–350.
- Prol, R. 2002. Las manifestaciones termales en la superficie de la Tierra. En: Prol, R. El calor de la Tierra. Quinta ed. México, D.F. Fondo de cultura económica. 15.
- Purcell, D., Sompong, U., Yim, L., Barraclough, T., Peerapornpisal, Y., Pointing, S. 2007. The effects of temperature, pH and sulphide on the community structure of hyperthermophilic streamers in hot springs of northern Thailand. *FEMS Microbiol Ecol*. 60: 456-466.
- Rainey, F., Donnison, A., Janssen, P., Saul, D., Rodrigo, A., Bergquist, P., Daniel, R., Stackebrandt, E., Morgan, H. 1994. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiol Lett*. 120: 263-266.
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P. 2011. Microbial phylogeny and diversity. Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbial Res*. 166. 99-110.
- Rappe, M., Kemp, P., Giovannoni, S. 1997. Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol Oceanogr*. 42: 811-826.
- Reysenbach, A., Voytek, M., Mancinelli, R. (eds). 2001. Thermophiles: Biodiversity, Ecology, and Evolution. Kluwer Academic Press/Plenum, New York.
- Reysenbach, A., Götz, D y Yernool, D. 2002. Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs. *Biodiversity of microbial life*. Wiley-Liss, New York. 348.
- Rimstidt, J., Cole, D. 1983. Geothermal mineralization I: the mechanism of formation of the Beowawe, Nevada, siliceous sinter deposit. *Am J Sci*. 283: 861-875.

Roeselers, G., Norris, T., Castenholz, R., Rysgaard, S., Glud, R., Kühl, M., Muyzer, G. 2007. Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). *Environ Microbiol.* 9: 26-38.

Rosas-Elguera, J., Ferrari, L., López-Martínez, M., Urrutia-Fucuguachi, J. 1997. Stratigraphy and tectonics of the Guadalajara region and triple-junction area, western Mexico. *Int Geol Rev.* 39: 125-140.

Ross, K., Feazel, L., Robertson, C., Fathepure, B., Wright, K., Turk-MacLeod, R., Chan, M., Held, N., Spear, J., Pace, N. 2012. Phototrophic phylotypes dominate mesothermal microbial mats associated with Hot Springs in Yellowstone National Park. *Microb Ecol.* 64: 162-170.

Rothrock, M., Garcia-Pichel, F. 2005. Microbial diversity of benthic mats along a tidal desiccation gradient. *Environ Microbiol.* 7: 593–601.

Rothschild L., Mancinelli, R. 2001: Life in extreme environments. *Nature.* 409: 1092-1101.

Russell, M., Nitschke, W., Branscomb, E. 2013. The inevitable journey to being. *Phil Trans R Soc B.* 368: 20120254.

Sahm, K., John, P., Nacke, H., Wemheuer, B., Grote, R., Daniel R., Antranikian, G. 2013. High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods. *Extremophiles.* 17: 649-662.

Saidova, R., 1963. Algae of several natural and artificial hot springs of central Asia. *Uzbeksk Biol Zhur.* 5-11.

Saiki, T., Kobayashi, Y., Kawagoe, K., Beppu, T. 1985. *Dictyoglomus thermophiles* gen. nov., sp. nov., a chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 35: 253-259.

Saiki, R. Gelfand, D. Stoffel, S. Scharf, S. Higuchi, R. Horn, G. Mullis, K. Erlich, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487–491

- Santoyo-Gutiérrez, E., Torres-Alvarado, I. 2010. Escenario futuro de explotación de la energía geotérmica: Hacia un desarrollo sustentable. *Revista Digital Universitaria*. 11: 19.
- Schäfer, H., and G. Muyzer. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods Microbiol.* 30: 425-468.
- Schneider, C., Rasband, W., Eliceiri, K. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 9: 671-675.
- Seckbach, J., Oren, A. (2007) Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. En: Seckbach J (ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, Dordrecht. 4-25.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., Uchiyama, H. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol Lett.* 23: 1205-1208.
- Severin, I., Stal, L. 2010. Diazotrophic microbial mats. En *Microbial mats. Modern and ancient microorganisms in stratified systems*. Springer Science. 323-324.
- Shima, S., Suzuki, K. 1993. *Hydrogenobacter acidiphilus* sp. nov., a thermoacidiphilic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium requiring elemental sulfur for growth. *Int J Syst Bacteriol.* 43: 703-708.
- Singleton, Jr. R., Amelunxen, R. 1973. Proteins from thermophilic microorganisms. *Bacteriol Rev.* 37: 320-342.
- Slobodkin, A., Tourova, T., Kuznetsov, B., Kostrikina, N., Chernyh, N., Bonch-Osmolovskaya, E. 1991. *Thermoanaerobacter sederophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe (III)- reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 1471-1478.
- Slobodkin, A., Reysenbach, A., Strutz, N., Dreier, M., Wiegel, J. 1997b. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe (III)- reducing bacterium from a continental hot spring. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 541-547.

Smol, J., Stoermer, E. (Eds). 2010. The Diatoms. Applications for the Environmental and Earth Sciences. *Cambridge University Press, Cambridge*.

Sompong, U., Hawkins, P., Besley, C., Peerapornpisal, Y. 2005. The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 365-376.

Squyres, R., Arvidson, E., Ruff, S., Gellert, R., Morris, R., Wing, D., Crumpler, L., Farmer, J., Des Marais, D., Yen, A., McLennan, S., Calvin, W., Bell, III., Clark, B., Wang, A., McCoy, M., Schmidt, E., de Souza Jr, P. 2008. Detection of silica-rich deposits on Mars. *Science*. 320: 1063-1067.

Staley, J., Reysenbach, A. 2002. Biodiversity of microbial life: foundation of Earth's biosphere. *New York, Wiley*.

Stetter, K. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *Curr opin microbiol.* 2: 265-269.

Streit, W., Chmitz, R. 2004. Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol.* 7: 492-498.

Svetlichny, V., Sokolova, T., Gerhardt, M., Ringpfeil, M., Kostrikina, N., Zavarzin, G. 1991. *Carboxidothermus hydrogenoformans* gen. Nov., sp. Nov., a CO-utilizing thermophilic anaerobic bacterium from hydrothermal environments of Kunashir Island. *Syst Appl Microbiol.* 14: 254-260.

Suárez, M. 2006. Modelado del flujo de masa y energía en chimeneas submarinas usando el método de elementos finitos. *Geotermia.* 19: 23-31.

Suzuki, M., Giovannoni, S. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ Microbiol.* 62: 625-630.

Tamura, T., Takeuchi, M., Yokota, A. 1994. *Luteococcus japonicas* gen.nov.,sp. nov., a New Gram-Positive Coccus with LL-Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 348-356.

Tiodijo, R., Sakatoku, A. Nakamura, A., Tanaka, D., Fantong, W., Tchakam, K., Tanyileke, G., Ohba, T., Hell, V., Kusakabe, M., Nakamura, S., Ueda, A. 2014. Bacterial and archaeal communities in Lake Nyos (Cameroon, Central Africa). *Sci Rep.* 4: 1-10.

Torres-Sanchez, R., Magaña-Vazquez, A., Sanchez-Yañez, J., Martinez-Gomez, L. 1996. High temperature microbial corrosion in the condenser of a geothermal electric power unit. CORROSION96. *The NACE Int Ann Conf Exp.* 293: 1-14.

Urakawa, H., Yoshida, T., Nishimura, M., Ohwada, K. 2000. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rRNA-based approaches and quinone profiling. *Environ Microbiol.* 2: 542-554.

Vallaeyts, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A., Soulas, G. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24: 279–285.

van Hannen, E., Zwart, G., van Agterveld, M., Gons, H., Ebert, J., Laanbroek, H. 1999 Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl Environ Microbiol.* 65: 795–801.

Vásquez, C., González, B., Vicuña, R. 1984. Plasmids from thermophilic bacteria. *Comp. Biochem. Physiol.* 78: 507-514.

Verma, S. Carrasco-Núñez, G., Milán, M. 1991. Geology and geochemistry of Amealco Caldera, Qro., Mexico. *J Volcanol Geoth Res.* 47: 105-127.

Verma, S., Navarro, I., García, L. 1992. Major-element geochemistry and mineralogy of the Huichapan Caldera, Hidalgo, Mexico. *J South Am Earth Sci.* 5. (3/4): 327-336.

Villareal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., Mendoza, H., Ospina, M., y Umaña, A. 2004. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de

biodiversidad. Programa de inventarios de biodiversidad. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 236.

Von Wintzingerode, F., Göbel, U., Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 21: 213-229.

Walker, J., Spear, J., Pace, N. 2005. Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment. *Nature.* 434: 1011-1014.

Ward, D., Weller, R., Bateson, M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* 345: 63-65.

Ward, D., Ferris, M., Nold, S., Bateson, M. 1998. A natural view of microbial biodiversity hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 1353-1370.

Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., Lane, D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173: 697-703.

Westall, F., de Vries, S., Nijman, W., Rouchon, V., Orberger, B., Pearson, V., Watson, J., Verchovsky, A., Wright, I., Rouzaud, J., Marchesini, D., Severine, A. 2006. The 3.466 Ga "Kitty's Gap Chert, an early Archaean microbial ecosystem. *Geol Soc Am.* 405: 105-131.

Wet, C., Davis, K. 2010. Preservation potential of microorganism morphologies in tufas, sinters, and travertines through geologic time. *Paleobiodivers Palaeoenviron.* 90: 139-152.

Wiegel, J., Ljungdahl, L. 1981. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., espec. nov., a new extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol.* 128: 343-348.

Woese, C., Fox, G. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5088-5090.

Xu, S., Nieto, F., Alaniza, S., Cerca, L. 2011. Structural analysis of a relay ramp in the Querétaro graben, central Mexico: Implications for relay ramp development. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas.* 28: 275-289.

Yang T, Lyons S, Aguilar C, Cuhel R, Teske A. 2011. Microbial communities and chemosynthesis in Yellowstone lake sublacustrine hydrothermal vent waters. *Front Microbiol.* 2: 1-17.

Zeikus, J., Hegge, P., Anderson, M. 1979. *Thermoanaerobium brockii* gen. nov., sp. nov., a new chemoorganotrophic caldophilic anaerobic bacterium. *Arch Microbiol.* 122: 41-48.

APÉNDICES

APÉNDICE I

Coordenadas geográficas, temperatura y pH de los sitios de colecta en Los Hervideros de Apaseo.

	Temp. (°C)	pH	Longitud	Latitud
1	35	8.5	-100.55026	20.53858
2	37	8.5	-100.55026	20.53858
3	38	8.8	-100.55027	20.53935
4	39	8.8	-100.55027	20.53935
5	40	7.5	-100.54456	20.53636
6	42	8.8	-100.55027	20.53935
7	43	5.7	-100.55027	20.53791
8	44	7.5	-100.54852	20.53546
9	44	8.5	-100.55026	20.53858
10	46	8.1	-100.54651	20.53551
11	46	8.8	-100.55027	20.53935
12	47	8.3	-100.54994	20.53991
13	47	6.5	-100.54772	20.53533
14	47	8.8	-100.55027	20.53935
15	48	7.5	-100.54984	20.53840
16	49	8.8	-100.55027	20.53935
17	50	8.8	-100.54993	20.53946
18	50	8.8	-100.55027	20.53935
19	51	8.5	-100.55006	20.53847
20	52	8.3	-100.54957	20.53865
21	55	8.8	-100.55027	20.53935
22	55	7.0	-100.54847	20.53533
23	56	7.1	-100.54632	20.53551
24	57	7.1	-100.54996	20.53852
25	57	8.3	-100.54957	20.53865
26	57	8.0	-100.54993	20.53837
27	58	8.8	-100.54993	20.53946
28	59	8.8	-100.54993	20.53946
29	60	8.3	-100.54999	20.53853
30	61	8.0	-100.54882	20.53413
31	61	8.3	-100.54957	20.53865

32	62	8.9	-100.55019	20.53903
33	63	8.8	-100.54993	20.53946
34	65	8.7	-100.54608	20.53556
35	65	8.0	-100.55062	20.53773
36	70	7.2	-100.54772	20.53533
37	70	8.1	-100.54547	20.53663
38	70	8.3	-100.54957	20.53865
39	71	8.0	-100.54993	20.53837
40	72	7.7	-100.54534	20.53662
41	73	7.1	-100.54852	20.53546
42	75	8.5	-100.55026	20.53858
43	78	8.1	-100.54547	20.53663
44	80	9.2	-100.54909	20.53398
45	80	8.1	-100.54635	20.53741
46	82	8.7	-100.54948	20.53993
47	83	8.5	-100.55026	20.53858
48	88	9.0	-100.54909	20.53398
49	90	8.7	-100.54922	20.53392
50	94	8.8	-100.54993	20.53946

APÉNDICE II

Concentraciones de DNA extraído de las muestras del campo hidrotermal Los Hervideros de Apaseo utilizadas para el DGGE

Temperatura de la poza (°C)	Concentración (ng/ul)	Absorbancia (nm) 260/280	Absorbancia (nm) 260/230	pH
50	14.9	1.9	0.7	8.8
58	10.2	2	0.4	8.8
60	9.9	2.1	0.6	8.8
61	5.6	2.4	0.3	8
62	7.1	2	0.5	8.9
71	10.5	2	0.5	8
73	6.3	2.4	0.2	7.1
75	7.7	1.8	0.5	8.5
80	9.3	2.2	0.6	9.2
83	5	2.7	0.2	8.5
88	6.3	2.4	0.4	9
90	5.6	1.9	0.4	8.7
94	5.9	2.1	0.5	8.8
SB	8.1	1.9	0.3	8.7

APÉNDICE III

Matriz de presencia-ausencia de bandas, según el patrón de bandeo del DGGE. Las muestras están ordenadas por temperatura (°C); SD = estándar, SB = subaéreo. Los valores (0 = negro, 255 = blanco) corresponden a la intensidad relativa de los pixeles de cada banda (mayor valor, mayor intensidad), comprendidos dentro de una Región de Interés (ROI) y calculados con el software ImageJ (ver metodología). Los valores en cero denotan ausencia de bandas. NOTA: la cuantificación de bandas y su intensidad se realizó sobre una imagen en positivo del DGGE, donde las bandas más intensas fluorescen con la luz UV tras la tinción y el revelado.

SD	94	90	88	83	80	75	73	71	62	61	60	58	50	SB	SD
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	101
0	0	0	0	109	109	0	128	110	111	107	112	112	0	67	0
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94
0	0	0	0	122	107	109	132	149	114	112	117	115	100	77	0
0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82	0
93	0	130	103	0	116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	112	0
0	0	0	0	0	143	148	136	156	134	118	117	123	101	99	0
0	0	0	0	0	143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	145	157	0	0	137	0	129	132	104	95	0
0	0	0	0	127	0	0	142	142	0	126	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	146	0	144	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	147	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	151	0	0	0
0	0	0	0	0	141	0	147	0	0	0	137	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	163	0	146	0	134	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	120
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	119	0	0
0	0	117	0	0	0	0	0	0	0	138	0	144	0	0	0
0	0	0	0	0	118	0	0	0	143	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	155	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	161	0	0	0	0	0	0	83	0
0	0	112	0	0	0	0	0	157	143	0	141	140	132	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	141	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	140	145	0	0	0
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	114
0	0	0	0	0	124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	132	0	152	0	0	0	0	159	150	0	0
0	0	0	0	0	146	0	0	0	0	0	0	162	157	0	0

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
112	0	124	0	0	153	0	0	158	0	0	156	179	170	112	112
0	0	0	0	0	154	0	0	0	196	0	167	190	151	0	0
106	0	0	0	0	154	0	161	193	0	148	212	204	160	0	106
0	0	0	0	0	153	157	170	201	199	159	238	244	167	92	0
0	128	0	122	134	0	232	0	208	0	0	0	249	175	101	0
92	0	0	0	0	0	236	0	0	0	244	230	230	243	110	92
0	138	0	0	210	0	235	209	225	192	241	0	223	249	114	0
79	0	0	0	214	163	241	200	223	179	213	226	198	209	102	79
104	155	0	0	217	159	236	0	0	0	190	208	0	185	0	104
0	0	0	0	217	0	0	0	0	157	0	0	0	0	0	0
139	146	0	0	197	0	233	0	0	0	0	169	0	0	0	139
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	139
123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	123
124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	124
92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92
121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	121
