



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO FILOGENÉTICO
DE BACTERIAS AISLADAS DE
LAGOS DE CRÁTERES VOLCÁNICOS

Tesis que para obtener el título de
BIÓLOGO

PRESENTA:
Julio César Valerdi Negreros

TUTORA:
Dra. Elcia Margareth Souza Brito



Mayo 2015

Índice

	xi
RESUMEN	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Origen y evolución de la Tierra	1
1.2 Origen y evolución de la vida en la Tierra	6
1.3 El CVTM y Valle de Santiago	8
1.3.1 Las Siete Luminarias y La Joya	11
1.4 Organismos extremófilos	14
1.4.1 Ambientes Extremos	17
1.5 Astrobiología	19
1.5.1 Europa	19
1.5.2 Titán	20
1.5.3 Encelado	20
1.5.4 Exoplanetas	21
1.5.5 Búsqueda de vida fuera del Sistema Solar	21
1.5.6 Bioseñales	21
1.5.7 Sitio halo-alcalófilo	22
1.6 El enfoque Astrobiológico	24
2 JUSTIFICACIÓN	27
3 HIPÓTESIS	29
4 OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GENERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5 MATERIAL Y MÉTODOS	33
5.1 Muestreo	33
5.2 Caracterización físico-química	33
5.2.1 Determinación de metales	35
5.2.2 Determinación de Mercurio	35

5.2.3	Determinación de exopolisacaridos (EPS)	35
5.3	Aislamiento de los microorganismos	36
5.3.1	Medios de cultivo	36
5.4	Caracterización microbiológica de los aislados	44
5.4.1	Morfología de colonias	44
5.4.2	Morfología de células	44
5.4.3	Fisiología de los microorganismos	44
5.5	Caracterización molecular de los aislados	46
5.5.1	Extracción de ADN	46
5.5.2	Electroforesis	48
5.5.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	49
5.6	Análisis filogenético	51
5.6.1	Eliminación de quimeras	51
5.6.2	BioEdit	51
5.6.3	BLAST	52
5.6.4	Mafft	52
5.6.5	MEGA5	53
6	RESULTADOS	55
6.1	Caracterización del sitio	55
6.2	Aislamiento y filogenia de bacterias	57
7	DISCUSIÓN	63
7.1	Caracterización del sitio	63
7.2	Aislamiento y filogenia de bacterias	65
7.3	Un enfoque Astrobiológico	71
8	CONCLUSIONES	73
9	PERSPECTIVAS	75
	Anexo 1 - Referencia IAEA-436	77
	Anexo 2 - Medio BSR	79
	Anexo 3 - Medio para bacterias litotróficas	81
	Anexo 4 - Electroforesis, TAE y TBE	83
	Anexo 5 - Extracción de ADN genómico	85
	Anexo 6 - Protocolo para la PCR	87
	Anexo 7 - Purificación de productos de PCR	89

<i>ÍNDICE</i>	v
Anexo 8 - Marcador de Peso Molecular (MPM)	91
ABREVIATURAS	93
BIBLIOGRAFÍA	95

Lista de Tablas

1.1	Clasificación de organismos extremófilos	18
5.1	Oligonucleótidos utilizados durante el presente trabajo.	51
6.1	Caracterización físico-química del sitio.	55
6.2	Concetración de metales pesados	56
6.3	Aislados obtenidos	58
9.1	Recommended values: Matrix and Minor Constituents	77
9.2	Recommended values: Trace Elements	78

Lista de Figuras

1.1	Capas de la Tierra	2
1.2	Placas tectónicas	4
1.3	Teoría de los supercontinentes	4
1.4	Experimento de Miller y Urey	7
1.5	Placas tectónicas en México	9
1.6	Cinturón Volcánico Transmexicano	10
1.7	Volcanes de México	10
1.8	Zonas geotérmicas en México	11
1.9	Mapa de sitios de muestreo	12
1.10	Sequia de Parangueo	14
1.11	Estromatolitos de Parangueo	15
1.12	Espectro de planetas	22
1.13	Sales Parangueo	23
1.14	Objetos celestes con interés Astrobiológico	24
1.15	Parámetros considerados en estudios de la EANA	25
5.1	Fotografías de los tres sitios de muestreos	34
5.2	Muestra colectada	34
5.3	Técnica de <i>roll tube</i>	38
5.4	Tubos Hungate [®] , tapones de butil y lacres de aluminio	38
5.5	Desgasificación de tubo Hungate [®]	39
5.6	Enfriamiento de tubo Hungate [®]	40
5.7	Bolsa de anaerobiosis	40
5.8	Material preparado en bolsa de anaerobiosis	42
5.9	Transferencia de colonia recuperada del <i>roll tube</i>	43
5.10	Formación de masa visible de ADN	47
6.1	Tapetes microbianos del cráter de Parangueo.	57
6.2	Morfología de una colonia	57
6.3	Morfología celular de los aislados	59
6.4	Electroforesis de ADN genómico y gen ADNr 16S	60
6.5	Árbol filogenético de cepas bacterianas aisladas	62
7.1	Filamento helicoidal en células bacterianas	66

7.2	Formación de esporas	67
9.1	Marcador de Peso Molecular	91

A mis padres...

*La evolución lamarckiana es rápida y acumulativa.
Explica la diferencia cardinal entre nuestro antiguo mecanismo
de cambio, puramente biológico, y nuestra actual enloquecedora
aceleración hacia algo nuevo y liberador ...
o hacia el abismo.*

S. Jay Gould, 1980

RESUMEN

El Cinturón Volcánico Transmexicano tiene un gran número de volcanes los cuales son adecuados para estudios de biodiversidad y bioprospección bacteriana. El interés sobre tales microorganismos está creciendo hoy en día principalmente debido a las aplicaciones biotecnológicas, aunque también hay interés desde punto de vista ecológico, sobre todo debido a su adaptación a condiciones extremas. En este trabajo elegimos algunos lagos volcánicos en territorio mexicano para hacer una bioprospección bacteriana, en concreto: La Joya, Cíntora y El Rincón de Parangueo, todos ubicados en el Valle de Santiago, estado de Guanajuato. Creemos que el aislamiento geográfico puede producir condiciones que permitan la evolución de microorganismos extremófilos. Con el objetivo de aislar tales microorganismos se coleccionaron muestras de sedimentos superficiales y agua que se utilizaron como inóculos para los diferentes medios de cultivo (LB, YPS, TSA y Didier). Las composiciones de metales pesados varían de 0,266 mg kg⁻¹ Ni a 35,189.03 mg kg⁻¹ Fe. Después de una extensa investigación se obtuvieron 3 cepas bacterianas en medio LB, 4 en medio YPS, 3 en TSA y 1 en medio Didier. Se extrajo el ADN genómico de estas cepas y los genes de ADNr 16S se amplificaron utilizando los oligonucleótidos 8F y 1513R. Los productos de PCR fueron enviados para la secuenciación en LAGEBIO-CINVESTAV, Irapuato. Se obtuvieron 9 cepas del lago Cíntora, 1 del lago La Joya y 1 más de El Rincón de Parangueo, ésta última probablemente debido a las condiciones halo-alcalinas, requeridas para el crecimiento de las poblaciones bacterianas específicas del sitio.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Origen y evolución de la Tierra

Actualmente nos encontramos inmersos en un gran universo, el cual, en algún momento fue, relativamente muy pequeño. Hace aproximadamente 15 mil millones de años, debido a la enorme energía concentrada en ese “diminuto” espacio, dio lugar a un posible fenómeno conocido como “Big Bang”. Éste consistió en una explosión excesivamente grande, que lanzó hacia el exterior, toda la materia del universo a velocidades increíbles y a partir de lo cual surgió todo (Rodríguez, 1986).

La Vía Láctea, se formó hace aproximadamente 13.3 mil millones de años, y tiempo después (hace aproximadamente 5 mil millones de años) al interior de esta galaxia, una nube de gas y polvo, llamada “nebulosa solar”, comenzó a contraerse lentamente. Debido a las interacciones gravitacionales entre sus partículas, formó un protosol en su interior (Tarbuck *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, del material que se encontraba girando a su alrededor, se formaron los planetas y componentes celestes. Este conjunto conforma el Sistema Solar. La Tierra y todo el Sistema Solar se formaron hace aproximadamente 4.5 mil millones de años. El Sistema Solar está conformado de cuatro planetas rocosos y cuatro planetas gigantes, además de dos Cinturones de asteroides y planetas enanos (Tarbuck *et al.*, 2005). El planeta Tierra es el tercero (partiendo del interior hacia afuera) y tiene singulares características, entre ellas el ser un planeta principalmente sólido a diferencia de los gigantes gaseosos (Cruz Conejo, 1987).

Durante la formación de los planetas del Sistema Solar, ocurrieron innumerables colisiones del material que orbitaba el protosol. Estos impactos, en el planeta Tierra, provocaron un aumento constante de su temperatura, que a su vez, llevó a una diferenciación química de los elementos presentes en la Tierra primitiva. Otra de las consecuencias de este fenómeno de diferenciación, fue el cambio de la composición química de la atmósfera primitiva. La primera atmósfera terrestre estaba compuesta principalmente por Helio e Hidrógeno, la cual se perdió a causa del viento solar, que era muy intenso. Bajo ese panorama la Tierra estaba en constante modificación.

En ese principio, la temperatura era tan alta, que las masas que darían origen

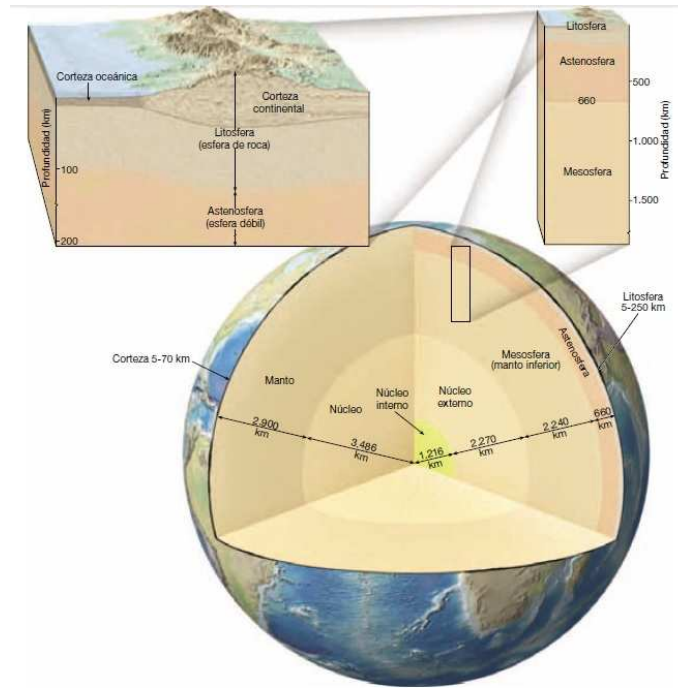


Figura 1.1: Perspectivas de la estructura en capas de la Tierra. El lado izquierdo de la sección transversal muestra que el interior de la Tierra se divide en tres capas distintas según sus diferencias composicionales: la corteza, el manto y el núcleo. El lado derecho de la sección transversal ilustra las cinco principales capas del interior de la Tierra según sus propiedades físicas y, por tanto, según su resistencia mecánica: la litósfera, la astenósfera, la mesósfera, el núcleo externo y el núcleo interno. Los bloques diagrama situados encima de la sección transversal muestran una perspectiva aumentada de la porción superior del interior de la Tierra. Fuente: Tarbuck *et al.* (2005).

a las rocas estaban fundidas, las cuales debido a su densidad, ascendieron a la superficie, donde finalmente, se solidificaron, dando lugar a la formación de nuestra corteza primitiva. Con este período de diferenciación química se establecieron tres divisiones básicas del interior de la Tierra (Longwell y Flint, 1962): El **núcleo**, formado principalmente de hierro y níquel; la capa más gruesa de la Tierra, llamada **manto**, compuesta principalmente por un tipo de roca llamada peridotita; y en la parte más superficial, la **corteza primitiva**, compuesta principalmente por basaltos y granodiorita (Figura 1.1).

Actualmente el núcleo se encuentra dividido en interno y externo, los cuales muestran distintas resistencias mecánicas. El **núcleo interno** es una esfera que cuenta con un radio de 1,216 kilómetros. Debido a que, a mayor profundidad es mayor la densidad y presión. Esta capa se comporta como sólido, pese a las altas temperaturas (donde se superan los 6,700 °C). El **núcleo externo** es una capa líquida de 2,270 kilómetros de grosor, y en esta zona es donde se genera el campo magnético de la Tierra. El manto se encuentra dividido en mesósfera y astenósfera. En la **mesósfera**, o manto inferior, se encuentra una capa de rocas muy rígida y caliente. Presenta una fluidez gradual y se localiza entre una profundidad de

660 y 2,900 kilómetros. La **astenosfera**, o manto superior, es una capa un poco más blanda, con presencia de algunas zonas de roca fundida. Es una zona muy dúctil, que se ubica aproximadamente a 660 kilómetros de profundidad. Finalmente se localiza la capa más externa de la Tierra, que conforma una zona muy rígida y fría, la **corteza terrestre**. En ella se encuentra la **litósfera** que presenta un grosor promedio de 100 kilómetros, pero llega a alcanzar los 250 kilómetros. Sobre ella se ubican la **corteza oceánica** (con un grosor de 7 kilómetros) y la **corteza continental**, con un promedio de 35 kilómetros, pero llegando a medir hasta 70 kilómetros de profundidad (Figura 1.1).

En repetidas ocasiones, a lo largo de la historia evolutiva de la Tierra, la morfología de la superficie del planeta, ha cambiado varias veces. Estas modificaciones han sido provocadas por un fenómeno conocido como **deriva continental**, el cual consiste en la destrucción y formación de la corteza terrestre y que se da de forma continua hasta la fecha (Tazieff, 1972). Ésto ocurre porque la capa externa de la superficie de la Tierra se encuentra fragmentada en segmentos denominados “placas”. En los límites de estas placas, que son puntos frágiles, el manto puede expulsar material o, la corteza puede descender a él, llevando a cabo un mecanismo de renovación (o ciclo de las capas de la Tierra). Consecuentemente, materiales del interior del planeta son impulsados a las capas más externas por el calor procedente de su interior. Actualmente se sabe que estas enormes placas, se desplazan gradualmente unas con otras, y se han identificado tres tipos de límites: divergentes, convergentes o transformantes (Figura 1.2). En los límite divergentes, las masas continentales se separan, se crean nuevas cuencas oceánicas, mientras tanto, las antiguas porciones del fondo oceánico se vuelven a sumergir en el interior de la Tierra. En los convergentes, las placas se desplazan en la misma dirección, una de la otra, y en la transformante, el desplazamiento es paralelo para una misma dirección o en dirección opuesta. Estos movimientos generan terremotos, maremotos, tsunamis, provocan la formación de volcanes y la creación de las principales cordilleras montañosas de la Tierra (Tarbuck *et al.*, 2005) .

Resultante de la deriva continental, el planeta ha presentado y sufrido múltiples modificaciones, algunas de ellas graduales, otras mucho más rápidas, esto dependiendo del fenómeno y de las fuerzas que actuaron en ese momento (Tarbuck *et al.*, 2005). Estudios geológicos han demostrado que hace aproximadamente 300 millones de años, las masas continentales se encontraban unidas, formando el supercontinente conocido como Pangea. Este supercontinente no fue el único de la historia geológica de la Tierra, fue simplemente el último de toda una serie de supercontinentes que se han formado y disgregado a lo largo de más de 3 mil millones de años (Decker y Decker, 2006). Por ejemplo, los geólogos han hipotetizado el continente Pannotia entre 550 y 650 millones de años, Rodonia alrededor de 1,000 millones de años atrás, igual que Nuna o Columbia, hace 1,800 millones de años (Figura 1.3). Pero los más viejos supercontinentes, según registros, fueron Kenorlandia y Ur que se formaron hace 2,500 y 3,000 millones de años respectivamente.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar el proceso de formación y frag-

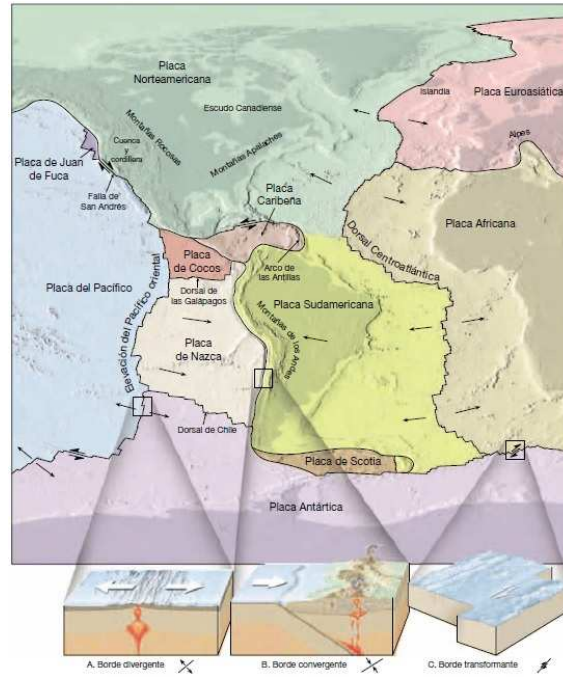


Figura 1.2: Descripción ilustrativa del mecanismo de las placas tectónicas. Fuente: http://observatorio.ilce.edu.mx/proyectos/erupciones_volcanicas_oto10/etapa2.html .

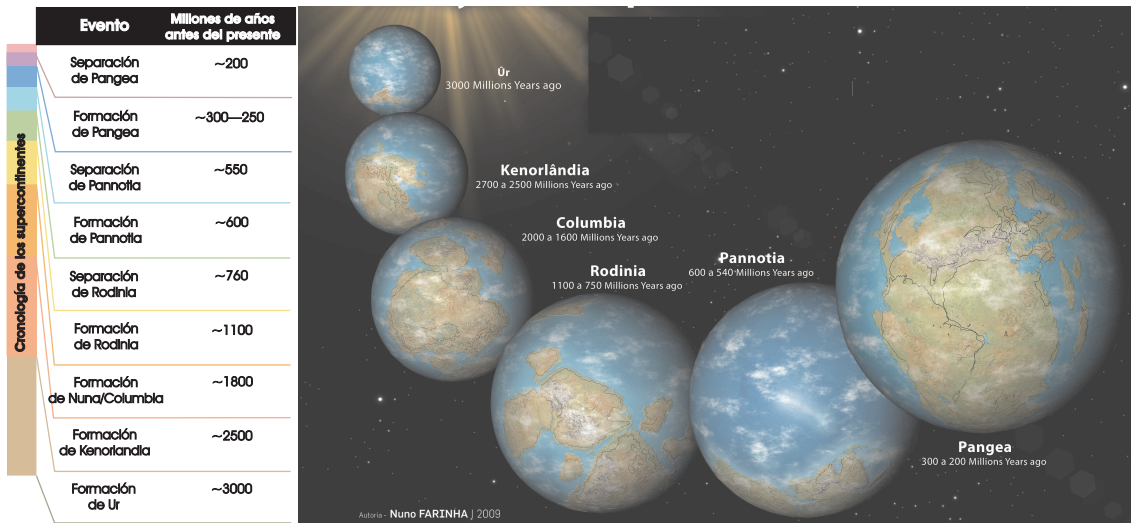


Figura 1.3: Teoría de los supercontinentes. A la Izquierda se muestran los períodos de los hipotéticos supercontinentes (Tarbuck *et al.*, 2005). A la derecha, una ilustración de cómo pudieron haberse visto dichos cambios. Tomado y modificado de http://education.natural-europe.eu/natural_europe/exhibits/show/pathway-slug-146/to-begin-with .

mentación de las masas continentales (Hoffman, 1992). Una hace analogía con un acordeón, en donde ocurre la fragmentación del supercontinente, y posteriormente debido al movimiento generado tanto por la corteza oceánica como la continental, éste se reúne de nuevo. Para la segunda, se lleva a cabo la disgregación, donde los continentes avanzan por todo el planeta hasta reunirse, de nuevo, en el lado opuesto. Pero dentro de todo este mecanismo, lo que es seguro que ocurre, es el proceso de subducción, el cual consiste en el retorno de litósfera oceánica al manto, en las regiones donde convergen los continentes, llevando a cabo un mecanismo de renovación o ciclo de las capas de la Tierra. Al mismo tiempo, la subducción tiene gran importancia, debido a que interviene de manera directa, o indirecta, en la formación de montañas, que es el proceso conocido como orogenia (Uyeda y Kanamori, 1979).

Regresando a información anterior, durante la formación de la Tierra, nuestro planeta giraba más de prisa. La superficie estaba plagada de cráteres y de chimeneas volcánicas de las que brotaban desde su interior sustancias volátiles. Además, el intenso bombardeo de meteoritos, sufrido durante esta etapa, fundía las rocas de la superficie, originando un océano de magma, del que escaparon al igual, gases que formaron la atmósfera primitiva. Al mismo tiempo, debido a la temperatura, relativamente elevada, y al débil campo gravitacional de la Tierra, los componentes más ligeros como el hidrógeno y el helio, eran barridos por los vientos solares y junto con ellos, su primer atmósfera (Tarbuck *et al.*, 2005). Algunos de los gases, como el amoníaco (NH_3), arrojados a partir de los movimientos de la superficie de la Tierra, eran descompuestos por la radiación solar; los gases más pesados se mantenían más cerca de la superficie debido a la gravedad. A partir de estos eventos, de forma lenta y gradual, se fue formando la segunda atmósfera, que poco a poco, fue evolucionando hasta la atmósfera actual. Ésta era cargada de electricidad y afectada constantemente por las tormentas solares. En su composición, abundaba principalmente vapor de agua (H_2O), nitrógeno (N_2), gas carbónico (CO_2), ácido clorhídrico (HCl), NH_3 y sulfuros (SO_2), los cuales la caracterizaba, principalmente por ser una atmósfera reductora y anaerobia (Ohmoto *et al.*, 2004). Durante este período, que tardó aproximadamente 2.5 mil millones de años, la atmósfera permanecía constantemente oscurecida debido a las nubes sulfurosas que emitían los volcanes, y también debido al polvo generado por las constantes colisiones de los meteoritos. La modificación de esta composición, fue cambiando lentamente con el surgimiento de las bacterias fototróficas anaerobias, que agregaban oxígeno (O_2) libre a la atmósfera, igual que las reacciones de fotólisis de los compuestos conteniendo oxígeno. A pesar de que estos microorganismos existían desde 3.8 mil millones de años atrás, se ha verificado que la acumulación de oxígeno en la atmósfera, apenas comenzó hace 2 mil millones de años. Estudios geoquímicos, han propuesto que las primeras moléculas de oxígeno, han sido atrapadas por las rocas de hierro presentes en abundancia en el planeta, formando lo que conocemos hoy en día como *Band Iron Formation* (Fe_2O_3) y las *Red Beds* (Fe_2S ; Ohmoto (1996)). La atmósfera actual, está compuesta principalmente por N_2 (78%), O_2 (21%) y Argón (0.93%), además de otros gases trazas y

gran cantidad de vapor de agua. Es interesante observar que hubo un cambio de una atmósfera altamente reductora hacia una altamente oxidante, con una alta concentración de N_2 y de O_2 . El aumento de la concentración de oxígeno en la atmósfera y su fotólisis, ha dado origen a la capa de ozono, que a su vez, ha contribuido de forma importante para que la vida pudiera salir hacia la superficie terrestre (hace aproximadamente 2.6 mil millones de años; Ohmoto (1996)).

1.2 Origen y evolución de la vida en la Tierra

Se calcula que la vida está presente en nuestro planeta desde hace aproximadamente 3,800 millones de años, con la aparición de organismos muy simples y unicelulares (Tarbuck *et al.*, 2005). La vida parece ser un comportamiento ordenado y reglamentado de la materia, donde se llevan a cabo interacciones con el medio que le rodea. Ésto con el fin de realizar el intercambio tanto de energía metabólica como de materia. De esta forma, un ser vivo, puede alejarse de su estado de equilibrio termodinámico, evitando la muerte (Schrödinger, 1992). Partiendo de este suceso, se han propuesto y desarrollado teorías acerca del origen y evolución de la vida.

La teoría que hipotetiza el origen de la vida más aceptada actualmente, es la de Oparin, Miller y Urey. Ella fue comprobada experimentalmente en la década de los 50's, del siglo pasado. La primera mención de esta teoría, estuvo descrita en una carta enviada por Darwin, en 1871, a Francis Dalton, en la que él hipotetizaba la posible existencia de "charcos primordiales", en los cuales, posiblemente, pudo haber surgido la vida (García *et al.*, 2010). Pero, fue hasta 1924, que Alexander I. Oparin propone la hipótesis heterótrofa del origen de la vida. En esta teoría, Oparin propuso que los primeros seres vivos habían sido heterótrofos anaerobios, los cuales se formaron y se nutrieron a partir de los compuestos sintetizados naturalmente en la Tierra primitiva, y acumulados en los mares, lo que conocemos como la **sopa prebiótica**. Dentro de esta teoría, Oparin mencionaba que la formación de moléculas orgánicas precursoras de los seres vivos (como por ejemplo los aminoácidos), había sido posible gracias a la ausencia de oxígeno libre en la atmósfera. Debido a las imposibilidades metodológicas, esta teoría va a ser comprobada años más tarde en 1952, por Stanley L. Miller y Harold C. Urey. Ellos comprueban experimentalmente la hipótesis de Oparin (Figura 1.4).

A pesar de que los aparatos y condiciones aplicadas en su experimento eran rudimentales, al poner en contacto la mezcla de gases de composición similar a la atmósfera primitiva (CH_4 , NH_3 , H_2 y vapor de H_2O) con descargas eléctricas, pudieron observar en el agua condensada (supuesto océano primitivo), la formación de aminoácidos, hidroácidos, urea y algunas otras moléculas de interés bioquímico (Figura 1.4). Otro aporte muy importante en la teoría de Oparin, fue realizado por Joan Oró, que en 1960 demostró que a partir de los productos formados en el experimento de Miller, se podría formar la adenina. Ella es una base nitrogenada muy simple que forma parte de la composición de varios ácidos nucleicos, tal como

la radiopanspermia y la litopanspermia. En la radiopanspermia se defiende que la vida en la Tierra proviene de esporas bacterianas extraterrestres, y que fueron transportadas a la Tierra. Ésta fue defendida por muchos científicos, entre ellos el físico Hermann von Helmholtz y William Thomson, y por el químico sueco, Svante Arrhenius, quien la sostuvo en una de sus publicaciones (Arrhenius, 1908). Para el caso de la litopanspermia, está basada en el descubrimiento de diversos compuestos de carbono en los meteoritos, y sostiene, que los compuestos orgánicos básicos habrían llegado a nuestro planeta utilizando este medio de transporte. La principal evidencia para esta teoría, está reforzada con el estudio del meteorito de *Murchison*, que cayó en Australia en septiembre de 1969, y datado de 4.6 mil millones de años (Kvenvolden *et al.*, 2000). En él se identificó la presencia de hidrocarburos, tanto lineales como aromáticos, así como una gran cantidad de aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, ácidos carboxílicos, al igual que moléculas las cuales son capaces de originar membranas bilipídicas. Estos datos nos indican que hace 4.6 mil millones de años, cuando apenas se estaba formando nuestro Sistema Solar, ya ocurrían una serie de procesos químicos que podrían permitir la síntesis y acumulación de compuestos orgánicos, con lo cual, posiblemente, de igual forma, ésto ocurría en la Tierra (Gull, 2014).

Hay una tercer teoría, la de **prueba y error**, más moderna, basada en estudios estadísticos. En ésta se utilizan herramientas matemáticas y físicas para comprobar que, sistemas tan complejos como son los seres vivos, pueden surgir aleatoriamente a través de reacciones autocatalíticas, sin la necesidad previa de material genético. Sin embargo, es necesario que el material esté en espacios suficientemente reducidos, para que puedan interactuar. Éstos, con el paso del tiempo, adquieren propiedades como lo son la auto-replicación, la auto-regulación y, finalmente la auto-reproducción (Kauffman, 1995). En esta línea de pensamiento, D'Antoni (2005), a su vez, generaliza, sugiriendo que la vida (y los sistemas autocatalíticos que pasan información de una generación a otra), pudo haber surgido sobre nuestro planeta, gracias a la presencia de agua líquida, nutrientes y fuentes de energía suplementarias. Según su teoría, en los mares primitivos, las moléculas de los ácidos nucleicos, entramaron una compleja red de interacciones que potenciaban la vida a través de adaptaciones, desarrollando, paso a paso, los linajes de organismos cuyos descendientes pueblan hoy nuestra biosfera (D'Antoni, 2005).

1.3 El Cinturón Volcánico Transmexicano y el Valle de Santiago

México se localiza sobre la placa Norteamericana (Figura 1.5), que a su vez, interactúa con otras cuatro placas: la del Pacífico, de Fuca, de Cocos y del Caribe. Actualmente, en México, podemos observar los resultados del movimiento de estas placas, que con el paso del tiempo, han creado varias regiones volcánicas. De forma simplista, se puede decir que el relieve volcánico, es resultante de la acción

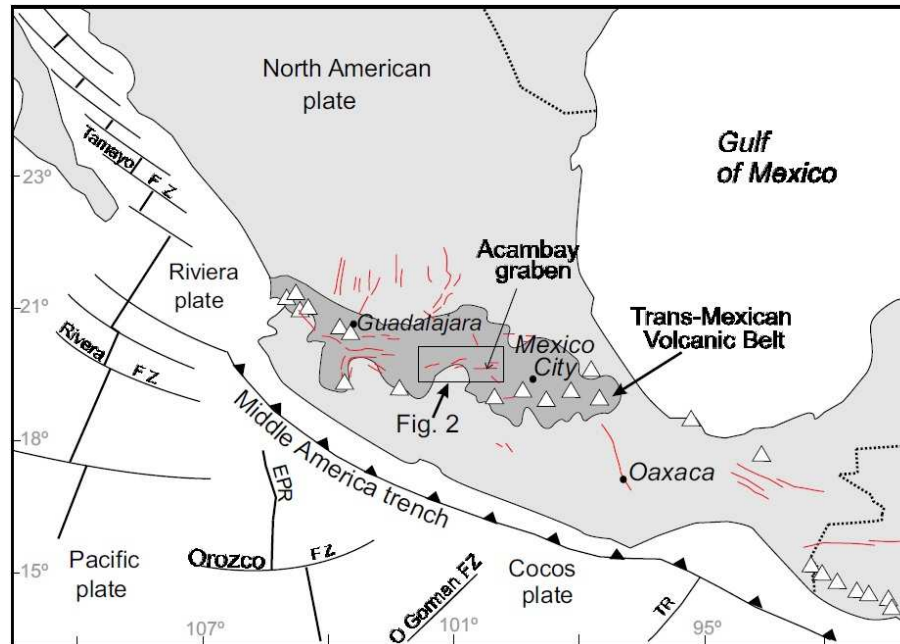


Figura 1.5: Mapa de México con destaque de las placas tectónicas. Tomada de Ortuño *et al.* (2014).

de los procesos endógenos y exógenos que ocurren en el encuentro de estas placas (Gorshkov y Iakushova, 1969). Esta actividad invariablemente ha dejado su huella a lo largo de todo el país en forma de sistemas volcánicos y sistemas hidrotermales, tanto fósiles como activos (Ferrari *et al.*, 2012).

El relieve de México se destaca por la presencia de complejos de montañas que cortan el país Norte-Sur y Este-Oeste. Al Este se encuentra la Sierra Madre Oriental, al Oeste la Sierra Madre Occidental, y al Sur la Sierra Madre del Sur. Entre éstas, en el centro, con más de 2 mil metros de altura, está el altiplano de la Meseta de Anáhuac. En ese relieve también se destaca el Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM) o Faja Volcánica Transmexicana (FVTM, Figura 1.6), que atraviesa el centro de México, desde el Golfo de California hasta el Golfo de México, aproximadamente entre las latitudes $18^{\circ}30' N$ y $21^{\circ}30' N$ (Ferrari *et al.*, 2012).

Los volcanes que se encuentran a lo largo del CVMT son: Tres Vírgenes, Sangangüey, Tequila, Nevado de Colima, Volcán de Colima, Parícutín, Tancítaro, Jorullo, San Andrés, Nevado de Toluca, Ajusco, Popocatepetl, Xitle, Iztaccihuatl, La Malinche, Cofre de Perote, Pico de Orizaba, San Martín, Chichonal y Tacaná (Figura 1.7). Algunos de éstos, están activos y otros inactivos.

México es también abundante en zonas geotérmicas. La Comisión Federal de Electricidad (CFE) ha establecido la existencia de más de mil manifestaciones termales en la República Mexicana (Figura 1.8), de las cuales, sólo una minoría corresponde a sistemas capaces de generar energía eléctrica comercialmente. Sin embargo, la mayoría de éstos, han sido utilizados como balnearios, aún desde tiempos pre-

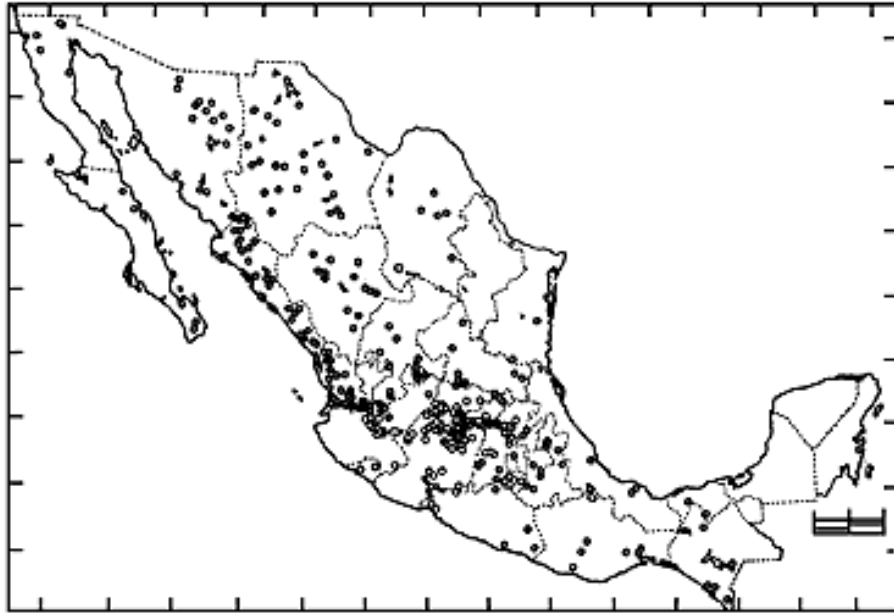


Figura 1.8: Zonas geotérmicas en México (CFE). Tomado de <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/058/imgs/f28p87.gif>.

colombinos (Villegas-Negrete, 2010).

1.3.1 Las Siete Luminarias y La Joya

El Valle de Santiago constituye una de las regiones más simbólicas del altiplano mexicano y está localizado dentro del CVTM. Debido a la presencia de siete conos volcánicos, dispuestos en el terreno, de tal manera que asemejan al acomodo de las siete estrellas de la Osa Mayor, es denominado localmente como “Las Siete Luminarias” (Figura 1.9).

Las Siete Luminarias son, de Norte a Sur: Hoya El Rincón de Parangueo, Hoya San Nicolás de Parangueo (también San Nicolás Parangueo o San Nicolás), Hoya Estrada, Hoya La Alberca, Hoya Blanca, Hoya Cíntora (Zíntora o La Cíntora) y Hoya Álvarez. El fondo de al menos cuatro de estos cráteres, fue lo suficientemente profundo para alcanzar el manto freático de la región, dando origen a lagos de cráter (maares); éstos son: Rincón de Parangueo, San Nicolás de Parangueo, La Alberca y Cíntora. Actualmente, la mayoría de estos lagos se encuentran en un estado avanzado de desecación o senescencia, con sus áreas superficiales y volúmenes reducidos (Kienel *et al.*, 2009).

Un claro ejemplo de aislamiento geográfico son los lagos de cráter, mejor conocidos como maar (Lorenz, 1986). En éstos, las condiciones presentes, muchas veces son clasificadas como extremas, y por lo tanto, los organismos que sobreviven ahí son extremófilos y pueden poseer mecanismos fisiológicos y metabólicos aun no observados o explotados por el hombre.

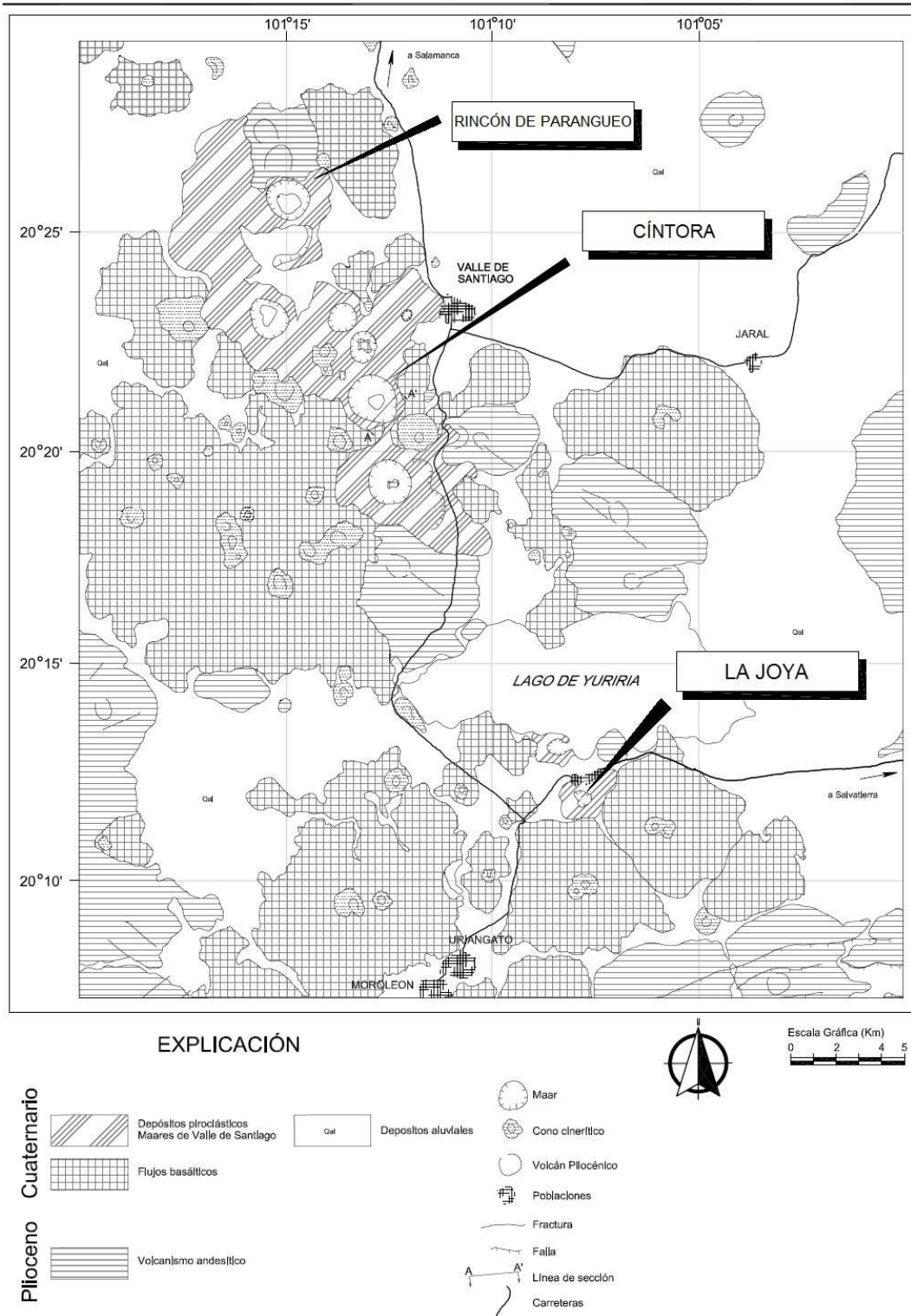


Figura 1.9: Mapa del Valle de Santiago y de Yuriria. Se señala la ubicación de los tres sitios de muestreo del presente estudio. Fuente: Demant (1978).

De acuerdo con estudios de vulcanismo de sitios cercanos a “Las Siete Luminarias”, se cree que estos cráteres se originaron durante el mioceno medio a tardío (entre 16 a 5,3 Ma; Alaniz-Álvarez y Nieto-Samaniego (2005)). Los grupos de conos volcánicos de lavas alcalinas-calcáreas son los más antiguos y datan de 6.8 Ma; mientras los pequeños cráteres y maares, son más recientes y datan de 0.07 Ma, los cuales surgieron sobre las lavas más antiguas. Ejemplo de estos son los maares de La Alberca y El Rincón de Parangueo (Murphy, 1986).

La topografía que se observa en el lago-cráter de Cíntora presenta una superficie lisa, ligeramente curvada y cóncava hacia arriba (Aranda-Gómez *et al.*, 2013). Según Aranda-Gómez *et al.* (2013), se puede observar una capa muy delgada de estromatolitos en fragmentos de rocas ubicados en los lagos de Cíntora y San Nicolás de Parangueo, lo que probablemente está relacionado a la salinidad de estos sitios. Los **estromatolitos** son formaciones rocosas en forma de domo, que consisten en la alternancia de láminas de carbonatos o silicatos. Se producen a través de largos períodos de tiempo, por la captura o acumulación de sedimentación de las capas de los microorganismos. Ellos representan uno de los registros fósiles más antiguos de las formas de vida que existen en la Tierra como son los de Australia, que datan de más de 3 mil millones de años. Pero, también hay estromatolitos vivos, como los encontrados en el cráter de Rincón de Parangueo, Guanajuato, la laguna de Alchichica en Puebla, o Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Actualmente, la mayoría de los lagos del Valle de Santiago, se encuentran secos, y se ha observado que su salinidad está aumentando gradualmente. De éstos, El Rincón de Parangueo es el más salino de todos, seguido por La Alberca y después por San Nicolás, que posee una salinidad similar a Cíntora (Aranda-Gómez *et al.*, 2013).

El maar de Rincón de Parangueo, es parte del complejo volcánico de Parangueo, el cual es formado por lo menos de 6 volcanes. El Rincón de Parangueo cuenta con un cono volcánico que posee un diámetro de 1,100 m (Escolero y Alcocer, 2004), y en algunos puntos se pueden observar pequeñas estructuras de lodos atribuidos a movimientos del maar en su formación (Aranda-Gómez *et al.*, 2013). En el área más profunda de este cráter, donde se observa la formación de pequeños pozos de agua, forma su base, la cual presenta a su alrededor un área de playa cubierta por un extenso sistema expuesto de estromatolitos (Figura 1.11). Estos estromatolitos, son precipitaciones de CaCO_3 de origen biológico, probablemente formado por tapetes de microalgas y de bacterias. Debajo de estos estromatolitos existe una capa de roca caliza (toba; CaCO_3) de aproximadamente 0.5 a 1.0 m. La extensión de los lagos varía mucho en función de la época de lluvia, pudiendo encontrarse casi completamente secos en épocas de sequía, como se observó en julio de 2010 (Figura 1.10).

El lago de cráter La Joya, no pertenece al complejo de las Siete Luminarias, pero se localiza en el sistema de fallas Taxco-San Miguel de Allende. Éste se ubica entre el poblado de Yuriria (Guanajuato, Figura 1.9). Al igual que algunos de los volcanes de “Las Siete Luminarias”, el cráter de La Joya fue lo suficientemente profundo para



Figura 1.10: Etapas de sequía del lago-cráter Parangueo. (a) 1995; (b) en 2002; (c) condiciones actuales del lago-cráter (2014). Tomada y modificado de Cruz *et al.* (2012).

alcanzar el manto freático y así dar origen a un lago de cráter. Pero actualmente, es mantenido de forma artificial, sobre todo, debido a su carácter ecológico para preservar aves migratorias de la región. Este volcán (que data de 6.9 ± 0.4 Ma) inició su actividad con erupciones explosivas, una secuencia de depósitos de caída de pómez, ignimbritas y oleadas piroclásticas. Posteriormente cambió de explosivo a efusivo, con emisiones radiales de derrames de lavas andesíticas y dacíticas de alta viscosidad en forma de coulees (lóbulos de corta extensión y de espesor elevado; Mori (2007)).

El elevado proceso de deterioro de estos lagos pone en cuestión la pérdida de la biodiversidad de este medio ambiente. Algunas de las causas antropogénicas de este proceso de deterioro son: la deforestación, la desviación de efluentes para la agricultura, la sobreextracción de aguas subterráneas, la contaminación y la eutrofización. La reducción del volumen del agua, también se ve reflejado en la alcalinidad y salinidad de estos lagos. La combinación de salinidad y pH elevados, hacen que estos cuerpos acuáticos sean clasificados como un ejemplo de hábitat extremos, en donde sólo pueden sobrevivir organismos altamente especializados, los microorganismos halo-alcalófilos.

1.4 Organismos extremófilos

Se puede considerar que los microorganismos constituyen la mayor cantidad de biomasa de la Tierra y son la clave de reservorios de nutrientes esenciales para la vida en el planeta. Incluso, se estima que el total de células microbianas que

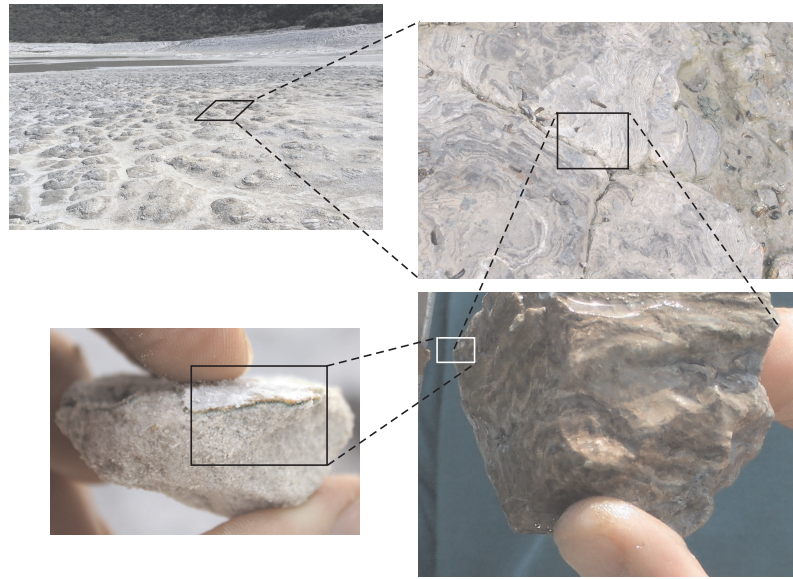


Figura 1.11: Estromatolitos encontrados en el lago-cráter de Parangueo. El acercamiento permite distinguir en un corte transversal, las capas que lo conforman.

habitan en la Tierra sean del orden de 5×10^{30} y el total del carbono presente en estas pequeñas células, sea equivalente a las encontradas en el total de plantas en el mundo, sin contar con el contenido de fósforo y nitrógeno que estas células pueden retener. Otro descubrimiento importante fue la omnipresencia de los microorganismos en los ambientes subsuperficiales del planeta. Por ejemplo, se han descubierto seres vivos que habitan a 10 Km de profundidad de la superficie de la Tierra (Madigan *et al.*, 2004).

Los microorganismos son muy adaptables, viven en ambientes comunes donde los humanos pueden habitar, pero también, a condiciones que hasta poco tiempo eran consideradas extremas para sostener la vida. Aquí se define vida como: los sistemas que poseen un comportamiento ordenado y reglamentado, que intercambian materia y energía con el medio con el fin de regular su metabolismo, mantienen su integridad genética, protegiéndola y transmitiéndola a sus descendientes, y con capacidad de evolucionar.

La existencia de agua líquida es un elemento clave para sustentar la vida como la que conocemos en la Tierra. El agua, considerada el solvente universal para los compuestos inorgánicos, es la vía que los seres vivos encontraron para intercambiar materia y energía con el medio circundante. Por ejemplo, los nutrientes una vez que están disueltos en agua pueden estar disponibles a las células vivas, dependiendo de la forma química en que se encuentran. Una vez que la sustancia química esté internalizada, podrá ser utilizada para realizar las funciones fisiológicas celulares. En el caso del nitrógeno, él podrá formar parte de moléculas orgánicas como las bases nitrogenadas, las purinas y pirimidinas. Muchas moléculas necesitan estar disueltas en al agua para que puedan atravesar la membrana celular, sim embargo

existen macromoléculas que utilizan transporte por canales proteicos. Además de los compuestos que los organismos necesitan para su catabolismo, ellos también necesitan de moléculas que puedan servir como donadores y aceptores de electrones. Estos son esenciales para llevar a cabo los procesos que resultarán en la síntesis del ATP. Son varios los compuestos que pueden servir como donadores y aceptores de electrones, y la pareja más conocida es del H_2O/O_2 .

El papel del agua como “solvente universal” es reflejado en la propia composición de las células. En general el contenido de agua en las células, consiste en promedio 70% de su peso. Sin embargo, el agua se evapora a 100 °C y se congela a 0 °C, propiedad física que puede ser un problema para las células. Éstas deben de poseer metabolismo fisiológico para mantener el agua líquida en su interior, independiente de la temperatura del exterior. Además, el agua congelada no sirve como fuente de materiales.

Igual que las temperaturas bajas, temperaturas más elevadas también son un problema para los seres vivos, ya que, a temperaturas altas el agua no puede llevar a cabo la misma función de las que realiza al estar a temperatura entre 5 y 60 °C. Por ejemplo, a temperaturas más elevadas aumenta la disolución de los gases en el agua, motivo por el cual, se observa que las aguas termales contienen usualmente bajo porcentaje de oxígeno disuelto y otros gases. Bajo estas condiciones, es usual observar en estos ambientes el desarrollo de microorganismos anaerobios y microaerófilos, los cuales presentan adaptaciones fisiológicas especiales, como el de utilizar el H_2S/H_2 como donador/aceptor de electrones.

Otro reto que los microorganismos necesitan superar cuando la temperatura aumenta es respecto a la composición de su membrana. Éstas son formadas por lípidos, fosfolípidos y glucolípidos, además de proteínas y de azúcares. En ambientes extremadamente cálidos, como por ejemplo las fuentes hidrotermales, donde la temperatura suele superar los 60 °C, se ha observado que la membrana de los microorganismos posee elevados contenidos de ácidos grasos saturados.

Para el caso de los ambientes con bajas temperaturas, las adaptaciones ocurren principalmente respecto a las concentraciones osmóticas, pues los microorganismos de ese ambiente necesitan evitar que el agua presente dentro de sus células se congele. Un ejemplo de adaptación en los microorganismos psicrófilos es la presencia de solutos intracelulares como el glicerol y el dimetilsulfóxido, estos microorganismos también presentan una membrana con muchos ácidos grasos insaturados, los cuales impiden el congelamiento del agua dentro de las células.

Actualmente se ha observado que la vida se puede desarrollar en ambientes considerados hostiles, comunmente conocidos como ambientes extremos. Éstos sitios presentan condiciones físico-químicas y ambientales que van desde elevadas o bajas de temperaturas, pH, salinidad, radiación, presión, etc. Los organismos que habitan estos ambientes, son clasificados como organismos **extremófilos**.

Como se ha mencionado anteriormente, los extremófilos poseen adaptaciones fisiológicas para desarrollarse en estos sitios y dependiendo de las condiciones ambientales, reciben nombres especiales, que está en función del ambiente y de las

condiciones físico-químicas del medio (Tabla 1.1). Así respecto a los extremos de temperaturas, los organismos pueden clasificarse como: psicrófilos, mesófilos, termófilos o hipertemófilos; en relación al pH del medio se clasifican en: acidófilos, neutrófilos o alcalófilos; los piezófilos son aquellos que soportan elevadas presiones. Estos organismos necesitan estas condiciones en su medio para lograr desarrollarse de manera óptima. En casos donde los organismos viven bajo más de una de estas condiciones se consideran **poliextremófilos** (Rainey y Oren, 2006).

A pesar de que los extremófilos se incluyen dentro de distintas taxas de Bacteria y Eukarya, los más abundantes se ubican como miembros del dominio Archea.

1.4.1 Ambientes Extremos

Actualmente existen ambientes en el planeta que se han descrito con características ambientales extremas, algunos naturales y otros como respuesta a la acción humana, o sea, de origen antropogénico.

El Río Tinto (en Huelva, España) es un ejemplo de un ambiente natural extremo. A pesar de tener un pH en sus aguas inferior a 2.5, la vida en este río es riquísima y diversa (D'Antoni, 2005). Las fumarolas submarinas y los géiseres son ejemplo también de un ambiente extremo ya estudiado. En éstos existen organismos vivos capaces de tolerar temperaturas que considerábamos letales hasta hace poco tiempo.

En las regiones cercanas a los polos y en elevadas altitudes (que se encuentran eternamente cubiertas por hielo y con temperaturas siempre bajo cero), se ha descubierto una fascinante colección de formas vivas (Dieser *et al.*, 2010). En estos ambientes los organismos encontrados, además de ser psicrófilos, también son radioresistentes y por lo tanto, poliextremófilos.

En muchos casos, el aislamiento geográfico juega un papel importante como elemento de especiación, ya que participa como una barrera a su dispersión. Asociado a eso, las condiciones extremas del ambiente, favorece a que organismos bajo dichas presiones se van adaptando de manera muy específica. Motivo por lo cual éstos son ambientes propicios para la búsqueda de nuevas especies o, más aún, de especies con características fisiológicas únicas. Es decir, estos ambientes son ideales para la bioprospección (Brito *et al.*, 2007).

En la actualidad, en nuestro planeta, hay evidencia de que la vida se adapta a las condiciones extremas que deben haber prevalecido en los momentos iniciales de la formación del planeta y origen de la vida (Stetter, 1999). Las Fosas de las Marianas y las Fumarolas Negras Submarinas son ejemplo de ambientes extremos en la Tierra que han sido estudiados con perspectivas a la Astrobiología. Estos estudios nos ayudan no solo a comprender el origen y evolución de la vida en la Tierra, sino también hipotetizar la formación de vida extraterrestre en ambientes similares a los que hubo en la Tierra en su formación y que aún hay en algunos puntos del planeta.

Tabla 1.1: Ejemplos de ambientes que presentan condiciones extremas y los microorganismos adaptados a dichas condiciones

Parametro Ambiental	Tipo	Localización y Condiciones	Ejemplos	Referencias
Desecación	Xerófilos	Organismos capaces de sobrevivir en condiciones de extrema sequia. Rocas expuestas al Sol, etc.	<i>Nostoc sp.</i> <i>Cytococcus sp.</i> Líquenes	Davis (1972)
		Organismos capaces de vivir en medios con pH cercano a cero (pH 0-4). Aguas termales (<i>hot springs</i>) Minas “ <i>The Iron Mountain Mine</i> ” en California del Norte.	<i>Cyanidium caldarium</i> <i>Dunaliella acidophila</i> <i>Thiobacillus sulfobus</i>	Seckbach (1994) Pick (1999) Madigan <i>et al.</i> (2004)
pH	Acidófilos	Organismo que viven en ambientes con pH superior a 9. Lagos sódicos y suelos muy carbonatados. Egipto, Valle del Rift, Africa y el Oeste de los Estados Unidos.	<i>Spirulina plantensis</i> Género <i>Bacillus</i>	Seckbach (2005) Madigan <i>et al.</i> (2003)
	Alcalófilos	Requieren condiciones de alta presión (Superior a 1 atm para su desarrollo y crecimiento Profundidades marinas y océanos.	Generos como <i>Shewanella</i> , <i>Moritella</i> , <i>Methanococcus</i>	Yano y Poulos (2003) Abe y Horikoshi (2001)
Presión Hidrostática	Piezófilos	Requieren cierta concentración de NaCl para su crecimiento. Lagos salinos (Gran Lago Salino de Utah y el Mar Muerto). Salinas Marinas	<i>Galdiera sulphuraria</i> <i>Halobacterium salinarum</i> ¹ <i>Chromobacterium</i>	Seckbach (1994); Pinto <i>et al.</i> (1994) Javor (1989) Ventosa <i>et al.</i> (1998)
Salinidad	Halófilos	Niveles altos de radiación	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Battista (1997)
Radiación	Psicrófilos	Crecen a temperaturas entre -20 °C y 15 °C. Regiones polares, glaciares, en fondos de los océanos, montañas altas, etc.	<i>Chlamydomonas nivales</i>	Ramírez <i>et al.</i> (2006)
		Temperaturas de 50 °C a 80 °C. Fuentes termales volcánicas terrestres, fumarolas termales.	<i>Thermus aquaticus</i>	Niehaus <i>et al.</i> (1999)
	Hipertermófilos	Crecimiento a temperaturas superiores a 80 °C. Fuentes termales volcánicas.	<i>Pyrolobus fumarii</i> ¹	Seckbach (2000)

¹ Especies clasificadas como poliextremófilos.

1.5 Astrobiología

A lo largo de la historia de la humanidad, se han abordado ideas en torno al tema de la vida fuera de la Tierra. Éstas se remontan a la antigua Grecia, donde fueron defendidas fuertemente por Epicuro (341–270 a.C.). Él desarrolló premisas basadas en Leucipo (siglo V a.C.) y Demócrito (460–370 a.C.), entre las que postulaba que “el presente estado de la naturaleza es resultado de un largo proceso evolutivo y la vida existe en todas partes del Universo” (Bailey, 1957). Posteriormente, personajes como Plutarco (46–120 D.C), sostenía ideas que iban en contra del pensamiento aristotélico, entre ellas la pluralidad de mundos habitados. Pero fue hasta el período del renacimiento, que con la llegada del paradigma copernicano, comienzan a surgir nuevas ideas acerca de esta pluralidad. Entre ellas las de Giordano Bruno (1548–1600), quien fue sentenciado y quemado en la hoguera por publicar *Del infinito universo y sus mundos*, donde defendía que la Tierra no era el centro del universo, y que además, había un infinito número de mundos y la vida existía en ellos. Johannes Kepler (1571–1630) y Tycho Brahe (1546–1601) consideraban la probabilidad de que existían habitantes en Júpiter.

Pero fue hasta el siglo XX, que por primera vez se utilizó el término “*astrobiología*” por Berthelot (1938), y conforme fueron avanzando los conocimientos y las tecnologías esta rama toma fuerza. A mediados de ese siglo, se organizó el primer “Simposio Americano de Astrobiología”. En 1982, durante la XVIII Asamblea General de la Unión Astronómica Internacional (IAU), realizada en Patras (Grecia), se creó la comisión 51, denominada *Bioastronomía* (Lemarchand, 2000). Actualmente, la **Astrobiología** se define como: el estudio de los orígenes, evolución, distribución y futuro de la vida en el universo.

Es evidente que la tecnología actual, no es suficiente para poder realizar viajes a grandes distancias, limitándose así, el estudio por medio de telescopios y sondas espaciales. Éstos estudian algunos satélites, asteroides, cometas y planetas del Sistema Solar, así como su vecindad (2 Kparsec) buscando algunas características que puedan sustentar la química de la vida. Actualmente hay algunos proyectos de astrobiología donde se planean enviar sondas espaciales, como por ejemplo, la sonda *Terrestrial Planet Finder* (TPF) de la NASA (<http://planetquest.jpl.nasa.gov/TPF>), y la misión Darwin de la ESA (<http://darwin.esa.int>; Lawson y Dooley (2005)).

A continuación, se describen tres objetos del Sistema Solar que han sido blanco de estudio astrobiológico, ellos son: Europa, satélite natural de Júpiter, al igual que Encelado y Titán, satélites de Saturno.

1.5.1 Europa

Gracias a la sonda espacial Galileo (de la NASA), se ha obtenido valiosa información de uno de los satélites de Júpiter como lo es Europa. Él posee un diámetro de 3,140 km, un poco menor al de nuestra Luna, una superficie extremadamente lisa y con pocos cráteres de impacto. Además, evidencias sugieren la existencia de un océano

interior. Gracias a datos de la sonda espacial Voyager y Galileo, se ha propuesto que Europa posee una capa superficial muy gruesa de hielo, que, además presenta sales principalmente de MgSO_4 y compuestos volátiles como CO_2 , SO_2 y H_2O_2 .

El interés astrobiológico de Europa es enorme. La Agencia Espacial Europea tiene previsto lanzar una misión en 2022 llamada *JUupiter ICy moons Explorer mission (JUICE)* que llegará a su destino en 2030, y posee el objetivo de medir, por primera vez, el grosor de la corteza de Europa, y evaluar su potencial de habitabilidad (SOMA, 2014).

1.5.2 Titán

En octubre de 1997 se llevó a cabo el lanzamiento de la nave espacial Cassini partiendo de la Tierra con destino a Saturno. Después de un largo viaje, a finales de junio de 2004, Cassini entró en órbita a Saturno. A bordo de esa nave, viajó la sonda espacial Huygens, de 300 kg de peso, la cual contaba con 6 instrumentos que permitieron realizar análisis físicos y químicos de la atmósfera y superficie de Titán, una de las lunas de Saturno. Su descenso sobre la superficie de Titán se logró el 15 de enero de 2005 (Lebreton *et al.*, 2009).

Los análisis realizados por la sonda Huygens, permitieron brindar un perfil bastante completo sobre los elementos que componen la atmósfera de Titán. Entre los principales están: N_2 con 98%, CH_4 con 1.4% y con 0.1% de H_2 . Entre los hidrocarburos, se encuentran: etano (C_2H_6) con 0.001% y acetileno (C_2H_2) con un 0.0002%. También se detectaron algunos compuestos orgánicos nitrogenados, entre los que destacaron, el ácido cianhídrico (HCN) con 0.00001%. Los compuestos oxigenados más abundantes son el dióxido de carbono CO_2 con $1.6 \cdot 10^{-7}$ % y agua H_2O con apenas $4 \cdot 10^{-8}$ %. La superficie de Titán presentó los siguientes datos físicos: 1,470 mbar de presión, 93.7 K de temperatura y 5 kg m^{-3} de densidad (Raulin, 2008)

Un resumen general de las condiciones de Titán, nos indica que cuenta con algunos de los criterios mínimos para la vida, como lo son: desequilibrio termodinámico; que posee abundantes moléculas que contienen carbono; su superficie mantiene temperaturas, lo suficientemente bajas, como para permitir un amplio rango de enlaces covalentes y no covalentes y; ofrece recursos útiles para catálisis necesarias para la vida, incluyendo metales y superficies (Benner *et al.*, 2004).

1.5.3 Encelado

Encelado es un pequeño satélite de Saturno (con 252 Km de diámetro). Su superficie se asemeja mucho a la de Europa (Lemarchand y Tancredi, 2010), es muy lisa, con pocos cráteres y extensas grietas, lo que refleja una continua remodelación por el material que fluye desde el interior (Sjogren *et al.*, 1976). La fuente de calor es mantenida por la fricción del material interno que posee efecto de marea, las cuales son causadas por Saturno y Dione, un satélite vecino. Éste, se encuentra en resonancia 2:1 con Encelado, es decir, por cada 2 revoluciones de Encelado, Dione completa

una vuelta, ampliando las mareas. Es también posible que este calor haya derretido el hielo interior manteniendo un océano subterráneo.

Cuando Cassini pasó por Encelado, descubrió la presencia de actividad en ese diminuto satélite. Efectivamente, se han observado géiseres en donde el material es eyectado a cientos de km de altura. Estos géiseres contienen partículas de hielo, vapor de agua y otros gases, tales como, CO_2 , N_2 , CH_4 , NH_3 , acetileno y propanol. Además de los descubrimientos de Cassini, el satélite también ha sido monitoreado por un conjunto de antenas localizadas en la Tierra llamadas *Deep Space Network (DSN)*, las cuales reciben información de sondas que orbitan Encelado. Sus datos indican que él tiene un interior dividido en capas de distintas densidades, y la existencia de un mar debajo de su corteza, el cual se extiende desde el polo Sur y hasta los 50° de latitud Sur. A lo largo de esta región, se localiza la zona sobre la cual están las “rayas de tigre”, de donde salen chorros discretos de vapor y hielo del interior. Adicionalmente, los datos sugieren que ese mar contenga bicarbonato de sodio (NaHCO_3 ; Iess *et al.* (2014)).

1.5.4 Exoplanetas

Los planetas que giran en torno a estrellas distintas al Sol, se les conoce como “exoplanetas”. En 1995, se observó por primera vez un sistema planetario fuera de nuestro Sistema Solar que se encontraba alrededor de la estrella 51 Pegasi (Mayor y Queloz, 1995). La detección de los Exoplanetas, se realiza por medio de métodos directos e indirectos, siendo estos últimos los que hasta ahora nos han arrojado un mayor número de resultados, pero conforme avanza el conocimiento y la tecnología, su detección va en aumento (Abe *et al.*, 2004).

1.5.5 Búsqueda de vida fuera del Sistema Solar

Dentro de la Astrobiología, el estudio de los exoplanetas es muy importante, pues nos indica entre muchas cosas, si el planeta tiene el tamaño adecuado para poseer atmósfera, la distancia a la que se encuentra de su estrella (zona de habitabilidad) y si cuenta con un ciclo de reciclado de capas (tectónica de placas) para poder permitir la liberación de gases a la superficie y con ello, provocar efecto invernadero, lo cual permitiría que la temperatura de su superficie esté por encima del punto de fusión del agua, y pueda estar líquida.

El 29 de Septiembre de 2010, se reportó el descubrimiento de Gliese581g, el primer planeta con tamaño similar al de la Tierra (Vogt *et al.*, 2010). Hasta el 22 de febrero de 2015, se han detectado 1890 exoplanetas (<http://exoplanet.eu/catalog/>).

1.5.6 Bioseñales

En 1993, la Tierra fue vista desde afuera por la sonda Galileo (Sagan *et al.*, 1993). Dentro de las características más importantes que se registraron, fueron: presencia

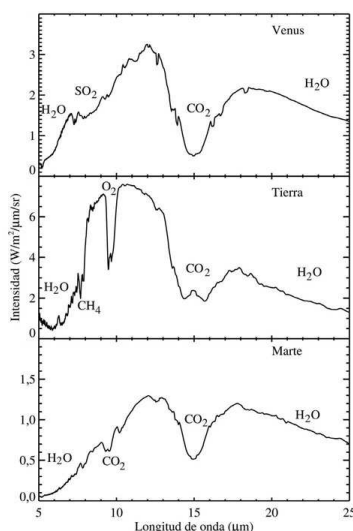


Figura 1.12: Espectros sintéticos de Venus, Tierra y Marte en el infrarrojo medio generados por el *Virtual Planetary Laboratory* (VPL). Fuente: Meadows y Crisp (1996).

de abundante Oxígeno (O_2), un extremo desequilibrio de metano (CH_3) atmosférico y una amplia distribución de pigmento superficial. Ésto indica que la Tierra posee características que son producto de la vida, y que además, se pueden detectar remotamente. La comparación de espectros entre otros planetas y el nuestro, nos muestra cómo diferenciar un mundo habitable y uno que no lo es (Figura 1.12). Con esto, surge la idea de estudiar la presencia de vida en un exoplaneta mediante la detección de bioseñales (biofirmas), las cuales pueden ser monitoreadas de manera remota (Des Marais *et al.*, 2002).

Tinetti *et al.* (2006) identifican tres tipos de bioseñales: atmosféricas, superficiales y temporales, las más estudiadas son las dos primeras. Es importante saber distinguir la diferencia entre una bioseñal que indique que un mundo es habitable, de uno que está habitado. La Tierra por ejemplo, no habría sido clasificada como un mundo habitado, aunque sí habitable durante sus primeros 2 mil millones de años (Segura *et al.*, 2007). Esto debido a que aquí había condiciones para la vida, pero estos seres vivos no producían sustancias en cantidades suficientes que pudieran ser detectadas de forma remota (Kiang *et al.*, 2007). Por ello, es importante estudiar la relación entre las reacciones bioquímicas de los organismos, y su ambiente, para así poder interpretar resultados que pudieran llegar de exoplanetas.

1.5.7 El sitio halo-alcalófilo como modelo para estudio de astrobiología

Como se ha descrito en secciones anteriores, la relación entre los organismos extremófilos y la búsqueda de vida fuera de la Tierra es muy grande. Además, uno

de los objetivos de la Astrobiología, es el estudio de los orígenes de la vida, y eso involucra a los estromatolitos, que son las evidencias biológicas más antiguas que existen actualmente. Otra relación que encontramos, es la presencia de sales en las hipotéticas aguas profundas de los satélites Europa y Encelado, este último con la presencia de NaHCO_3 . Así podremos reforzar el objetivo de estudiar sitios como los lagos de cráter, sobre todo, El Rincón de Parangueo, que cuenta con la presencia de estromatolitos, así como con un ambiente hipersalino a base de carbonatos, así, los organismos que habitan en él, podrían representar ejemplos de adaptaciones a ambientes extraterrestres (Figura 1.13). Otro ejemplo de estudios de sitios en el territorio mexicano con énfasis a la astrobiología son los estudios realizados en Cuatro Ciénegas, donde también se observa la presencia de estromatolitos (Souza *et al.*, 2004). Por otro lado, existen grupos de investigación que realizan estudios de tolerancia a sales de organismos halófilos dentro del contexto astrobiológico, simulando las condiciones que podrían existir en Encelado, Europa o Ganímedes (Ramírez *et al.*, 2013)



Figura 1.13: Sales encontradas en los bordes del lago-cráter El Rincón de Parangueo. A partir de estas zonas, se tomaron muestras para la bioprospección bacteriana.

1.6 El enfoque Astrobiológico

La Red de Asociación de Astrobiología Europea (EANA, por sus siglas en inglés: *European Astrobiology Network Association*), que actualmente representa 19 naciones con comunidades de astrobiología, realizó el proyecto AstRoMap (*Astrobiology Roan Mapping*, por sus siglas en inglés). Su objetivo fue recaudar datos sobre las actividades de ciencia y tecnología que se realizan en Europa relacionadas a la astrobiología a través de una encuesta muy específica dirigida a personas involucradas en el tema (Horneck *et al.*, 2015). Entre los resultados arrojados, destaca la investigación que se realiza con interés en objetos celestes, entre ellos, tres satelites naturales de nuestro sistema solar, específicamente Europa, Titan y Encelado (como se observa en la Figura 1.14 y se describieron anteriormente).

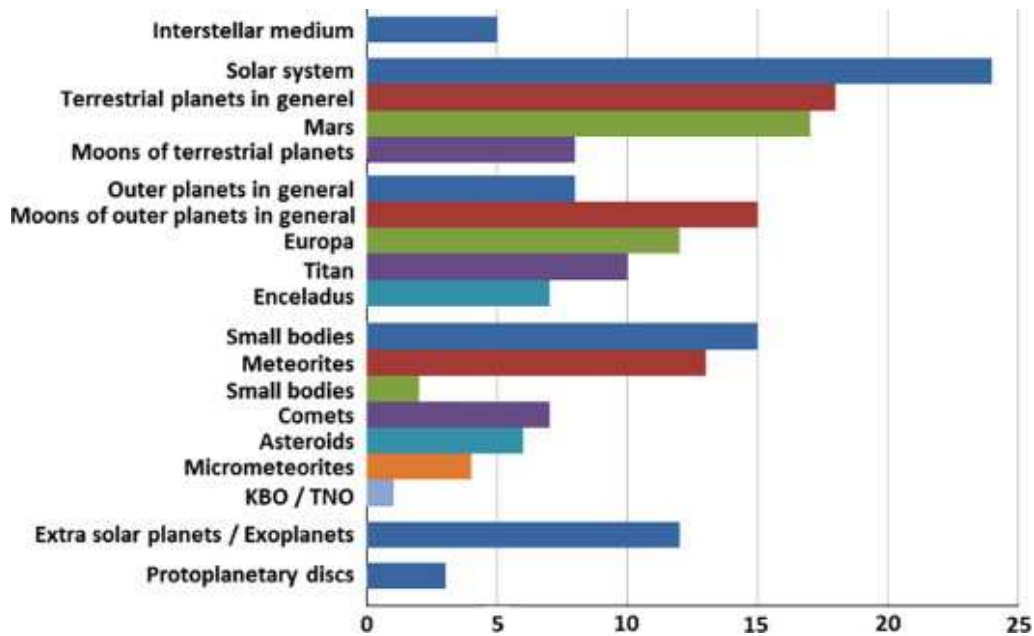


Figura 1.14: Objetos celestes investigados por la comunidad de la EANA. Tomada de Horneck *et al.* (2015).

Además, los estudios que se han realizado en astrobiología también se centran en entornos extraterrestres bajo condiciones físico-químicas poco favorables para la vida. Entre los parámetros más importantes que se consideran, según ese estudio fueron: radiación, temperaturas extremas, pH extremo, condiciones atmosféricas extremas, presión, disponibilidad de nutrientes, y disponibilidad de energía (Figura 1.15).

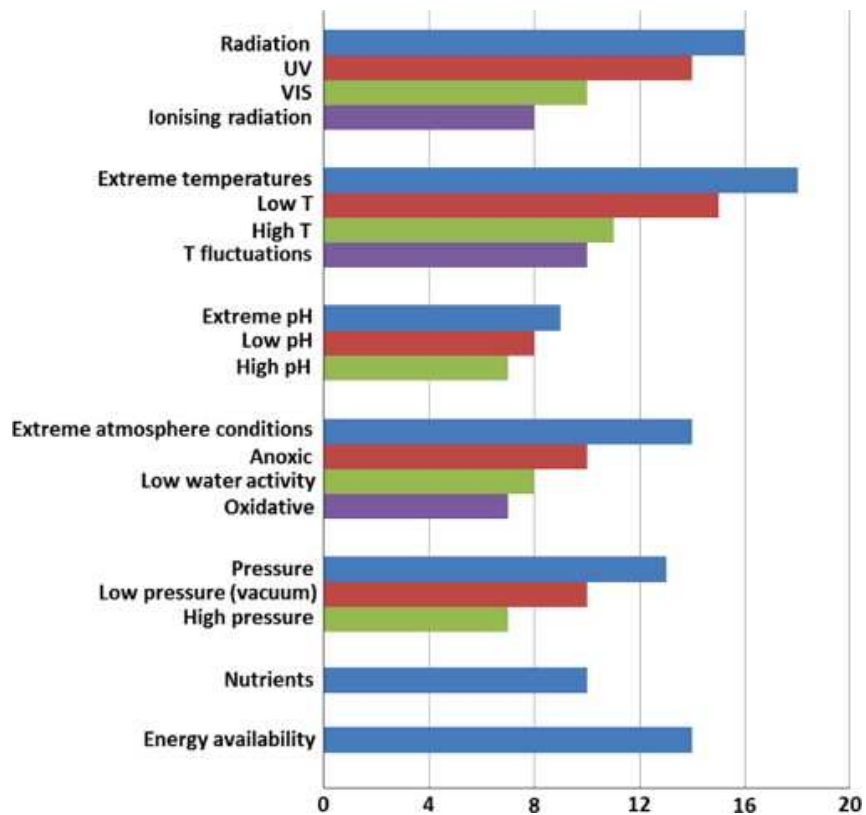


Figura 1.15: Condiciones físico-químicas de interés para la comunidad de astrobiología en Europa. Tomada de Horneck *et al.* (2015).

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN

Los sitios extremos generan un estrés físico-químico, provocando que en este ambiente se desarrollen organismos con adaptaciones muy específicas. Éstos, a su vez, representan un alto potencial para investigaciones novedosas en biotecnología, como se han observado en metodologías revolucionarias de biología molecular, donde se utilizan enzimas provenientes de organismos extremófilos. El ejemplo más claro es la enzima *TaqPol*, que proviene de *Thermus aquaticus*, la cual es utilizada en la PCR (Saiki *et al.*, 1988). Por otro lado, hay un creciente interés en Astrobiología por estos sitios, ya que asemejan condiciones que se podrían encontrar fuera de la Tierra (Horneck *et al.*, 2015).

Capítulo 3

HIPÓTESIS

Los lagos alcalinos de los cráteres del Valle de Santiago y Yuriria, a pesar de sus características extremas, pueden albergar vida bacteriana.

Capítulo 4

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar microorganismos y realizar estudio filogenético de los mismos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el sitio de muestreo respecto los parámetros físico-químicos;
- Preparar medios de cultivo distintos para aislar la mayor cantidad de microorganismos de los sitios estudiados.
- Aplicar técnicas tradicionales de cultivo para aislar los microorganismos.
- Caracterizar morfológicamente las colonias y los aislados a partir de técnicas tradicionales de microbiología.
- Obtener el ADN genómico de los aislados.
- Amplificar el gen que codifica para el ADNr 16S y enviar a secuenciar.
- Realizar estudio filogenético a partir de las secuencias obtenidas, aplicando herramientas básicas de bioinformática.

Capítulo 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestreo

Se seleccionaron tres lagos de cráteres para el desarrollo de este trabajo: Cíntora (20.38 lat. 101.20 long.), El Rincón de Parangueo (20.42 lat. 101.25 long.) y La Joya (20.20 lat. 101.13 long.) (Figura 1.9, 5.1). Se realizaron dos colectas: una en julio de 2012, de los tres lagos (el cual representó un año característicamente seco), y la siguiente, en agosto de 2013, en un periodo más lluvioso. Esta última colecta se realizó únicamente en el lago-cráter El Rincón de Parangueo.

En cada una de las colectas se obtuvieron muestras de agua y de sedimento para la determinación de parámetros biológicos y físico-químicos, además, de sedimento superficial para la bioprospección bacteriana. Las muestras se almacenaron en tubos estériles BD FalconTM de 50 ml (Figura 5.2) y el agua en frascos de vidrio con tapón (frascos ISO[®]) estériles de 1,000 ml. En el caso específico para las muestras de microbiología se utilizó soplete para garantizar su esterilidad durante el muestreo.

5.2 Caracterización físico-química

La caracterización físico-química del sitio nos arroja información importante para inferir las condiciones a las cuales los microorganismos se encuentran expuestos y a las que han tenido que adaptarse a lo largo de su evolución. Los parámetros contemplados en este trabajo fueron: salinidad, pH, temperatura y metales pesados. La determinación de los tres primeros se realizó en *in situ*, mientras que para los metales pesados se colectaron muestras para llevar al laboratorio.

La salinidad se determinó por medio de un salinómetro HANNA[®] *instruments* modelo HI 98129. Mientras el pH y la temperatura se determinaron con potenciómetro HANNA[®] *instruments* modelo HI 98130.

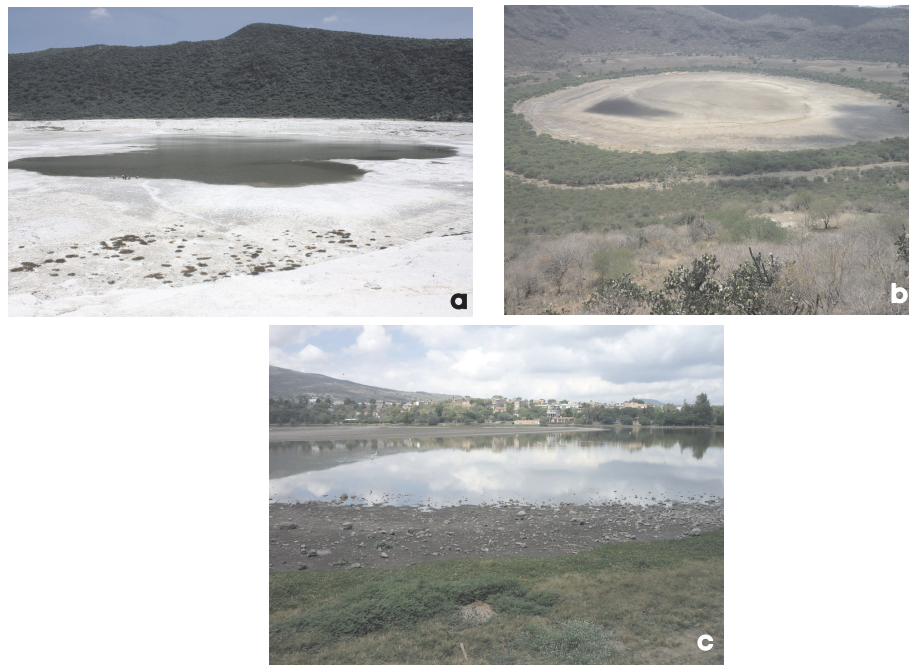


Figura 5.1: Fotografías de los tres sitios de muestreos. a. El Rincón de Parangueo; b. Lago-cráter Cíntora; c. La Joya.



Figura 5.2: Fotografía de muestra tomada en un tubo BD FalconTM en Parangueo.

5.2.1 Determinación de metales

Para la **determinación de metales**, las muestras fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil (LREPF, UFRJ). Se utilizó la metodología descrita por Malm *et al.* (1989), la cual consistió en una digestión ácida y determinación por absorción atómica de flama, y se detalla a continuación.

Se pesó 0.1 g de sedimento, se adicionaron 2 mL de HNO_3 concentrado (65%) y se digirió durante una noche (aproximadamente 18h). El extracto, se recuperó con HCl, transfiriéndolo a un vaso de teflón. Posteriormente, se digirió en baño de arena ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$), el cual llevó entre 2 y 3 horas. Se recuperó el extracto y se aforó con HCl 1M, con el cual se determinan los metales.

5.2.2 Determinación de Mercurio

La **determinación de Mercurio** también se llevó a cabo en el LREPF, siguiendo la metodología descrita por (Bastos *et al.*, 1998), ésta consistió en una digestión ácida en presencia de KMnO_4 y determinación por *FIMS (Flow Injection Mercury System)*; que se detalla a continuación. Se pesó 1 g de sedimento, se le adicionaron 2 mL de H_2O destilada y 5mL de agua-regia ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$; 3:1); Después se incubó a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 5 mL de KMnO_4 (5%) e incubó por 10 min más a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez realizado lo anterior, se dejó digerir toda la noche, a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó 1mL de $\text{NH}_2\text{OH}:\text{HCl}$ (hidroxilamina) y se aforó con H_2O milliQ un volumen conocido.

Control de calidad

Para el control de calidad analítico, se realizó un análisis de metales en triplicado y con 2 blancos analíticos los cuales contenían únicamente los reactivos. Además, conjuntamente con las muestras se procesó una muestra de referencia analítica (**Referencia IAEA 436 para metales y mercurio; Anexo 1**). La cuantificación se obtuvo comparando los datos de las muestras con los de una curva patrón (con r^2 de 0.9999).

5.2.3 Determinación de exopolisacaridos (EPS)

En el sitio de Paranguero debido a que las muestras se trataban de un posible tapete microbiano, se realizó la extracción de los exopolisacáridos (EPS) y se cuantificó el porcentaje de éstos en las muestras.

Los exopolisacáridos están compuestos por una fracción coloidal y una capsular. En la fracción coloidal, los carbohidratos y proteínas están muy débilmente asociados a los microorganismos, mientras que en la fracción capsular, estos compuestos están firmemente unidos a la biomasa. Entonces, una vez que se separa la biomasa de

la primera fracción de EPS (la coloidal), ésta debe ser almacenada, mientras que se realiza una extracción más fuerte para obtener la fracción capsular. Al final, la dos fracciones son unidas para estimar la composición de EPS de la muestra (Zhang *et al.*, 2014; Kroll *et al.*, 2014).

Para la extracción de los EPS inicialmente se pesó la muestra húmeda, la cual fue liofilizada. Con este dato se calculó el % de humedad de la muestra. La muestra liofilizada se resuspendió en 50 mL de agua MilliQ, y se agitó (en *shaker* orbital a 30 rpm) por 20 min y a temperatura ambiente; después se centrifugó durante 15 min. a 4,000g. Se separó el sobrenadante en un tubo (previamente pesado y etiquetado). Ésta se etiqueta como **fracción coloidal**. Al precipitado, que contiene la fracción capsular y celular, se le adicionó NaCl 0.35M y se incubó por 3h a 80 °C en un *shaker* orbital (a 30 rpm). Después se centrifugó (15,000g por 25 min.) separando el sobrenadante, uniéndolo con la primera fracción (sepada anteriormente, la fracción coloidal). El precipitado corresponde a la **fracción celular**. Al final, se liofilizaron las dos fracciones, las cuales fueron pesadas por medio de la determinación del peso seco de cada una y se calculó el % de EPS.

5.3 Aislamiento de los microorganismos

En todos los ambientes pueden habitar múltiples organismos, y para realizar estudios de un microorganismo en particular, es necesario separarlo de la comunidad dentro de la que se encuentra. Para tal fin se emplean técnicas de aislamiento que conduzcan a la obtención de un cultivo puro. En esta sección se describen las técnicas utilizadas en el aislamiento de los microorganismos cultivables de los sitios estudiados.

5.3.1 Medios de cultivo

En el aislamiento de un microorganismo es importante considerar las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuados que éstos requieren para su crecimiento. Debido a la dificultad de obtener estos *in vitro*, se utilizaron técnicas de cultivo para microorganismos tanto aerobios como anaerobios. Para los primeros, se llevó a cabo la siembra tradicional en placa de petri, y para los anaerobios se aplicó una técnica de tubo rodado (*roll-tube*) en atmósfera de CO₂:N₂ (Hungate, 1969).

Para la dilución de los medios se utilizaron 3 tipos de agua distinta, a) **agua destilada estéril**; b) **agua del sitio estéril**; c) **una mezcla de agua destilada con agua del sitio (1:1)**. Los pHs variaron de 7 a 10 para cada uno de los medios.

Para utilizar el agua del sitio como fuente de minerales ésta debe ser esterilizada por 2 horas, con intervalos de 24 horas, durante 3 días seguidos. Ese procedimiento disminuye la posibilidad de que el medio contenga microorganismos, mismos que resistan a temperaturas altas y los que produzcan esporas. Adicionalmente, antes del uso de esta agua como medio, ella fue filtrada (con filtro biológico de 0.25 μm de diámetro de poro).

Aislamiento de los microorganismos aerobios

Las siembras para el aislamiento de los microorganismos aerobios fueron realizadas sobre placa de petri y medios de cultivo ricos tradicionales, normalmente utilizados para el aislamiento de bacterias entéricas y heterotróficas totales, que fueron: LB, YPS, TSA y R2A.

LB (Luria Bertani; Miller (1972)) – Para preparar 1L de este medio, se agregaron: 10 g de bacto-tryptona, 5 g de extracto de levadura, y 10 g de NaCl.

YPS – Para preparar 1 litro de medio pesaron: 3 g peptona bacteriana, 3 g extracto de levadura, 2 mM CaCl_2 , y 2 mM MgSO_4 .

R2A – Para preparar 1 litro de este medio se pesaron: 0.5 g de extracto de levadura, 0.5 g de peptona (proteasa), 0.5 g de casaminoácidos (triptona), 0.5 g de dextrosa (glucosa), 0.5 g de almidón soluble, 0.3 g de piruvato de sodio y, 0.3 g de K_2HPO_4 .

TSA – Para preparar 1 litro de este medio se pesaron: 15 g de Triptona, 5 g de Peptona de soya, 3 g de Extracto de levadura, 5 g de Glucosa y 5 g de NaCl.

En el caso de una preparación de medio sólido se adicionaron entre 15 a 20 g de agar bacteriológico de acuerdo al medio en preparación. Se controló el valor de pH con NaOH o HCl, y se esterizaron los medios en autoclave (121 Psi de presión) durante 20 minutos.

Aislamiento de microorganismos anaerobios

Roll-tube – La técnica de *roll-tube* o tubo rodado fue desarrollada por Hungate (1969) y es equivalente a la siembra en placa de Petri, sólo que para cultivos anaerobios. Esta técnica permite el aislamiento de las colonias en un tubo sellado bajo una atmósfera reducida. Con ella es posible obtener una fina capa de medio sólido (de agar bacteriano) distribuida uniformemente sobre la pared interior del tubo, sobre la cual se desarrollan las colonias con una atmósfera completamente anaerobia (N_2 o CO_2 , o mezcla de estos; Figura 5.3). A pesar de que se trata de una metodología un tanto tediosa, el *roll-tube* aún sigue siendo una de las mejores técnicas para el aislamiento de los microorganismos que requieren condiciones anóxicas estrictas, o sea, con potencial redox inferior a 300 mV (Wu *et al.*, 2014). Para los cultivos anaerobios únicamente se utilizó el medio R2A.

A continuación se detallan los procedimientos a seguir tomados en el *roll tube*.

- En tubos Hungate[®] de 22 mL y para un volumen final de 10 mL de medio de cultivo sólido, se pesaron 0.3 g de agar bacteriano (previamente lavado). A éstos se les adicionaron 5 ml de agua destilada. Éstos fueron sellados con tapones azules de butilo, y se lacraron con sellos de aluminio (Figura 5.4).



Figura 5.3: Muestra de colonias aisladas mediante la técnica de *roll tube*.

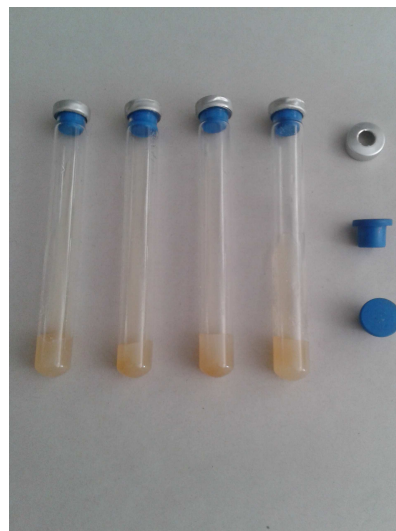


Figura 5.4: Tubos Hungate[®], tapones de butil y lacres de aluminio utilizados para el *roll tube*.



Figura 5.5: Desgasificación de tubo Hungate[®].

Posteriormente, se esterizaron en autoclave (121 Psi de presión a 20 minutos). Una vez que salieron de la autoclave se deben mantener todos los tubos en baño maría (para que no se solidifique el agar).

- Independientemente, en frascos de penicilina de 120 mL, se preparó el medio R2A, para el cual se utilizó agua del sitio estéril; y se reesterilizó en autoclave (121 Psi de presión a 20 minutos). Una vez que salió de la autoclave, se desgasificó el medio con atmósfera de N_2 por 2 minutos.
- También se prepararon frascos estériles vacíos, y con atmósfera anaerobia para las diluciones. Se utilizó el medio descrito arriba para preparar diluciones de las muestras (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), y se apartaron.
- A los tubos de Hungate[®] con agar los cuales fueron mantenidos en baño maría, se les cambió la atmósfera para una mezcla de $N_2:CO_2$ (80:20) burbujeando ese gas durante 1 minuto; para después adicionar 5 mL del medio R2A anaerobio (Figura 5.5).
- Mediante jeringas con agujas hipodérmicas estériles y, manteniendo un burbujeo constante de la mezcla $N_2:CO_2$, se inoculó cada uno de los tubos Hungate[®] con 50 μ L de la muestra. Cada tubo con una de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (previamente preparadas)
- Finalmente, una vez inoculado el tubo, éste se rodó (de forma horizontal) dentro de un recipiente con agua y hielo para que el agar pudiera solidificarse formando una capa homogénea y delgada sobre las paredes internas del tubo (Figura 5.6).



Figura 5.6: Enfriamiento de tubo Hungate[®] mediante el rodado dentro de un recipiente con hielo.

- Se dejó a incubar por 7 días a 37 °C.
- Una vez crecidas las colonias, las mismas fueron recuperadas y transferidas a medio líquido. Eso se hizo en una bolsa de anaerobiosis con atmósfera de N₂ (Figura 5.7).



Figura 5.7: Bolsa de anaerobiosis.

Agar semisólido – Hay algunas bacterias que no son capaces de desarrollarse en medio completamente anaerobio ni tampoco aerobio, ellas necesitan de un ambiente microaerófilico. Con la finalidad de prospectar dichas bacterias se utilizó la técnica del agar semisólido, que se describe a continuación.

- Inicialmente se prepararon las diluciones de las muestras en medio líquido, tal como se describió anteriormente en la técnica de Hungate (1969) y, se almacenaron.
- Para hacer el agar semisólido primero se pesaron 3 g de agar bacteriano en botellas de 1 L, y se lavó con agua destilada, como se describe: se llenó el frasco con agua destilada, se esperó 1 h para que el agar se decante, se eliminó el agua sobrenadante con sifón y se repitió el procedimiento 5 veces (o hasta que el agar esté blanco). Al final se aforó el frasco a 100 mL y se esterilizó en autoclave (121 Psi de presión) durante 20 minutos.
- Inmediatamente que salió el agar de la autoclave, se tomó, en condiciones de esterilidad, una alícuota de 3 ml del agar, los cuales se transfirieron para tubos estériles de tapa rosqueada de volumen final 11 mL.
- A continuación, se le adicionaron a cada tubo 6 mL de medio de cultivo R2A y 1 mL de inóculo (ya diluida previamente).
- Se virió el tubo varias veces para homogeneizar la muestra (suavemente para no formar borbuja).
- Después, se pasó a la siguiente dilución, hasta 10^{-6} .
- Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente y en presencia de luz natural.
- Una vez crecidas las colonias, las mismas fueron recuperadas y transferidas a medio líquido.

Diluciones seriadas en medio líquido. – Las muestras de agua tomadas del lago El Rincón de Parangueo, fueron dejadas a temperatura ambiente y expuestas a luz natural. Después de 1 mes bajo estas condiciones, tornaron a una coloración rosa, probablemente por el desarrollo de bacterias fototróficas. En el intento de aislar estos microorganismos, se utilizó la técnica de dilución seriada en medio líquido bajo condiciones anaerobias. En este caso, se utilizó un medio específico para bacterias sulfato-reductoras (Balch *et al.* (1979); **Anexo 2**), el cual se modificó adicionando $\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ y NaHCO_3 (modificado de Alazard *et al.* (2003); **Anexo 3**).

- Una vez preparado el medio, se procedió a llenar los tubos Hungate[®] con 18 ml de ese medio. Se sellaron los tubos con tapón azul de butil y con lacre de aluminio. Después, se esterizaron en autoclave (121 Psi de presión) durante 45 minutos.
- Al salir de autoclave, y aún caliente, se desgasificaron los tubos con N_2 durante 2 minutos.

- Una vez fríos, se etiquetaron los tubos (con sus respectivas diluciones) y al primer tubo (dilución 10^{-1}) se agregaron 2 ml de la muestra, se vortexó y de ese mismo tubo, se toman 2 ml para inocular al siguiente tubo (dilución 10^{-2}), y así sucesivamente hasta llegar a la dilución planeada, en este caso fue hasta 10^{-15} . De cada dilución se prepararon tres réplicas.
- Se desgasificaron todos los tubos con la mezcla de $N_2:CO_2$ (80:20%) durante 2 minutos.
- Finalmente, se colocaron en incubadora a una temperatura de 30 °C para estimular el crecimiento del cultivo, y sobre luz artificial.
- Pasando 15 días, se tomó una alícuota de cada cultivo y se observó a través de microscopio óptico de campo claro (con aumento de 1,000 X), partiendo del tubo con la dilución mayor (10^{-15}) para los de menor dilución, hasta observar un tubo con crecimiento bacteriano. Se tomó como aislado positivo el tubo que estuvo inmediatamente antes del negativo.

Recuperación de las colonias en bolsa de anaerobiosis. – Para la recuperación de colonias obtenidas a partir de la técnica de *roll-tube*, así como, toda la manipulación de los microorganismos anaerobios, se utilizó una bolsa de anaerobiosis con atmósfera de N_2 . Para ésto se debe tener todo el material preparado y listo que se va a utilizar dentro de la bolsa, al igual que el medio de cultivo líquido con frascos estériles y desgasificados donde se recuperarán las colonias (Figura 5.8). Una vez inflada



Figura 5.8: Bolsa de anaerobiosis con la preparación de material utilizado para la recuperación de las colonias logradas mediante *roll tube*.

la bolsa, se debe realizar, por lo menos, tres purgas para asegurar una atmósfera anaerobia.

Una vez preparada la bolsa:

- Se llenaron los frascos con aproximadamente 5 ml de medio;
- Se abrió cuidadosamente el tubo donde se encuentran las colonias que se van a recuperar;
- Con ayuda de una espátula (o pipeta pasteur) esterilizada con alcohol al 96%, se tomó, con mucho cuidado, la colonia aislada, que se encontraba sobre la superficie de la pared interna del tubo, y
- Se le transfirió para el frasco con medio líquido (Figura 5.9);



Figura 5.9: Transferencia de una colonia recuperada del *roll tube*, a un frasco con medio estéril dentro de una bolsa de anaerobiosis.

- Se selló con tapón azul de butil.
- Al salir de la bolsa, se cambió la atmósfera de los frascos para una con mezcla de $N_2:CO_2$ (80:20%).

Este procedimiento se repitió para todas las colonias individualmente. Es importante que las colonias estén claramente separadas para asegurar su aislamiento.

Al concluir con la recuperación de todas las colonias, se agrega una mayor cantidad de medio de cultivo líquido a los frascos. Ésto sirve para tener menos espacio de atmósfera en los frascos, impidiendo la entrada de oxígeno, y al mismo tiempo, para obtener una mayor biomasa al momento de que haya crecimiento.

Se incubaron a temperatura ambiente y en contacto directo con luz natural, hasta obtener una buena cantidad de biomasa para proceder a la extracción de ADN.

5.4 Caracterización microbiológica de los aislados

Una vez que se obtuvieron los aislados, éstos fueron catalogados en relación a la morfología de la colonia y de la célula.

5.4.1 Morfología de colonias

Se observó la morfología de las colonias a través de la placa sembrada con el aislado. En dicha descripción se debe incluir:

Tamaño – el diámetro aproximado de la colonia (en mm).

Forma – es la apreciación general de su figura, puede ser: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme.

Elevación – ésta puede ser: plana, elevada, convexa, monticular, umbeliforme, umbilicada.

Borde o margen – se refiere al contorno de las colonias, y puede ser: entero, ondulado, lobulado, crenado, filamentoso o rizado.

Color – puede ser: Blanco, amarillo, negro, marrón, naranja, etc.

Superficie – Lisa o rugosa.

5.4.2 Morfología de células

La forma de las bacterias fueron observadas al microscopio óptico de campo claro (modelo Primo Zeiss). Éstas básicamente, se diferencian según su forma en **cocos** (esféricas u ovaladas), **bacilos** (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y **espirilos** (espiral).

5.4.3 Fisiología de los microorganismos

Catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos, la cual cataliza la disminución del peróxido de hidrógeno H_2O_2 (al 30%) en agua y oxígeno. Para realizar esta prueba se debe tomar una colonia de crecimiento reciente colocándola sobre un porta objetos, se le agrega una gota de agua oxigenada al 30 % y observa la presencia de burbujas. Si éstas aparecen, el microorganismo se cataloga como catalasa positivo.

Tinción Gram

Esta técnica es de gran importancia en microbiología debido a que permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias (las Gram+ y de las Gram-), según se comporten ante esta tinción. El fundamento radica en la diferenciación estructural de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram+ tienen una gruesa capa de

peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram- tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa de lípolisacáridos externa.

Para la aplicación de esta prueba se debe extender una gota de la muestra (de siembra reciente) con el asa sobre un portaobjetos. Si fuera de cultivo en placa, se diluye la colonia en una gota de agua destilada estéril. Se deja el porta objeto al lado del mechero, para que se evapore al agua y para que la muestra se distribuya uniformemente sobre el portaobjeto formando una capa delgada. Posteriormente, se fija la muestra pasando el portaobjetos por encima de la llama del mechero (más o menos a 15 cm de la flama, para que no se quemen y carbonizen las células).

En seguida, se prepara la tinción como sigue:

- Se añade cristal violeta y se deja reposar entre 1 y 2 minutos la muestra;
- Pasando este tiempo se debe lavar con alcohol (95%) para eliminar el exceso de colorante.
- El siguiente paso, es añadir lugol y esperar 1 minuto;
- Pasado este tiempo, se lava con alcohol al 70% para eliminar el exceso de colorante.
- Después de realizar el procedimiento anterior, se decolora la muestra agregando etanol-acetona 50% v:v dejando durante 30 segundos reposar;
- Se lava con agua destilada.
- Finalmente se añade safranina y pasando 1 minuto de reposo, se lava la muestra con agua destilada y se deja secar
- Después se puede observar a microscopio.

KOH 3 M Gram

Esta prueba es utilizada para confirmar la tinción Gram. Debido a algunas complicaciones que presenta la tinción Gram, por ejemplo, el uso de células frescas, se innovó esta técnica, que de igual forma, hace la diferencia entre bacterias Gram+ y Gram-.

Para llevar a cabo esta técnica, se debe colocar una colonia sobre un porta objetos (no necesita ser fresco). Se añade una gota de KOH 3M en la parte superior de las células dejando reposar por 1 minuto. Si se forma un líquido celular viscoso, la prueba arroja como resultado una bacteria Gram- (Buck, 1982).

5.5 Caracterización molecular de los aislados

5.5.1 Extracción de ADN

En este trabajo se utilizaron dos técnicas para la extracción del ADN total de las muestras, las cuales se describen a continuación.

Técnica tradicional, modificado Tsai y Griffiths

Ésta técnica a pesar de ser una muy laboriosa, aún sigue siendo muy utilizada, debido a que muchas veces resulta más eficiente que algunos kits comerciales de extracción de ADN total (Tsai y Olson, 1991).

En esta técnica se utiliza tanto la lisis mecánica, térmica y química para destruir la pared celular. La primera etapa consiste en la lisis de la membrana celular: en este caso se utilizó lisoenzima, acromopeptidasa, proteinasa K y SDS. Todas actúan en conjunto y en condiciones óptimas de actividad para la ruptura de la membrana tanto para bacterias Gram+ como Gram-. En esta etapa se liberan muchas proteínas, las cuales deben de ser eliminadas. Consecuentemente, se realiza un tratamiento con Fenol (estabilizado y de pureza para biología molecular), Cloroformo y Alcohol Isoamílico. Los ácidos nucleicos obtenidos de esta forma, son en seguida precipitados con etanol y acetato de sodio (3M). El procedimiento se detalla en el **Anexo 5**.

Kit comercial ProMega®.

Se utilizó *Wizard*® *Genomic DNA Purification Kit* (número de catálogo #A1120) para extraer ADN de algunas de las cepas, utilizando el procedimiento sugerido por el proveedor, que a continuación se describe:

- Una vez obtenido el precipitado de células, éste se resuspende en EDTA (50mM) para estabilizar el pH de la muestra.
- Se agregó una solución de enzimas líticas (para el caso de bacterias Gram+) y se incubó a 37 °C por 30 minutos;
- Una vez realizado esto, se centrifugó durante 2 minutos a 13,400 rpm y se eliminó el sobrenadante;
- Se le añadió la solución *Nuclei Lysis Solution*, pipeteando suavemente para obtener una mezcla homogénea.
- Después, se incubó por 5 minutos a 80 °C.
- A continuación, se le agregó la solución *RNase Solution*;



Figura 5.10: Masa de ADN formada después de realizar inversiones suaves del tubo eppendorf[®].

- Se mezcló vertiendo manualmente el tubo por 5 veces, y se incubó durante 15 a 60 minutos a 37 °C.
- Se le añadió la solución *Protein Precipitation Solution* y se vortexeó a máxima velocidad.
- Para eliminar las proteínas, se incubó en hielo por 5 minutos, para después centrifugar a 13,400 rpm.
- Se recuperó el sobrenadante (que es donde quedó suspendido el ADN) y;
- Se transfirió a un tubo eppendorf[®] nuevo, que contenía una solución de **isopropanol**.
- Se mezcló (suavemente) el tubo hasta la formación de una masa visible (Figura 5.10).
- Posteriormente, se centrifugó el tubo a 13,400 rpm.
- Cuidadosamente, se eliminó el sobrenadante con ayuda de una pipeta (pero, evitando tocar las paredes del tubo que es donde queda adherido el material genético).

- Se agregó al tubo **etanol** al 70% para lavar la muestra.
- Se centrifugó nuevamente el tubo a 13,400 rpm, para posteriormente eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
- Se dejó secar el etanol restante durante 10 a 15 minutos, dejando el tubo abierto.
- Finalmente, se añadió la solución ***DNA Rehydration Solution***;
- Se dejó incubar la muestra por 1 hora a 65 °C.
- Pasando este proceso, se dejó incubar la muestra durante toda la noche a 4 °C.
- El ADN debe mantenerse de 2 a 8 °C.

Se realizó una electroforesis para verificar el ADN genómico extraído. Como anteriormente se ha mencionado, dependiendo el tamaño del material genético que se desea observar, se utiliza una concentración específica de la agarosa. En este caso, se preparó un gel de agarosa al 0.5% y se dejó correr la muestra a una potencia de 65 volts por 45 minutos.

5.5.2 Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas cargadas a través de una matriz porosa. Los materiales más comunes utilizados en la preparación de la fase sólida son compuestos poliméricos, como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cámara (de electroforesis), sumergidos en una fase móvil, que es un tapón también cargado (TAE o TBE con pH alrededor de 8). Se aplica la muestra en el gel; cuando éstas son sometidas a un campo eléctrico, los componentes cargados de la muestra se separan en función de su tamaño y debido a la interacción de éstos con la matriz sólida, migran hacia el polo positivo.

Para separar ADN total, cuyo tamaño es de al rededor de 5 Mpb para una bacteria (Madigan *et al.*, 2004), se utiliza un gel a una concentración de 0.5 a 0.8 % de agarosa. Para separar fragmentos de aproximadamente de 1500 pb, como por ejemplo, el gen ADNr 16S se utilizan geles de 1 a 1,2 % de agarosa. Para separar fragmentos menos que 400 pb, por ejemplo, los productos de restricción enzimática, se suelen utilizar concentraciones al 3 %.

En el **Anexo 4** se describen las condiciones de electroforesis utilizadas en este trabajo y detalles de la preparación de tapones TAE y TBE, del tapón de carga y de los geles.

5.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de segmentos de genes se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). Esta consiste en preparar una mezcla reaccional conteniendo dNTPs, los oligonucleótidos, el ADN molde, la enzima de polimerización y sus tampones. Los dNTPs son una mezcla comercial que contiene las cuatro bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina y Timina); los oligonucleótidos son pequeños fragmentos de aproximadamente 10 pb que normalmente se alinean con las regiones conservadas del ADN y son ellos los que limitan el inicio y final del fragmento que se desea amplificar; la polimerasa es la enzima que va a llevar a cabo la reacción de elongación de la cadena molde del ADN y normalmente necesita de tapones y condiciones reaccionales específicas que dependen de la marca comercial; y el ADN molde, es el material genético que contiene el gen que se desea amplificar.

Las condiciones de amplificación van a depender del fragmento que se desea obtener y también de las características de los oligonucleótidos que están siendo utilizados. Se aplican tres temperaturas básicas en una PCR las cuales se repiten periódicamente: la primera es la temperatura de desnaturalización para la apertura de las dos hebras del ADN molde, la segunda se relaciona con la temperatura de alineamiento (T_a) de los oligos, es decir, es la temperatura en la que los oligonucleótidos se alinean a la cadena molde y, la tercera que se refiere a la temperatura ideal de la polimerasa. El equipo que se utiliza para llevar a cabo esta reacción es un termociclador y existen varias marcas disponibles en el mercado.

Condiciones de la PCR para la amplificación del gen ADNr 16S – Los ARNs ribosomales (ARNr) son componentes esenciales en la fisiología celular. Estos componentes se integran de modo específico con las proteínas para formar las subunidades de los ribosomas que actúan en la síntesis de proteínas. Los ARNr son el principal producto de transcripción en cualquier célula, constituyendo generalmente de 80 a 90 % de la masa del ARN total de procariontes y eucariontes (Lewin y Dover, 1994).

En la década de los 80's se demostró que ciertas regiones de genes que codifican los ARNr presentan una conservación significativa de secuencias, tanto en procariontes como en eucariontes. Esas regiones conservadas entre organismos filogenéticamente distantes, se encontraron dispersas dentro de regiones con bajo porcentaje de similitud entre sus secuencias (Ware *et al.*, 1983). Esta es la razón por la cual este grupo de genes han sido de gran importancia para la aplicación de análisis filogenéticos, y al mismo tiempo, de estudios evolutivos. El gen que codifica para el ARNr 16S, de las bacterias, presenta un tamaño aproximado de 1,500 pb (Russo-Matioli, 2001). En este trabajo, se utilizó la secuenciación de este gen, para realizar el análisis filogenético de los aislados.

Para la amplificación del gen ADNr 16S, se utilizaron los oligonucleótidos 8F y 1513R (Tabla 5.1) de la marca Sigma[®] y la enzima polimerasa utilizada fue de la marca Fermentas[®]. La mezcla reaccional se preparó siguiendo las sugerencias del

proveedor (**Anexo 6**).

El protocolo aplicado en el termociclador para la PCR consistió primeramente, en aplicar un calentamiento (94 °C por 5 minutos) para desnaturalizar el material genérico; en secuencia, se siguió la aplicación de 32 ciclos con tres distintas condiciones de temperatura:

- La primera, etapa de desnaturalización, se calentó a 94 °C por 45 segundos;
- La segunda, de alineamiento, se calentó a 55 °C por 45 segundos; y
- En la tercera, la extensión, a 72 °C por 30 segundos. Esa es la temperatura óptima para la acción enzimática de la *Taq* polimerasa.

Finalmente, después de los 32 ciclos, se aplicó una última temperatura de extensión (a 72 °C) por 10 minutos más.

La temperatura de alineación de los oligonucleótidos está en función de la cantidad de las bases púricas y pirimidínicas. Se puede calcular a partir de la fórmula: $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$ °C; mientras la temperatura para alinear en la PCR se calcula: $T_a = T_m - 4$ °C. Algunas veces, la temperatura calculada a partir de la T_m no funciona, y la PCR no produce los amplicones. En estos casos, se realizó la PCR con un gradiente de temperatura con rango de 14 °C (7 °C mayores a la T_a y 7 °C menores a la T_a ; Figura ??).

Una vez verificando la calidad de los amplicones, el producto de PCR debe ser purificado, para eliminar los reactivos de la mezcla reaccional que no participaron de la PCR. En este estudio se utilizaron para purificar los productos de la PCR el kit comercial *Illustra GFX DNA and Gel Band Purification kit GE*[®], siguiendo las sugerencias del proveedor (**Anexo 7**).

Electroforesis para verificar el gen ADN_r 16S

Se utilizó una electroforesis para verificar si la PCR había funcionado, si el amplicon producido fue del tamaño deseado, si éste consistió de una única banda, y también para inferir (indirectamente) su concentración aproximada. Para esa electroforesis, se preparó un gel de agarosa entre 1.2 a 1.5% en TAE (1X), se aplicaron 5 μ L del producto de la PCR y se dejó correr la muestra a una potencia de 65 volts por 45 minutos (Figura ??).

PCR para la reacción de secuenciación

En la secuenciación se utiliza el método de Sanger, el cual se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica, que es marcada por una base nitrogenada fluorescente (Prober *et al.*, 1987). Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles los cuales se puedan distinguir entre sí, debido al tipo de marcaje que lleva el último nucleótido de una determinada reacción. Después, la muestra es sometida a una electroforesis capilar con detector de fluorescencia.

Tabla 5.1: Oligonucleótidos utilizados durante el presente trabajo.

Oligo	Especificidad	Secuencia 5' \implies 3'	Posición	Referencia
8F	Bacteria	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8–27	Lane (1991)
536F	Bacteria	GTGCCAGCMGCCGCGGTAATWC	515–536	Lane (1991)
907R	Universal ¹	GCCCCGTCAATTCMTTTRAGTTT	930–907	Lane (1991)
1513R	Bacteria	ATCGGYTACCTTGTACGACTTC	1513–1489	Weisburg <i>et al.</i> (1991)

¹ Tanto Arqueas como Bacterias. M=A/C; R= A/G; W=A/T; Y=C/T

Una vez obtenido el gen blanco, que en este caso fue el gen que codifica para el ARNr 16S, ese fue purificado y enviado a secuenciar en el LANGE BIO – CINVESTAV, Irapuato. En esa etapa, se utilizaron los amplicones (de aproximadamente 1,500 pb) como molde para una segunda PCR. En esa PCR, en la mezcla reaccional además del reactivo “dNTPs”, se utiliza una mezcla donde cada una de las bases nitrogenadas están marcadas fluorescentemente. También, se adiciona un único oligonuclido, y los 32 ciclos de la PCR se redujeron a 20. En la Tabla 5.1 se lista los oligonuclidos utilizados en ese trabajo.

5.6 Análisis filogenético y herramientas estadísticas utilizadas

5.6.1 Eliminación de quimeras

Se utilizó el software libre *pintail*. Dentro de éste, se coloca en la ventana correspondiente, la secuencia problema y se compara, primero contra la secuencia de una bacteria tipo, y después contra la secuencia de una clona. Tanto la secuencia de la bacteria tipo, como la de la clona, se obtienen a partir de un análisis BLAST en el sitio NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). El programa señala en rojo si hay una gran probabilidad de que la secuencia sometida sea una quimera; en amarillo si la secuencia tiene algunas anomalías; y en verde, si no hay probabilidad de ser una quimera.

5.6.2 BioEdit

Los resultados de secuenciación se obtienen en formato *.ab1*, los cuales son analizados y editados por medio del software libre *BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.0*. En este programa se puede observar la calidad de la secuencia. Cada base se observa como una curva gaussiana. Éstas deben estar bien delimitadas identificando una única base, y no deben estar muy cercana a la línea base. Con Bioedit se elimina la región inicial de la secuencia que pertenece al oligonucleótido utilizado en la segunda PCR, así como, las últimas bases, las cuales normalmente se presentan muy pequeñas, próximas a la línea base (es donde el proceso de secuenciación deja de ser eficiente).

Con éste mismo software, también se puede generar la copia de la tira complementaria reversa. Finalmente se realiza la unión de las secuencias *forward* y *reverse*. Primero se alinearon, y después se hace el *contig*. Las secuencias obtenidas se deben guardar en un archivo *.FASTA* o *.txt* para su posterior procesamiento.

5.6.3 BLAST

Una vez con las secuencias *contig* éstas se utilizan para encontrar las cepas ya clasificadas y catalogadas. Por lo que se compararon las secuencia *contig* de este trabajo con las secuencias de cepas tipo depositadas en el banco de datos *on line* el NCBI, siguiendo los pasos que a continuación se describen:

Primero, en el sitio del NCBI se realiza un BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) depositando la secuencia *contig* en la ventana. En la página se selecciona:

- *Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)*
- *Align two or more sequences*
- *16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)*
- *Sequences from type material*
- *Optimize for Highly similar sequences (megablast)*

El programa enlista las cepas tipo más similares a la secuencia depositada, el número de *Accesion* de la cepa tipo (el código de referencia), el tamaño de la secuencia sometida, la relacion y porcentaje de identidad de las secuencias comparadas y si éstas están en la misma dirección (*Plus/Plus*) o en dirección reversa (*Plus/Minus*). En caso de que la secuencia esté *Plus/Minus* hay que solicitar la dirección inverso complementaria de la secuencia *contig*, por ejemplo en Bioedit. En esta página, haciendo click en el número de *Acceso* de la cepa tipo nos lleva a otra página con los datos de ella. Debemos verificar las características de la cepa, su filogenia, donde fue colectada, y si realmente es una cepa de colección. En caso que no sea, se busca la secuencia de la cepa de referencia en la página de *List of Procariotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN; <http://www.bacterio.net>), la cual contiene todas las cepas de referencia del *Bergeys Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (BMSAB).

Así se organiza un nuevo archivo, FASTA con todas las secuencias *contig* y las secuencias de las cepas de referencia en un archivo *.txt*

5.6.4 Mafft

Una vez con las secuencias *contig* y las secuencias de las cepas de referencia más similares, se utiliza un programa para alinearlas. Hay varios programas que hacen el alineamiento de múltiples secuencias, como MEGA5 , Bioedit, Mothur, Mafft,

ClustalW, etc. Aquí se utilizó Mafft, un programa de línea de comando del sistema operativo LINUX. Éste realiza de forma rápida y concisa el alineamiento de múltiples secuencias basado en un método de transformada de Fourier para la detección de segmentos homólogos (Kato y Standley, 2013).

Los comandos son:

```
% mafft [arguments] input > output
```

La salida es un archivo *.txt* con las secuencias alineadas.

5.6.5 MEGA5

MEGA, por sus siglas en inglés *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, es el software más usado para construir árboles filogenéticos, ya que al generarlos, incorpora información evolutiva. Por ejemplo, se puede considerar, en el cálculo de la matriz la cual se utilizará en la construcción del árbol filogenético, datos de divergencia de separación evolutiva y tasa de evolución molecular.

Para construir el árbol filogenético, se copiaron las secuencias del archivo de salida del mafft (con las secuencias alineadas), en un nuevo archivo de MEGA. Lo primero que se hizo fue cortar los extremos, a modo de analizar con MEGA únicamente el fragmento de las secuencias que realmente están alineadas. Después, la calidad del alineamiento fue verificada visualmente antes de solicitar la construcción de la matriz de distancia.

En seguida, se solicitó la construcción de la matriz de similitud, seleccionando las condiciones para evaluar la distancia evolutiva. Haciendo click en el icono ***Distance***, se abren las opciones de cálculos:

- *Distance*
- *Comput Pairwise Distances*
- *Variance estimation method – bootstrap*
- *Substitution model – Nucleotide*
- *Method* – hay 4, que son:
 - p-distance,*
 - Jukes-cantor,*
 - Kimura2-parameters,*
 - Tajima-Nei,*
 - Tamura3-parameter,*
 - Tamura-Nei, y*
 - Maximum composite likelihood*

y las opciones de métodos estadísticos para la construcción de los árboles son:

- *Construct/Test Maximum Likelihood Tree*
- *Construct/Test Neighbor-Joining Tree*
- *Construct/Test Minimum-Evolution Tree*
- *Construct/Test UPGMA Tree*
- *Construct/Test Maximum Parsimony Tree*

Se utilizó el método de máxima verosimilitud, bootstraps de 1,000 repeticiones, y el modelo de Jukes-Cantor.

Capítulo 6

RESULTADOS

6.1 Caracterización del sitio

Los sitios seleccionados para este estudio fueron tres lagos de cráteres volcánicos localizados en el Valle de Santiago y Yuriria, Guanajuato: Cíntora, El Rincón de Parangueo y La Joya. Cada uno de estos sitios presenta características peculiares por lo cual fueron elegidos para su análisis, tales como: pH, concentración de metales, y sobre todo su aislamiento geográfico. Se realizaron dos colectas: Una en julio de 2012, el cual representó un año característicamente seco, y la siguiente, en agosto de 2013. La última se realizó únicamente en el lago de cráter El Rincón de Parangueo, ya que no se habían logrado aislar microorganismos de ese sitio en el año anterior.

De los tres cráteres estudiados, en el cráter de Cíntora por tratarse de un lago de temporada, no presentaba agua y se colectó el sedimento húmedo (en la época del primer muestreo, junio 2012); para este sitio no se determinaron los parámetros físico-químicos. Los lagos analizados (de La Joya y de El Rincón de Parangueo) pudieron ser caracterizados como alcalinos, con valores de pH 9.5 y 11, respectivamente (Tabla 6.1). La temperatura superficial del agua, en el día de la colecta, fue de 25 °C. Respecto a la salinidad, se puede clasificar el lago de Parangueo como un lago hipersalino. El lago de La Joya no lo es.

Para las muestras de sedimentos se determinó la concentración total de Hg, Zn, Fe, Pb, Ni, Cu, Cr y Mn (Tabla 6.2). Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Radioisótopos Eduardo Penna Franca de la Universidad Federal de Rio de Janeiro,

Tabla 6.1: Caracterización físico-química del sitio.

Parámetro	Temperatura (°C)	Salinidad (%)	pH	Observación
La Joya	25	1.70 ± 0.2	9.48	–
Cíntora ¹	–	–	–	Seco
Parangueo	25	12.2	11.16	–

¹ En el caso de Cíntora no hay datos, debido a que el lago se encontraba seco.

Tabla 6.2: Concentración de metales pesados (mg kg^{-1})

Metal	Sitio de muestreo			Referencias ^a		
	La Joya	Cíntora	Parangueo	Europa ¹	EUA ²	Global (cp ^b)
Hg	13.094 (± 3.12)	28.87 (± 4.12)	13.901 (± 4.44)	0.037(<1.35)	0.75(<3)	0.1
Zn	44.485 (± 0.86)	48.464 (± 1.13)	61.133 (± 11.98)	48(<2,270)	56.5(<6,173)	62
Fe	35,189.036 (± 8736.47)	21,069.457 (± 2898.92)	75.503 (± 9.41)	–	–	54,055 ³
Pb	51.235 (± 14.73)	6.180 (± 1.72)	24.153 (± 1.73)	15(<886)	10.1(<1,650)	25
Mn	428.037 (± 34.52)	506.316 (± 92.42)	3.614 (± 0.15)	382(<6,480)	372(<8,071)	418
Cu	10.455 (± 2.23)	16.401 (± 1.24)	53.026 (± 1.01)	12 (<239)	17.3 (<1,836)	14
Cr	13.821 (± 2.75)	8.616 (± 2.60)	2.439 (± 0.04)	22.0(<234)	24(<4,107)	42
Ni	12.818 (± 0.63)	13.961 (± 0.59)	0.266 (± 0.09)	14(<2,560)	18.3(<4,497)	18

^a Valores de referencia para muestras de suelos y sedimento (Alloway, 1995);

^b Concentración promedio en suelos a nivel mundial (Kabata y Pendias, 2001);

¹Salminen *et al.* (2005) ²Burt *et al.* (2003) ³Concentración promedio registrada en Cuba(Alfaro *et al.*, 2015).

Brasil. Los metales fueron clasificados en dos grupos en función de su concentración: unos alcanzando concentraciones dentro del promedio y otros con elevadas concentraciones. En el primer grupo se encuentra el Cr y Ni, con valores que variaron en promedio de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ hasta $13,9 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. El Hg, Zn, Pb, Mn y Cu, son los metales del segundo grupo. Sin embargo, algunos de estos son considerados muy tóxicos sobre todo en elevadas concentraciones, como por ejemplo en Pb y Hg, especialmente sus iones y compuestos (Alloway, 1995).

Las muestras del lago de Parangueo tenían una aparente presencia de tapetes microbianos (Figura 6.1). Para verificar la supuesta hipótesis, se determinó la composición de EPS de estas muestras. Los resultados arrojaron la presencia de un 5.9% de EPS.



Figura 6.1: Tapetes microbianos del cráter de Parangueo.

6.2 Aislamiento y filogenia de bacterias

Conforme a lo descrito en la metodología, se aplicaron técnicas tanto para aislamiento de microorganismos aerobios como anaerobios, obteniendo un total de 11 cepas (Tabla 6.3). Diez de éstas en condiciones aerobias y una en condiciones anaerobias. De las cepas aerobias, 4 crecieron en el medio YPS, 3 en el medio LB y 3 en TSA. La cepa aislada en condiciones anaerobias se logró por medio de una combinación de técnicas para este tipo de bacterias, entre ellas: diluciones seriadas con atmósfera de $\text{CO}_2:\text{N}_2$ y la técnica de *Roll Tube*. Probablemente se trata de un anaerobio estricto. Ese aislado creció en el medio descrito por Alazard *et al.* (2003).

Los aislados fueron analizadas según la morfología de la colonia, la morfología celular y su fisiología (Tabla 6.3). En general se observaron colonias circulares, blancas, de mas o menos 2 mm de diametro, con elevación convexa y borde liso. En la Figura ?? se ilustra una de las colonias como modelo.

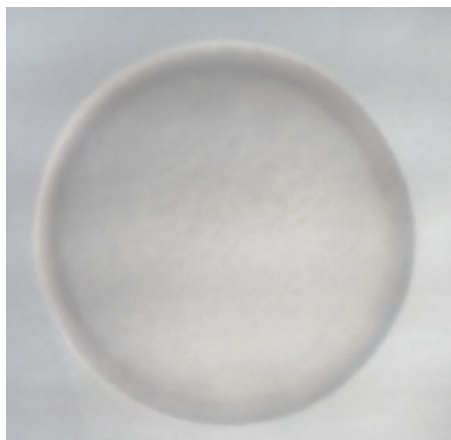


Figura 6.2: Morfología de una colonia. Cepa CSOT02.

Respecto a la morfología celular, se observó que nueve de los aislados presentaban

Tabla 6.3: Aislados obtenidos. Caracterización microbiológica y molecular.

Aislado	Medio	Sitio	Condición	Colonia						Célula	Pruebas fisiológicas			Molecular	
				Tamaño ¹	Forma	Elevación	Borde	Color	Superficie	Morfología	Catalasa	Gram	KOH 3M	NCBI	Similitud
CSOY01	YPS	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Bacillus tequilensis</i>	99%
CSOY02	YPS	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Bacillus malacitensis</i>	99%
CSOY03	YPS	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	99%
CSOT01	TSA	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	100%
CSOT02	TSA	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	100%
CSOT03	TSA	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	100%
CSOL01	LB	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Bacillus tequelensis</i>	100%
CSOL02	LB	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>	99%
CSOL03	LB	C	Ae	2	Cir	Convexa	En	Bla	Lisa	Bacilo	+	+	+	<i>Bacillus malacitensis</i>	99%
PACD01	Didier	P	An	NA*	NA*	NA*	NA*	-	NA*	Coco-Bacilo	NA*	-	NA*	<i>Ectothiorhodospira sp.</i>	97%
YAOY01	YPS	Y	Ae	1.5	Cir	Convexa	En	Am	Rugosa	Coco-Bacilo	+	-	-	<i>Acinetobacter sp.</i>	98%

C=Cintora, P=Paranguo, Y=La Joya; Ae=Aerobio, An=Anaerobio; ¹ en mm; Cir=Circular; En=Entero; Color: Bla=Blanco. Am=Amarillo; NA*=No aplica.

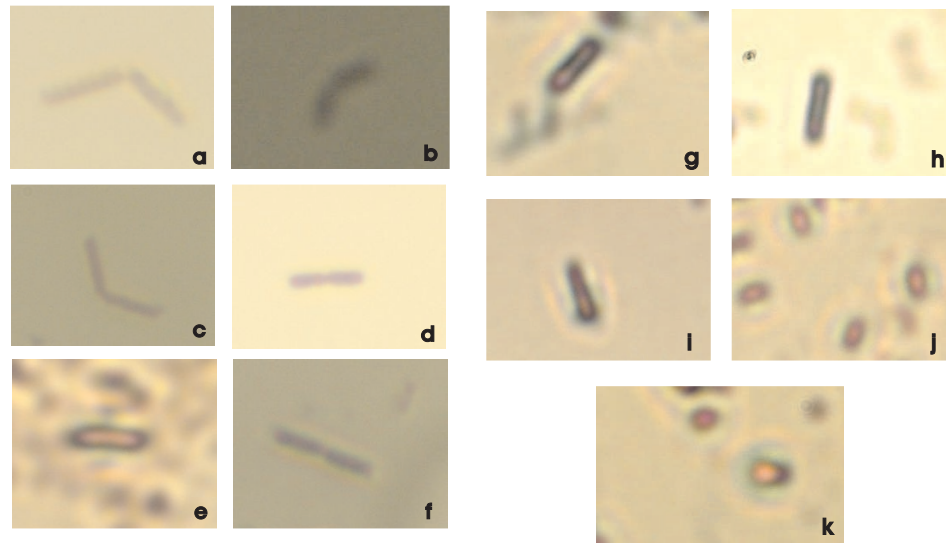
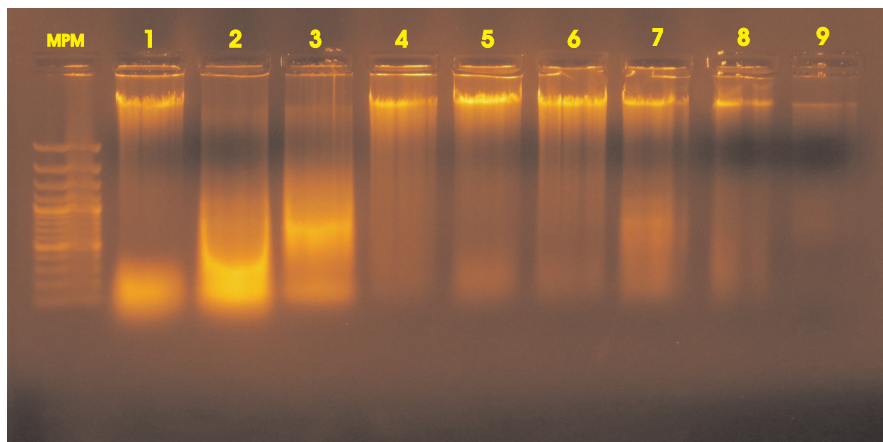


Figura 6.3: Morfología celular de los aislados. a. CSOY01; b. CSOY03; c. CSOY06M; d. CSOT01; e. CSOT01M; f. CSOT06; g. CSOL04b; h. CSOL05b; i. CSOL06b; j. P03; k. YagOY05.

forma de bacilos Gram-positivos, más o menos 5:1 (Figura 6.3 de la **a** a la **i**) y dos más presentaron la forma de coco-bacilo (2:1) Gram-negativos (Figura 6.3 **j** y **k**). Aparentemente tres cepas esporulan (Figura 6.3 **g**, **i** y **k**). Cabe resaltar que para el microorganismo anaerobio, algunos de estos parámetros no fueron posible analizar.

Se realizó la clasificación de los aislados basados en la similitud de la secuencia del gen ADNr 16S con las secuencias depositadas en el banco de datos *on line* del NCBI. Para la realización de ese estudio, inicialmente se extrajo el ADN genómico de los aislados (Figura 6.4a), el cual se utilizó para amplificar el gene ADNr 16S (Figura ??b). Los ultimos se purificaron y se enviaron a secuenciación en el LANGEBIO-CINESTAV, Irapuato, Mexico.

a.



b.

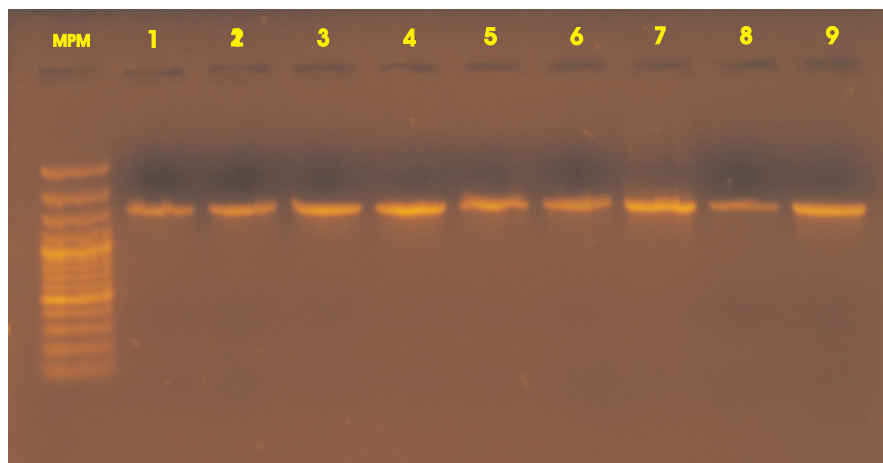


Figura 6.4: Electroforesis del ADN genómico y gen ADNr 16S. (a) ADN genómico: gel de agarosa 0.5% y (b) gen ADNr 16S en gel de agarosa al 1%. MPM: Marcador de Peso Molecular, (información detallada en **Anexo 8**). En los carriles: 1= CSOY01, 2= CSOY03, 3= CSOY01, 4= CSOT02, 5= CSOT03, 6= CSOL01, 7= CSOL02, 8= CSOL03 y 9= PACD01.

Los aislados obtenidos en este estudio se distribuyeron en las clases: *Actinobacteria*, *Bacilli* y *Gammaproteobacteria*, dentro del *phylum* Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria respectivamente (Figura 6.5). Con estos datos, se construyó un árbol filogenético aplicando método de máxima parsimonia y modelos estadísticos que mejor interpretan las modificaciones evolutivas ocurridas dentro de la secuencia de genes como el ADN_r 16S, en este caso, se utilizó el descrito por Jukes y Cantor (1969) (Figura 6.5).

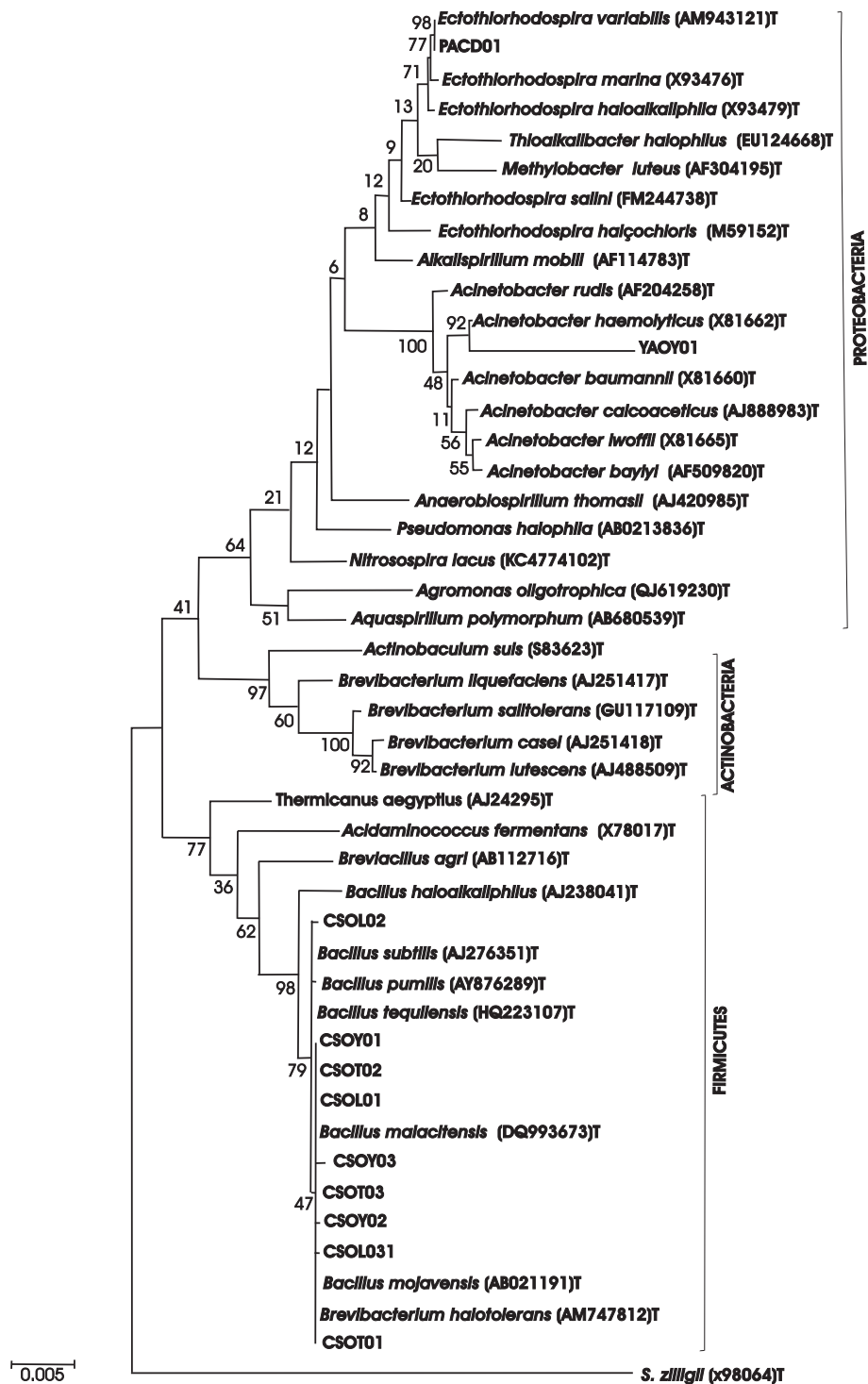


Figura 6.5: Árbol filogenético de las cepas bacterianas aisladas. El árbol se contruyó en el software MEGA 6 comparando las secuencias del gen ADNr 16S de los aislados, con las depositadas en el banco de datos *on line* del NCBI. Después del alineamiento, las secuencias fueron editadas, y se utilizaron 1503 pares de bases, con el método de parsimonia y máxima verosimilitud (Bootstrap de 1000 veces) y el model de Junkes–Cantor.

Capítulo 7

DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del sitio

De acuerdo a los resultados obtenidos, el lago-cráter La Joya es alcalino (pH 9.5, Tabla 6.1), presentando concentraciones de Hg, Pb y Mn por arriba de los promedios globales registrados para suelos y sedimentos según Kabata y Pendias (2001) (13.09 mg kg^{-1} , 51.23 mg kg^{-1} y $428.03 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente) y dentro de la media para Zn, Cu, Cr y Ni (Tabla 6.2). Cabe resaltar que la concentración registrada para Fe, fue la más elevada entre los tres sitios de muestreo ($35,189.03 \text{ mg kg}^{-1}$), sin embargo no rebasa lo registrado por Alfaro *et al.* (2015). Los resultados de salinidad muestran que se encuentra dentro de las condiciones normales, sin presentar una condición extrema en este rubro (Williams, 1996). Actualmente, hay pocos estudios sobre este sitio, siendo el único, el publicado por Sánchez y Reynoso (2012) relacionado a la herpetofauna. La región del lago-cráter La Joya, fue declarada área natural protegida en 2001 (POGEG, 2001). Este lago se asemeja al lago-cráter Xiloá en Nicaragua (Dittmann *et al.*, 2012), por presentar características de eutrofización según datos de Valerdi *et al.* (2013) donde se muestra ésta condición. En años anteriores, el lago-cráter La Joya presentó una época de sequía total, pero actualmente es mantenido artificialmente debido a su importancia para aves migratorias. A su alrededor, se desarrolla el pueblo de Yuriria.

El lago-cráter de Cántora presenta un cuerpo de agua que depende de la época de lluvias (Puente-Solis, 2004), aunque en los últimos años, no se ha visto agua presente en el cráter. Incluso en el 2012, éste se encontraba seco y debido a ello no fue posible registrar algunos de los datos físico-químicos. Según lo descrito por Kienel *et al.* (2009), la causa de la sequía de la región del Valle de Santiago se ve afectada por múltiples factores, entre ellos el evento del Niño, la sobreexplotación de aguas subterráneas (debido a la expansión de la agricultura de riego en la región) y a la posible falla que atraviesa la zona, la cual, al moverse, ocasiona que el manto freático baje su nivel. De acuerdo a los resultados de metales, éste sitio presentó elevadas concentraciones de Hg, Mn y Cu (28.87 mg kg^{-1} , $506.31 \text{ mg kg}^{-1}$ y 16.40 mg kg^{-1} respectivamente). Tanto los datos obtenidos en el presente estudio para Hg

como Mn, están muy por encima de las concentraciones globales y al mismo tiempo, fueron las más elevadas entre los tres sitios de muestreo; mientras que mantuvo concentraciones dentro de las registradas por Alloway (1995) para Fe, Pb, Cr y Ni (Tabla 6.2). Para el caso del Zn, éste metal no rebasa la concentración media global, pero si las registradas en Europa, con 48.46 mg kg^{-1} (Salminen *et al.*, 2005). A pesar de no contar con los datos físico químicos de ese lago, Aranda-Gómez *et al.* (2013) lo reportaron con concentraciones bajas en salinidad, por lo cual, estos autores apuntaron que el lago-cráter de Cántora es el menos salino del Valle de Santiago.

El Rincón de Parangueo fue clasificado como hiperalcalino (pH 11.16) y al mismo tiempo como hipersalino (12.2%; **Tabla 6.1**), considerando que el mar tiene una salinidad de 3.5% y el agua dulce menos de 0.3% (Williams, 1996). Según la literatura **científica**, en 1986, el lago de Parangueo contenía 1.6% de salinidad (Green, 1986), desde entonces se ha registrado un aumento gradual de esta característica. Por ejemplo, en 1995 fue de 5.3% y en 2002 de 12.0% (Alcocer, 2002). Es importante destacar que las sales que mayormente abundan en éste lago, son principalmente carbonatos (CO_3) y bicarbonatos (HCO_3) a diferencia de otros sitios donde abunda el NaCl (Aranda-Gómez *et al.*, 2013), esto debido a una aparente entrada de CO_2 magamático presente en el agua, según lo sugerido por Earman *et al.* (2005). Sin embargo, una fuente alternativa del exceso de CO_2 en el lago de Parangueo, está relacionado con la descomposición orgánica o la actividad microbiana, ya que en su superficie, comunmente se observan burbujas de gas aisladas (Aranda-Gómez *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Armienta *et al.* (2008), se reportó una tabla con los parametros físico-químicos de lagos de cráter en México, destacando El Rincón de Parangueo como el más alcalino de todos (10.2 de pH), seguido de La Alberca (Guanajuato) con 9.6 de pH y Alchichica (Puebla) con un pH de 8.9. La conductividad eléctrica para la mayoría de los lagos, reportó para El Rincón de Parangueo $165,000 \mu\text{S cm}^{-1}$, muy por encima del segundo lugar que fue el lago de Alchichica con $12,940 \mu\text{S cm}^{-1}$ Armienta *et al.* (2008), reafirmando la extrema salinidad de Parangueo. Éstas características destacan este sitio como el más interesante, comparado con los otros sitios de muestreo, desde el punto de vista de la Astrobiología.

Por otro lado, éste lago mostró todas las concentraciones de metales fuera del rango normal, fluctuando desde las extremadamente altas, hasta las extremadamente bajas de acuerdo a los datos de Alloway (1995). Dentro del primer grupo se encuentra el Hg y Cu (con 13.90 mg kg^{-1} y 53.02 mg kg^{-1} respectivamente). En el segundo grupo se encuentran el Mn, Cr y Ni (3.6 mg kg^{-1} , 2.43 mg kg^{-1} y 0.26 mg kg^{-1} respectivamente). Para el caso de Zn y Pb, se registraron concentraciones por encima de la media en Europa (Salminen *et al.*, 2005) y EUA (Burt *et al.*, 2003), casi alcanzando el promedio global (61.13 mg kg^{-1} y 24.15 mg kg^{-1} respectivamente; Tabla 6.2). Parangueo se asemeja al lago de Alchichica debido a la presencia de estromatolitos y al pH alcalino en ambos (Gérard *et al.*, 2013). Pocos lagos cuentan con presencia de elevadas concentraciones de CO_2 , tal es el caso del maar Albano en Italia (Anzidei *et al.*, 2008).

7.2 Aislamiento y filogenia de bacterias

En estudios de bioprospección, usualmente nos enfrentamos a una etapa complicada que involucra el encontrar las condiciones óptimas para el desarrollo y crecimiento de las cepas aisladas. Este problema es aún mayor al intentar aislar microorganismos de sitios extremos, tal es el caso de nuestros tres sitios de muestreo, ya que el controlar ese tipo de condiciones no siempre es un trabajo fácil.

El proceso de aislamiento por lo general contempla varias etapas hasta lograr el resultado final, donde se obtiene la caracterización de la cepa. A lo largo del presente trabajo, se implementaron distintas técnicas para verificar la pureza de los aislados, comenzando por la observación de la morfología de la colonia, donde se verificó que fuera la misma, hasta la corroboración a través del microscopio óptico, donde se logró observar la misma morfología celular. Cabe resaltar, que estos procedimientos no siempre garantizan que el análisis de secuenciación arroje un resultado positivo, ya que muchas veces pueden existir morfotipos distintos de una misma especie de organismos o morfologías muy similares de especies distintas (Wang *et al.*, 2007). Por eso es necesario realizar una comprobación más a través de las pruebas bioquímicas, y finalmente lo que nos ayudará a dar una conclusión final, es un análisis molecular del material aislado. En la Figura 6.2, se muestra la morfología de colonia que presentó la mayor parte de los aislados, debido posiblemente a la similitud de sus características de morfología celular, y también su fisiología (como se observa con los resultados de las pruebas bioquímicas en la Tabla 6.3). No fue posible describir a detalle la morfología de colonia que presentó la cepa PACD01 debido a que se utilizó la técnica de *roll-tube* para su aislamiento y es difícil observar a través del tubo todas sus características.

Como se indica en la Tabla 6.3, se lograron aislar 11 cepas, 10 de ellas en condiciones aerobias, y una más bajo condiciones anaerobias. Cada una de ellas fue etiquetada bajo el mismo criterio. La primer letra indica el sitio del que fue aislada, **C** para Cintora, **P** para Parangueo o **Y** para La Joya. La segunda letra indica la muestra a partir de la cual fue tomada, **S** para Sedimento o **A** para Agua. En tercer lugar, el caracter describe la condición bajo la cual se desarrolló, **O** en condiciones aerobias (**O**xígeno) o **C** en condiciones anaerobias (**C**O₂:N₂). Sucesivamente se indica a través de una letra, el medio de cultivo en que creció el aislado, **D** para el medio Didier, descrito por (Alazard *et al.*, 2003), **L** para el medio LB, **T** en medio TSA o **Y** para el medio YPS. Finalmente se le asignó un número que indica, **01** si fue el primer aislado bajo esas condiciones, **02** si fue el segundo y así sucesivamente.

La morfología celular en bacterias, esta determinada por la regulación de expresión de una familia de genes similares a los que producen la proteína actina en eucariontes, conocida como *MreB* (Ku *et al.*, 2014). Esto lo hacen a través de la síntesis de la pared celular, que interviene y participa en la determinación de su morfología (Jones *et al.*, 2001). Así, se forman filamentos con morfología helicoidal localizados a lo largo de la membrana citoplasmática (anclados hacia la parte interna), y que tienen forma de resorte (Figura 7.1), lo que provoca que muchos

tipos de células se alarguen y presenten morfología bacilar (similar a un baston) (Carballido-López y Errington, 2003). La mayor parte de las cepas aisladas presentaron forma de bacilos o coco-bacilos (como se indica en la Tabla 6.3).

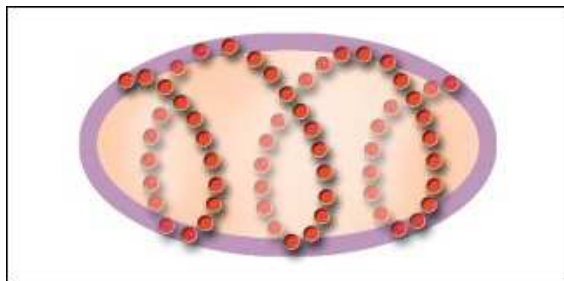


Figura 7.1: Filamento helicoidal formado al interior de las células bacterianas. Tomada y modificada de Nevo-Dinur *et al.* (2012).

Las estrategias que los organismos utilizan como mecanismo de defensa para contrarrestar el estrés ambiental son muy variadas (Snyder *et al.*, 2007). En los procarionetes, se destacan las bacterias capaces de producir endosporas, comúnmente observadas en los Firmicutes (Piggot, 2002). El proceso de esporulación está muy bien estudiado en *Bacillus subtilis* (Kroos, 2007; Errington, 2003; González-Pastor *et al.*, 2003). Según estos autores, la esporulación comienza por la compartimentación de la célula a través de la formación de un septo que genera dos morfologías distintas pero genéticamente idénticas (Figura 7.2): una célula madre y una pre-espora (Higgins y Dworkin, 2012; Tan y Ramamurthi, 2014; Piggot y Coote, 1976). Al final del evento, la espora es envuelta por una gruesa capa de peptidoglicano y la célula madre entra en un proceso de lisis programada para así, liberar la espora madura al medio ambiente (Hosoya *et al.*, 2007). De esta forma, las bacterias pueden sobrevivir en condiciones ambientales adversas en un estado latente, y pueden activar nuevamente su metabolismo, una vez que las condiciones vuelven a ser favorables (Setlow, 2006). Como se puede observar en la Figura 6.3 g, i (cepas CSOL01 y CSOL02), aparentemente existe la presencia de esta estructura (preespora), lo cual se relaciona fuertemente a las condiciones bajo las cuales éstos organismos están sometidos constantemente, pues fueron aislados del lago-cráter Cíntora, el cual como ya se discutió anteriormente, presenta largos periodos de sequía total. Otra cepa que presenta aparentemente este mecanismo, es YAOY01 (Figura 6.3 k), el cual se aisló a partir de sedimento del lago-cráter La Joya. Recordando que ese lago tuvo una época de sequía total y que actualmente es mantenido artificialmente. Además, también es un lago eutrofizado. Éstas características favorecen la presencia de microorganismo capaces de esporular, como los detectados en éste trabajo.

A pesar de ser muy criticado el análisis comparativo de secuencias utilizando el gen ARNr 16S, éste fue establecido como un estándar para la reconstrucción de relaciones filogenéticas entre los procarionetes (Ludwig y Klenk, 2001). Ya que las técnicas tradicionales, tales como, coloración Gram, morfología celular, etc., no

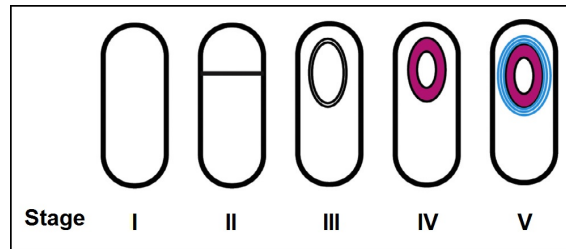


Figura 7.2: Se observan las etapas en el proceso de esporulación, muy probablemente nuestras muestras se encuentran en la etapa II. Tomada y modificada de Fimlaid y Shen (2015).

son suficientes para poder separar los procariontes filogenéticamente cercanos. En este sentido, las secuencias obligatoriamente deben ser de alta calidad para futuros análisis (Stackebrandt *et al.*, 2002). Adicionalmente, en los estudios filogenéticos, sobre todo en la descripción de nuevas especies, éstos debe contener además de los caracteres de morfología celular antes citados, la secuencia del gen ADNr 16S, la composición de los lípidos de membrana, y las características fisiológicas y metabólicas del aislado.

En éste trabajo, los genes ADNr 16S se amplificaron y secuenciaron con el objetivo de identificar la relación filogenética de nuestros aislados comparados con los depositados en bancos de datos *on line*. El tratamiento estadístico de éstos resultados es de suma importancia, pues de ello dependerán resultados posteriores como la construcción de su filogenia (Stackebrandt *et al.*, 2002). De acuerdo con el análisis BLAST, se obtuvieron cuatro especies con una similitud del 99 al 100%, además de tres distintos géneros con similitud del 97 al 99% (Tabla 6.3), lo que indica que entre los aislados, no hay ningún nuevo género.

Algunos de los aislados obtenidos presentaron mayor similitud (de la secuencia del gen ADNr 16S) con las cepas tipo *Bacillus malacitensis*, *Bacillus Mojaven-sis* y *Brevibacterium halotolerans* (cepas CSOY01, CSOT02, CSOL01, CSOY03, CSOT03 y CSOY02, CSOL03 CSOT01) y con *B.tequilensis*, *B. puminis*, y *B. subtilis* (CSOL02) perteneciente al phylo de los Firmicutes en la Clase Bacilli (Figura 6.5).

Bacillus tequilensis, es una bacteria aerobia, y como todas las especies del género *Bacillus* es una bacteria Gram positiva formadora de esporas (Logan y Halket, 2011). Ella fue aislada de una tumba de tiro no saqueada que data de más de 2,000 años, localizada cerca de la ciudad de Tequila, Jalisco (de la Vega y Camberos, 1996). Está fuertemente emparentada con *Bacillus subtilis* (similitud del 99%), aunque la digestión de la enzima *NotI* analizada por medio de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés *Pulsed-field gel electrophoresis*), reveló un perfil de restricción que era considerablemente distinto al de *B. subtilis* y al de otras especies estrechamente relacionadas. La hibridación ADN-ADN, fue menor al 70% (Gatson *et al.*, 2006). De ésta cepa ha sido aislada y purificada una pecto-liasa

alcalina Chiliveri y Linga (2014). Ésta es una enzima con actividad específica, ampliamente utilizada en la industria textil (Traore y Buschle-Diller, 2000). En otro estudio Sondhi *et al.* (2014), se purificaron y caracterizaron de esa cepa, otras enzimas, entre las cuales se destaca una metal tolerante extracelular Termo–alcalino estable. Ella posee tanto aplicaciones industriales como biotecnológicas, tales como el bioblanqueo, biorremediación, eliminación de colorantes textiles y aplicaciones en la industria alimenticia (Shekher *et al.*, 2011). También hay estudios que relacionan la importancia de ésta especie con aplicaciones de sus productos en la industria farmacéutica, ya que también se extrajeron de ella, una asparaginosa (Nayak *et al.*, 2014). La última es una enzima con acción oncolítica, que se ha mostrado eficaz en el tratamiento de la leucemia aguda (Ferrara *et al.*, 2004). Los estudios anteriormente descritos, demuestran el amplio interés que representa ésta especie.

En el año 2000 se aisló un bacilo, cepa CR-95^T, a partir de sedimentos salobres en la desembocadura del Río Vélez, en Malaga, España. Ésta fue sometida a pruebas físico–químicas que la identificaron como Gram–positiva y catalasa positiva. En el mismo estudio, a través de hibridación ADN–ADN, con especies del género *Bacillus*, produjo valores inferiores a 46.9% de similitud, justificando su clasificación como nueva especie, proponiendo el nombre de *Bacillus malacitensis* (Ruiz-García *et al.*, 2005). Posteriormente, en 2007, un estudio detallado acerca de la clasificación de dos nuevas especies, dió como conclusión que los resultados no mostraban diferencias significativas para justificar la separación de las cepas tipo de *Bacillus axarquiensis* y *Bacillus malacitensis* con *Bacillus mojaviensis*, por lo que Wang *et al.* (2007) proponen que deben considerarse sinónimos heterotípicos. Ésta última especie, fue aislada de muestras del desierto de Mojave, California, EUA, por lo que sus hábitats comunes son los sedimentos desérticos y salobres (Roberts *et al.*, 1994). Los datos anteriores se correlacionan a que las cepas hayan sido aisladas a partir de sedimentos bajo condiciones similares a las descritas para ésta especie, ya que el lago–cráter de Cíntora se caracteriza por presentar sequías en una época del año. Entre los estudios relacionados sobre ésta especie, destaca el realizado por Naila *et al.* (2011). En él los autores llevan a cabo una comparación en la producción de histamina (amina biógena que en elevadas concentraciones podría causar intoxicación (Motil y Scrimshaw, 1979; Russell y Maretić, 1986)), a partir de diferentes cepas aisladas, entre ellas *B. malacitensis*. En otro estudio realizado por (Dongdong *et al.*, 2014), se utilizan esporas producidas por *B. malacitensis* como biocontrol para combatir el hongo *Verticillium wilt*, que afecta el desarrollo óptimo de plantas de algodón e impacta económicamente en algunas regiones a nivel mundial, debido a bajas o pérdidas en su producción (Shezeng *et al.*, 2001).

Brevibacterium halotolerans representa un caso particular, ya que como su nombre lo indica, el género *Brevibacterium* pertenece al phylo Actinobacterias, pero en bases de datos *on line* está clasificada dentro del género *Bacillus*, perteneciente a los Firmicutes (Boone *et al.*, 2005). Ésta especie fue aislada de suelos áridos en Marrakech, Marruecos, y es una bacteria en forma de bacilo, Gram–positiva y aerobia estricta (Delaport y Sasson, 1967). Las cepas de *B. halotolerans* han sido probadas

para control biológico como agente antagónico al hongo *Fusarium moniliforme*, éste último un patógeno endofítico productor de micotoxinas de maíz y otras plantas (Bacon y Hinton, 2002). Duce *et al.* (1980) e Iwasaka *et al.* (1983) analizaron el impacto ambiental causado por el movimiento de polvo del desierto verificando que éste se conforma de minerales y partículas microbianas, que van desde virus, bacterias y hongos (Jones y Harrison, 2004; Prospero *et al.*, 2005). Con respecto a las partículas bacterianas, encontraron una gran abundancia de Firmicutes, entre ellas *B. halotolerans* (Maki *et al.*, 2014). También ha sido utilizada para el tratamiento de residuos orgánicos, compuestos principalmente de lignocelulosa (Jurado *et al.*, 2014). Son muchos los estudios que involucran a *B. halotolerans*, pero hasta ahora, ninguno debate sobre su nomenclatura y clasificación.

La cepa de *Bacillus pumilus* fue aislada y caracterizada por primera vez por Gottheil (1901). Esa especie está estrechamente relacionada filogenéticamente con *Bacillus subtilis* (Rooney *et al.*, 2009). Ella ha sido ampliamente estudiada debido a su aplicación en la industria biotecnológica. Uno de los estudios más completos al respecto fue el realizado por Handtke *et al.* (2014), quienes reportaron resultados de análisis de proteómica con un total de 3,616 proteínas codificadas para mantener el metabolismo de éste organismo. A pesar de que la producción de celulosa comercial es hecha a partir de hongos (Ariffin *et al.*, 2008), se ha logrado producir y caracterizar esta biomolécula a partir de cepas de *B. pumilus* (Ariffin *et al.*, 2006). A fin de apreciar el importante papel que las bacterias han desempeñado en la historia de la evolución de la Tierra, Daskalakis *et al.* (2015) probaron la capacidad de biomineralización de carbonato de calcio (CaCO_3) por *B. pumilus*, la cual produjo finas capas de éste material dando lugar a la formación de vaterita, mineral con una fase termodinámicamente estable, producido en una amplia variedad de entornos biológicos (Han *et al.*, 2006). Se ha demostrado que *B. pumilus* logra sobrevivir en ambientes extremos, de hecho, tanto en naves espaciales, como en la superficie de la Estación Espacial Internacional (ISS por sus siglas en inglés *International Space Station*), se detectaron sus esporas, incluso después de realizar técnicas de esterilización estrictas (La Duc *et al.*, 2004).

En 1833 fue aislada una cepa en Berlín y nombrada *Vibrio subtilis* por Ehrenberg (1833). Posteriormente esa cepa fue reclasificada y renombrada por Cohn (1876) como *Bacillus subtilis* y es actualmente utilizada como la cepa modelo para las bacterias Gram-positivas (Harwood, 1992; Harwood *et al.*, 2013). También fue seleccionada como modelo en el proyecto genoma, siendo así uno de los primeros organismos con un análisis completo de su genoma (Harwood y Wipat, 1996), contando con un cromosoma con tamaño de 4.2 Mb (Kunst *et al.*, 1997).

El resto de los aislados obtenidos, presentaron mayor similitud con las cepas tipo *Acinetobacter haemolyticus* (cepa YAOY01), perteneciente al phylum de las Proteobacterias en la Clase Gammaproteobacteria, al igual que *Ectothiorhodospira variabilis*, que presentó una relación filogenética con la cepa PACD01, como lo muestra la Figura 6.5.

El género *Acinetobacter* constituye una rama filogenética de bacilos Gram-negati-

vos dentro del phylo Proteobacteria (Woese *et al.*, 1985), se considera de importancia por su potencial aplicación dentro de la industria alimenticia y biotecnológica (Kämpfer, 2014). Con los resultados de hibridación ADN–ADN se pudo separar las cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwofii* y de *Acinetobacter haemolyticus*, la última aislada de pacientes humanos Bouvet y Grimont (1986). Es un patógeno humano que causa endocarditis Martínez *et al.* (1995), o sea, anomalías anatómicas que involucran estructuras internas cardiacas (Linde y Heins, 1960). Sin embargo, como otras especies patógenas, también ha sido descrita y utilizada en estudios de biorremediación (Pei *et al.*, 2009). Mostrando resistencia y capacidad para transformar Cr(VI) en Cr(III) (Ahmad *et al.*, 2009, 2013). Recientemente, se ha secuenciado el genoma completo de ésta especie (cromosoma con tamaño de 3.4 Mb, Khatri *et al.* (2014)).

La familia *Ectothiorhodospiraceae* se ubica dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, ella es muy diversa y sus individuos presentan crecimiento anaerobio. Al mismo tiempo, muchas son halófilas y/o alcalófilas Gram–negativas (Imhoff, 2006; Oren, 2014). En 2009 se aislaron 11 cepas a partir de delgados tapetes microbianos, encontrados sobre la superficie de sedimentos de varios lago, ubicados en: Egipto (Lago Hamra y Um Risha (Imhoff *et al.*, 1979)), Mongolia (Lago Shara Burdin (Sorokin *et al.*, 2004)) y Siberia (Lago Tanatar (Foti *et al.*, 2007)). Estos lagos cuentan con características similares, con un pH que varió de 9.4 hasta 10.3 (Gorlenko *et al.*, 2009). Por medio de análisis de hibridación ADN–ADN se demostró que las cepas formaban un grupo homogéneo, pero distante a otras especies, considerándola nueva especie y nombrandola *Ectothiorhodospira variabilis*. Éstas presentaron morfología ovalada, bacilar y algunas espiral, con crecimiento estrictamente anaerobio, y clasificadas como bacterias fotoautotróficas púrpuras de azufre, soportando hasta 8% de salinidad con pH óptimo de 9 (Gorlenko *et al.*, 2009). Budinoff y Hollibaugh (2008) analizaron las reacciones de oxidación de arsenito a arsenato realizadas por cepas de *Ectothiorhodospira* aisladas a partir de sedimentos del Lago Mono, un sitio hipersalino (Stine, 1990). Ellos observaron la importancia de las transformaciones redox de arsénico por parte de las cepas, para la obtención de energía para su crecimiento.

7.3 Un enfoque Astrobiológico

Es amplia la discusión respecto al origen de la vida. Hay teorías que defienden que la vida se originó en lagunas o arenales húmedos, en arcillas, cerca de fuentes hidrotermales, en minerales sulfurosos, en aerosoles o gotas de vapor (para una revisión más detallada, consultar Cleaves y Chalmers (2004)). Un acuerdo común entre estas teorías, independientemente de donde se haya dado por primera vez el origen de la vida, es que para ésta debería haber materia orgánica para sostener las reacciones metabólicas, debería haber energía para estos mecanismos y las primeras moléculas deberían poseer capacidad de autoreplicación.

A pesar de suponer que haya, o que pueda haber vida fuera de la Tierra, éste es el único lugar donde ha sido realmente identificada. Mientras no tengamos tecnología para verificar objetivamente la presencia de vida fuera de la Tierra, un tema más concreto, es comprender como se desarrolla, o como se desarrolló, la vida aquí. Actualmente, el estudio de los microorganismos extremófilos, entre otras cosas, busca también aportar información adicional respecto a adaptaciones a condiciones ambientales extremas, similares a las encontradas fuera de la Tierra (extraterrestres) tales como las observadas en algunas lunas, asteroides, cometas, etc.

Los microorganismos aislados de ambientes hipersalinos, como los de El Rincón de Parangueo pueden ser importantes para estudios futuros respecto a adaptaciones fisiológicas de éstos como respuesta a presiones selectivas de extrema sequía y elevadísimas concentraciones de sales, además de la exposición a radiación y déficit de oxígeno. Mientras que microorganismos aislados del lago La Joya (y también de El Rincón de Parangueo) son importantes como ejemplo de adaptaciones a condiciones alcalófilas.

Las características ambientales del lago-cráter El Rincón de Parangueo, parecen ser similares a los encontrados en el océano interno de la Luna Eropa, una de las lunas de Júpiter. Hay también estudios que especulan la posible presencia de evaporitos en Marte, aún no evidenciado Mancinelli (2005). Mientras no tengamos tecnología para estudiar un posible microorganismo de ese ambiente, podemos comprender como se comporta y evoluciona la vida en ambientes terrestres similares a estos. Es exactamente con esa visión que algunos biólogos están apoyando a la Astrobiología.

En este estudio hemos aislado únicamente una cepa de El Rincón de Parangueo, la PACD01, y una cepa de La Joya (YAOY01). Sin embargo, datos de secuenciación de alto rendimiento han apuntado hacia una diversidad bacteriana relativamente grande para los lagos de El Rincón de Parangueo. En él se obtuvieron entre 14,000 y 18,900 *pyrotags*, para dos muestras enviadas a secuenciar por MiSeq (datos aun no publicados, (Valerdi *et al.*, 2014)). Incluso, para una de las muestras se obtuvieron 4,359 (Lago Grande) y 6,481 (Lago Chico) de *pyrotags* pertenecientes a Proteobacteria, el phylo con la segunda mayor abundancia relativa observada (la más abundante fue Firmicutes con 10,596 *pyritags*). Ésto que explica el éxito en el aislamiento de esa cepa. Éstos datos también apuntan el camino correcto que se está siguiendo en dicha prospección. En la continuación de ese trabajo se puede,

por ejemplo, tener éxito utilizando medios específicos para Clostridios, los cuales presentaron también una gran abundancia relativa, y es una clase con muchos microorganismos anaeróbicos y alcalófilos ya identificados. Adicionalmente, también se podrán utilizar medios específicos para aislar los microorganismos de los otros phylos identificados por MiSeq (por ejemplo, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes* y *Spirochaetes*), los cuales presentaron baja abundancia relativa. Sin embargo, éstos serán probablemente mucho más difícil aislar.

La cepa aislada de Parangueo (PACD01) es similar a *Ectothiorhodospira variabilis*, una *Gammaproteobacteria*, alcalófila, fotoautotrófica púrpura del azufre conocida desde 1979, pero ha sido muy poco explorada respecto sus características extremófilas, donde se destaca el trabajo de Stine (1990). Una posible característica de este microorganismo es también la resistencia a la radiación, característica común en los microorganismos alcalófilos fototróficos (Seckbach y Oren, 2007). El éxito en el aislamiento de esta cepa destaca a México como un país con condiciones de realizar y dar aportes importantes en el área de la Astrobiología.

El otro sitio estudiado también presentó características extremas (el lago de Cíntora). Los aislados obtenidos de ese sitio se destacan por su capacidad de formar esporas. Ellos son del phylo Firmicutes, probablemente son resistentes a sequía y también a la radiación, condiciones ambientales frecuentemente observadas en el cráter de Cíntora. Es bien conocido que los microorganismos de la clase *Bacilli* son muy apreciados por la Astrobiología, ya que la capacidad de formar esporas les confiere una plasticidad adaptativa enorme. Estos microorganismos pueden estar en forma latente por siglos, dicha capacidad pone a los microorganismos del phylo Firmicutes en destaque en los estudios de Astrobiología ya que las esporas son estructuras adaptativas importantísimas en estudio como la panspermia y la cepa de *B. subtilis* es una de las más utilizadas en estos estudios (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005; Benardini *et al.*, 2003). Las esporas confieren resistencia a varias condiciones físico-químicas, tales como a la desecación, a la radiación ultra-violeta y radiación gamma (Nicholson y Schuerger, 2005). Por ejemplo, Schuerger *et al.* (2003) utilizaron una cepa de *Bacillus subtilis* para simular la exposición a factores ambientales de la superficie de Marte (radiación, presión, desecación) identificando que la radiación solar era la menos letal bajo las condiciones estudiadas.

Este trabajo es apenas el inicio de un estudio mucho más amplio respecto a la biodiversidad bacteriana de sitios extremos en México. Teniendo en este caso, un enfoque muy específico a la Astrobiología, pero el abordaje utilizado en el estudio se puede aplicar también a otras líneas de investigación. Además, los microorganismos aislados son nativos de México y están disponibles para estudios más profundos respecto a su fisiología y metabolismo.

Capítulo 8

CONCLUSIONES

- El lago-cráter La Joya es alcalino con pH 9.5.
- Cíntora representó el sitio con la mayor concentración de Hg y Mn. Además, su época de sequía representa una fuerte presión ambiental para la adaptación de microorganismos extremófilos, muchos de ellos esporulan.
- El lago-cráter El Rincón de Parangueo es hiper halo-alcalófilo (12.2% y 11.2 en salinidad y pH respectivamente), características que lo destaca para futuros estudios astrobiológicos.
- Se logró aislar un total de 11 cepas bacterianas.
- Se aislaron 8 cepas del lago-cráter Cíntora (CSOL02, CSOY01, CSOT02, CSOL01, CSOY03, CSOT03, CSOY02, CSOL03 y CSOT01), todas relacionadas filogenéticamente con especies del género *Bacillus*.
- La cepa YAOY01 (aislada de La Joya) presentó alta similitud con *Acinetobacter haemolyticus*, una *Gammaproteobacteria*.
- La cepa PACD01 (aislada del cráter El Rincón de Parangueo), es anaerobia, y filogenéticamente similar a *Ectothiorhodospira variabilis*, una *Gammaproteobacteria*.

Capítulo 9

PERSPECTIVAS

- Utilizar técnicas modernas de secuenciación masiva para estudiar la biodiversidad bacteriana total de las muestras, y de esa forma poder comparar la biodiversidad de estos ecosistemas. Con ello se logrará discutir mejor la eficiencia de los métodos utilizados en este trabajo para la bioprospección bacteriana.
- Analizar el metabolismo de cada uno de los aislados y su resistencia bajo diversas condiciones de estrés, con el fin de entender sus mecanismos de adaptación bajo un enfoque evolutivo.
- Debido a las condiciones de pH a las que habita la cepa YAOY01, es interesante analizar más a detalle su metabolismo. Por ejemplo, comparar la resistencia y conversión de la cepa frente a diferentes concentraciones de Cr(VI). Ya que ella es similar a una cepa ya estudiada resistente a ese metal, el cual es un contaminante muy tóxico, y un problema ambiental identificado en diferentes regiones del país.
- La cepa PACD01 representa un organismo con un fuerte interés astrobiológico, pues el ambiente en el que se desarrolla podría ser similar a otros fuera de la Tierra. Es por ello que se propone analizar a fondo sus estrategias de adaptación. Al mismo tiempo, se puede implementar la información para ser aplicada en técnicas de biotecnología. Por ejemplo, probar su resistencia frente a diferentes concentraciones de As e intentar biorremediar suelos contaminados, tomando en cuenta que es similar a cepas donde se ha identificado resistencia a ese metal.

Anexo 1 - Referencia IAEA-436

Tabla 9.1: Recommended values: Matrix and Minor Constituents
(Based on dry weight)

Element	Concentration ¹ (g kg ⁻¹)	Std Deviation ² (g kg ⁻¹)	95% Confidence Interval ³ (g kg ⁻¹)	N ⁴
Calcium	0.154	0.021	0.128–0.181	5
Potassium	12.3	0.6	11.5–13.0	5
Magnesium	1.07	0.04	1.02–1.11	6

Information values
(Based on dry weight)

Element	Concentration ¹ (mg kg ⁻¹)	Std Deviation ² (mg kg ⁻¹)	95% Confidence Interval ³ (mg kg ⁻¹)	N ⁴
Silver	0.009	0.002	0.006–0.013	4
Bromine	14.8	1.5	10.9–18.6	3
Lithium	0.040	0.009	0.018–0.062	3
Rubidium	2.41	0.27	1.96–2.86	4
Sodium	1501	116	1306–1696	4

¹ Mean values expressed on a dry-weight basis.

² 1 Standard Deviation of the mean.

³ 95% Confidence Interval, μ , defined as $\bar{x} \pm t \left(\frac{s}{\sqrt{N}} \right)$, where t is the Student's t value.

⁴ Number of laboratory means from the total which were used by Cofino model to calculate the Recommended values and applied to calculate the mean confidence interval.

Internal Atomic Energy Agency

Analytical Quality Control Services
Wagramer Strasse 5, P. O. Box 100, A-1400 Vienns, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA-436

TRACE ELEMENTS AND METHYLMERCURY IN
TUNA FISH FLESH HOMOGENATE

Date of issue: 17 February 2006

Tabla 9.2: Recommended values: Trace Elements
(Based on dry weight)

Element	Concentration ¹ (mg kg ⁻¹)	Std Deviation ² (mg kg ⁻¹)	95% Confidence Interval ³ (mg kg ⁻¹)	N ⁴
Aluminium	3.06	0.42	2.68–3.44	7
Arsenic	1.98	0.17	1.91–2.06	22
Cadmium	0.052	0.007	0.050–0.054	35
Cobalt	0.042	0.006	0.039–0.45	16
Chromium	0.194	0.058	0.168–0.219	23
Copper	1.73	0.19	1.66–1.79	38
Iron	89.3	4.2	87.8–90.9	30
Mercury	4.19	0.36	4.04–4.34	24
Manganese	0.238	0.042	0.218–0.257	20
Nickel	0.069	0.041	0.040–0.099	10
Selenium	4.63	0.48	4.36–4.89	15
Tin	0.030	0.014	0.012–0.048	5
Strontium	0.564	0.062	0.523–0.606	11
Zinc	19.0	1.3	18.6–19.4	40
MeHg ⁵	3.67	0.42	3.30–4.05	7

¹ Mean values expressed on a dry-weight basis.

² 1 Standard Deviation of the mean.

³ 95% Confidence Interval, μ , defined as $\bar{x} \pm t \left(\frac{s}{\sqrt{N}} \right)$, where t is the Student's t value.

⁴ Number of laboratory means from the total which were used by Cofino model to calculate the Recommended values and applied to calculate the mean confidence interval.

⁵ Concentration reported as mg Hg kg⁻¹

Anexo 2 - Medio BSR

A continuación se enlistan los reactivos y cantidades de medio de cultivo para BSR descrito por Balch *et al.* (1979).

Para preparar 1 L de medio, se pesaron los siguientes reactivos:

- 1 g de NH_4Cl ,
- 0.3 g de K_2HPO_4 ,
- 0.3 g de KH_2PO_4 ,
- 3 G de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$,
- 0.1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
- 25 g de NaCl ,
- 0.2 g KCl ,
- 3.16 g de Na_2SO_4 ,
- 0.5 g de acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$),
- 2.24 g de lactato de sodio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$),
- 0.5 g de clorhidrato de cisteína,
- 0.5 g de extracto de levadura,
- 0.5 g de bio-Trypticasa,
- 10 ml de solución de metales traza,
- 1.0 mg de rezaursurina,
- aforar a 1000 mL con agua esteril del sitio (pH 10).

Anexo 3 - Medio para bacterias litotróficas

Éste medio se modificó a partir de lo descrito por Alazard *et al.* (2003); Para prepararlo se agregaron todos los componentes del medio descrito en el Anexo 2, adicionando:

- 0.04 % (w/v) de $\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ y
- 0.2 % (w/v) de NaHCO_3 .
- Estos dos reactivos, se prepararon y esterilizaron por separado, ya que al agregar al medio directamente, se precipitaban,

Anexo 4 - Electroforesis, TAE y TBE

Para correr una muestra en la electroforesis, primero se preparó un gel de agarosa.

- Se pesaron 0.5 g de agarosa.
- Se adicionaron a la agarosa, 50 mL de TAE 1X, y se calentó la mezcla en horno de microondas hasta lograr su homogenización completa.
- En un matraz (destinado para reactivos químicos tóxicos), se agregó el volumen total previamente preparado y se le adicionan 5 μL de bromuro de etidio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$, 10 ppm).
- Se homogenizó la mezcla y se vertió sobre el molde con los peines colocados.
- Una vez solidificado, se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis; y se llenó la cámara con TAE 0.5X hasta la marca indicada.

Para correr una muestra del gen ADN_r 16S, se ajustó la corriente eléctrica a 60 volt durante 1 hora.

- Preparando un gel a 0.5% y a un volumen final de 50 mL.
- Se pesaron 0.25 g de agarosa y se sigue el mismo procedimiento arriba listado.

En la electroforesis se pueden usar los tapones TAE o TBE, los cuales se describen a continuación.

Para preparar la solución de TAE a 1X adicionar:

- 40 mM de Tris de HCl,
- 5 mM de acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$),
- 10 mM de EDTA,
- Se afora la solución con agua MilliQ estéril al volumen deseado y
- Se ajusta el pH a 8.

Para preparar la solución TBE a 10X se adiciona:

- 89 mM de Tris-Base,
- 89 mM de ácido bórico H_3BO_3
- 2 mM de EDTA, y
- 10 mg/mL de bromuro de etidio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$),
- Se afora con agua estéril a 1 L, y
- Controlar pH a 8.

Para preparar la solución del tapon de carga se adiciona:

- Tris 20 mM, pH 8,
- EDTA 2 mM
- SDS al 5%
- beta-mercaptoetanol al 10% y
- azul de bromofenol al 0.05 %

Anexo 5 - Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN por metodo tradicional descrita por Tsai y Olson (1991) y Griffiths *et al.* (2000), se divide en tres etapas:

Lisis enzimática:

- Se digiere el boton celular previamente precipitado, en 400 μL de TGE (Tris 25mM; glucosa 50mM;y EDTA 10 mM) y 4 μL de lisoenzima a 37 °C por 10 minutos.
- Para asegurar la lisis de bacterias Gram+, se adicionan 4 μL de acromopeptidasa; y además 4 μL de proteínasa K y 20 μL de SDS (*Sodium Dodecil Sulphate*) y se deja incubar la muestra por 30 min a 37 °C.

Eliminación de proteínas:

- Se agregan 500 μL de una mezcla de Fenol:Cloroformo (94:4) y se centrifuga por 7 minutos a 8,000 rpm.
- El sobrenadante se recupera en un tubo eppendorft[®] nuevo, y se repite el paso anterior.
- Al sobrenadante recuperado, nuevamente en un tubo eppendorft[®] nuevo, se le aaden 500 μL de una mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico (48:48:4) y se centrifuga a 8,000 por 7 minutos. Se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo. Tomar nota del volumen recuperado.

Nota: Cada vez que se recupera el sobrenadante, poner atención en tomar únicamente el sobrenadante, no proteínas (capa blanca) y fenol o cloroformo (fase precipitada).

Eliminación de ARN y recuperación de ADN:

- Se agregan 1:10 volúmenes de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol (EtOH) al 95% al último sobrenadante recuperado, y dejar incubar 24 horas a – 20 °C.
- Pasadas las 24 horas, precipitar en centrifuga la muestra durante 30 minutos a 1,400 rpm a 4 °C.

- Retirar el etanol y acetato de sodio con precaución, sin tocar las paredes del tubo, pues el DNA se quedó ahí.
- Lavando las paredes del tubo, agregar 1 volumen de etanol al 70 % y centrifugar por 15 minutos a 1,400 rpm a 4 °C.
- Con mucha precaución, retirar el etanol de la muestra, y dejar que se evapore por completo hasta que el tubo de la muestra se vea seco.
- Resuspender el ADN que se encuentra en las paredes del tubo, en 50 μ L de H₂O libre de RNasas y DNasas y digerir con 1 μ L de RNasa por 30 minutos a 37 °C.
- Almacenar los extractos de ADN a -20 °C.

Anexo 6 - Protocolo para la PCR

La mezcla reaccional de PCR para un volúmen total de 50 μL , se preparó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor de la *Taq*Pol (Fermentas[®]) y se describe a continuación:

- 5 μL de *Taq* Buff 10X,
- 1 μL de dNTP 10 mM (para una concentración final de 0.2 mM)
- 0.5 μL de *primer* 8F 10 mM (para una concentración final de 0.1 μM),
- 0.5 μL de *primer* 907R 10 mM (para una concentración final de 0.1 μM),
- 4 μL de MgCl_2 25 mM (para una concentración final de 2 μM),
- 0.25 μL de *Taq*Pol para una concentración final de 1.25u,
- Se pueden agregar distintas concentraciones de ADN, dependiendo cuanto se observó en la electroforesis. Va desde 0.5 μL hasta 2 μL por cada 50 μL de volumen final,
- Se afora a 50 μL de H_2O restando la cantidad que se le agregará de ADN (ejemplo, si se agrega 1 μL de muestra (ADN) por cada 50 μL de mezcla reaccional, el volumen de H_2O será de 36.75 μL).

Anexo 7 - Purificación de productos de PCR

Una vez amplificada correctamente la muestra, se debe realizar una purificación antes de enviarla a secuenciar. Para ello se utilizó un kit comercial *illustra GFX DNA and Gel Band Purification kit GE[®]* y se describe a continuación:

- Se adicionaron 500 μL de la solución *Capture buffer type 3* (tapa azul), a 100 μL de la muestra de PCR a purificar. Esta solución sirve para desnaturalizar proteínas y/o agarosa.
- Observar si la mezcla permanece en color amarillo (o naranja), o si se torna a un color rosa o púrpura. Si pasa lo último, agregar aproximadamente 10 μL de acetato de sodio 3M pH5 y mezclar.
- Cargar el volumen total de la mezcla anterior, a una *GFX Microspin column* colocada dentro de un tubo nuevo (de 2,000 μL).
- Centrifugar durante 30 segundos a 16,000 x g.
- Una vez precipitado todo el volumen de la nueva mezcla, agregar a la misma columna 500 μL de *Wash buffer type 1*.
- Centrifugar durante 30 segundos a 16,000 x g.
- Transferir la *GFX Microspin column* a un tubo eppendorf[®] nuevo.
- Dentro de la *GFX Microspin column*, adicionar de 10 a 50 μL de *Elution buffer type 4* y dejar incubar durante 1 minuto. Con esta solución, el ADN se va a desprender de la columna.
- Centrifugar durante 30 segundos a 16,000 x g.
- Almacenar la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Anexo 8 - Marcador de Peso Molecular (MPM)

El marcador o líder de peso molecular que se utilizó para realizar las electroforesis presentadas en los resultados, fue de 100pb y se muestran en la Figura 9.1 algunas de sus características.

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, ready-to-use

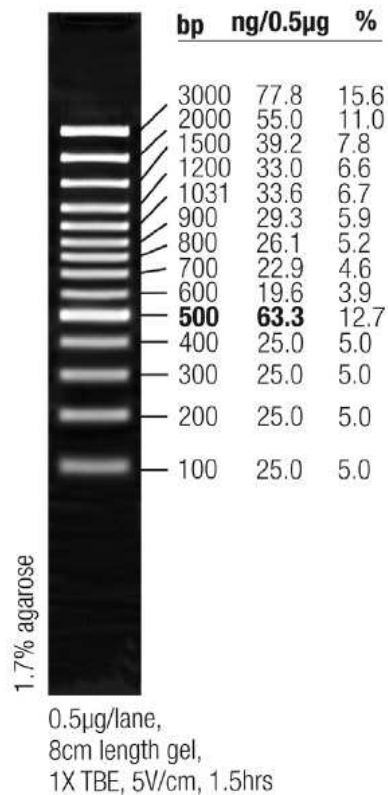


Figura 9.1: Especificaciones del MPM utilizado en el presente trabajo.

ABREVIATURAS

ATP Adenosín trifosfato
ADP Adenosín difosfato
AMP Adenosín monofosfato
ADN Ácido desoxirribonucleico
ARN Ácido ribonucleico
CVTM Cinturon Volcánico Transmexicano
FVTM Faja Volcánica Transmexicana
CFE Comisión Federal de Electricidad
IAU *International Astronomical Union*
TPF *Terrestrial Planet Finder*
NASA *National Aeronautics and Space Administration*
ESA *European Space Agency*
JUICE *JU*pter *ICy* moons *Explorer*
SOMA *SO*ciedad *ME*xicana de *AS*trobiología
DSN *Deep Space Network*
EANA *European Astobiology Network Association*
AstRoMap *Astrobiology Roan Mapping*
ARNr 16S Gen ARN de la subunidad menor ribosomal 16S
LREPF Laboratorio de Radioisótopos Eduardo Penna Franca
UFRJ Universidad Federal Rio de Janeiro
FIMS *Flow Injection Mercury System*
EPS Exopolisacárido
PCR *Polymerase Chain Reaction*
dNTP *Deoxynucleotide triphosphates*
Tm Temperatura de fusión del ADN
Ta Temperatura de alineamiento
NCBI *National Center for Biotechnology Information*
LPSN *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*
BMSAB *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*
MEGA *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
POGEG Periódico Oficial del Gobierno del Estado de Guanajuato
Taq *Thermus aquaticus*
PFGE *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
IAEA *International Atomic Energy Agency*

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F., Bennett, D., Bond, I., Eguchi, S., Furuta, Y., Hearnshaw, J., Kamiya, K., Kilmartin, P., Kurata, Y., Masuda, K., *et al.* (2004). Search for low-mass exoplanets by gravitational microlensing at high magnification. *Science*, 305(5688):1264–1266.
- Abe, F. y Horikoshi, K. (2001). The biotechnological potential of piezophiles. *TRENDS in Biotechnology*, 19(3):102–108.
- Ahmad, W. A., Ahmad, W. H. W., Karim, N. A., Raj, A. S., y Zakaria, Z. A. (2013). Cr (VI) reduction in naturally rich growth medium and sugarcane bagasse by *Acinetobacter haemolyticus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85:571–576.
- Ahmad, W. A., Zakaria, Z. A., Zakaria, Z., y Surif, S. (2009). Hexavalent chromium reduction at different growth phases of acinetobacter haemolyticus. *Environmental Engineering Science*, 26(7):1275–1278.
- Alaniz-Álvarez, S. A. y Nieto-Samaniego, A. F. (2005). El sistema de fallas taxco-san miguel de allende y la faja volcánica transmexicana, dos fronteras tectónicas del centro de méxico activas durante el cenozoico. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 57(1):65–82.
- Alazard, D., Dukan, S., Urios, A., Verhé, F., Bouabida, N., Morel, F., Thomas, P., Garcia, J.-L., y Ollivier, B. (2003). Desulfovibrio hydrothermalis sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1):173–178.
- Alcocer, J. (2002). Surface water—major challenges in mexico. *LakeLine*, 22:28–31.
- Alfaro, M. R., Montero, A., Ugarte, O. M., do Nascimento, C. W. A., de Aguiar Accioly, A. M., Biondi, C. M., y da Silva, Y. J. A. B. (2015). Background concentrations and reference values for heavy metals in soils of cuba. *Environmental monitoring and assessment*, 187(1):1–10.
- Alloway, B. J. (1995). *Heavy metals in soils*. Springer Science & Business Media.

- Anzidei, M., Carapezza, M. L., Esposito, A., Giordano, G., Lelli, M., y Tarchini, L. (2008). The Albano Maar Lake high resolution bathymetry and dissolved CO₂ budget (Colli Albani volcano, Italy): constrains to hazard evaluation. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 171(3):258–268.
- Aranda-Gómez, J. J., Levresse, G., Martínez, J. P., Ramos-Leal, J. A., Carrasco-Núñez, G., Chacón-Baca, E., González-Naranjo, G., Chávez-Cabello, G., Vega-González, M., Origel, G., *et al.* (2013). Active sinking at the bottom of the rincón de parangueo maar (guanajuato, méxico) and its probable relation with subsidence faults at salamanca and celaya. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 65(1):169–188.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M., Shirai, Y., y Hassan, M. (2006). Production and characterization of cellulase by bacillus pumilus eb3. *International Journal of Engineering and Technology*, 3(1):47–53.
- Ariffin, H., Hassan, M. A., Shah, U. K. M., Abdullah, N., Ghazali, F. M., y Shirai, Y. (2008). Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by bacillus pumilus eb3. *Journal of bioscience and bioengineering*, 106(3):231–236.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Ceniceros, N., Cruz, O., Aguayo, A., y Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2):249–258.
- Arrhenius, S. (1908). *Worlds in the making: the evolution of the universe*. Harper & brothers.
- Bacon, C. W. y Hinton, D. M. (2002). Endophytic and biological control potential of bacillus mojavensis and related species. *Biological Control*, 23(3):274–284.
- Bailey, C. (1957). Epicurus letter to herodotus en wj oates, ed. *The Stoic and Epicurean Philosophers*, pages 3–15.
- Balch, W. E., Fox, G., Magrum, L., Woese, C., y Wolfe, R. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*, 43(2):260.
- Bastos, W., Malm, O., Pfeiffer, W., y Cleary, D. (1998). Establishment and analytical quality control of laboratories for hg determination in biological and geological samples in the amazon, brazil. *Ciencia e Cultura*, 50(7):255–260.
- Battista, J. (1997). Against all odds: the survival strategies of *deinococcus radiodurans*. *Annual Reviews in Microbiology*, 51(1):203–224.

- Benardini, J. N., Sawyer, J., Venkateswaran, K., y Nicholson, W. L. (2003). Spore uv and acceleration resistance of endolithic bacillus pumilus and bacillus subtilis isolates obtained from sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia. *Astrobiology*, 3(4):709–717.
- Benner, S. A., Ricardo, A., y Carrigan, M. A. (2004). Is there a common chemical model for life in the universe? *Current opinion in chemical biology*, 8(6):672–689.
- Berthelot, R. (1938). La pensée de l'asie et l'astrobiologie. *Revue de l'histoire des religions*, 188(1):109–109.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., y Staley, J. T. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, volume 2. Springer Science & Business Media.
- Bouvet, P. J. y Grimont, P. A. (1986). Taxonomy of the genus acinetobacter with the recognition of acinetobacter baumannii sp. nov., acinetobacter haemolyticus sp. nov., acinetobacter johnsonii sp. nov., and acinetobacter junii sp. nov. and emended descriptions of acinetobacter calcoaceticus and acinetobacter lwoffii. *International journal of systematic bacteriology*, 36(2):228–240.
- Brito, E. M. S., Andrade, L., Caretta, C. A., y Duran, R. (2007). Microorganisms bioprospection: A new tendency in microbial ecology. In Pawley, L. E., editor, *Leading-Edge Environmental Biodegradation Research*, chapter 6, pages 199–222. Nova Publisher, New York, third edition.
- Buck, J. D. (1982). Nonstraining (koh) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4):992–993.
- Budinoff, C. R. y Hollibaugh, J. T. (2008). Arsenite-dependent photoautotrophy by an ectothiorhodospira-dominated consortium. *The ISME journal*, 2(3):340–343.
- Burt, R., Wilson, M., Mays, M., y Lee, C. (2003). Major and trace elements of selected pedons in the usa. *Journal of Environmental Quality*, 32(6):2109–2121.
- Carballido-López, R. y Errington, J. (2003). The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein mbl of bacillus subtilis. *Developmental cell*, 4(1):19–28.
- Chiliveri, S. R. y Linga, V. R. (2014). A novel thermostable, alkaline pectate lyase from bacillus tequilensis sv11 with potential in textile industry. *Carbohydrate polymers*, 111:264–272.
- Cleaves, H. J. y Chalmers, J. H. (2004). Extremophiles may be irrelevant to the origin of life. *Astrobiology*, 4(1):1–9.

- Cohn, F. (1876). Studies on the biology of the bacilli. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 2:249–276.
- Cruz, A. A., Melgarejo, E. D., Contreras, R. E. A. V., y González, G. M. A. (2012). *La Biodiversidad de Guanajuato: Estudio de Estado*, volume II. Comisión Nacional [para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)].
- Cruz Conejo, M. (1987). Los planetas interiores. mercurio, venus, el sistema tierra-luna, marte. *Coleccion Divulgacion, Madrid: Equipo Sirius*, — c1987, 1.
- D’Antoni, H. L. (2005). Astrobiología, el origen de la vida y el cambio global. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(3):381–394.
- Daskalakis, M. I., Rigas, F., Bakolas, A., Magoulas, A., Kotoulas, G., Katsikis, I., Karageorgis, A. P., y Mavridou, A. (2015). Vaterite bio-precipitation induced by bacillus pumilus isolated from a solutional cave in paiania, athens, greece. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99:73–84.
- Davis, J. (1972). Survival records in the algae, and the survival role of certain algal pigments, fat, and mucilaginous substances. *Biologist*.
- de la Vega, J. R. y Camberos, M. (1996). Datos preliminares sobre el descubrimiento de una tumba de tiro en el sitio de huitzilapa, jalisco. *Ancient Mesoamerica*, 7(01):121–134.
- Decker, R. y Decker, B. (2006). *Volcanoes*, volume 4. W. H. Freeman and Company, New York, USA, 4th edition.
- Delaport, B. y Sasson, A. (1967). Etudé de bactéries des sols arides du Maroc: *Brevibacterium halotolerans* n. sp. et *brevibacterium frigoritolerans* n. sp. *Compte Rendu de l’Académie des Sciences, Paris, Séries D*, 264(18):2257.
- Demant, A. (1978). Características del eje neovolcánico transmexicano y sus problemas de interpretación. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 2(2):172–187.
- Des Marais, D. J., Harwit, M. O., Jucks, K. W., Kasting, J. F., Lin, D. N., Lunine, J. I., Schneider, J., Seager, S., Traub, W. A., y Woolf, N. J. (2002). Remote sensing of planetary properties and biosignatures on extrasolar terrestrial planets. *Astrobiology*, 2(2):153–181.
- Dieser, M., Greenwood, M., y Foreman, C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42(4):396–405.
- Dittmann, M. T., Roesti, M., Indermaur, A., Colombo, M., Gschwind, M., Keller, I., Kovac, R., Barluenga, M., Muschick, M., y Salzburger, W. (2012). Depth-dependent abundance of midas cichlid fish (*amphilophus* spp.) in two nicaraguan crater lakes. *Hydrobiologia*, 686(1):277–285.

- Dongdong, Z., Junpo, J., y Baocheng, Z. (2014). Optimization of fermentation conditions of a biocontrol bacterial isolate bacillus z-5 against cotton verticillium wilt. *Cotton Science*, 1:002.
- Duce, R., Unni, C., Ray, B., Prospero, J., y Merrill, J. (1980). Long-range atmospheric transport of soil dust from asia to the tropical north pacific: Temporal variability. *Science*, 209(4464):1522–1524.
- Earman, S., Phillips, F. M., y McPherson, B. J. (2005). The role of “excess” CO₂ in the formation of trona deposits. *Applied Geochemistry*, 20(12):2217–2232.
- Ehrenberg, C. G. (1833). *Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes*. na.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in bacillus subtilis. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2):117–126.
- Escolero, Ó. A. y Alcocer, J. (2004). Desecación de los lagos cráter del valle de santiago, guanajuato. *El Agua el Mexico vista desde la academia. Academia Mexicana de Ciencias, Mexico*, pages 99–115.
- Fajardo-Cavazos, P., Link, L., Melosh, H. J., y Nicholson, W. L. (2005). Bacillus subtilis spores on artificial meteorites survive hypervelocity atmospheric entry: implications for lithopanspermia. *Astrobiology*, 5(6):726–736.
- Ferrara, M. A., Mattoso, J. M., Bon, E. P., y Pereira Jr, N. (2004). Kinetics of asparaginase ii fermentation in saccharomyces cerevisiae ure2dal80 mutant. In *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO*, pages 299–305. Springer.
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., y Manea, M. (2012). The dynamic history of the trans-mexican volcanic belt and the mexico subduction zone. *Tectonophysics*, 522:122–149.
- Fimlaid, K. A. y Shen, A. (2015). Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the firmicutes. *Current opinion in microbiology*, 24:88–95.
- Foti, M., Sorokin, D. Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Kuenen, J. G., y Muyzer, G. (2007). Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and environmental microbiology*, 73(7):2093–2100.
- García, L., Dadgug, L., Picquart, M., y Vázquez, E. (2010). *Introducción a la Física Biológica*. El Colegio Nacional, 1er edition.

- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., y Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7):1475–1484.
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R., y López-García, P. (2013). Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of lake alchichica (mexico). *The ISME journal*, 7(10):1997–2009.
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., y Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301(5632):510–513.
- Gorlenko, V. M., Bryantseva, I. A., Rabold, S., Tourova, T. P., Rubtsova, D., Smirnova, E., Thiel, V., y Imhoff, J. F. (2009). *Ectothiorhodospira variabilis* sp. nov., an alkaliphilic and halophilic purple sulfur bacterium from soda lakes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4):658–664.
- Gorshkov, G. P. y Iakushova, A. F. (1969). *Physical geology*, volume 24. Gordon and Breach.
- Gottheil, O. (1901). Botanische beschreibung einiger bodenbakterien. *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II*, 7:680–691.
- Green, J. (1986). Associations of zooplankton in six crater lakes in arizona, mexico and new mexico. *Journal of Zoology*, 208(1):135–159.
- Griffths, R. I., Ehiteley, A. S., O'Donnell, A., y Bailey, M. . (2000). Rapid method for coextraction of dna and rna from natural environments for analysis of ribosomal dna–based microbial community composition. *Applied and environmental microbiology*, 66(12):5488–5491.
- Gull, M. (2014). Prebiotic phosphorylation reactions on the early earth. *Challenges*, 5(2):193–212.
- Han, Y. S., Hadiko, G., Fuji, M., y Takahashi, M. (2006). Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH. *Journal of crystal growth*, 289(1):269–274.
- Handtke, S., Volland, S., Methling, K., Albrecht, D., Becher, D., Nehls, J., Bongaerts, J., Maurer, K.-H., Lalk, M., Liesegang, H., et al. (2014). Cell physiology of the biotechnological relevant bacterium *Bacillus pumilus* omics-based approach. *Journal of biotechnology*, 192:204–214.
- Harwood, C. R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in biotechnology*, 10:247–256.

- Harwood, C. R., Pohl, S., Smith, W., y Wipat, A. (2013). Bacillus subtilis: model gram-positive synthetic biology chassis. *Comput. Sci*, 40:87–117.
- Harwood, C. R. y Wipat, A. (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of bacillus subtilis strain 168. *FEBS letters*, 389(1):84–87.
- Higgins, D. y Dworkin, J. (2012). Recent progress in bacillus subtilis sporulation. *FEMS microbiology reviews*, 36(1):131–148.
- Hoffman, P. (1992). Rodinia, gondwanaland, pangea and amasia: alternating kinematic scenarios of supercontinental fusion. *EOS (Transactions of the American Geophysical Union)*, 73(14):282.
- Horneck, G., Rettberg, P., Walter, N., y Gomez, F. (2015). European landscape in astrobiology, results of the astromap consultation. *Acta Astronautica*.
- Hosoya, S., Lu, Z., Ozaki, Y., Takeuchi, M., y Sato, T. (2007). Cytological analysis of the mother cell death process during sporulation in bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, 189(6):2561–2565.
- Hungate, R. (1969). Chapter iv a roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in microbiology*, 3:117–132.
- Iess, L., Stevenson, D., Parisi, M., Hemingway, D., Jacobson, R., Lunine, J., Nimmo, F., Armstrong, J., Asmar, S., Ducci, M., *et al.* (2014). The gravity field and interior structure of enceladus. *Science*, 344(6179):78–80.
- Imhoff, J. F. (2006). The family ectothiorhodospiraceae. In *The Prokaryotes*, pages 874–886. Springer.
- Imhoff, J. F., Sahl, H. G., Soliman, G. S., y Trüper, H. G. (1979). The wadi natrun: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiology Journal*, 1(3):219–234.
- Iwasaka, Y., Minoura, H., y Nagaya, K. (1983). The transport and spacial scale of asian dust-storm clouds: a case study of the dust-storm event of april 1979. *Tellus B*, 35(3):189–196.
- Javor, B. (1989). Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. *Brock/Springer series in contemporary bioscience (USA)*.
- Jones, A. M. y Harrison, R. M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations a review. *Science of the Total Environment*, 326(1):151–180.
- Jones, L. J., Carballido-Lpez, R., y Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in bacillus subtilis. *Cell*, 104(6):913 – 922.

- Jukes, T. H. y Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3:21–132.
- Jurado, M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M., López, M., López-González, J., y Moreno, J. (2014). Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency y final product maturity. *Process Biochemistry*, 49(11):1958–1969.
- Kabata, A. y Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants. *New York. CRC*.
- Kämpfer, P. (2014). *Acinetobacter*. In Tortorello, C. A. y Lou, B., editors, *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, pages 11–17. Academic Press, Oxford.
- Katoh, K. y Standley, D. M. (2013). Mafft multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4):772–780.
- Kauffman, S. (1995). *At home in the universe: The search for the laws of self-organization and complexity*. Oxford university press.
- Khatri, I., Singh, N. K., Subramanian, S., y Mayilraj, S. (2014). Genome sequencing and annotation of acinetobacter haemolyticus strain mtcc 9819 t. *Genomics Data*, 2:10–12.
- Kiang, N. Y., Segura, A., Tinetti, G., Blankenship, R. E., Cohen, M., Siefert, J., Crisp, D., y Meadows, V. S. (2007). Spectral signatures of photosynthesis. ii. co-evolution with other stars and the atmosphere on extrasolar worlds. *Astrobiology*, 7(1):252–274.
- Kienel, U., Bowen, S. W., Byrne, R., Park, J., Böhnelt, H., Dulski, P., Luhr, J. F., Siebert, L., Haug, G. H., y Negendank, J. F. (2009). First lacustrine varve chronologies from mexico: impact of droughts, enso and human activity since ad 1840 as recorded in maar sediments from valle de santiago. *Journal of Paleolimnology*, 42(4):587–609.
- Kroll, A., Behra, R., Kaegi, R., y Sigg, L. (2014). Extracellular polymeric substances (eps) of freshwater biofilms stabilize and modify ceo2 and ag nanoparticles. *PloS one*, 9(10):e110709.
- Kroos, L. (2007). The bacillus and myxococcus developmental networks and their transcriptional regulators. *Annu. Rev. Genet.*, 41:13–39.
- Ku, C., Lo, W.-S., y Kuo, C.-H. (2014). Molecular evolution of the actin-like mreB protein gene family in wall-less bacteria. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(4):927–932.

- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657):249–256.
- Kvenvolden, K. A., Glavin, D. P., y Bada, J. L. (2000). 1, extraterrestrial amino acids in the Murchison meteorite: re-evaluation a (ter thirty years). *Perspectives in amino acid and protein geochemistry*, page 7.
- La Duc, M., Kern, R., y Venkateswaran, K. (2004). Microbial monitoring of spacecraft and associated environments. *Microbial ecology*, 47(2):150–158.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, G. and Goodfellow, M., editors, *Nucleic Acid Techniques Systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, 1 edition.
- Lawson, P. R. y Dooley, J. A. (2005). *Technology plan for the terrestrial planet finder interferometer*. Pasadena, CA: Jet Propulsion Laboratory, National Aeronautics and Space Administration.
- Lebreton, J.-P., Coustenis, A., Lunine, J., Raulin, F., Owen, T., y Strobel, D. (2009). Results from the Huygens probe on Titan. *The Astronomy and Astrophysics Review*, 17(2):149–179.
- Lemarchand, G. (2000). A new era in the search for life in the universe. In *Bioastronomy 99*, volume 213, page 7.
- Lemarchand, G. A. y Tancredi, G. (2010). *Astrobiología, del Big Bang a las civilizaciones*. UNESCO, Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe.
- Lewin, B. y Dover, G. (1994). *Genes v*, volume 299. Oxford University Press Oxford.
- Linde, L. M. y Heins, H. L. (1960). Bacterial endocarditis following surgery for congenital heart disease. *New England Journal of Medicine*, 263(2):65–69.
- Logan, N. A. y Halket, G. (2011). Developments in the taxonomy of aerobic, endospore-forming bacteria. In *Endospore-forming Soil Bacteria*, pages 1–29. Springer.
- Longwell, C. R. y Flint, R. F. (1962). Introduction to physical geology. *Soil Science*, 93(4):294.
- Lorenz, V. (1986). On the growth of maars and diatremes and its relevance to the formation of tuff rings. *Bulletin of Volcanology*, 48(5):265–274.
- Ludwig, W. y Klenk, H.-P. (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology*, pages 49–65. Springer.

- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (2003). Diversidad procariótica: Archea. *Brock Microbiología de los Microorganismos. Tenth edition. Ed. Pearson-Prentice Hall, Madrid*, pages 741–766.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, M. G., Fernández, C. R., y Pérez, M. S. (2004). *Brock Biología de los microorganismos*, volume 10. prentice hall.
- Maki, T., Puspitasari, F., Hara, K., Yamada, M., Kobayashi, F., Hasegawa, H., y Iwasaka, Y. (2014). Variations in the structure of airborne bacterial communities in a downwind area during an asian dust (kosa) event. *Science of the Total Environment*, 488:75–84.
- Malm, O., Pfeiffer, W., Fiszman, M., y Azcue, J. (1989). Heavy metal concentrations and availability in the bottom sediments of the paraiba do sulguandu river system, rj, brazil. *Environmental Technology Letters*, 10(7):675–680.
- Mancinelli, R. L. (2005). 12 microbial life in brines, evaporites and saline sediments: The search for life on mars. In *Water on Mars and life*, pages 277–297. Springer.
- Martínez, E. C., Blanco, V. R., Suárez, M. R., Llosa, C., Asensio, M. T., y Torrico, A. M. (1995). Infective endocarditis of an interventricular patch caused by *acinetobacter haemolyticus*. *Infection*, 23(4):243–245.
- Mayor, M. y Queloz, D. (1995). A jupiter-mass companion to a solar-type star. *Nature*, 378(6555):355–359.
- Meadows, V. S. y Crisp, D. (1996). Ground-based near-infrared observations of the venus nightside: The thermal structure and water abundance near the surface. *Journal of Geophysical Research: Planets (1991–2012)*, 101(E2):4595–4622.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics.
- Mori, L. (2007). *Origen del magnetismo moicénico en el sector central de la FVTM y sus implicaciones en la evolución del sistema de subducción mexicano*. PhD thesis, Universidad Autónoma de México, México.
- Motil, K. J. y Scrimshaw, N. S. (1979). The role of exogenous histamine in scombroid poisoning. *Toxicology Letters*, 3(4):219–223.
- Murphy, G. P. (1986). *The chronology, pyroclastic stratigraphy, and petrology of the Valle de Santiago Maar Field, Central Mexico*.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G. C., Bremer, P. J., y Meerdink, G. (2011). Biogenic amines and potential histamine-forming bacteria in rihaakuru (a cooked fish paste). *Food chemistry*, 128(2):479–484.

- Nayak, S., Porob, S., Fernandes, A., Meena, R. M., y Ramaiah, N. (2014). PCR detection of *ansA* from marine bacteria and its sequence characteristics from *Bacillus tequilensis* NIOS4. *Journal of basic microbiology*, 54(2):162–168.
- Nevo-Dinur, K., Govindarajan, S., y Amster-Choder, O. (2012). Subcellular localization of rna and proteins in prokaryotes. *Trends in Genetics*, 28(7):314–322.
- Nicholson, W. L. y Schuerger, A. C. (2005). *Bacillus subtilis* spore survival and expression of germination-induced bioluminescence after prolonged incubation under simulated mars atmospheric pressure and composition: implications for planetary protection and lithopanspermia. *Astrobiology*, 5(4):536–544.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., y Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6):711–729.
- Ohmoto, H. (1996). Evidence in pre-2.2 ga paleosols for the early evolution of atmospheric oxygen and terrestrial biota. *Geology*, 24(12):1135–1138.
- Ohmoto, H., Watanabe, Y., y Kumazawa, K. (2004). Evidence from massive siderite beds for a co₂-rich atmosphere before ~ 1.8 billion years ago. *Nature*, 429(6990):395–399.
- Oren, A. (2014). The family Ectothiorhodospiraceae. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*, pages 199–222.
- Ortuño, M., Zúñiga, F. R., Aguirre-Díaz, G. J., Carreón-Freyre, D., Cerca, M., y Roverato, M. (2014). Holocene paleo-earthquakes recorded at the transfer zone of two major faults: The Pastores and Venta de Bravo faults (trans-mexican volcanic belt). *Geosphere*, pages GES01071–1.
- Pei, Q. H., Shahir, S., Raj, A. S., Zakaria, Z. A., y Ahmad, W. A. (2009). Chromium (vi) resistance and removal by *Acinetobacter haemolyticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6):1085–1093.
- Pick, U. (1999). *Dunaliella acidophila* most extreme acidophilic alga. In *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*, pages 465–478. Springer.
- Piggot, P. (2002). Sporulation genes and inter-compartmental regulation. *Bacillus subtilis and its Closest Relatives: from Genes to Cells*.
- Piggot, P. y Coote, J. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological reviews*, 40(4):908.
- Pinto, G., Albertano, P., y Pollio, A. (1994). Italy's contribution to the systematics of *Cyanidium caldarium* sensu lato. In *Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: Cyanidium caldarium (Rhodophyta) and Related Cells*, pages 157–166. Springer.

- POGEG (2001). (*Periódico Oficial del Gobierno del Estado de Guanajuato*). Decreto por el que se declara Área Natural Protegida en la categoría de Parque Ecológico, la zona conocida como Lago-Cráter La Joya, del municipio de Yuriria. Declaratoria en el número 16, segunda parte del 23 de febrero de 2001.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zargursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., y Baumeister, K. (1987). A system for rapid dna sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238(4825):336–341.
- Prospero, J. M., Blades, E., Mathison, G., y Naidu, R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from africa to the caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 21(1):1–19.
- Puente-Solis, I. R. (2004). Estratigrafía e historia eruptiva del cráter de explosión hoyo La Cíntora, GTO. Bachelor Thesis, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ciencias de la Tierra-Facultad de Ingeniería.
- Rainey, F. A. y Oren, A. (2006). *Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them*, volume 35. Elsevier.
- Ramírez, N., Serrano, J. A., y Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3):56–71.
- Ramírez, S., Montoya, L., y Avendaño, R. (2013). Halotolerant and halophilic bacteria in the oceans of the icy satellites. In *AGU Spring Meeting Abstracts*, volume 1, page 07.
- Raulin, F. (2008). Astrobiology and habitability of titan. In *Strategies of Life Detection*, pages 37–48. Springer.
- Roberts, M. S., Nakamura, L., y Cohan, F. M. (1994). *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in dna sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(2):256–264.
- Rodríguez, L. F. (1986). *Un universo en expansión*, volume 1. Fondo de Cultura Económica.
- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., y Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10):2429–2436.

- Ruiz-Garcia, C., Quesada, E., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M. C., y Béjar, V. (2005). *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(3):1279–1285.
- Russell, F. E. y Margetić, Z. (1986). Scombroid poisoning: mini-review with case histories. *Toxicon*, 24(10):967–973.
- Russo-Matioli, S. (2001). *Biologia Molecular e Evolução*, volume 1. Holmos Editora, Sao Paulo, Brasil, 1st edition.
- Sagan, C., Thompson, W. R., Carlson, R., Gurnett, D., y Hord, C. (1993). A search for life on earth from the Galileo spacecraft. *Nature*, 365(6448):715–721.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., y Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491.
- Salminen, R., Batista, M., Bidovec, M., Demetriades, A., De Vivo, B., De Vos, W., Duris, M., Gilucis, A., Gregorauskiene, V., Halamic, J., *et al.* (2005). Foregs geochemical atlas of Europe. *Part 1: Background information, methodology and maps*.
- Sánchez, M. L. y Reynoso, V. H. (2012). Herpetofauna del Área de Uso Sustentable Cerro Amoles, del Parque Ecológico Lago Cráter La Joya y del Área de Restauración Ecológica Laguna Yurira y su zona de influencia en Guanajuato. *La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado*, II:232–233.
- Schrödinger, E. (1992). What is life?. 1944. *reprinted Cambridge University Press*, 1995:87.
- Schuerger, A. C., Mancinelli, R. L., Kern, R. G., Rothschild, L. J., y McKay, C. P. (2003). Survival of endospores of *Bacillus subtilis* on spacecraft surfaces under simulated martian environments: implications for the forward contamination of Mars. *Icarus*, 165(2):253–276.
- Seckbach, J. (1994). *Evolutionary pathways and enigmatic algae*. Kluwer Academic Publishers.
- Seckbach, J. (2000). Extremophiles as models for extraterrestrial life. In *Bioastronomy 99*, volume 213, page 379.
- Seckbach, J. (2005). The relevance of halophiles and other extremophiles to martian and extraterrestrial environments. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*, pages 123–136. Springer.

- Seckbach, J. y Oren, A. (2007). Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, pages 3–25. Springer.
- Segura, A., Meadows, V., Kasting, J., Crisp, D., y Cohen, M. (2007). Abiotic formation of O₂ and O₃ in high-CO₂ terrestrial atmospheres. *Astronomy & Astrophysics*, 472(2):665–679.
- Setlow, P. (2006). Spores of bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, 101(3):514–525.
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A., *et al.* (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research*, 2011.
- Shezeng, L., Ping, M., y Xingzhong, L. (2001). Biological control of cotton verticillium wilt by antagonistic bacteria. *Huazhong Agricultural University*, 20(5):422–425.
- Sjogren, W., Anderson, J., Phillips, R., y Trask, D. (1976). Gravity fields. *Geoscience Electronics, IEEE Transactions on*, 14(3):172–183.
- Snyder, L., Champness, W., y Champness, W. (2007). *Molecular genetics of bacteria*. ASM Press Washington, DC.
- SOMA, S. M. d. A. (Abril–Octubre, 2014-No.45). Boletín de la sociedad mexicana de astrobiología.
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., y Gupta, N. (2014). Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from bacillus tequilensis sn4. *PloS one*, 9(5):e96951.
- Sorokin, D. Y., Gorlenko, V. M., Namsaraev, B. B., Namsaraev, Z. B., Lysenko, A. M., Eshinimaev, B. T., Khmelenina, V. N., Trotsenko, Y. A., y Kuenen, J. G. (2004). Prokaryotic communities of the north-eastern mongolian soda lakes. *Hydrobiologia*, 522(1-3):235–248.
- Souza, V., Escalante, A., Espinoza, L., y Valera, A. (2004). Cuatro ciénegas un laboratorio natural de astrobiología. *Ciencias*, 75:4–12.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., *et al.* (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3):1043–1047.

- Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS letters*, 452(1):22–25.
- Stine, S. (1990). Late holocene fluctuations of mono lake, eastern california. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 78(3):333–381.
- Tan, I. S. y Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in bacillus subtilis. *Environmental microbiology reports*, 6(3):212–225.
- Tarback, E. J., Lutgens, F. K., y Tasa, D. (2005). *Ciencias de la Tierra: Una introducción a la Geología Física*, volume 736. Prentice hall.
- Tazieff, H. (1972). *Les volcans et la dérive des continents*. Presses Universitaires, Paris.
- Tinetti, G., Meadows, V. S., Crisp, D., Kiang, N. Y., Kahn, B. H., Bosc, E., Fishbein, E., Velusamy, T., y Turnbull, M. (2006). Detectability of planetary characteristics in disk-averaged spectra ii: synthetic spectra and light-curves of earth. *Astrobiology*, 6(6):881–900.
- Traore, M. K. y Buschle-Diller, G. (2000). Environmentally friendly scouring processes. *Textile Chemist & Colorist & American Dyestuff Reporter*, 32(12).
- Tsai, Y. L. y Olson, B. H. (1991). Rapid method for direct extraction of dna from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4):1070–1074.
- Uyeda, S. y Kanamori, H. (1979). Back-arc opening and the mode of subduction. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth (1978–2012)*, 84(B3):1049–1061.
- Valerdi, J. C., Brito, E. M., Caretta, C. A., Goni, M., y Guyoneaud, R. (2014). Biodiversidad bacteriana del lago alcalino “El Rincón de Parangueo”, Guanajuato, México. In *Memorias IX Reunión de la Sociedad Mexicana de Astrobiología*, pages 193–198. Unpublisher, Universidad de Guadalajara, SOMA.
- Valerdi, J. C., Pacheco, R. K., Rivera Martínez, L. G., Rico Herrera, M., Malm, O., y Souza Brito, E. M. (2013). Estudio Filogenético de cepas bacterianas aisladas de lagos de cráteres “7 Luminarias”. In *Aplicaciones en Bioingeniería Ambiental (First Edition)*, pages 80–87. Universidad de Guanajuato, Guanajuato. ISBN: 978-607-441-276-5.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., y Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2):504–544.
- Villegas-Negrete, N. (2010). Estudio de la diversidad bacteriana de un sitio extremo: Los tapetes microbianos del balneario “Los Azufres”. Bachelor Thesis, U.Guanajuato, DCNyE – Dept. Biología.

- Vogt, S. S., Butler, R. P., Rivera, E. J., Haghhighipour, N., Henry, G. W., y Williamson, M. H. (2010). The lick-carnegie exoplanet survey: a 3.1 m planet in the habitable zone of the nearby m3v star gliese 581. *The Astrophysical Journal*, 723(1):954.
- Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J., Yokota, A., y Kuo, H.-P. (2007). Reclassification of bacillus axarquiensis ruiz-garcia et al. 2005 and bacillus malacitensis ruiz-garcia et al. 2005 as later heterotypic synonyms of bacillus mojavensis roberts et al. 1994. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(7):1663–1667.
- Ware, V. C., Tague, B. W., Clark, C. G., Gourse, R. L., Brand, R. C., y Gerbi, S. A. (1983). Sequence analysis of 28s ribosomal dna from the amphibian xenopus laevis. *Nucleic acids research*, 11(22):7795–7817.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., y Lane, D. J. (1991). 16s ribosomal dna amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2):697–703.
- Williams, W. (1996). The largest, highest and lowest lakes of the world: saline lakes. *Verhandlungen-Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 26:61–79.
- Woese, C., Weisburg, W., Hahn, C., Paster, B., Zablen, L., Lewis, B., Macke, T., Ludwig, W., y Stackebrandt, E. (1985). The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Systematic and applied microbiology*, 6(1):25–33.
- Wu, C.-Y., Chen, N., Li, H., y Li, Q.-F. (2014). Kocuria rosea hn01, a newly alkaliphilic humus-reducing bacterium isolated from cassava dreg compost. *Journal of Soils and Sediments*, 14(2):423–431.
- Yano, J. K. y Poulos, T. L. (2003). New understandings of thermostable and peizostable enzymes. *Current opinion in biotechnology*, 14(4):360–365.
- Zhang, P., Fang, F., Chen, Y.-P., Shen, Y., Zhang, W., Yang, J.-X., Li, C., Guo, J.-S., Liu, S.-Y., Huang, Y., et al. (2014). Composition of eps fractions from suspended sludge and biofilm and their roles in microbial cell aggregation. *Chemosphere*, 117:59–65.