



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE  
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A ONCOIDES  
DE MANANTIALES HIDROTERMALES DE  
SANTISPAC, BAHÍA CONCEPCIÓN, B.C.S.,  
MÉXICO.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
( Orientación en Biotecnología )

P r e s e n t a

**Priscila Gallut Rubio**

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2016.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 23 del Mes de Noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de Santispac, Bahía Concepción, B.C.S., México".**

Presentada por el alumno:

**Priscila Gallut Rubio**

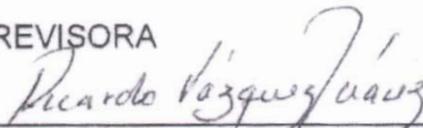
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología.**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



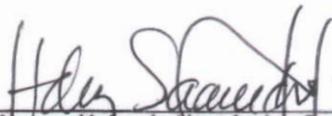
Dr. Alejandro López Cortés  
Director de Tesis



Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
Co-tutor



José Q. García Maldonado  
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Alejandro López Cortés  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.  
Director

Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.  
Tutor

Dr. José Quinatzin García Maldonado  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mérida.  
Tutor

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. José Quinatzin García Maldonado

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. José Quinatzin García Maldonado

## **SUPLENTE**

Dra. Yolanda Maya Delgado

## Resumen

La diversidad filogenética y funcional de microorganismos de ventilas hidrotermales intermareales de Bahía Concepción, B.C.S., México ha sido poco estudiada. Sin embargo, estos sistemas han atraído la atención de científicos por ser modelos del origen de la vida en la Tierra, en otros planetas y por presentar microorganismos con capacidades metabólicas de interés en biotecnología. En este estudio se determinó la composición elemental de macroestructuras denominadas oncoides, que se desarrollan en manantiales hidrotermales intermareales de Playa Santispac, B.C.S., encontrando por análisis semicuantitativo a los siguientes elementos: Ag, Au, As, Co, Cu, Cl, Ca, Cd, Fe, Na, Mg, Mn, O, Si y S; mientras que por medio del análisis cuantitativo se detectaron: Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, V, Zn. Con estos resultados se reporta por primera vez la presencia de Ag, Au, Be, Cr, Cl, K, Na, P, Pb, Sb, Se, Sn y Sr en el sistema hidrotermal de playa Santispac, B.C.S. En base a las concentraciones obtenidas del análisis cuantitativo, los elementos más abundantes en el oncoide correspondieron al Mn ( $138312 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mg ( $28531 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y Ca ( $56606 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Metales y metaloides tóxicos fueron encontrados: As ( $550 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Ba ( $950 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y V ( $770 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Con la finalidad de incrementar el conocimiento de la diversidad de bacterias aerobias mesófilas de los oncoides, en este trabajo se aislaron 22 cepas, de las cuales se identificaron a los géneros *Nitratireductor*, *Ornithinibacillus*, *Bacillus*; y a las especies *Bacillus licheniformis* y *Synechococcus elongatus* a partir de las secuencias parciales del 16S ARNr. Los cultivos obtenidos en este trabajo pueden ser empleados como modelos de estudio para la identificación y análisis de los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables de la resistencia bacteriana a metales y metaloides con fines de biorremediación.

**Palabras clave:** *Manantiales hidrotermales intermareales, oncoides, composición elemental, bacterias heterótrofas mesófilas, 16S ARNr.*

**Vo. Bo. Dr. Alejandro López Cortés**

## Summary

The phylogenetic and functional diversity of microorganisms from intertidal hydrothermal springs in Bahía Concepción, B.C.S., México have scarcely been studied. However, these systems have attracted the attention of scientists as models for the origin of life on Earth, on other planets and for harboring microorganisms with metabolic capacities of biotechnological interest. In this study it was determined the elemental composition of macrostructures termed oncoids, which are developed in intertidal hydrothermal springs of Santispac beach, B.C.S., finding by a semi-quantitative analysis the follow list of elements: Ag, Au, As, Co, Cu, Cl, Ca, Cd, Fe, Na, Mg, Mn, O, Si, and S. Through quantitative analysis, we detected: Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, V, and Zn. With these results its reported for the first time the presence of Ag, Au, Be, Cr, Cl, K, Na, P, Pb, Sb, Se, Sn and Sr in the hydrothermal system of Santispac beach, B.C.S. Based on the concentrations obtained from quantitative determinations, the most abundant elements found in the oncoid were Mn ( $138312 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mg ( $28531 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and Ca ( $56606 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Toxic metals and metalloids were found: As ( $550 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Ba ( $950 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and V ( $770 \text{ mg kg}^{-1}$ ). With the goal of increasing the knowledge of the diversity of mesophilic aerobic bacteria of oncoids, we isolated 22 strains of aerobic mesophilic heterotrophic bacteria, of wich were identified the genera *Nitratireductor*, *Ornithinibacillus*, and *Bacillus*; and the species *Bacillus licheniformis* and *Synechococcus elongatus* from the partial sequences of 16S rRNA. The cultures obtained in this study could be used as study models for identification and analysis of the genetic and biochemical mechanisms responsible for bacterial resistance to metals and metalloids whit bioremediation purposes.

**Key words:** *Intertidal hydrothermal springs, oncoids, elemental composition, heterotrophic mesophilic bacteria, 16S rRNA.*

**Vo. Bo. Dr. Alejandro López Cortés**

## Dedicatoria

*Dedico esta tesis a mi madre Liliana Gema quien fue mi primera y por siempre maestra. Te AMO INFINITAMENTE ojitos verdes... A mi querido hermano Alexis;*

*A todas las enseñanzas que me han brindado mi familia, mis amigos y profesores;*

*y a todos aquellos que han sembrado y cultivado la ciencia en México.*



*Educar es lo mismo que poner un motor a una barca,  
hay que medir, pensar, equilibrar, y poner todo en marcha.*

*Pero para eso, uno tiene que llevar en el alma  
un poco de marino, un poco de pirata, un poco de poeta,  
y un kilo y medio de paciencia concentrada.*

*Pero es consolador soñar, mientras uno trabaja,  
que esa barca, ese niño irá muy lejos por el agua.*

*Soñar que ese navío llevará nuestra carga de palabras  
hacia puertos distantes, hacia islas lejanas.*

*Soñar que cuando un día esté durmiendo nuestro propio barco,  
en barcos nuevos seguirá nuestra bandera enarbolada.*

*G.C*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante dos años para mi manutención con número de registro 276805 y servicios médicos proporcionados.

Agradezco enormemente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por admitirme como estudiante de maestría y así poder formarme como futuro científico. En particular al Programa de Planeación y Conservación Ambiental por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de experimentos, ya que la realización de esta tesis fue posible con el apoyo del proyecto de recursos fiscales del PPAC otorgado al Dr. Alejandro López Cortés.

Al programa de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por la beca otorgada para mi manutención por tres meses y patrocinio de las impresiones de tesis permitiéndome finalizar la maestría. Especialmente quiero agradecer al personal que allí labora, por todas las amables atenciones, facilidades y servicios brindados.

A mi director de tesis el Dr. Alejandro López Cortés por permitirme estudiar este tema, por transmitirnos la importancia del conocimiento científico. Reconozco su gran dedicación a mi aprendizaje y atesoraré por siempre todos sus consejos a lo largo de este camino.

También deseo agradecer a mi comité tutorial, el Dr. Ricardo Vázquez Juárez por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de esta tesis; al Dr. José Quinatzin García Maldonado por sus aportaciones y sugerencias para mejorar mi proyecto de investigación.

Al técnico Biól. Mar. Hever Lastinere Barragán por su admirable asesoramiento en las técnicas de biología molecular. Al M.C Baudilio Acosta Vargas y al I.B.Q Ariel Arturo Cruz Villacorta por su apoyo con la composición elemental de oncoides.

A la Academia de Biotecnología en especial al Dr. García Carreño por su buen ejemplo.

Con cariño a mis compañeros de laboratorio por su solidaridad, colaboración y amistad, Biól. Mar. Carolina Alejandra Martínez, Biól. Juan Pablo Molina.

A los estudiantes y buenos amigos, Isaac Camargo, Esteban Velázquez, Daniel Romo, Leticia Cab, Jhonathan Jiménez, Carmen Pasos. A Olivia Gonzales, Luis Beltrán y toda la pandilla. A Olaff Osuna. A Winny y Butch por estar siempre conmigo y darme todo su amor. A todos ellos gracias por ayudarme a finalizar esta etapa de mi vida.

A la ciudad de la Paz B.C.S., donde viví en paz durante tres años, maravillada de su espectacular biodiversidad.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	vi
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	viii
<b>Abreviaturas</b> .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Estrategias para el estudio de los microorganismos .....	1
1.2. Métodos independientes de cultivo .....	3
1.2.1. PCR-DGGE .....	3
1.2.2. Clonación .....	4
1.2.3. Metagenómica .....	5
1.3. Métodos dependientes de cultivo .....	6
1.4. Ventilales hidrotermales someras .....	10
1.5. Las ventilales hidrotermales como modelos del origen de la vida en la Tierra y en otros planetas .....	11
1.6. Geología .....	13
1.6.1. Geoquímica .....	13
1.6.2. Registro fósil .....	13
1.7. Oncoides modernos .....	13
1.8. Microbiología de aberturas hidrotermales someras y oncoides .....	15
1.9. Biotecnología .....	17
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>6. MATERIAL Y METODOS</b> .....	21
6.1. Área de estudio .....	21
6.2. Parámetros fisicoquímicos y toma de muestras .....	23
6.3. Composición elemental de los oncoides .....	24
6.3.1. Microanálisis elemental por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X .....	24
6.3.2. Microanálisis elemental por espectrometría con plasma acoplado inductivamente .....	24
6.4.1. Aislamiento de cianobacterias .....	25
6.4.2. Aislamiento de bacterias .....	26

6.4.3 Crecimiento y cultivo de microorganismos.....	26
6.4.4. Preservación de cultivos de microorganismos.....	27
6.4.5. Caracterización morfológica .....	27
6.5. Secuenciación parcial del gen 16S ARNr .....	28
6.6. Reconstrucción filogenética .....	30
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
7.1. Parámetros fisicoquímicos del área de estudio .....	31
7.2. Determinación de la composición química de los oncoides.....	31
7.3. Descripción del oncoide.....	36
7.4. Aislamiento, crecimiento y cultivo de microorganismos de oncoides.....	36
7.4.1. Características diagnósticas de las cepas .....	37
7.4.2. Morfología colonial de cultivos de cianobacterias.....	37
7.4.4. Morfología colonial de bacterias heterótrofas .....	38
7.4.5. Morfología celular de bacterias heterótrofas.....	39
7.5. Asignación taxonómica por la secuenciación parcial del gen 16S ARNr de cepas.....	40
7.6. Reconstrucción basada en secuencias de cepas cultivadas .....	41
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
8.1. Área de estudio.....	43
8.2. Determinación de la composición química de los oncoides.....	43
8.3. Aislamiento, crecimiento y cultivo de microorganismos de oncoides.....	49
8.4. Secuencias del gen 16S ARNr .....	50
8.5. Diversidad filogenética de bacterias aisladas de oncoides.....	54
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>10. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>11. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>57</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de localización de playa Santispac, Bahía Concepción, Baja California sur, México. ....	22
<b>Figura 2.</b> Mapa de la localización del manantial hidrotermal 2 en playa Santispac.....	23
<b>Figura 3.</b> Línea de barrido tomada con SEM-EDS, que muestra la composición elemental de submuestras de oncoide incluye a los elementos oxígeno y silicio .....	32
<b>Figura 4.</b> Línea de barrido tomada con SEM-EDS, que muestra la composición elemental de submuestras de oncoide excluye a los elementos oxígeno y silicio .....	33
<b>Figura 5.</b> Proporción de elementos químicos de submuestras de Oncoides, detectados por espectrometría con plasma acoplado inductivamente .....	35
<b>Figura 6.</b> Oncoides del manantial 2 de Santispac, Bahía Concepción, Baja California Sur .....	36
<b>Figura 7.</b> Micrografías de contraste de fases de cepas cianobacterianas.....	37
<b>Figura 8.</b> Micrografías de contraste de fases de cepas bacterianas. ....	40
<b>Figura 9.</b> Reconstrucción filogenética de la cepa O_6 y sus vecinos más cercanos derivado de un análisis tipo Neighbord Joining. El filograma fue calculado de la divergencia de secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	41
<b>Figura 10.</b> Reconstrucción filogenética de la cepa O_22 derivado de un análisis tipo Neighbord Joining. El filograma fue calculado de la divergencia de secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	41
<b>Figura 11.</b> Reconstrucción filogenética que incluye las cepas O_22, O_23, O_24, O_26, O_27 y sus vecinos más cercanos derivado de un análisis tipo Neighbord Joining. El filograma fue calculado de la divergencia de secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	42

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Principales técnicas de aislamiento de microorganismos.....	8
<b>Tabla II.</b> Macroelementos que componen a la célula de procariontes y sus funciones fisiológicas (Tomado de Battley, 1995).....	9
<b>Tabla III.</b> Mezcla para una reacción de PCR con Go taq Green Master Mix®.....	29
<b>Tabla IV.</b> Porcentaje en peso y porcentaje atómico de la composición química de submuestras de oncoide .....	32
<b>Tabla V.</b> Porcentaje en peso y porcentaje atómico de la composición química de submuestras que excluye a los elementos oxígeno y al silicio .....	33
<b>Tabla VI.</b> Concentración en mg kg <sup>-1</sup> de la composición elemental de submuestras de oncoide .....	34
<b>Tabla VII.</b> Asignación taxonómica por la secuenciación parcial del gen 16S ARNr de cepas .....	40
<b>Tabla VIII.</b> Comparación de la concentración en mg kg <sup>-1</sup> de la composición elemental de oncoides, de la ventila geotermal de Santispac en dos años consecutivos de estudio, y de la corteza terrestre.....	44
<b>Tabla IX.</b> Relación de los elementos químicos y la función de los microorganismos (Tomado y modificado de Gadd, 2010).....	46

## Abreviaturas

**°C:** Grados Celsius

**16S ARNr:** Molécula conformacional de la subunidad menor del ribosoma procariota

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**cm:** Centímetros

**DGGE:** Electroforesis de gel en gradiente desnaturalizante

**EDS:** Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía

***et al.:*** Y colaboradores

**g:** gramos

**ICP MS:** Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

**kb:** Kilobase

**kg:** Kilogramos

**km:** Kilómetro

**kV:** Kilovoltio

**L:** Litros

**mg:** Miligramos

**min:** Minutos

**mm:** Milímetros

**µL:** Microlitros

**µM:** micromolar

**µm:** micra

**mL:** Mililitros

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**nm:** Nanómetros

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**pH:** concentración de iones hidrógeno  $[H]^+$

**PSU:** Unidades prácticas de salinidad

**s:** Segundos

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Estrategias para el estudio de los microorganismos

Entre las disciplinas dedicadas al estudio de las diferentes formas de vida en nuestro planeta, la Microbiología fue la última en establecerse. Como consecuencia sus fronteras no están muy bien definidas. Substrayendo de la totalidad de los organismos aquellos que pueden ser estudiados por las técnicas clásicas de la botánica y la zoología, el resto se ha dejado a los microbiólogos. Lo que usualmente queda son pequeños organismos que pueden ser visualizados sólo mediante el uso de equipo especial, los microscopios. En contraste a los animales y plantas, la morfología de los microorganismos es en general demasiado simple para servir de base para una clasificación razonable y permitir una fiable identificación. Así, hasta muy recientemente, la identificación microbiana requirió del aislamiento de cultivos puros (o co-cultivos definidos), seguida por múltiples pruebas de rasgos fisiológicos y bioquímicos. Se consideró como exitoso a un microbiólogo por su habilidad de cultivar microorganismos. En consecuencia, cualquier enfoque para identificar las poblaciones microbianas específicas en su ambiente natural, sin su cultivo inmediato podría ser revolucionario, ya que podría cambiar el carácter de la microbiología y cerrar la brecha metodológica que todavía existe en comparación con la botánica y la zoología (Amann *et al.*, 1995).

En las últimas décadas, los mayores avances en la Microbiología han sido en el desarrollo de métodos para el estudio de los ácidos nucleicos. Técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen 16S ARNr es la más útil y empleada para la identificación de especies (Giovannoni *et al.*, 1990; Woese, 1977). La genómica de células individuales, clonación, electroforesis de geles en gradiente desnaturizante (DGGE), y la más reciente metagenómica, han logrado identificar numerosos filotipos nuevos de microbios en una amplia gama de hábitats (Munson *et al.*, 2002; Rappe y Giovannoni, 2003; Zhou *et al.*, 2004; Aas *et al.*, 2005). Estas técnicas independientes de cultivo permiten

monitorear la abundancia y diversidad de los microorganismos en el ambiente, y permite describir sus relaciones evolutivas (Aas *et al.*, 2005).

Sin embargo, los estudios metagenómicos revelan una preponderancia de genes desconocidos de alrededor del 30 %, no teniendo similitud con los genes para los que se ha atribuido una función o taxa. Una cuestión importante es que si estas son especies con genes hipotéticos sean ecológicamente importantes o biogeoquímicamente relevantes y varias líneas de evidencia sugieren que lo son, puesto que los genes y las proteínas de función desconocida a menudo se expresan en el ambiente y son indispensables para el organismo (Frias-Lopez *et al.*, 2008). Por lo que los enfoques ómicos idealmente deben de realizarse en paralelo con los enfoques geoquímicos y microbiológicos tradicionales de manera integrada (Oremland *et al.*, 2005).

Para que la Microbiología siga desarrollándose es necesario reinventar nuevas estrategias para recuperar y cultivar nuevas taxas de microorganismos o aquellos poco representados en una muestra ambiental, posibilitando el estudio detallado de los microorganismos lo que permite la verificación y comprobación sobre las hipótesis del potencial metabólico determinado por los datos metagenómicos (Zengler, 2009).

Para el 2016 un total de 1,411,234 secuencias completas del gen 16S ribosomal de bacteria y 53,546 de arqueas han sido depositadas en bases de datos. De las 1,411,234 solamente 266,867 pertenecen a secuencias de organismos cultivables y 1,144,367 son secuencias de bacterias no cultivables (Schloss *et al.*, 2016).

Generaciones de microbiólogos desde hace años han sido conscientes de la dicotomía entre las observaciones del mundo microbiano a través del microscopio y los recuentos de microbios en medio sólidos (Staley y Konopka, 1985). A dichas inconsistencias se le conoce como la anomalía del conteo en placa, la cual refiere a que los microorganismos cultivables del ambiente representan solo del 0.001-

10 % de la diversidad total (Amann *et al.*, 2000). El hecho de que no sean cultivables significa que son resistentes a crecer aislados o no crecen en los medios de cultivos convencionales. Esto se debe a que los microorganismos pueden tener requerimientos fastidiosos para su crecimiento, como lo son el requerir nutrientes específicos, condiciones específicas de pH, temperaturas de incubación, ciertos niveles de oxígeno en la atmósfera o necesitar de las interacciones con otros microbios (Zengler, 2009).

Los microorganismos no cultivables constituyen una gran parte de la biomasa y biodiversidad terrestre (Rappé y Giovannoni, 2003). Esto representa retos y oportunidades para los microbiólogos, por la falta de información sobre su Biología, que será fundamental para poderlos crecer, en tal sentido que al lograr su cultivo aprenderemos sobre los principios moleculares y celulares, permitiendo el diseño de nuevas técnicas que permitan el acceso a la diversidad metabólica desconocida (Staley y Konopka, 1985; Whitman *et al.*, 1998; Amann *et al.*, 2000).

## **1.2. Métodos independientes de cultivo**

### **1.2.1. PCR-DGGE**

La electroforesis de geles en gradiente desnaturizante (DGGE) se utilizó inicialmente para la detección de mutaciones en el genoma humano, pero fue modificado por Muyzer y colaboradores para la separación de amplicones del gen 16S ARNr (Muyzer, 1999; Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer *et al.*, 2004). Este método consiste en separar genes del mismo tamaño que se diferencian en su perfil de fusión (desnaturización) debido a las diferencias en la secuencia de las bases. La DGGE emplea un gradiente de desnaturización de ADN, basado en una mezcla de urea y formamida. El uso de secuencias ricas en guanina y citosina de 40 pares de bases (pb) unidas al extremo 5' de uno de los cebadores, impide la desnaturización completa del ADN, y la separación parcial las bandas resultantes durante la migración es lograda con un gel de poliacrilamida. Las

diferencias en la secuencia de bases causan diferencias en las propiedades de fusión del ADN. Por lo tanto, las diferentes bandas observadas en un gel de DGGE son filotipos que pueden diferir tan sólo en una base en la secuencia. Una vez que se ha realizado la DGGE, se cortan las bandas individuales y se secuencian. Se puede emplear el gen ARN ribosomal 16S o un gen funcional como blanco y así evaluar el número de filotipos o el número de filotipos de un gen específico en una muestra (Madigan *et al.*, 2009).

### 1.2.2. Clonación

Durante 1990 las librerías de clonas generadas a partir de muestras ambientales fue la estrategia predominante para describir la diversidad y detectar nuevos grupos filogenéticos (Morris *et al.*, 2002).

La clonación molecular se basa en el aislamiento de una secuencia de ADN de interés para obtener múltiples copias de la misma *in vitro* (Lu *et al.*, 2008).

El ADN de origen puede ser el ADN genómico total, ADN sintetizado a partir de un molde de ARN por la transcriptasa inversa o un gen o genes amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si el ADN es genómico primero se corta con enzimas de restricción para obtener una mezcla de fragmentos de tamaño manejable. La inserción se hace por medio de un vector de clonación los cuales son elementos genéticos pequeños que se replican independientemente y por ello se utilizan para replicar genes. La mayoría de los vectores de clonación proceden de plásmidos o virus. Los vectores de clonación permiten la inserción *in vitro* de ADN exógeno en un sitio de restricción que corta al vector sin afectar su replicación. Si el ADN y el vector se cortan con una enzima de restricción que produce extremos cohesivos la unión será muy favorecida por el apareamiento de dichos extremos cohesivos. Los extremos romos se pueden unir también empleando ligadores o adaptadores sintéticos de ADN. En la transformación se introduce ADN recombinantes en células huésped. En la práctica no todas las células contienen el gen de interés clonado (Madigan *et al.*, 2009) y la

recuperación de taxas es limitada respecto a la diversidad total (Lunn *et al.*, 2004).

Por otro lado, obtener la secuencia que será insertada puede complicarse debido a los errores producto de los diferentes artefactos generados durante la PCR.

Existen tres tipos de artefactos que se pueden generar durante el transcurso de la PCR: (a) la formación de quimeras, que representan productos de PCR incompletos que pueden hibridar como oligonucleótidos en secuencias heterólogas; (b) la formación de moléculas heterodúplex, se suelen producir en los últimos ciclos de la PCR cuando puede llegar a existir una limitación en la concentración de oligonucleótidos en la reacción de amplificación. En estos casos, se puede producir una hibridación cruzada entre secuencias heterólogas formando moléculas heterodúplex; (c) errores por la polimerasa, la introducción de una base errónea, oscilando la tasa de error entre  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  dependiendo de la enzima que se utilice (Lunn *et al.*, 2004).

En cuanto a la clonación de genes funcionales los principales desafíos son la selección de genes funcionales para el diseño de cebadores adecuados que permitan amplificar secuencias robustas en cobertura, y el establecimiento de bases de datos con secuencias de estos genes a fin de permitir una asignación (Petrii *et al.*, 2000).

### 1.2.3. Metagenómica

El término metagenómica fue publicado por primera vez por Handelsman en 1998, en un estudio de los microorganismos del suelo mediante la clonación aleatoria de DNA ambiental. Esta herramienta de la microbiología refiere al estudio de los genomas colectivos en una comunidad ambiental, con la pretención de detectar la mayor cantidad de genes, o genomas completos de la muestra (Madigan *et al.*, 2009).

La principal tarea de la metagenómica basado en la secuenciación es reconstruir el metabolismo de los organismos que componen la comunidad y predecir sus roles funcionales en el ecosistema, mediante etiquetas de genes ambientales, es decir, fragmentos de genes que codifican dominios conservados o motivos de familias de proteínas. El procedimiento consiste en: (1) la selección de un nicho ambiental; (2) el aislamiento del material genético directamente de la muestra ambiental; (3) la manipulación del material genético; (4) la construcción de una librería; y (5) el análisis del material genético en la librería creada para el metagenoma (Simon y Daniel, 2011).

Es una herramienta muy empleada en la bioprospección, para la búsqueda de microorganismos con producción de nuevos antibióticos, genes de resistencia a antibióticos, enzimas, genes que degraden y sinteticen biopolímeros, etc. (Riesenfeld *et al.*, 2004). Su actividad se ha ido incrementando conforme el desarrollo de las técnicas de secuenciación permiten mayor cobertura y menor costo (Simon y Daniel, 2011).

### **1.3. Métodos dependientes de cultivo**

Grandes logros de la microbiología incluyendo la fisiología, la bioquímica, la genética, la medicina y la biotecnología se fundan en estudios de cultivos puros. Mediante el cultivo se obtienen cepas de referencia y secuencias del genoma que ayudan al diseño de mejores cebadores para el perfeccionamiento de los métodos de detección molecular. La interpretación de las bases de datos de secuencias actuales que sirven como punto de partida para estudios de cultivo independiente depende de los microorganismos cultivados (Heylen *et al.*, 2012).

Es importante diferenciar los términos aislamiento, crecimiento y cultivo de microorganismos ya que frecuentemente son empleados erróneamente como sinónimos (Zengler, 2009).

Durante el aislamiento son generados cultivos mixtos y cultivos puros. El aislamiento puede ser (1) de un material matriz como el agua, el aire, partículas del suelo o tejidos eucariontes; o (2) la separación física entre dos o múltiples microorganismos lo cual es crucial para obtener cultivos puros (Zengler, 2009). Un cultivo puro consiste en un solo clon de un microorganismo (Madigan *et al.*, 2009).

Existen varios métodos para separar físicamente a las células microbianas, probablemente el más común es la separación de las células mediante la difusión en un medio sólido. Este método fue introducido por Robert Koch hace más de un siglo, el principio básico de aislar las bacterias mediante la difusión en cajas Petri consiste en tomar una sola colonia bacteriana, inocularla en una nueva caja que al dividirse formará colonias visibles por el ojo humano o por microscopía. Estas colonias luego se pueden separar entre sí mediante varias herramientas, por ejemplo, un asa o un palillo, dependiendo en el tamaño de la colonia. El proceso se define por una etapa de separación (propagación de las células en una placa), una etapa de crecimiento (formación de las colonias), y la etapa de aislamiento real (colonia por colonia). Otra técnica comúnmente utilizada es el aislamiento de bacterias por dilución hasta extinción en medio líquido. Para la recuperación de ciertas taxas se diseñan medios de cultivo de acuerdo a sus demandas nutricionales, o se añaden químicos específicos (Jones y Krieg, 1984; Prakash *et al.*, 2013) (Tabla I).

**Tabla I.** Principales técnicas de aislamiento de microorganismos.

<b>Técnica</b>	<b>Descripción</b>
Modificación del medio de cultivo	Diseño de medios de cultivo, cambios en la composición, adición de químicos específicos, disminución del contenido de materia orgánica
Dilución por extinción	Dilución del medio hasta lograr la separación de una sola célula
Modificación de las condiciones de crecimiento	Modificar el tiempo de incubación, tamaño del inóculo, condiciones de aireación
Micromanipulación	Se emplean dispositivos que permiten tomar un filamento de cianobacteria

El crecimiento implica la división celular, que resulta en la duplicación del número celular. La duplicación celular puede ser mediante la fisión binaria, la gemación o la esporulación.

El crecimiento celular bacteriano depende de una amplia variedad de tipos de reacciones químicas (Madigan *et al.*, 2009) por ello el diseño de medios de cultivo específicos no es trivial y la recuperación de microbios sigue siendo limitada.

Para entender la termodinámica del crecimiento es necesario conocer la composición de biomasa las células microbianas. De los más de 100 elementos químicos que aparecen en la tabla periódica 30 a 40 son considerados esenciales. Seis no metales (C, O, H, N, S y P) y 4 metales (K, Mg, Fe y Ca) comprenden el 98% del peso seco de los procariontes (Tabla II) (Battley, 1995).

**Tabla II.** Macroelementos que componen a la célula de procariontes y sus funciones fisiológicas. (Tomado de Battley, 1995).

<b>Elemento</b>	<b>% peso seco</b>	<b>Función fisiológica</b>
C	48-59	Mayor constituyente orgánico celular
O	13.1-23.9	Material orgánico y agua del citoplasma
H	6.4-8	Material orgánico y agua del citoplasma
N	13.6-14.7	Proteínas, ácidos nucleicos, y coenzimas
S	0.9-1.4	Cisteína, metionina en proteínas. Coenzima pirofosfato tiamina, coenzima A, biotina, ácido $\alpha$ -lipoico
P	2-5.4	Ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos, ácidos teicoicos y coenzimas
K	0.03-1.4	Catión divalente intracelular, mantenimiento de la osmolaridad de la célula, cofactor de algunas enzimas
Mg	0.007-0.05	Catión monovalente predominante en el citoplasma, cofactor de algunas enzimas, ésteres de fosfato, ribosomas, membranas y pared celular
Ca	0.00006-0.06	Presente en exoenzimas (proteasas) y en la pared celular, dipicolinato de calcio es un componente importante de las endoesporas
Na	1.45	Oxalacetato, glutaconil-CoA, metilmanolil-CoA decarboxilasa; coenzima M molibtopterina.
Cl	0.05	Toma activa de solutos compatibles y formación del flagelo en halófilas
Fe	0.003-0.02	Presente en citocromos, ferredoxinas, y otras proteínas de hierro, cofactor en enzimas

Microelementos como Mn, Co, Cu, Mo, Zn, Ni, V, Se, W, B, también son constituyentes de las células y necesarios para el crecimiento, así como factores de crecimiento. Los factores de crecimiento en pequeñas cantidades (0.1 y 1  $\mu$ M) estimulan a la célula a crecer. Generalmente se reconocen tres tipos de factores de crecimiento: 1) aminoácidos; 2) purinas y pirimidinas; y 3) vitaminas. Otros factores que influyen el crecimiento de los microorganismos son el pH, osmolaridad, temperatura, y la concentración de O<sub>2</sub> (Dworkin *et al.*, 2006).

En el cultivo, una población microbiana definida puede crecer y ser mantenida viva en el laboratorio, usualmente a una escala que involucra billones de células a la vez (Zengler, 2009).

Es muy importante preservar y mantener los cultivos a corto y largo plazo, para futuros estudios, ya sea como referencia, como controles experimentales y pruebas, para propósitos taxonómicos, o para aplicaciones biotecnológicas. A corto plazo por lo general se almacenan en tubos de agar inclinado y a largo plazo los cultivos son mantenidos liofilizados o criopreservados para prolongar su viabilidad y reducir cambios genéticos por mutaciones (Prakash *et al.*, 2013; Dworking *et al.*, 2006).

#### **1.4. Ventilales hidrotermales someras**

Las ventilales hidrotermales someras se forman en los márgenes continentales afectados por tectonismo intenso. Son sistemas muy dinámicos, las fallas formadas en las rocas por donde el agua fría fluye, entra en contacto con las cámaras magmáticas de temperaturas elevadas y es forzada a regresar a la superficie. Esta agua muy caliente disuelve minerales y gases de las rocas basálticas, los cuales son liberados o precipitados en la ventilales (Tarasov, 2005).

Las ventilales hidrotermales someras se definen como aquellas que se encuentran a menos de 200 metros de profundidad (Levin *et al.*, 2000). Usualmente se localizan en la zona fótica, donde la producción primaria es primeramente fotosintética, como la fuente dominante de carbono. Sin embargo, tapetes con microorganismos quimiolitotrófos están presentes, y pueden ser potenciales fuentes de producción primaria para organismos capaces de consumir y metabolizar el carbono derivado de la quimiosíntesis. Una característica notable de las ventilales hidrotermales someras es la ocurrencia de actividad gasohidrotermal, donde gases son descargados en corrientes a lo largo de los fluidos hidrotermales (Dando *et al.*, 1995), esto no sucede en las ventilales hidrotermales profundas (de profundidad mayor a 200 metros). Otras diferencias son, que dentro de las especies de ventilales de profundidad hay numerosos taxos específicos, ausentes o raras de encontrar en las someras; en la biomasa de las

comunidades biológicas de ventilas las profundas dominan formas simbiotes, lo que es inusual o no es el caso de las ventilas someras (Tarasov, 2005).

En el oeste de México, en particular en el Golfo de California, a lo largo de la península de Baja California, los sistemas de fallas peninsulares en el Golfo de California involucran a la actividad hidrotermal (Libbey y Johnson, 1997; Canet *et al.*, 2003), detectándose en Bahía Concepción (McFall, 1968), San Felipe, Punta Estrella, El Coloradito y Puertecitos en el Golfo de California a lo largo de la costa oriental de la Península de Baja California (Barragán *et al.*, 2001), y en Punta Banda en el oeste de la costa de Baja California Norte cerca de Ensenada (Vidal *et al.*, 1978). También se han investigado en Punta Mita, cerca de Puerto Vallarta, México (Rubio-Ramos y Prol-Ledesma, 2000; Prol-Ledesma *et al.*, 2002; Taran *et al.*, 2002). En otras partes del mundo se han reportado en California (Stein, 1984; Kleinschmidt y Tschauder, 1985), Nueva Zelanda (Sarano *et al.*, 1989), norte de Islandia (Fricke *et al.*, 1989), Bahía de Kagoshima, Japón (Ossaka *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1993; Miura *et al.*, 1997), las Islas de Tokara (Takeda *et al.*, 1993), La isla Nishino Shima Shinto (Takeda y Kubata, 1977), el mar Tirreno, Italia (Abbiati *et al.*, 1994; Sedwick y Stuben, 1996; Stuben *et al.*, 1996), el mar Egeo (Thiermann *et al.*, 1994), y en las islas Feni en Papua Nueva Guinea (Pichler y Dix, 1996).

### **1.5 Las ventilas hidrotermales como modelos del origen de la vida en la Tierra y en otros planetas**

El descubrimiento de las ventilas hidrotermales a finales de 1970 expandió nuestro conocimiento sobre los múltiples microhábitats de los microorganismos y su posible origen sobre la Tierra. Se han propuesto a los sistemas hidrotermales como los lugares donde surgió la vida hace aproximadamente 3,800 millones atrás, debido a que en experimentos realizados de síntesis abiótica bajo las condiciones fisicoquímicas de estos ambientes han resultado en los aminoácidos

serina, glicina, ácido aspártico y ácido glutámico (Hennet *et al.*, 1992; Hazen y Deamer, 2007; Rauchfuss, 2008).

Corliss (1981), consideraba que las condiciones hidrotermales eran reactores ideales para la síntesis abiótica dichas condiciones consistían en los gradientes de la temperatura del agua, los gradientes en el pH del agua, y la concentración de solutos en los manantiales calientes. También muchos geólogos creen que el hidrotermalismo en la Tierra primigénea fue probablemente más frecuente de lo que es ahora, ya que la gruesa corteza continental no había sido formada todavía y el interior de la Tierra era todavía más caliente de lo que es ahora (Holm *et al.*, 1992).

En cuanto a lo que respecta del origen de la vida en otros planetas según esta teoría, se han identificado ambientes hidrotermales en Marte, esto ha sido investigado por muchos autores incluyendo Carr (1979), Newsom (1980), Mouginiis-Mark (1985, 1990), Brakenridge *et al.* (1985), Squyres *et al.* (1987), McKay y Stoker (1989), Gulick y Baker (1990), MacKinnon y Tanaka (1989), Gulick (1993), Clifford (1993), Greeley y Thomas (1994), Carr (1995), Gulick *et al.* (1997), Wilson y Head (1997), Tanaka *et al.* (1998), y Dohm *et al.* (1998, 2000, 2001a, 2001b, 2004).

Por lo que los ambientes hidrotermales probablemente van a mantenerse como focos de estudios en el futuro, ya que muchos de ellos son (1) blancos favorables para el desarrollo y el sustento de la vida existente, (2) puede comprender una gran variedad de compuestos minerales (3) Los ambientes hidrotermales terrestres (antiguos y existentes) proveen el sitio para desarrollar experimentos, y estudiar estos ambientes y extrapolarlos a otros planetas (Schulze-Makuch *et al.*, 2007; Dirk *et al.*, 2007).

## **1.6. Geología**

### 1.6.1. Geoquímica

Las descargas de agua de las ventilas hidrotermales proveen distintos gradientes fisicoquímicos. Las ventilas hidrotermales enriquecidas en azufre en Nueva Zelanda, Isla Norte (Castenholz, 1976), y el Parque Nacional de Yellowstone (Brock, 1969; Castenholz, 1977) proporcionan gradientes de temperatura, sulfuros, concentración de oxígeno, de pH, concentración de minerales y nutrientes orgánicos; que cambian dependiendo la estación del año, lo que ocasiona cambios en la composición de las comunidades microbianas (Bauld y Brock, 1973; Castenholz, 1976).

### 1.6.2. Registro fósil

Los oncoides son excelentes indicadores paleoambientes, de la fluctuación del nivel del mar y de las condiciones de depositación (Riding, 1983). Los oncoides más antiguos datan del arqueano, eran de calcita, algunas veces con minerales de arcilla, cuarzo o materia orgánica. Su composición correspondía con los minerales presentes durante su desarrollo (Hofmann *et al.*, 1999; Grotzinger y James 2000).

Se tienen registros de oncoides en el Fanerozoico y Ordovícico en el sur de Escocia (Riding, 1977). En el Devónico en la Cuenca de Canning en el occidente de Australia (Playford y Cockbain, 1976). En el Carbonífero al Sur de Galicia (Wright, 1982). Anadon y Zamarreño (1981) describen oncoides y oncolitos de los depósitos de los canales fluviales del Paleoceno en la Cuenca del Ebro, España. Estos oncoides primitivos son similares a los recientes.

## **1.7. Oncoides modernos**

Los oncoides marinos se forman en la zona intermareal y ambientes submareales poco profundos (Peryt, 1983). El proceso es el siguiente: sedimentos erosionados del basalto (sedimentos terrígenos) son depositados en la cuenca evaporítica, la

depositación es por capas, primero de basalto, luego arenas y lodos sedimentan en la cuenca pudiéndose formar barreras que bloquean el agua, haciendo que esta se estanque a poca profundidad, lo que propicia el desarrollo de microorganismos ( Groves *et al.*, 1981).

Heim, en 1916 acuña el término oncoides (del griego onkos que significa nódulo) para denotar un tipo de grano cubierto, él fue el primero en atribuir que su formación era producto de microorganismos, y por ello otros autores se refieren a ellos como cianoides (Peryt, 1981) por que al principio se pensaba que en su formación participaban solo cianofitas, después se supo que también era por el producto del metabolismo de cianobacterias incluyéndose posteriormente a bacterias y arqueas (Monty, 1977; Peryt, 1981; Tarasov *et al.*, 2005), por ello deberían llamarse micronoides en vez de cianoides.

Una asociación de oncoides es conocida como oncolito (Peryt, 1981). Más detalladamente podemos describirlos como estructuras biogeosedimentarias, con un componente biótico representado principalmente por microorganismos, que al excretar polímeros de alto peso molecular como polisacáridos, facilitan la adhesión con el sedimento, conglomerándose de forma concéntrica y laminada. El componente abiótico está dado por la composición mineral de los sedimentos y rocas asociadas. Y también por precipitación de carbonato de calcio por el consumo de dióxido de carbono por las cianobacterias durante la fotosíntesis. Otros factores fisicoquímicos estarán influenciando la composición del oncoide son el pH, la salinidad, la temperatura, la tasa de sedimentación, la exposición al aire, la fuerza de la corriente de agua, el proceso de mineralización de los compuestos orgánicos, la radiación UV, el potencial de óxido reducción, contenido de CO<sub>2</sub> disuelto en el agua, y otros (Gerdes y Krumbein, 1967).

### 1.8. Microbiología de aberturas hidrotermales someras y oncoides

Comunidades microbianas de ventilas hidrotermales en la isla de Taketomi, Japón de 23 metros de profundidad fueron estudiados empleando técnicas cultivo dependientes y técnicas moleculares. Los parámetros fisicoquímicos obtenidos en este estudio fueron un rango de pH de 6.6 a 7.8, la temperatura máxima fue de alrededor de 52 °C. Y emisiones de gases como CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> fueron detectados. Los organismos más abundantes detectados por la aproximación cultivo dependiente fueron cepas de bacterias autotrófas oxidadoras de azufre incluyendo bacterias mesófilas del género *Thiomicrospira* y bacterias termófilas de la especie *Sulfurivirga caldicuralii*; bacterias reductoras de hierro del género *Deferribacter*, bacterias sulfato reductoras del género *Desulfovibrio*, bacterias heterótrofas del género *Pseudoalteromonas* y de arqueobacterias termófilas del género *Thermococcus*. El análisis cultivo independiente que consistió en la recuperación de secuencias del gen 16S ARNr mostraron diversas arqueas de la Clase *Archaeoglobales* y del Phylum Crenarchaeota y como el filotipo predominante a las bacterias termófilas de la especie *Sulfurivirga caldicuralii* (Hirayama *et al.*, 2007).

Ventilas hidrotermales someras gaseosas de 8 metros de profundidad y 45 °C de temperatura en Milos, Grecia, con presencia de gases de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, por aproximación cultivo independiente por la técnica de DGGE fueron estudiadas, la secuenciación de bandas resultó en la bacterias heterótrofas de los géneros *Cytophaga* y *Flexibacter*, bacterias sulfato reductoras del género *Desulfobacteriaceae*, bacterias termófilas del género *Caldicellulosiruptor*, y bacterias quimiolitotróficas del género *Thiomicrospira* (Sievert *et al.*, 2000).

Tapetes microbianos asociados a ventilas hidrotermales someras en la Playa de Seashore en Islandia de 95 °C de temperatura, a 4 metros de profundidad, con un rango de pH de 6.7 a 8.3, enriquecidas con azufre, fueron estudiadas por enriquecimientos *in situ*, y muestras de tapetes microbianos para el análisis del gen 16S ARNr por medio de la técnica de clonación, revelando la presencia de

clonas relacionadas con microorganismos terrestres, termófilos, y mesófilos. Se identificaron bacterias verdes no sulfuradas del género *Chloroflexus*. Los Phyla *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae*, *Thermotogae*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*. La Clase *Thermomicrobium*, y una nueva potencial división. También se identificaron arqueas de los grupos *Korarchaeota*, *Thermofiliaceae*, de la familia *Desulfurococcaceae* y las especies termófilas *Desulfurococcus mobilis*, *Thermofilum pendens* (Skirnisdottir *et al.*, 2000).

En las ventilas hidrotermales someras marinas de las islas Eolian, Italia, de 5 metros de profundidad, cuya temperatura tiene un rango de 60 °C a 70 °C, un rango de pH de 4.4 a 6.3, y los compuestos H<sub>2</sub>S, NO<sub>3</sub> y PO<sub>4</sub> disueltos en el agua. Por la aproximación cultivo dependiente obtuvieron cepas de bacterias heterótrofas de los siguientes géneros: *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas/Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* (Gugliandolo y Maugeri, 1998).

En ventilas hidrotermales someras en el noreste de Taiwán, cuyas características fisicoquímicas con un rango de temperatura de 49 °C a 115 °C, pH de 2.82, con iones disueltos de SiO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y PO<sub>4</sub>. Los microorganismos fueron estudiados por la aproximación cultivo independiente por la técnica de pirosecuenciación para el gen 16S ARNr de muestras ambientales, logrando identificar bacterias termófilas moderadas quimiolitotrofas del género *Nautilia*. Bacterias quimiolitotrofas de los géneros *Caminibacter*, *Thioreductor*, *Lebetimonas*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum*, *Hydrogenimonas*, *Nitratifactor* y *Sulfurospirillum*. Bacterias heterótrofas del género *Arcobacter* y diversas bacterias de la clase *Epsilonproteobacteria* (Zhang *et al.*, 2012).

Estudios metagenómicos por pirosecuenciación del gen 16S ARNr de muestras de agua superficial de ventilas hidrotermales en Taiwán, cuyas características fisicoquímicas con rangos de temperatura de 30 °C a 116 °C, un rango de pH de 1.5–5.0, enriquecidas de azufre, y gases como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>S, revelaron que

las clases predominantes eran del grupo *Epsilonproteobacteria* (*Nautiliales*-like) con 40 clases representativas (79.5 % del total de secuencias asignadas) y el grupo *Gammaproteobacteria* (*Thiomicrospira*-like) (61.6 %), seguido por la clase *Alphaproteobacteria* (16.2 %) y *Betaproteobacteria* (9.5 %). *Nautilia*, *Caminibacter*, *Thiomicrospira* fueron los géneros más dominantes de bacterias quimiolitotrofas. Otros grupos significativos fueron bacterias quimiolitotrofas de los géneros *Nitratiruptor*, *Sulfurovum*, *Lebetimonas*, *Sulfurimonas*, *Hydrogenimonas*, *Nitratifractor*, *Sulfurospirillum*, *Nitrosococcus*. Y bacterias heterótrofas de los géneros, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Arcobacter*, *Marinobacter*. El grupo *Epsilonproteobacteria* se considera como una fuente que evolucionó a partir de formar parte primero como patógenos de humanos y animales. Los géneros *Campylobacter* y *Helicobacter* filogenéticamente están emparentados con patógenos de procariontes y son encontrados en ventilas hidrotermales someras (Tang *et al.*, 2103).

## 1.9. Biotecnología

Las ventilas hidrotermales en general son sitios poco explorados, en la base de datos del NCBI existen aproximadamente 10,860 secuencias del gen 16S ARNr correspondientes a 4,216 unidades taxonómicas operacionales (Schloss *et al.*, 2016). De las cuales, aproximadamente 80 microorganismos han sido cultivados y solo 50 de ellos han sido asociados con patentes y aplicaciones. Algunos organismos tienen varias patentes registradas, por ejemplo, *Thermococcus litoralis* asociado a 50 patentes y un producto comercial, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5210036 es de una enzima termoestable (Neethu *et al.*, 2014). Las ventilas hidrotermales son reservorios genéticos, los cuales representan opciones para convertirse en aplicaciones biotecnológicas.

## 1. ANTECEDENTES

### 2.1. Estudios de microbiología en Bahía Concepción B.C.S., México

La diversidad filogenética y funcional de microorganismos de ventilas hidrotermales intermareales de Bahía Concepción, B.C.S., México ha sido poco estudiada. En particular las comunidades microbianas asociadas a los oncoides de manantiales hidrotermales en Playa Santispac. De los oncoides solo se conoce una fracción de la diversidad microbiana correspondiente al grupo de las cianobacterias y se desconoce la diversidad de bacterias y arqueobacterias. Las cianobacterias fueron estudiadas mediante la aproximación cultivo dependiente y cultivo independiente. Las cepas obtenidas a partir de los oncoides fueron asignadas por la secuenciación del gen 16S ARNr al género *Cyanobacterium* y a las especies *Synechococcus elongatus*, *Leptolynbya thermalis*, y *Limnothrix amphigranulata*. Empleando sondas del gen 16S ARNr en microarreglos y en DGGE se obtuvieron secuencias del género *Gleoethece* y la especie *Microcoleus chthonoplastes*. De acuerdo a su morfología empleando un microscopio de contraste de fases, se identificaron los géneros de cianobacterias *Geitlerinema*, *Lyngbya*, *Gleoethece*, *Cyanobacterium*, *Chroococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece* y *Microcoleus*. Y de bacterias fotótrofas *Chloroflexus*, *Thiocystis*, *Rhodospirillum* (López-Cortés, 1998, 2001; García-Maldonado, 2009).

Otro estudio cercano incluye la diversidad parcial microbiana en las ventilas hidrotermales submarinas someras difusas conocidas como Mapachitos en Bahía Concepción. Se obtuvieron secuencias del gen 16S ARNr por medio de la clonación, las cuales pertenecen en orden de mayor a menor abundancia en la muestras de sedimentos fueron los siguientes taxas: el 21 % correspondió a las Clase *Gammaproteobacteria*, el 17 % la clase *Bacteroidetes*, el 14 % al grupo de las cianobacterias, el 10 % al Phylum Chloroflexi, el 10 % al Phylum Firmicutes, el 4 % al Phylum Actinobacteria, el 10 % la Clase *Deltaproteobacteria*, el 7 % la clase *Epsilonproteobacteria*, el 4 % la Clase *Alphaproteobacteria*, y por último el 3 % la Clase Spirochaetes (Dávila-Ramos *et al.*, 2015).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los oncoides que se desarrollan en los manantiales con aberturas hidrotermales someras intermareales han sido poco estudiados en lo que respecta a la composición geoquímica y la diversidad filogenética y funcional de los microorganismos asociados. Se sabe la composición química del agua, sedimentos y gases de las ventilas hidrotermales someras del manglar de Santispac, presentando diversos metales y metaloides disueltos en el agua y precipitados en los sedimentos, por lo que las fisiologías de los microorganismos asociados a este sistema pueden ser de interés para la Biotecnología. Por ello, consideramos relevante analizar la composición química de los oncoides y realizar estudios microbiológicos dependientes de cultivo de los oncoides. Ya que está bien documentado que los microorganismos que ocupan estos ambientes tienen activa participación en fenómenos como la, productividad primaria, la degradación completa de los compuestos orgánicos, la catálisis de la oxidación y reducción de los metales y metaloides, la formación biogénica de los minerales, desintegración de rocas y formación de sedimentos (Gerdes y Krumbein, 1987; Gadd, 2010). Tales procesos son componentes importantes de los ciclos biogeoquímicos, y en un contexto humano las transformaciones de metales y metaloides pueden tener consecuencias perjudiciales o beneficiosas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si el agua y los sedimentos del sistema hidrotermal asociado a un manglar en Playa Santispac contiene diversos metales y metaloides, entonces esperaríamos que dichos elementos químicos se encontrarán en los oncoides que se desarrollan en el manantial hidrotermal intermareal dos, lo que influenciaría en la composición de las comunidades microbianas asociadas a esta estructura biogeosedimentaria.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Explorar la diversidad de microorganismos cultivables en muestras de oncoides asociados a manantiales hidrotermales intermareales y relacionarlos con la composición química de los oncoides.

##### **5.2 Objetivos particulares**

1. Determinar la composición elemental de los oncoides de manantiales hidrotermales intermareales de Playa Santispac.
2. Aislar y cultivar microorganismos heterótrofos mesófilos del oncoide.
3. Caracterizar el fenotipo de los microorganismos cultivados.
4. Identificar a los microorganismos de cultivos por medio de la secuenciación parcial del gen 16S ARNr.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

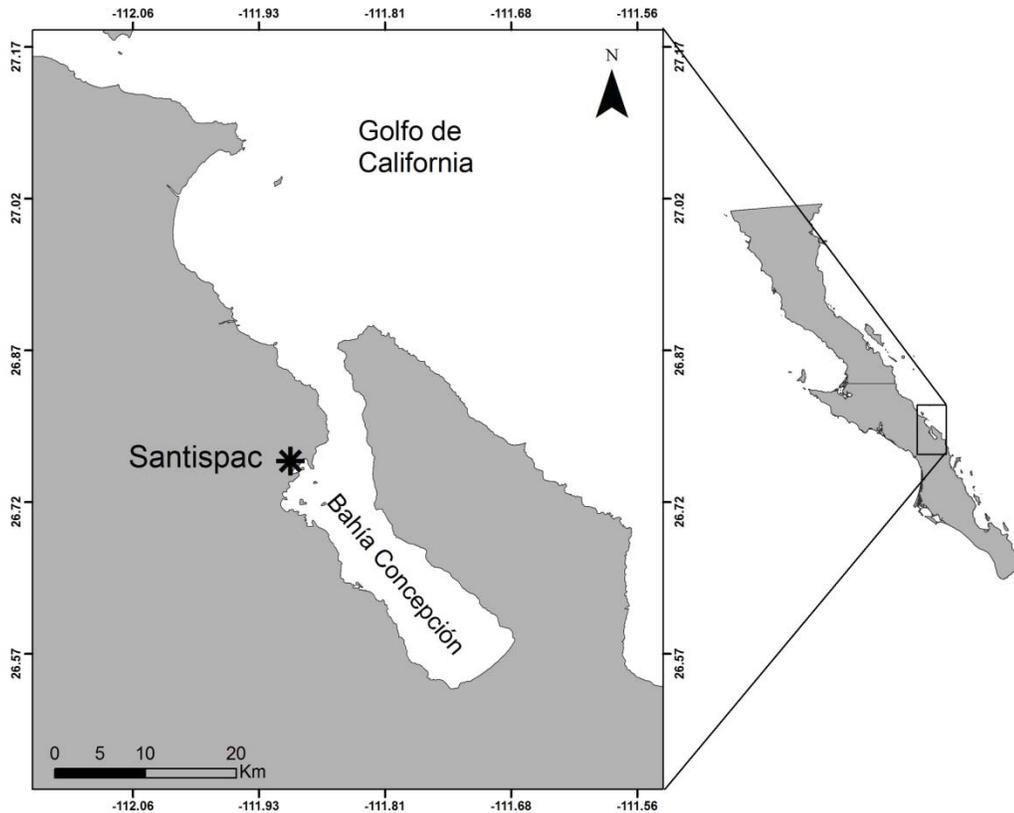
### 6.1. Área de estudio

Bahía Concepción está localizada en el Golfo de California en el Estado de Baja California Sur, aloja un sistema hidrotermal que consiste en diversas manifestaciones submarinas poco profundas, intermareales y subaéreas (Ledesma-Vázquez y Jhonson, 2001). Algunas de estas se encuentran en playa Santispac (Fig. 1) a 1 km de distancia de la entrada de acceso a la playa hacia el mangle.

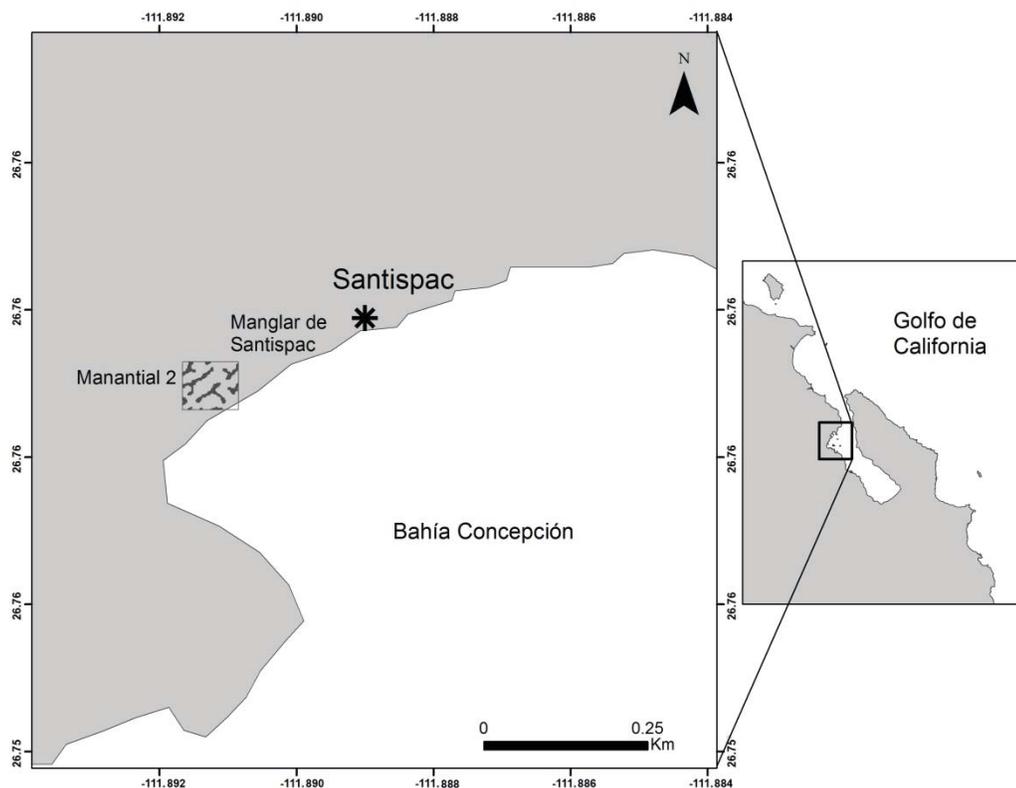
En ese sitio se han detectado manantiales hidrotermales asociados al manglar costero que rodea una laguna (López-Cortés, 1999; López-Cortés *et al.*, 2001). De la laguna hacia la planicie evaporítica costera se ubicó el manantial número dos entre los 26°45'45.73'' de latitud norte y 111°53'39.31'' de longitud oeste. Con una dimensión de 4.0 metros de diámetro y 0.5 metros de profundidad (Fig. 2). Durante la marea alta son inundados y en la etapa de bajamar los fluidos geotermales son mezclados con el agua de mar dispersándose hacia las zonas adyacentes (Leal-Acosta *et al.*, 2010). Los fluidos de las ventilas son 40 % agua de mar y 60 % agua de lluvia sometida a una circulación profunda. El agua termal se descarga sub-aereamente hacia el mar, pero cuando existe marea alta, el agua de mar cubre los manantiales (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). El agua tiene un rango de temperatura de 28 a 45 °C, un pH de 7.1 y salinidad de 2.9 %. Comunidades microbianas bentónicas se han observado adheridas a la superficie de las paredes del manantial y otras comunidades microbianas que del fondo del manantial se desprendieron formando natas flotantes en el agua. Y de interés particular estructuras de color negro identificadas como oncoides en las paredes y en los bordes del manantial (López-Cortés, 1999).

Estas comunidades microbianas se desarrollan bajo condiciones extremas, como lo es la desecación, la radiación UV, cambios de temperatura, cambios de salinidad, y diversos metales disueltos en el agua: Aluminio, Bario, Calcio,

Cadmio, Cesio, Cobalto, Cobre, Hierro, Litio, Manganese, Mercurio, Molibdeno, Níquel, Rubidio, Titanio, Uranio, Vanadio, Zinc; y al metaloide Arsénico. (Leal-Acosta, 2012; Prol-Ledesma *et al.*, 2004). También se ha reportado la presencia de gases de CO<sub>2</sub> (44%), N<sub>2</sub> (54%), CH<sub>4</sub> (2.2%), Ar (0.7%), He (0.04%), H<sub>2</sub> (0.007%) y O<sub>2</sub> (0.2%) (Forrest y Melwani, 2003).



**Figura 1.** Mapa de la localización de playa Santispac, Bahía Concepción Baja California Sur, México. (\*) Ventilias y manantiales hidrotermales.



**Figura 2.** Mapa de la localización del manantial hidrotermal 2 en playa Santispac. (\*) Acceso a playa Santispac.

## 6.2. Parámetros fisicoquímicos y toma de muestras

Del agua del manantial 2 se determinó la temperatura con un termómetro portátil digital, el pH y la salinidad con un equipo HI pHep+ (Hanna Instruments, Italia).

Se obtuvieron muestras de los escurrimientos y de las paredes del manantial 2, submuestras de biopelículas (10 mm) de color verde oscuro casi negro y submuestras de oncoides se colocaron en crioviales con solución preservadora de ácidos nucleicos denominada RNA later (Hilden Qiagen, Alemania) para los estudios de biología molecular.

Para el análisis de la composición química de los oncoides, las muestras de oncoides completos se depositaron en contenedores de plástico, los cuales se

secaron al sol durante 24 horas. Muestras secas de oncoides de 5 cm se emplearon para la determinación de análisis de composición química.

### **6.3 Composición elemental de los oncoides**

#### **6.3.1 Microanálisis elemental por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X**

Se realizó una detección semicuantitativa de submuestras oncoides en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIBNOR, las cuales fueron secadas a punto crítico siguiendo el método propuesto por Anderson (1956). En un portamuestras con una etiqueta de carbón conductivo se analizaron dos puntos al azar (1 mm) de las submuestras utilizando un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3000N, acoplado a un detector de energía dispersiva (EDS) a 5,000 X de amplificación y 15 kV de voltaje de aceleración. El análisis de la caracterización se llevó a cabo con el Software SEM EDS Aztec energy.

#### **6.3.2 Microanálisis elemental por espectrometría con plasma acoplado inductivamente**

El análisis cuantitativo se realizó en el Laboratorio de Espectrofotometría de Absorción del CIBNOR, por medio de un espectrómetro con plasma acoplado inductivamente (HORIBA). El método para la digestión de la muestra fué tomado de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de acuerdo al procedimiento 3052-B para determinar metales en sedimentos, lodos y suelos. Las submuestras se digirieron con una mezcla de ácidos (3 mL HNO<sub>3</sub> ultrapuro 60 %, 2 mL HF o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 %) para 0.1 g de muestra (peso seco) en un recipiente de teflón muy bien cerrado, calentado a 200 °C por 12 horas. Resultó una solución incolora y se le añadió 95 mL de agua ultrapura de un sistema Milli-Q ®.

Para el microanálisis la calibración del equipo se llevó a cabo con soluciones estándar de 28 metales y metaloides de alta pureza. Las condiciones de operación

del equipo fueron realizadas de acuerdo al método 6020-A de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, este método es para conocer la composición elemental de muestras ambientales. Las condiciones para la tasa de flujo de gas fueron: nebulizador 0.86 L/min; Auxiliar de flujo de gas 1.2 L/min; plasma de flujo de gas 15 L/min; voltaje de la lente 7.25 V; I.C.P. de potencia RF 1100 W.

## **6.4 Aislamiento, crecimiento y cultivo de microorganismos del oncoide**

### 6.4.1. Aislamiento de cianobacterias

Cianobacterias filamentosas fueron crecidas en el medio ASNIII° sin la fuente de nitrógeno (Rippka *et al.*, 1979) empleado como medio selectivo, bajo las siguientes condiciones, temperatura de 25°C, agitación de 120 rpm, intensidad de luz de 35  $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ .

Se separaron filamentos de cianobacterias por medio de micromanipulación con pipetas pasteur, con apoyo de un estereoscopio con aumento de 30X, fueron lavadas con medio de cultivo ASNIII por arrastre. Las cianobacterias unicelulares se aislaron por dilución hasta extinción y se inocularon en medio ASNIII agar por la técnica de extensión en placa.

Se disolvieron 0.0025 gramos de antibiótico Inipenem en 50 mL de agua de mar artificial estéril, obteniendo una solución 0.005%, se emplearon 10 mL de esta solución en 250 mL del cultivo líquido ASN III, para obtener cultivos libres de bacterias heterótrofas, con un tiempo de exposición de dos horas (Rippka, 1979).

#### 6.4.2. Aislamiento de bacterias heterótrofas mesófilas

250 mL de medio de cultivo caldo 2216 Difco® (ZoBell, 1941) fueron enriquecidos con trozos de oncoide al 25 % (P/V) para el aislamiento de microorganismos heterótrofos. El medio de cultivo que contenía oncoide se dividió para aplicar dos tratamientos. Una porción que no tuvo tratamiento térmico y fue incubado a 30 °C por 24 horas, posteriormente 500 µL de este cultivo se inocularon por extensión en placa que contenían medio sólido 2216 e incubadas hasta por 48 horas a 30 °C. La segunda porción fue tratada, a una temperatura de 120 °C por 15 minutos, con el objetivo de recuperar bacterias esporuladas, después del tratamiento, 500 µL fueron inoculados en medio sólido 2216 e incubados a 30 °C hasta por 48 horas. Cultivos puros, fueron logrados por la técnica de estría cruzada en medio sólido y dilución hasta extinción ( $10^{-6}$ ) con extensión en placa en medio sólido agar marino 2216.

#### 6.4.3 Crecimiento y cultivo de microorganismos aislados de oncoides

Las cianobacterias fueron cultivadas y crecidas en el medio de cultivo ASNIII (Rippka *et al.*, 1979) a 25 °C, agitación de 120 rpm e intensidad de luz de 35 µmol m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> por 9 días.

Las bacterias fueron crecidas y cultivadas en el medio de cultivo comercial 2216 Difco® (ZoBell, 1941), y se incubaron a 30°C por 24 y 48 horas.

Para confirmar la presencia de solo un morfotipo, se realizaron preparaciones de las muestras microbianas para su observación bajo microscopía de fases. Aquellos que presentaron un solo morfotipo fueron elegidos para formar parte de la colección de microorganismos del Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología de CIBNOR.

#### 6.4.4. Preservación de cultivos de microorganismos

Se preparó un stock de glicerol, de tal manera que el glicerol estéril se diluyó con agua de mar artificial estéril para obtener una concentración al 60 %. A 1 mL de cultivos bacteriológicos en medio líquido en fase exponencial altamente densos se le añadieron 500  $\mu$ L de glicerol para quedar a una concentración final del 30 %. Se pre congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ , luego se pasaron al congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento a largo plazo (Bonavia *et al.*, 2012).

Cultivos líquidos de cianobacterias altamente densos en medio de cultivo líquido fueron preservados con una solución de dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final del 0.5 % como crioprotector. Los cuales se pre congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ , luego se pasaron al congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento a largo plazo (Ripka *et al.*, 1979).

#### 6.4.5. Caracterización morfológica celular y colonial de los cultivos

Los cultivos puros de bacterias se tiñeron por la técnica de Gram (Gram, 1884). Posteriormente se analizaron por microscopía de fases, para interpretar los resultados. Son Gram positivas aquellas bacterias que poseen una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano, además de los ácidos lipoteicoico y teicoico y Gram negativas las bacterias cuya pared celular es delgada y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior por medio de lipoproteínas, una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración se debe a que la membrana externa de las bacterias Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglicano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea, mostrándose finalmente de color rosado. Por el contrario, las

bacterias Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros, cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, manteniendo así la coloración azul-violeta.

Fueron descritos los morfotipos de cultivos de cianobacterias de acuerdo a sistemas de clasificación botánicos (Anagnostidis y Komarek, 1998; Geitler, 1932; Tilden, 1968; Desikachary, 1959).

Para la observación de la morfología colonial se empleó un estereoscopio con aumento de 30X y para la caracterización celular se empleó un microscopio de contraste de fases acoplado a un sistema de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Japón), la observación se realizó con un aumento de 1000X. Este sistema permite detectar la presencia de clorofila y por lo tanto la viabilidad de células fotosintéticas, ya que la clorofila es una molécula capaz de fluorecer al absorber fotones, emitiendo fotones de menor energía que se observan en el microscopio como una luz color roja con la ayuda de un filtro azul-violeta BV2 (400-440 nm longitud de onda de excitación; Nikon, Japón).

#### 6.5. Secuenciación parcial del gen 16S ARNr

La asignación taxonómica de las cepas bacterianas se realizó a través de la secuenciación parcial del gen 16S ARNr, para lo cual se realizó la extracción de ADN genómico, empleando el Kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit 50 (69504 Qiagen Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. Para conocer la integridad del ADN aislado se preparó un gel de agarosa al 1 %. Alícuotas de 5 µL de ADN genómico de los cultivos se colocaron en los pozos del gel, en uno de los pozos se colocó 5 µL de un marcador de peso molecular de 1 kilobase (kb) (ThermoFisher, Massachusetts EUA), las condiciones de la electroforesis fueron 90 volts por 30 minutos, después del tiempo transcurrido el gel se tiñó con el

colorante GelRed (Sigma-Aldrich, EUA), para la visualización de bandas de ácidos nucleicos por excitación del colorante con la luz UV se empleó un fotocomentador (Bechop UV transilluminator, UVP, BioDoc-it imaging System, EUA). Se determinó la concentración de ADN (ng/μL) y pureza con respecto a la proteína asociada por el cociente 260nm/280nm empleando un nanodrop (Lite Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Posteriormente, se llevaron a cabo diversas PCR de punto final y de gradiente. Se emplearon cebadores universales del dominio bacteria, 8F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y 1522R (5'-AAGGACGTCATCCAGCCGCA-3') (Turner *et al.*, 1999) más una mezcla de agua grado biología molecular, Go taq Green master mix (Promega, China) y el ADN (Tabla III), llevándose cabo una PCR con un termociclador (Gen Cyclor, Bio Rad, Hercules, EUA). El programa fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización a 94 °C de 3 minutos, 30 ciclos para el alineamiento de los cebadores a 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 7 minutos (López-Cortés *et al.*, 2006).

**Tabla III.** Mezcla para una reacción de PCR con Go taq Green master mix®

<b>Componente</b>	<b>Volúmen (μL)</b>	<b>Concentración final</b>
Go taq Green Master mix 5x	12.5	1 X
Cebador F	2	1μM
Cebador R	2	1μM
DNA template	1	15-20ng/μL
Agua (ultrapura)	7.5	-

Para el caso de cepas de cianobacterias se utilizaron los cebadores CYA106F (5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTG A-3') y una mezcla CYA781-Ra (GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T CYA) + 781Rb (GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T) (Nubel, 1997) así como los demás componentes de la mezcla de reacción antes descritos, el programa del termociclador fue el siguiente: un ciclo

de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, un ciclo de 72 °C por 1 minutos, un ciclo de 72 °C por 5 minutos (García-Maldonado, 2009).

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % a 90 volts por 30 minutos, se tiñó el gel con el colorante gel red y se comparó que el tamaño (pb) del amplicón con los cebadores 8F y 1522R fuera de alrededor de 1500 pb, y para el caso de los cebadores CYA106F y CYA781Rab fuera alrededor de 400 pb, se precipitaron con acetato de amonio 5M y se enviaron secuenciar en ambos sentidos a la compañía GENEWIZ (South Plainfield, N.J. USA). Las secuencias fueron editadas en el programa Chromas Pro versión 1.7.7 y se realizó la comparación por BLASTn del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, último acceso en 2016) para designar una identidad de la cepa.

Dichas secuencias fueron depositadas en GenBank del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, último acceso en 2016) con los siguientes números de acceso asignados KX814337, KX814338, KX814339, KX814340, KX814341, KX814342 y KX814343.

## **6.6 Reconstrucción filogenética**

Secuencias de genes de bacterias que codifican para el 16S ARNr disponibles de GenBank y aquellas determinadas en este estudio fueron alineadas usando la paquetería CLC Genomics WorkBench 8. Los árboles filogenéticos de las cepas aisladas y de sus vecinos emparentados más cercanos fue construido empleando la misma paquetería.

Los filogramas fueron calculados de la divergencia en secuencias parciales del gen 16S ARNr, empleando el método computacional Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987) con un bootstrapp de 100 réplicas.

El árbol filogenético construido con secuencias de organismos del género *Nitratireductor* incluyó 581 pb, mientras que el árbol construido con secuencias de organismos que incluye a *B. cereus* comprendió 611 pb. Finalmente el árbol construido con secuencias que incluye a *B. licheniformis* consideró 502 pb.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Parámetros fisicoquímicos del área de estudio

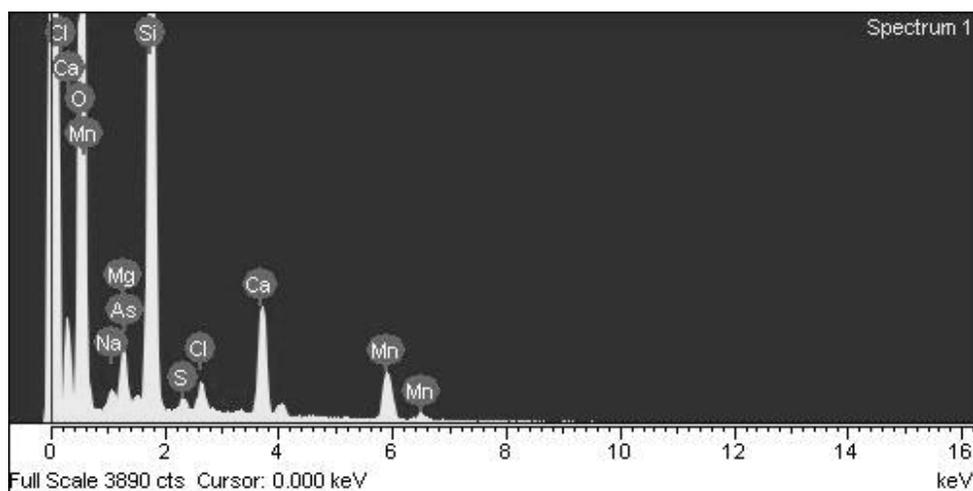
El día 26 de febrero de 2016 a las 12:30 horas, el manantial hidrotermal 2 presentó una temperatura de 38.5 °C, un pH de 7.1, y salinidad de 26 UPS.

### 7.2. Determinación de la composición química de los oncoides.

Los análisis semicuantitativos realizados con espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS), acoplado a microscopio electrónico de barrido (SEM HITACHI 300) de submuestras de oncoides mostraron estar compuestos por los elementos químicos Ag, Au, As, Co, Cu, Cl, Ca, Cd, Fe, Na, Mg, Mn, O, Si y S. Para ello se realizaron dos análisis, el primero que incluyó los elementos oxígeno y silicio (Tabla IV) (Fig.3) y el segundo excluyó a los elementos silicio y oxígeno, esto se realizó considerando que estos dos elementos son los más abundantes en la corteza terrestre, 47 % es oxígeno en forma de minerales ( $O^{2-}$ ) y 28 % es silicio como minerales de silicatos ( $Si^{4+}$ ) comprendiendo el 75 % de la composición de las rocas en la superficie terrestre (Mason, 1952) (Tabla V) (Fig.4), impidiendo la detección de elementos representados por bajas abundancias, por ello se procedió en un segundo análisis con la exclusión de dichos elementos.

**Tabla IV.** Porcentaje en peso y atómico de la composición química de submuestras de oncoide.

Elemento	Tipo de radiación	Peso %	Atómico %
O	K	66.24	79.36
Na	K	1.18	0.99
Mg	K	2.28	1.79
Si	K	18.97	12.95
S	K	0.48	0.29
Cl	K	1.08	0.58
Ca	K	4.86	2.33
Mn	K	4.88	1.70
As	L	0.02	0.01
<i>Total</i>		100.00	

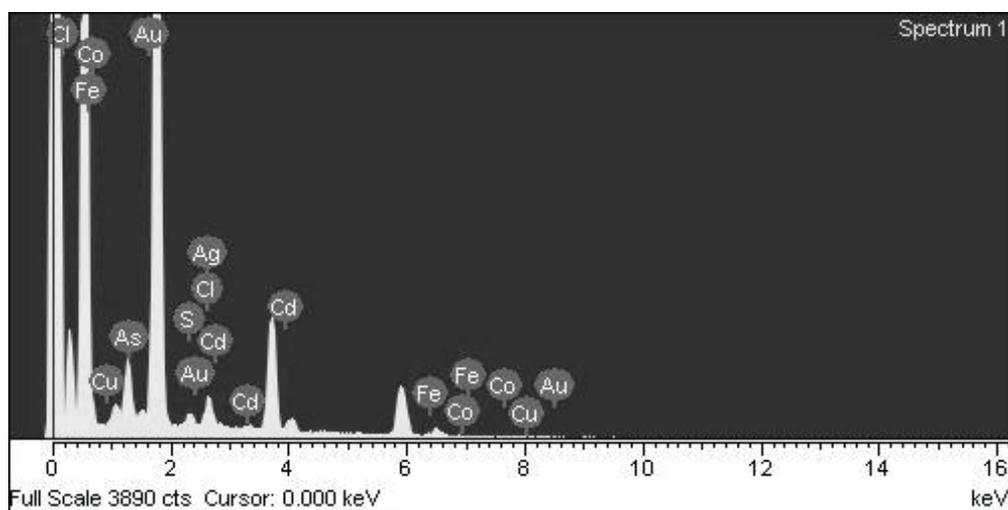


**Figura 3.** Línea de barrido tomada con SEM-EDS (composición elemental de submuestras de oncoide incluye a los elementos oxígeno y silicio).

Al omitir a los elementos oxígeno y silicio del análisis se evidenciaron los nuevos elementos: Au, Ag, Cd, Co, Fe y S.

**Tabla V.** Porcentaje en peso y atómico de la composición química de submuestras de oncoide excluyendo los elementos oxígeno y al silicio.

Elemento	Tipo de radiación	Peso%	Atómico%
S	K	14.99	26.40
Cl	K	22.79	36.31
Fe	K	2.92	2.96
Co	K	1.14	1.09
Cu	K	0.00	0.00
As	L	33.56	25.30
Ag	L	1.96	1.03
Cd	L	1.91	0.96
Au	M	20.74	5.95
<i>Total</i>		100.00	

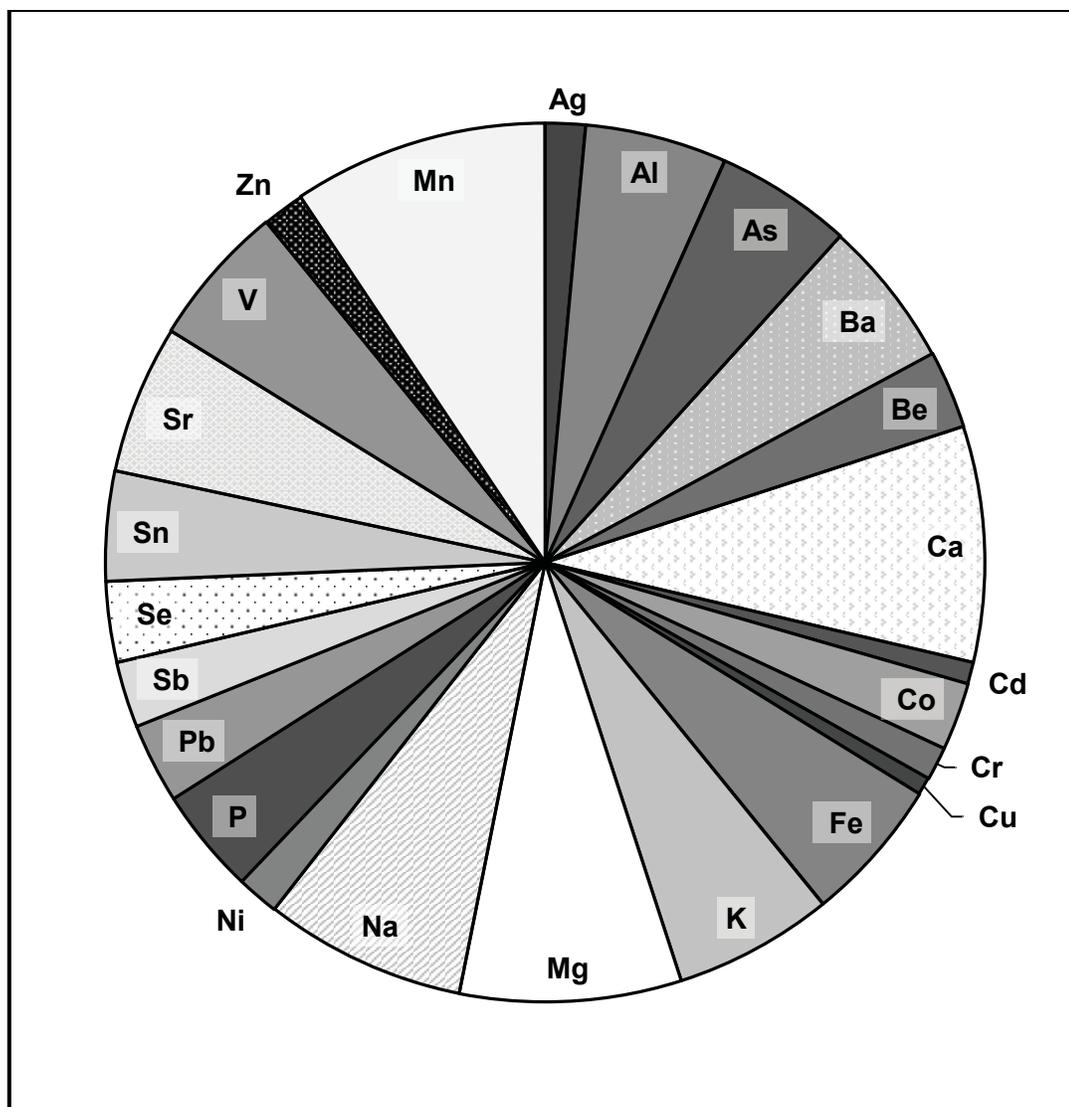


**Figura 4.** Línea de barrido tomada con SEM-EDS, muestra la composición elemental de submuestras de oncoide excluye a los elementos oxígeno y silicio.

Mediante análisis cuantitativos mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente se cuantificaron los siguientes elementos químicos contenidos en submuestras de oncoide: Ca, Mg, Na, Mn, K, Fe, Sr, V, Al, Ba, As, P, Se, Be, Pb, Co, Sb, Ni, Zn, Ag, Cr, Cd y Cu (Tabla VI) (Fig. 5).

**Tabla VI.** Concentración en mg kg<sup>-1</sup> de la composición elemental de submuestras de oncoide detectados por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

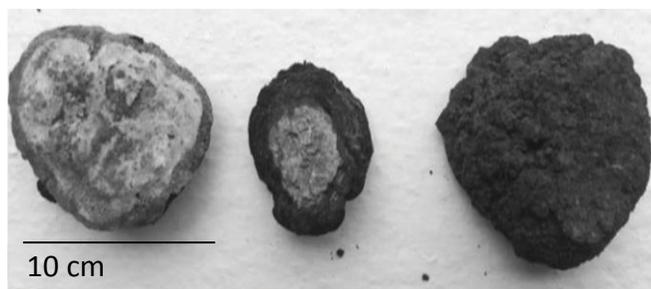
<b>Elemento</b>	<b>mg Kg<sup>-1</sup></b>
Ag	6.45
Al	723.27
As	550.78
Ba	950.8333333
Be	36.90666667
Ca	56606.56
Cd	2.743333333
Co	23.36
Cr	4.666666667
Cu	2.256666667
Fe	816.4733333
K	1662.086667
Mg	28530.90667
Na	11599.62333
Ni	7.086666667
P	133.71
Pb	40.78
Sb	21.42666667
Se	42.37666667
Sn	163.58
Sr	1001.193333
V	770.0766667
Zn	6.9
Mn	138312.2333



**Figura 5.** Proporción de elementos químicos de submuestras de oncoïdes. Basado en el logaritmo base 10 de la concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  identificada por espectrometría con plasma acoplado inductivamente.

### 7.3. Descripción del oncoide

Una submuestra de oncoide mostró las siguientes características, tamaño de 3 cm en su corte vertical y 2.5 cm en el corte horizontal, forma semiesférica, de consistencia compacta, la superficie es pustular, presenta laminación y desde la sección transversal esta es plana (Fig. 6). Es un oncoide de tipo compuesto, debido a que la biota dominante está integrada por una asociación de cianobacterias (Fig. 7), algas, bacterias (Fig. 8), y pequeños caracoles incrustados. Es calcáreo, y contiene  $56606.56 \text{ mg kg}^{-1}$  de calcio.



**Figura 6.** Oncoides del manantial 2 de Santispac, Bahía Concepción, Baja California Sur.

### 7.4. Aislamiento, crecimiento y cultivo de microorganismos de oncoides

Se obtuvieron 22 cepas de bacterias heterótrofas aerobias aisladas de oncoides. De estas, 15 cepas son cultivos mixtos de dos morfotipos bacterianos; se lograron 6 como cultivos puros. Todos ellos fueron preservados a largo plazo para la formar parte de la colección del Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología del CIBNOR.

Se cultivaron cianobacterias a partir de cultivos mixtos de las cepas SP2A9606-8 y LPV9602-5 proporcionadas por el Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología del CIBNOR.

### 7.4.1. Características diagnósticas de las cepas

#### 7.4.2. Morfología colonial de cultivos de cianobacterias

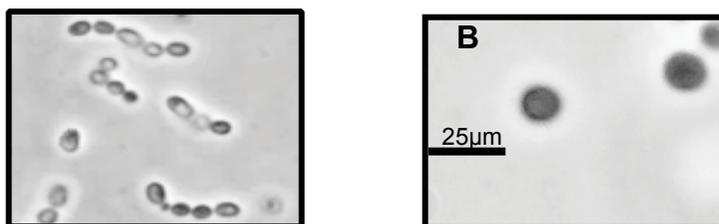
Cepa SP2A9606-8: Colonia es de forma circular con elevación convexa, el margen es entero, de color verde, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es opaco y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia dura, superficie lisa y de 1 mm a 1.5 mm de diámetro.

Cepa LPV9602-5: Colonia es de forma circular con elevación convexa, el margen es entero, de color verde, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es opaco y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia dura, superficie lisa y de 1 mm a 2 mm de diámetro.

#### 7.4.3. Morfología celular de cultivos de cianobacterias (Fig. 7)

*Synechococcus elongatus* cepa SP2A9606-8: Cianobacteria unicelular, presenta células esféricas y en forma de bacilo, de 1.5 a 2  $\mu$  de diámetro y de 2 a 4  $\mu$  de longitud. Las células pueden ser unidas en agregados coloniales formando cadenas de hasta 12 células de longitud unidas por la formación de un mucílago, no produce vaina laminada bien definida.

*Synechocystis pevalekii* cepa LPV9602-5: Cianobacteria unicelular, células esféricas de 1.5  $\mu$ . Las células aparecen solas o en parejas después de la división, reproducción por fisión binaria en un plano.



**Figura 7.** Morfotipos de cianobacterias detectados por microscopia de contraste de fases. A. micrografía de la cianobacteria unicelular *S. elongatus* cepa SP2A9606-8 B. Micrografía de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* cepa LPV9602-5

#### 7.4.4. Morfología colonial de bacterias heterótrofas

Cepa O\_6: Colonia de forma circular con elevación, el margen es entero, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es translúcida y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia butirosa, superficie lisa y de 1 mm de diámetro.

Cepa O\_13: Colonia de forma circular con elevación, el margen es entero, de color blanco, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es opaca y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia mucoide, superficie áspera a lisa y de 2 mm de diámetro.

Cepa O\_17: Colonia de forma circular con elevación, el margen es entero a rizoide, de color blanco, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es opaca y hacia la luz reflejada es opaca, de consistencia butirosa, superficie áspera y de 2 mm de diámetro.

Cepa O\_23: Colonia de forma irregular a filamentosa con elevación, el margen es ondulado, de color rosa pálido, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es translúcida y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia dura, superficie rugosa y de 1 mm de diámetro.

Cepa O\_24: Colonia de forma irregular con elevación convexa, el margen es ondulado, de color crema, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es translúcida y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia suave, superficie suave y de 1 mm de diámetro.

Cepa O\_26: Colonia de forma circular con elevación convexa, el margen es entero, de color beige, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es translúcida y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia mucoide, superficie suave y de 1 mm de diámetro.

Cepa O\_27: Colonia de forma irregular a filamentosa con elevación convexa, el margen es filamentoso, de color blanco, las propiedades ópticas hacia la luz transmitida es translúcida y hacia la luz reflejada es brillante, de consistencia dura, superficie áspera y de 2 mm de diámetro.

#### 7.4.5. Morfología celular de bacterias heterótrofas (Fig. 8)

Cepa O\_6: Bacterias Gram negativas en forma de bacilos, móviles, de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1 a 1.2  $\mu\text{m}$  de largo, células solas y en parejas, no esporuladas.

Cepa O\_13: Bacterias Gram positivas en forma de bacilos, células vegetativas móviles, de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, presenta endoesporas a las 48 horas de incubación, las endoesporas son ovales, subterminales a centrales no deformantes. Células solas, en parejas y forman cadenas.

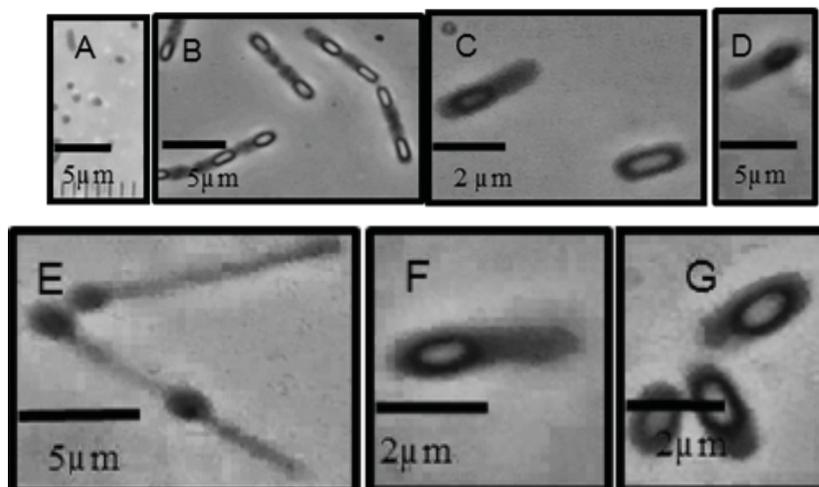
Cepa O\_17: Bacterias Gram positivas en forma de bacilos, células vegetativas móviles, de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, presenta endoesporas a las 24 horas de incubación, las endoesporas son ovales subterminales no deformantes. Células solas en parejas y forman cadenas.

Cepa O\_23: Bacterias Gram positivas en forma de bacilos, células vegetativas móviles, de 0.8 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 4 a 8  $\mu\text{m}$  de largo, presenta endoesporas a las 48 horas, las endoesporas son ovales terminales no deformantes. Células solas en parejas y forman cadenas.

Cepa O\_24: Bacterias Gram positivas en forma de bacilos, células vegetativas móviles, de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, presenta endoesporas a las 48 horas, las endoesporas son circulares terminales deformantes. Células solas en parejas.

Cepa O\_26: Bacterias Gram positivas en forma de bacilos, células vegetativas móviles, de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo, presenta endoesporas a las 48 h, las endoesporas son ovales subterminales no deformantes. Células solas y en formando cadenas.

Cepa O\_27: Bacterias Gram positivas en forma de bacilos, células vegetativas móviles, de 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2 a 6  $\mu\text{m}$  de largo, presenta endoesporas a las 48 horas, las endoesporas son ovales subterminales a terminales no deformantes. Células solas en parejas y forman cadenas.



**Figura 8.** Micrografías de contraste de fases con aumento de 1000X de cultivos bacterianos. A. Ceba O\_6, bacteria no esporulada; B. Ceba O\_17; C. Ceba O\_22; D. Ceba O\_23; Ceba E. O-24; Ceba F O\_26; Ceba G O\_27. B., C., D., E., F., y G. muestran endosporas bacterianas a las 24 y 48 horas.

### 7.5. Asignación taxonómica por la secuenciación parcial del gen 16S ARNr de cepas.

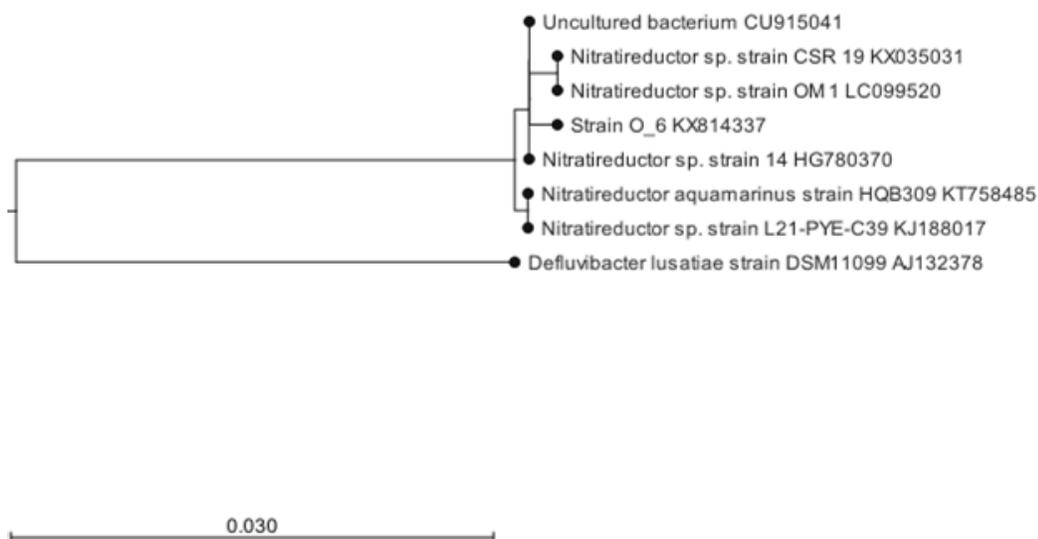
Las secuencias del gen que codifica para el 16S ARNr de las cepas obtenidas fueron comparadas en la base de datos del NCBI GenBank, con acceso en Agosto de 2016 para la asignación taxonómica (Tabla VII) y las secuencias fueron depositadas en esta misma base de datos.

**Tabla VII.** Asignación taxonómica por la secuenciación parcial del gen 16S ARNr de las cepas aisladas.

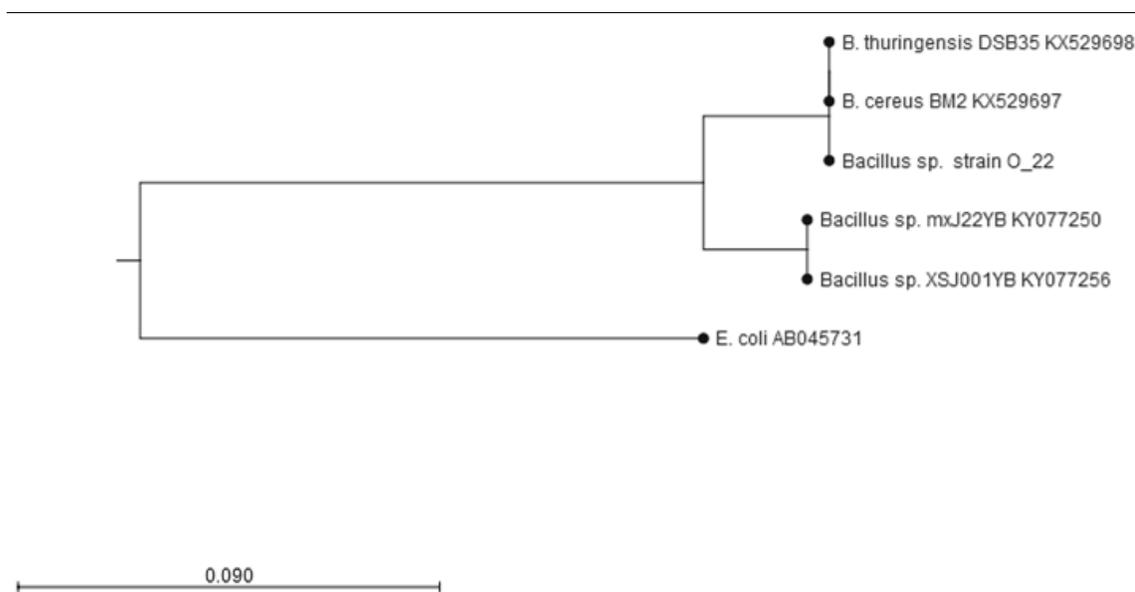
Cepa	Longitud (pb)	Taxa	% de similitud
SP2A9606-8	600	<i>Synechococcus elongatus</i>	100
O_6	700	<i>Nitratireductor</i>	99
O_22	600	<i>Bacillus</i>	100
O_23	800	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
O_24	600	<i>Ornithinibacillus</i>	99
O_26	700	<i>Bacillus</i>	99
O_27	800	<i>Bacillus</i>	100

## 7.6 Reconstrucción basada en secuencias de cepas cultivadas

La secuencia de la cepa O\_6 estuvo muy emparentada con secuencias de *Nitratireductor sp.* y distantemente relacionada con la agrupación de *N. aquamarinus* (Fig. 9). La secuencia de la cepa O\_22 fue idéntica a secuencias de *Bacillus thuringensis* y *B. cereus* (Fig. 10).

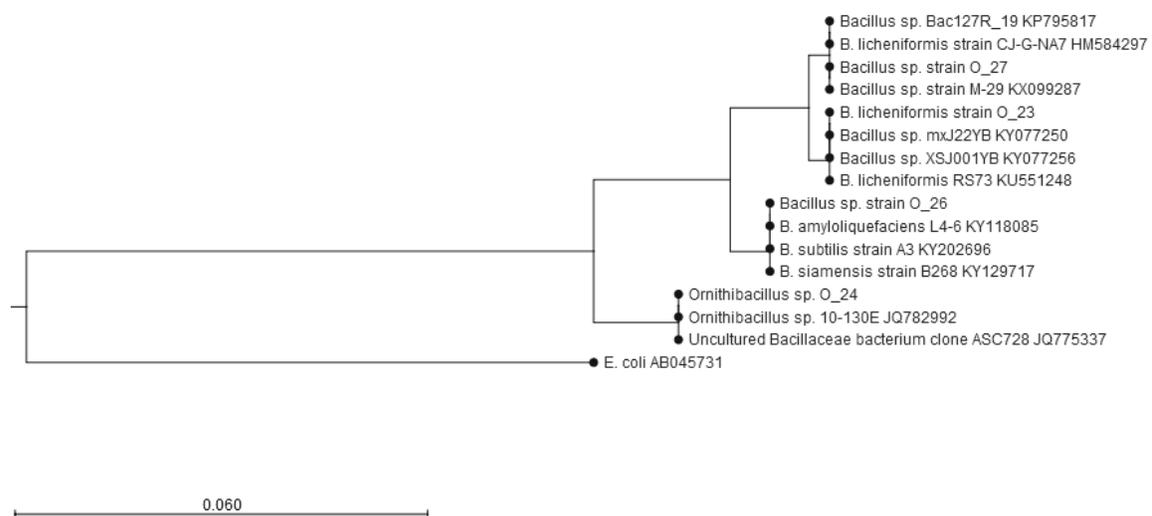


**Figura 9.** Reconstrucción filogenética de la cepa O\_6 y sus vecinos más cercanos derivado de un análisis tipo Neighbord Joining. El filograma fue calculado de la divergencia de secuencias parciales del gen 16S ARNr.



**Figura 10.** Reconstrucción filogenética de la cepa O\_22 derivado de un análisis tipo Neighbord Joining. El filograma fue calculado de la divergencia de secuencias parciales del gen 16S ARNr.

Las cepas O\_23 y O\_27 se agrupan en dos subgrupos cercanamente relacionados a *B. licheniformis*; mientras que la secuencia de la cepa O\_24 fue idéntica a secuencias del género *Ornithibacillus*; finalmente la secuencia de la cepa O\_26 fue idéntica a secuencias de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. siamensis* (Fig. 11).



**Figura 11.** Reconstrucción filogenética que incluye las cepas O\_22, O\_23, O\_24, O\_26, O\_27 y sus vecinos más cercanos derivado de un análisis tipo Neighbor Joining. El filograma fue calculado de la divergencia de secuencias parciales del gen 16S ARNr.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Área de estudio

En el sistema hidrotermal de playa Santispac, Bahía Concepción, B.C.S. se han presentado variaciones fisicoquímicas temporales y espaciales. Leal-Acosta encontró que la concentración de los elementos químicos de la abertura hidrotermal cambió de un año a otro. Y en este estudio se detectó mayor concentración de algunos elementos en el oncoide respecto a la composición química del agua de las ventilas geotermales de Santispac reportada en años anteriores (Tabla VIII) (Leal-Acosta, 2012). También se han registrado variaciones de temperatura (Canet *et al.*, 2003; García-Maldonado, 2009) y de diversidad microbiana en cuanto al grupo de las cianobacterias (López-Cortés, 1998, 2001; García-Maldonado, 2009). También una posibilidad del cambio en la composición de las comunidades de cianobacterias es el impacto por la actividad turística en el sitio, que conlleva al uso de los manantiales como albercas de baño.

### 8.2. Determinación de la composición química de los oncoides

Los elementos más abundantes por espectrometría en el oncoide son Mn (57 %) el Ca (23 %) y el Mg (12 %). Mientras que las estimaciones semicuantitativas por espectroscopía confirmaron que los elementos más abundantes en la corteza terrestre corresponden al O (66 %) y el Si (19 %). Comparando la técnica por espectrometría con la técnica de espectroscopia y considerando a los elementos O y Si en el análisis, el Mn es un componente de menor porcentaje en el oncoide (5 %) al igual que el Ca (5 %) y el Mg (2 %). Descartando el O y el Si del análisis de espectroscopía la abundancia y el tipo de elemento cambió, evidenciando aquellos que estaban en menor proporción en las submuestras de oncoide, siendo los elementos detectados As (33 %), Cl (23 %), Au (21 %) y el S (15 %).

Se encontraron diferencias numéricas en cuanto a la composición y concentración de elementos químicos entre el oncoide y las ventilas (Prol-Ledesma *et al.*, 2004; Leal-Acosta *et al.*, 2012). Algunos elementos se encuentran en mayor concentración en el oncoide que en la ventila geotermal de Santispac y que la corteza terrestre (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Concentración en  $\text{mg kg}^{-1}$  de la composición elemental de oncoides, de la ventila geotermal de Santispac en dos años consecutivos, y la corteza terrestre.

Elemento	Oncoide	Ventila 06-2010	Ventila 07-2011	Corteza terrestre
Ag	<b>6.45</b>	Ni	Ni	0.075
Al	<b>723.27</b>	4.4	6.4	8.23
As	<b>550.78</b>	162	116	1.8
Ba	<b>950.83</b>	340	660	425
Be	<b>36.9</b>	Ni	Ni	2.8
Ca	<b>56606.56</b>	Ni	Ni	4.2
Cd	<b>2.74</b>	27.7	267	0.2
Co	23.36	74	115	25
Cr	4.67	139	75	102
Cu	2.26	123	627	55
Fe	816.47	1.4	3.1	5.6
K	1662.08	Ni	Ni	20900
Mg	<b>28530.9</b>	3	4.1	23300
Mn	<b>138312.23</b>	3	4.1	950
Ni	7.08	30	45	75
P	133.71	Ni	Ni	1050
Pb	40.78	49	27	14
Sb	<b>21.43</b>	18	4.2	0.2
Se	<b>42.34</b>	11	4.8	0.05
Sn	<b>163.58</b>	54	5.9	2.3
Sr	<b>1001.19</b>	730	760	350
V	<b>770.077</b>	168	183	85
Zn	6.9	1838	9.4	70

**NOTA:** Ni= No identificado. Los valores en negritas se han resaltado para notar a los elementos que están en mayor concentración que en la corteza terrestre.

La acumulación de calcio en el oncoide puede deberse a la actividad metabólica de cianobacterias y o a partir de una combinación de bacterias sulfato reductoras y la actividad de las cianobacterias (Tekin *et al.*, 2000).

El oncoide es un microhábitat debido a que es una mezcla de minerales y la mayoría de los microorganismos viven unidos a las superficies (Holm *et al.*, 1992), parece probable que la estructura de las comunidades bacterianas esté influenciada por los minerales en su microhábitat. Estudios de otros ambientes demuestran que diferentes minerales en el suelo pueden seleccionar comunidades bacterianas distintas formando microhábitats (Roberts, 2004). Los estudios *in situ* de microorganismos del suelo y minerales también proporcionan evidencia de que los minerales influyen en las comunidades bacterianas que viven en sus microhábitats (Carson *et al.*, 2009). Los minerales en el suelo pueden tener más influencia en la estructura de la comunidad bacteriana en sus microhábitats cuando contienen elementos que están ausentes o en concentraciones bajas en el suelo. Gleeson y colaboradores en 2006, encontraron que la presencia de ribotipos bacterianos específicos estaban relacionados con elementos químicos particulares de los minerales.

Los microorganismos poseen metabolismos y funciones específicos para cada elemento de la tabla periódica y en la siguiente tabla se muestra la función conocida de los microorganismos en relación con los elementos químicos detectados en el oncoide (Tabla IX).

**Tabla IX.** Relación de los elementos químicos y la función de los microorganismos. Tomado y modificado de Gadd, 2010.

Elemento	Función microbiana
S	Degradación de compuestos orgánicos que contienen S; Transformaciones orgánicas-inorgánicas de S; Absorción y asimilación de compuestos S orgánicos e inorgánicos; sulfidogénesis; S (0) acumulación; Reducción y asimilación de $\text{SO}_4^{2-}$ ; Reducción de S (0); Oxidación de compuestos S reducidos, p.e. S (0), tiosulfato, tetratiónato; Oxidación de $\text{H}_2\text{S}$ a S (0); Reducción de S (0) a $\text{H}_2\text{S}$ ; Disolución de minerales que contienen S en suelos y rocas (sulfuros, sulfatos).
Fe	Degradación de minerales que contienen Fe en rocas y suelos; Solubilización de Fe por sideróforos, ácidos orgánicos, metabolitos, etc.; Reducción de Fe (III) a Fe (II); Oxidación de Fe (II) a Fe (III); Fe biomineralización de óxidos, hidróxidos, carbonatos, sulfuros; Sorción de metales a óxidos de Fe
Mn	Oxidación de Mn (II) e inmovilización como óxidos de Mn (IV); Reducción de Mn (IV); Reducción indirecta de Mn (IV) $\text{O}_2$ por metabolitos (oxalato); Bioacumulación de óxidos de Mn sobre superficies y exopolímeros; Contribución a la formación del barniz del desierto; biosorción; acumulación; Precipitación intracelular; Biomineralización de Mn, como óxidos, carbonatos, sulfuros, oxalatos; Sorción de metales a óxidos de Mn
Cr	Reducción de Cr (VI) a Cr (III); Cr (III) oxidación; Acumulación de oxianiones de Cr
Mg, Ca, Co, Ni, Zn, Cd, Sr	Degradación de minerales en rocas y suelo; biosorción; Absorción y acumulación; Bioprecipitación, como oxalatos, sulfuros, fosfatos, carbonatos; Reducción de Co (III)
Ag	Reducción de Ag(I) a Ag (0); biosorción; acumulación
K, Na	Absorción y acumulación; Movilización de minerales en el suelo
Cu	Movilización de minerales que contienen cobre en rocas y suelos; Formación de $\text{CuS}$ ; biosorción; Absorción y acumulación; Bioprecipitación (oxalatos)

---

Se	Reducción de oxianiones de Se: Se (VI) a Se (IV) a Se (0); oxidación de Se (0) ; Biometilación y demetilación de los compuestos de Se; Asimilación de compuestos orgánicos e inorgánicos de Se
Pb	Biosorción; Formación de oxalato de plomo; biometilación
Cl, Br	Dehalorespiración; Biometilación; Acumulación en biomasa
Sn	Degradación de organoestánicos; Absorción y acumulación de especies de Sn soluble; Biometilación
Au	Reducción de especies solubles a Au(0); Dispersión mineral y solubilización
As	Biometilación de las especies As: Arsenito a trimetilarsina; Reducción de oxianiones de As: Arsenato a arsenito; Oxidación de oxianiones de As: Arsenito a arsenato
Al	Movilización de minerales que contienen Al en suelos y rocas; Disolución de aluminosilicatos; Precipitación de Al como óxidos (fase temprana de la bauxitización); biosorción
Si	Absorción de especies de Si soluble; Formación de complejos orgánicos de Si a partir de silicatos inorgánicos; Formación de siloxano orgánico; Degradación de sílice, silicato y aluminosilicatos; Movilización de Si a través de la producción de quelantes, ácidos, bases, exopolímeros; silicificación
V	Acumulación de V; Reducción de V(V) a V(IV)

---

Como se muestra en la tabla anterior los elementos detectados en los oncoides del manantial dos de Santispac pueden ser acumulados o asociados con la biomasa microbiana, de tal manera que los microbios son capaces de mediar la bioprecipitación de metales y minerales, por la producción de metabolitos, cambiando las condiciones microambientales fisicoquímicas alrededor de la célula, y también por la liberación de sustancias, como el fosfato por la descomposición orgánica, también las paredes celulares microbianas contienen exopolímeros capaces de absorber, unir o atrapar muchas especies de metales solubles e insolubles (Gadd, 2010).

Deben considerarse para evitar daños a la salud humana los resultados del análisis de espectrometría respecto a la concentración del metaloide As en el oncoide que es de  $550.78 \text{ mg kg}^{-1}$  debido a que algunas especies químicas del As son altamente tóxicas, el arsenato es un análogo estructural del fosfato, interfiriendo en el metabolismo celular, en particular desacoplando el sistema de fosforilación de la cadena respiratoria y el arsenito bloquea a los grupos sulfhidrilo (-SH) y grupos (-OH) de proteínas, modificando su estructura (Wang *et al.*, 2014).

Por otro lado la abundancia de As en las manifestaciones hidrotermales llama la atención por la posibilidad de encontrar microorganismos que metabolicen arsénico, de tal forma que lo pueden reducir oxidar o metilar, lo cual es importante conocer por el impacto positivo y negativo que estas transformaciones químicas puedan significar a la sociedad.

Otros elementos que están enriquecidos en comparación de la corteza terrestre y son tóxicos son el Ba y el V. El bario es un antagonista competitivo del canal de potasio que bloquea el flujo pasivo del potasio intracelular, dando como resultado un desplazamiento del potasio de los compartimentos extracelulares a los intracelulares. El resultado neto de este cambio es una disminución significativa en la concentración de potasio en el plasma sanguíneo. Los efectos asociados son hipopotasemia, efectos gastrointestinales, daño cerebral, debilidad muscular y parálisis (Tarasenko *et al.*, 1976).

El vanadio provoca una variedad de efectos tóxicos tales como cambios hematológicos y bioquímicos, por ejemplo, hemólisis y disminución en el recuento de eritrocitos, nivel de hemoglobina, índice de hematocrito, lesiones neuronales, afectando la actividad neuronal general y en el aprendizaje, anomalías en el desarrollo y la reproducción, por ejemplo, embriotoxicidad, teratogenicidad o lesiones morfológicas y funcionales en hígado, riñones, huesos, bazo y leucocitos. La inhalación de vanadio puede causar rinitis, faringitis, tos crónica productiva,

traqueobronquitis, broncopneumonia y muerte (Barceloux, 2000; Ghosh *et al.*, 2015).

### **8.3. Aislamiento, crecimiento y cultivo de microorganismos de oncoides**

Se aislaron bacterias Gram positivas, del género *Bacillus* formadoras de esporas, tras aplicar un tratamiento de temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

En un estudio donde el objetivo era saber la temperatura máxima de resistencia de las esporas de *Bacillus subtilis* cepa STCC 4524, las esporas en buffer de citrato-fosfato (pH 7) toleraron hasta 102 °C (Palop *et al.*, 1999). Las esporas de *B. subtilis* cepa PS832 comienzan a desnaturalizarse sus componentes (proteínas) a una temperatura de 70 °C (Zhang *et al.*, 2009).

Entre los factores importantes para determinar el nivel de resistencia a las esporas. Estos factores incluyen la composición genética, las condiciones precisas de esporulación, particularmente la temperatura, las capas de esporas, la relativa impermeabilidad del protoplasto de las esporas, el contenido de agua del protoplasto, el alto nivel de minerales en la espora, etc. Por ejemplo, las esporas bacterianas suelen ser más resistentes al calor cuando esporulan a temperaturas más altas (Berg *et al.*, 1970; Condón *et al.*, 1996). Temperaturas más altas de esporulación se han correlacionado con mayores niveles de mineralización de esporas (Lechowich y Ordal, 1962). Se cree que los minerales (calcio principalmente) aumentan el grado de inmovilización de las moléculas y estructuras, haciéndolos menos sensibles al calor (Gerhardt y Marquis, 1989). Los tipos de minerales y el contenido global de esporas pueden modificarse un poco cambiando la composición mineral del medio de esporulación (Slepecky y Foster, 1959).

La supervivencia de endosporas a condiciones adversas, permite especular sobre la posibilidad de que las endosporas sean la forma en que los microorganismos se transporten a Marte o viceversa, por ejemplo, el caso de esporas de *Bacillus subtilis* que sobrevivieron en el espacio por 6 años (Nicholson *et al.*, 2000). Se

sabe que en la Tierra, las esporas pueden transportarse a través del aire, el agua y organismos huésped, a ambientes potencialmente favorables para su germinación y reanudar el crecimiento vegetativo.

#### **8.4. Secuencias del gen 16S ARNr**

La cepa O\_6 se identificó dentro del género *Nitratireductor* con un valor de similitud del 99 %, corresponde a una  $\alpha$ -proteobacteria, especies de este género reducen nitratos a nitritos. Se reconocen seis especies aisladas de hábitats marinos. *N. aquibiodomus* reduce nitratos a nitritos, y fue aislado de un sistema de denitrificación marino en Montreal, Canadá. *N. basaltis* se aisló de arena de playa de la isla de Jeju, Corea. *N. kimnyeongensis* se aisló de una muestra de algas secas colectada de la playa de Kimnyeong en Jeju, Corea. *N. indicus*. y *N. aquimarinus* fueron aisladas en el agua del mar del este en Corea y *N. pacificus* fué aislada de aguas profundas del océano Índico y también de sedimentos de aguas profundas del Océano Pacífico, respectivamente (Labbé *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2011). Es la primera vez que este género es aislado de un ambiente hidrotermal, y de especial interés sería conocer si estos microorganismos poseen alguna estrategia para la detoxificación de metales y metaloides por ejemplo, al As.

Las cepas O\_22, O\_26 y O\_27 se identificaron dentro del género *Bacillus* con un valor de similitud del 100 %. Este es un grupo extremadamente diverso pues muestran una serie de habilidades fisiológicas que les permiten vivir en una amplia gama de hábitats, incluyendo muchos hábitats extremos como las arenas del desierto, las aguas termales y los suelos árticos. Las especies del género *Bacillus* pueden ser termófilas, psicrófilas, acidófilas, alcalifílicas, halotolerantes o halofílicas y son capaces de crecer a valores de pH, temperaturas y concentraciones de sal en las que pocos otros organismos pueden sobrevivir (Rüger *et al.*, 2000). Son esporulados y cada célula puede formar una spora, éstas se forman cuando el microorganismo se encuentra en un ambiente

desfavorable para su desarrollo, lo que les confiere gran resistencia en el ambiente (Madigan *et al.*, 2009). 15 cepas de *Bacillus* fueron aislados de las ventilas hidrotermales someras de las islas Panarea en Italia (Gugliandolo, 2012), por lo que el aislar tres cepas de características coloniales y celulares distintas del género *Bacillus* podemos comprobar su capacidad para adaptarse al ambiente.

La cepa O\_24 que se identificó dentro del género *Ornithinibacillus* con un valor de similitud del 99 %, pertenece a la familia *Bacillaceae*. Especies de este género han sido aislados de varios ambientes, por ejemplo, *Ornithinibacillus contaminans* cepa DSM22953<sup>T</sup> fue aislada de sangre humana, *O. californiensis* cepa DSM16628<sup>T</sup> fue aislado de sedimento marino, *O. scapharcae* cepa TW25<sup>T</sup> fue aislado de una almeja muerta, *O. bavariensis* fue aislada de leche de vaca de Baviera en Alemania. Esta es la primera vez que este género es aislado de sistemas hidrotermales, lo que parece no ser tan extraño ya que en el genoma de *O. californiensis* cepa DSM16628<sup>T</sup> fueron encontrados genes de respuesta al estrés y de resistencia a los metales pesados lo que refleja su adaptación al ambiente complejo marino (Francis y Tebo, 2002; Bagheri *et al.*, 2013; Lu, 2014).

La cepa O\_23 fue asignada a la especie *Bacillus licheniformis* con un valor de similitud del 100 %, esta es una especie que se encuentra en una amplia gama de ambientes por ejemplo, en diferentes clases de suelos, en alimentos, en animales, en las plumas de las aves, de agua marina y dulce, particularmente se han aislado en ambientes hidrotermales, tales como salinas hidrotermales y ventilas hidrotermales someras en Italia, los exopolisacáridos que excretan las células de la cepa aislada en las ventilas hidrotermales somera de las islas Vulcano en Italia son de alto uso potencial para el desarrollo de nuevos fármacos (Spano *et al.*, 2013). El hecho de obtener una cepa aislada de esta especie en un ambiente hidrotermal no es nuevo, pero sí, las condiciones del microhábitat que esta especie ocupa por que lo pudiera ser un ecotipo nuevo.

La especie de cianobacteria *Synechococcus elongatus* cepa SP2A9606-8 con un valor de similitud del 100%, corresponde a una cianobacteria que se encuentra ampliamente extendida en el medio marino. Ha sido empleada como modelo de estudio en diversas disciplinas científicas. De particular interés en este estudio sobresale su capacidad de resistencia a metales y metaloides, salinidad, y altas temperaturas. Además esta especie presenta altas tasas de transferencia horizontal de genes que resulta en una alta variabilidad genética con ventajas evolutivas (Paerl *et al.*, 2011). Lo que puede explicar su adaptación a las condiciones fisicoquímicas de los oncoides.

Las bacterias cultivadas fueron asignadas a taxones que han sido aislados de una gran versatilidad de ambientes, lo que prueba que estos microorganismos se adaptan a diversos nichos. Esto sugiere que forman parte de la biósfera común de los oncoides, ya que fueron crecidos en medio de cultivo marino convencional.

Estudios demuestran que los microorganismos poco abundantes o raros, sólo es posible detectarlos empleando tecnología de secuenciación de punta. A estos microorganismos se les ha llamado reservorios genéticos, puesto que están a la espera de que las condiciones ambientales favorezcan su metabolismo para así incrementar su crecimiento poblacional, y en tal caso, podría ser que las ventilas hidrotermales son reservorios genéticos microbianos debido a los múltiples cambios ambientales que están presentando (Sogin *et al.*, 2006).

No existe ningún método para determinar la totalidad de la diversidad, abundancia y función de los microorganismos en la Tierra. Sin embargo, los recientes avances tecnológicos nos han permitido conocer mayores escalas de diversidad microbiana. No ha sido sencillo establecer los métodos para su estudio, los microorganismos (especialmente bacterias y arqueas) se distinguen mejor por su diversidad metabólica más que por su morfologías. Crear estándares para delimitar que hace un microbio diferente de otro ha sido contencioso (Banfield *et al.*, 2005), sobre todo si analizamos cuál es el concepto de especie en

microbiología. Una definición de especie microbiana, es aquella que refiere a su ecología, podríamos referirnos a ellas como ecotipo microbiológico. La interacción genética y procesos celulares se definen tanto por los organismos a su alrededor como por las características físicoquímicas del ambiente. Los métodos independientes de cultivo han aumentado considerablemente nuestra comprensión de las comunidades microbianas que habitan el medio marino (Sogin *et al.*, 2006). Estamos en la era en la que en un estudio de diversidad pueden revelarse simultáneamente un gran número (millones) de individuos y genes (Bartram *et al.*, 2011). Pero todas las técnicas tienen sus limitaciones y sesgos (Schloss, 2016). Los resultados obtenidos están sujetos a una multitud de factores, como lo son los cambios físicos y químicos del ambiente (temporales), a las relaciones entre organismos, el método de colecta, el método de obtención del ADN, etc. Pensar en que se ha llegado a un límite parece ser una suposición muy apresurada.

Además que pueden estar desempeñando funciones únicas y específicas en el ambiente, como asimilar elementos químicos para poder ser metabolizados por el resto de los organismos. Un ejemplo pudiera ser la transformación de compuestos tóxicos en otros con de menor toxicidad de ciertos elementos del oncoide con beneficio para el resto de la biodiversidad que se desarrolla en el manglar.

Existe evidencia fósil de hace 3,500 millones de años (Dunlop *et al.*, 1978) que apoya la existencia de los microorganismos. Durante todo este tiempo las bacterias han interactuado con los elementos químicos. Un ambiente parecido a estas condiciones son los ambientes hidrotermales, de los cuales se han formulado teorías sobre el origen de la vida, sobre los mecanismos de regulación y moleculares que hacen que la vida sea posible en condiciones adversas, y posibilitan que organismos vivos se desarrollen en otros planetas (Brock, 1969; Herschy *et al.*, 2014). Entonces la hipótesis del origen de la vida a partir de las ventilas hidrotermales nos deja claro que la vida sedesarrolla en la frontera de lo abiótico y abiótico para formar biomoleculas, obteniendo compuestos que

permitieron dar forma a estructuras que les permitió encapsular un grupo selecto de elementos químicos del resto (membrana), si a partir de aquí, evolucionaron todas las formas biológicas actuales, pareciera ser que algunas formas de vida siempre se adaptan al ambiente.

### **8.5. Diversidad filogenética de bacterias aisladas de oncoides**

La secuencia del gen 16S ARNr de la cepa O\_6 se localizó en la regiones variables que van de la V1 a la V3 y mostró diferencias con aquellas reportadas en GeneBank para el género *Nitratireductor*.

La secuencia del gen 16S ARNr de la cepa O\_22 está comprendida en una agrupación que incluye dos especies distintas del género *Bacillus*, aun siendo idénticas 502 pb de las regiones variables que van de la V1 a la V4.

La secuencia del gen 16S rRNA de las cepas O\_23 se localizó en regiones conservadas correspondientes a V4 a la V7, la cepa O\_26 incluyó regiones variables y regiones conservadas, mientras que la secuencia O\_27 se localizó en la región variable V1 a la V4. Aun siendo secuencias correspondientes al género *Bacillus*, se observaron en la topología del árbol subgrupos distantemente relacionados.

La secuencia del gen 16S rRNA de la cepa O\_24 se localizó en regiones variables V1 a la V3. Esta secuencia es idéntica a una secuencia de un clon no cultivable, por lo que la cepa O\_24 obtenida pudiese ser el representante cultivable de dicho clon.

## 9. CONCLUSIONES

Las ventilas hidrotermales intermareales asociadas a un manglar localizado en la Playa Santispac en Bahía Concepción pueden ser consideradas como una fuente geogénica de metales y metaloides, debido a que el estudio de la concentración química de los oncoides indicó que 15 metales y metaloides, están por encima de la concentración que de la corteza terrestre.

Las esporas de las cepas de bacterias obtenidas del género *Bacillus* son resistentes a la temperatura de 121°C durante 15 minutos, por lo tanto podrían ser utilizadas para fines biotecnológicos.

Las bacterias aisladas de los oncoides compuestos por 28 metales y 2 metaloides crecieron en medio comercial 2216 enriquecido con oncoides. De la misma manera las cianobacterias aisladas de los oncoides crecieron en medio ASN III enriquecido con oncoides. Por lo que los cultivos obtenidos en este trabajo pueden ser empleados como modelos de estudio para la identificación y análisis de los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables de la resistencia bacteriana a metales y metaloides. Otros estudios pueden incluir la selección de las cepas con el mejor potencial para su uso en biorremediación.

Los géneros *Nitratirreductor* y *Ornithinibacillus* se reportan por primera vez en ventilas hidrotermales en el mundo. Son especies que se describieron recientemente, por lo que cualquier aportación es de relevancia científica o biotecnológica.

El análisis filogenético de las cepas recuperadas mostró que estos microorganismos están lejanamente emparentados entre sí y muy variables, posiblemente debido a las diferentes condiciones ambientales a las que se deben de adaptar.

## 10. RECOMENDACIONES

Las ventilas hidrotermales difusas son comunidades muy complejas y diversas. Por lo que se recomienda llevar a cabo estudios metagenómicos, los cuales posibilitan estudiar el mayor número de genes posibles (el gen 16S ARNr y genes funcionales). De esta manera sería posible detectar algunos de los microorganismos que se encuentran en baja abundancia, pudiendo estos representar la mayor parte de la diversidad filogenética del sitio, además que pudieran tener gran relevancia ecológica.

Pueden llevarse estudios más específicos para revelar un metabolismo en particular, por medio de la secuenciación masiva de un gen funcional. Siendo necesario el diseño de cebadores específicos, y llevar a cabo estudios geoquímicos más detallados, que permitan distinguir las especies químicas de los elementos asociados al metabolismo.

Otros enfoques biotecnológicos o ecológicos pueden desarrollarse, por ejemplo, estudiar los genomas completos de estas cepas, o comparar como cambian las comunidades microbianas sujetas a las condiciones de este ambiente.

También las cepas obtenidas en estos estudio pueden ser empleadas como modelos de estudio apoyándose con otras disciplinas (por ejemplo, bioquímica, evolución).

## 11. LITERATURA CITADA

- Aas, J.A., B.J. Paster, L.N. Stokes, I. Olsen, F.E. Dewhirst. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5721–5732.
- Abbiati, M., L. Airoidi, A. Castelli, F. Cinelli, A.J. Southward. 1994. Preliminary observations on a dense population of *Phyllochaetopterus socialis*, Claparede at the sulphurous water boundary in a Mediterranean submarine cave. *Mem. Mus. Nat. Hist. Nat.* 162: 323–329.
- Abramov, O., D.A. Kring. 2005. Impact induced hydrothermal activity on early Mars. *J. Geophys. Res.* 110: 12-19.
- Amann, R.L., W. Ludwig, K.H. Schleifer, W. Ludwig, K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- Amann, R. 2000. Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:1-8.
- Anadon, P., I. Zamarreño. 1981. Paleogene marine algal deposits from the Ebro Basin (North eastern Spain). En: Monty E. (ed.). *Phanerozoic Stromatolites*. Editorial Springer. Primera edición. Berlin. pp 140-154.
- Anagnostidis, K., A. Pantazidou. 1998. Endolithic cyanophytes from the saline thermal springs of Aedipsos, Hellas, Greece. *Arch. Hydrobiol.* 80: 555-559.
- Anderson, T.F. 1956. Electron microscopy of microorganisms. *Phys. Tech. Res.* 3: 78-181.
- Banfield, J.F., J. Cervina-Silva, K.M. Nealson. 2005. Molecular geomicrobiology. *Rev. Min. Soc. Am.* 59: 210-214.
- Barceloux, D.G. 2000. Vanadium. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38: 813-817.
- Bagheri, M. 2013. *Ornithinibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic, Gram stain positive, endospore-forming bacterium from a hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 844–848.
- Barragan, R., R.M. Birkle, P.M. Portugal, E.G. Arellano, R.J. Alvarez. 2001. Geochemical survey of medium temperature geothermal resources from the Baja California Peninsula and Sonora, Mexico. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* 110: 101-119.
- Battley, E. H. 1995. An apparent anomaly in the calculation of ash free dry weights for the determination of cellular yields. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1655–1657.

Bartram A., M.D.J. Lynch, J.C. Stearns, G. Moreno-Hagelsieb, J.D. Neufeld. 2011. Generation of multimillionsequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 3846–3852.

Bauld, J., T.D. Brock. 1973. Ecological studies of *Chloroflexus*, a gliding photosynthetic bacterium. *Archiv. Für. Mikrobiol.* 92: 267–284.

Berg, R. W., W. E. Sandine. 1970. Activation of bacterial spores. A review. *J. Milk Food. Technol.* 33: 435–441.

Brakenridge, G.R., H.E. Newsome, V.R. Baker. 1985. Ancient hot springs on Mars: Origins and paleoenvironmental significance of small martian valleys. *Geology* 13: 859–862.

Brock, T.D. 1969. *Thermus aquaticus* gen. and sp., a non-sporulating extreme thermophile. *J. Bact.* 98: 289-297.

Bonavia, A. 2012. Bacteria Cryopreservation. *Nature Protocol Ex.* 10.

Canet, C., Prol-Ledesma, R.A., Melgarejo, J.C., A. Reyes. 2003. Methane-related carbonates formed at submarine hydrothermal springs: a new setting for microbially-derived carbonates? *Mar. Geol.* 199: 245–261.

Carr, M.H. 1995. The martian drainage system and the origin of valley networks and fretted channels. *J. Geophys. Res.* 100: 7479–7507.

Carr, M.H. 1979. Formation of martian flood features by release of water from confined aquifer. *J. Geophys. Res.* 84: 2995–3007.

Carson, K., L. Campbell, D. Rooney, N. Clipson, D. Gleeson. 2009. Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 67: 381-388.

Castenholz, R. W. 1976. The effect of sulfide on the bluegreen algae of hot springs in New Zealand and Iceland. *J. Phycol.*, 12: 54–68.

Castenholz, R.W. 1977. The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs in Yellowstone National Park. *Microb. Ecol.* 3: 79–105.

Clifford, S.M. 1993. A model for the hydrologic and climatic behavior of water on Mars. *J. Geophys. Res.* 98: 10973–11016.

Condón, S., A. Palop, J. Raso, F.J. Sala. 1996. Influence of the incubation

temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. Lett. Appl. Microbiol. 22:149–152.

Corliss, J.B., J.A. Baross, S.E. Hoffman. 1981. An hypothesis concerning the relationship between submarine hot springs and the origin of life on Earth. Oceanol. Acta. 4: 59–69.

Dando, P.R., J.A. Hughes, F. Thiermann. 1995. Preliminary observations on biological communities at shallow hydrothermal vents in the Aegean Sea. Hydrothermal vents and processes. Geol. Soc. Spec. 87: 303-317.

Dávila-Ramos, S., A. Estradas-Romero, R.M. Prol-Ledesma, K. Juárez-López. 2015. Bacterial populations (First Record) at two shallow hydrothermal vents of the Mexican Pacific west coast bacterial populations (First Record) at two shallow hydrothermal vents of the Mexican Pacific west coast. Geomicrobiol. J., 32: 657-665.

Desikachary, T.V. 1959. Monographs of algae. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research. Editorial I.C.A.R. Segunda edición. New Delhi, India. 686p.

Dirk, S.A., M. James, C. Dohmb, F.A. Chaojun, A.G. Fairén, J.A. Rodriguez, V.R. Baker, F. Wolfgang. 2007. Exploration of hydrothermal targets on Mars. Icarus 189: 308–324.

Dohm, J.M., K.L. Tanaka, J.H. Lias, T.M. Hare. 1998. Warrego Valles and other candidate sites of local hydrothermal activity within the Thaumasia region, Mars. Lunar Planet. Sci. 3: 25-46.

Dohm, J.M., V.R. Baker, R.C. Anderson, D.H. Scott, J.W. Rice Jr., T.M. Hare, T.M., 2000. Identifying martian hydrothermal sites: Geological investigation utilizing multiple datasets. Planet. Space. Sci. 47: 411–431.

Dohm, J.M., J.C. Ferris, V.R. Baker, R.C. Anderson, T.M. Hare, R.G. Strom, N.G. Barlow, K.L. Tanaka, J.E. Klemaszewski, D.H. Scott. 2001a. Ancient drainage basin of the Tharsis region, Mars: Potential source for outflow channel systems and putative oceans or paleolakes. J. Geophys. Res. 106: 32942–32958.

Dohm, J.M., R.C. Anderson, V.R. Baker, J.C. Ferris, L.P. Rudd, T.M. Hare, J.W. Rice Jr., R.R. Casavant, R.G. Strom, J.R. Zimbelman, D.H. Scott. 2001b. Latent activity for western Tharsis, Mars: Significant flood record exposed. J. Geophys. Res. 106:12300–12314.

Dohm, J.M., J.C. Ferris, N.G. Barlow, V.R. Baker, W.C. Mahaney, R.C. Anderson, T.M. Hare. 2004. The northwestern Slope valleys (NSVs) region, Mars: A prime candidate site for the future exploration of Mars. Planet. Space Sci. 52: 189–198.

Dunlop, J.S. 1978. Archaen evaporitic sulphates from the north pole barite

deposits, western Australia. Editorial Geo. Soc. American. Volumen 10. 393p.

Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, H. Stackebrandt, The prokaryotes a handbook on the biology of bacteria. 2006. Editorial Springer. Tercera edición. New York, N.Y. 939p.

Francis, C.A., B.M. Tebo. 2002. Enzymatic manganese (II) oxidation by metabolically dormant spores of diverse *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 68: 874–880.

Frias-López J., Y. Shi, G.W. Tyson, M.L. Coleman, S.C. Schuster, S.W. Chisholm. 2008. Microbial community gene expression in ocean surface waters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 3805-3810.

Fricke, H., O. Giere, K. Stetter, G.A. Alfredsson, J.K Kristjansson, P. Stoffers, J. Svavarsson. 1989. Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar mid Atlantic ridge. Mar. Biol. 102: 425-429.

Forrest, M.J., A. Melwani. 2003. Ecological consequences of shallow water hydrothermal venting along the el Requesón fault zone, Bahía Concepción, B.C.S., Mexico: Geol. Soc. America. 35: 577-578.

Gadd, G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. Microbiol. 156 (3): 609–643.

García-Maldonado, J.Q. 2009. Análisis espacio-temporal de la comunidad de cianobacterias de manantiales hidrotermales intermareales. Tesis (maestría). La Paz, BCS, México. CIBNOR. 87p.

Gardner, C.A., K.M. Scott, C.D. Miller, B. Myers, W. Hildreth, P.T. Pringle. 1995. Potential volcanic hazards from future activity of Mount Baker, Washington. U.S.G.S Open-File Report 95-498.

Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. Rabenhorst kryptogamenflora von Deustscland, Osterreich und der Scewiz. Akademische Verlag. Leipzig, Germany.

Gerdes G. W., E. Krumbein. 1987. Biolaminated deposits. Lecture Notes in Earth Sciences. Editorial Springer. Volúmen 9. Berlín, Alemania. 183p.

Gerhardt, P., R.E. Marquis. 1989. Spore thermoresistance mechanisms, regulation of procaryotic development. En: Smith I., R.A. Slepecky, P. Setlow (eds.). Regulation of procaryotic development. Editorial American Society for Microbiology. Primera edición. Washington, D.C. pp 43–63.

Giovannoni S.I., T.B. Britschgi, C.L. Moyer, K.G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63.

Gleeson, D.E., F. McDermott, N. Clipson. 2006. Structural diversity of bacterial communities in a heavy metal mineralized granite outcrop. *Environ. Microbiol.* 8: 383-393.

Gram, C. 1884. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Am. Soc. Microbiol.* 2:185-189.

Greeley, R., Thomas, P.E., 1994. Mars landing site catalog. NASA Ref. Pub. 1238: 342-365.

Grotzinger, J.P., N.P. James. 2000. Precambrian carbonates: evolution of understanding. In carbonate sedimentation and diagenesis in the evolving Precambrian world. *J. Sediment. Res.* 44: 3–20.

Ghosh, S.K., R. Saha, B. Saha. 2015. Toxicity of inorganic vanadium compounds *Res. Chem. Intermed.* 41: 4873.

Gugliandolo, C., T.L. Maugeri. 1998. Temporal variations in heterotrophic mesophilic bacteria from a marine shallow hydrothermal vent off the Island of Vulcano (Eolian Islands, Italy). *Microb. Ecol.* 36: 13-22.

Gulick, C., D. Tyler, C. McKay, R.M. Haberle. 1997. Episodic ocean induced CO<sub>2</sub> greenhouse on Mars: Implications for fluvial valley formation. *Icarus.* 130: 68–86.

Gulick, V.C., 1993. Magmatic intrusions and hydrothermal systems: Implications for the formation of small martian valleys. Thesis (Doctorado). Tucson, Arizona. Univ. of Arizona. 170p.

Gulick, V.C., V.R. Baker. 1990. Origin and evolution of valleys on martian volcanoes. *J. Geophys. Res.* 95: 14325–14344.

Groves, D. I., J.S. Dunlop, R. Buick. 1981. An early habitat of life. *Sci. American.* 245: 56-65.

Hashimoto, J., T. Miura, K. Fujikura, J. Oosaka. 1993. Discovery of vestimentiferan tube-worms in the euphotic zone. *Zool. Sci.* 10: 1063–1067.

Hazen, R.M., Deamer D.W. 2007. Origin of life. *Evolution. Biosph.* 37:143.

Heim, A. 1916. Monographie der Churfrsten-Mattstock-Gruppe. *Beitr. Geol. Karte.* 20: 369–573.

Henet, J.R., Holm N.G., Engel M.H. 1992. Abiotic synthesis of amino acids under Hydrothermal conditions and the origin of life: a perpetual phenomenon?. *Nat. Biotechnol.* 94: 565–574.

Herschy, B., A. Whicher, E. Camprubi, C. Watson, L. Dartnell, J. Ward, N. Lane. 2014. An origin of life reactor to simulate alkaline hydrothermal vents. *J. Mol. Evol.* 79: 213–227.

Heylen, K., S. Hoefman, B. Vekeman, J. Peiren, P. De Vos. 2012. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. *Appl. Microbiol.* 79 (8): 361-365.

Hirayama, H., M. Sunamura. K. Takai, T. Nunoura, T. Noguchi, H. Oida, Y. Furushima, H. Yamamoto, T. Oomori, K. Horikoshi. 2007. Culture-dependent and independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi Island, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:764–7656.

Hofmann H.J., K. Grey, A.H. Hickman, R.I. Thorpe. 1999. Origin of 3.45 Ga coniform stromatolites in Warrawoona Group, Western Australia. *Geol. Soc. Am. Bull.* 111: 1256–1262.

Holm, P.E., P.H. Nielsen, H.J. Albrechtsen, T.A. Christensen. 1992. Importance of unattached bacteria and bacteria attached to sediment in determining potentials for degradation of xenobiotic organic contaminants in an aerobic aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3020–3026.

Inskeep W.P., D.B. Rusch, Z.J. Jay, M.J. Herrgard, M.A. Kozubal, T.H. Richardson. 2010. Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. *PLoS ONE* 5:67-73.

Jianping, Xu. 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Mol. Ecol.* 15: 1713–1731.

Jones, D., N.R. Krieg. 1984. Serology and chemotaxonomy. En N. R. Krieg (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins. Primera edición. Baltimore. pp 15-18.

Kang, H. S., H.L. Yang, S.D. Lee. 2009. *Nitratireductor kimnyeongensis* sp. nov., isolated from seaweed. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1036–1039.

Kim, K. H., S.W. Roh, H.W. Chang, Y.D. Nam, J.H. Yoon, C.O. Jeon, J.W. Bae. 2009. *Nitratireductor basaltis* sp. nov., isolated from black beach sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 135–138.

Kleinschmidt, M., R. Chauder. 1985. Shallow-water hydrothermal vent systems off the Palos verdes peninsula, Los Angeles County, California. *Bull. Biol. Soc. Wash.* 6: 485-488.

Labbé, S., S. Parent, R. Villemur. 2004. *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel  $\alpha$ -proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 269–273.

Lai, Q., Z. Yu, J. Wang, H. Zhong, F. Sun, L. Wang, B. Wang, Z. Shao. 2011. *Nitratireductor pacificus* sp. nov., isolated from a pyrene-degrading consortium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1386–1391.

Leal-Acosta, M.L. 2012. Influencia de las fuentes geotermales e hidrotermales sobre la biogeoquímica de elementos traza en la Bahía Concepción, Golfo de California. Tesis (Doctorado). La Paz, B.B.S. México. CICIMAR. 326 p.

Leal-Acosta, M.L., E. Shumilin, N. Mirlean, D. Sapozhnikov, V. Gordeev. 2010. Arsenic and mercury contamination of sediments of geothermal springs, mangrove lagoon and the Santispac Bight, Bahía Concepción, Baja California Peninsula. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6: 609-613.

Lechowich, R.J., Z.J. Ordal. 1962. The influence of the sporulation temperature on the heat resistance and chemical composition of bacterial spores. *Can. J. Microbiol.* 8: 287–295.

Ledesma-Vázquez, J., M.E. Johnson. 2001. Miocene–Pleistocene tectono sedimentary evolution of Bahía Concepción region, Baja California Sur (México). *Sed. Geol.* 144: 83–96.

Levin, L.A., D.W. James, C.M. Martin, A.E. Rathburn, L.H. Harris, R.H. Michener. 2000. Do methane seeps support distinct macrofauna assemblages? Observations on community structure and nutrition from the northern California slope and shelf. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 208: 21-39.

Libbey, L.K., M.E. Johnson. 1997. Upper Pleistocene rocky shores and intertidal biotas at playa La Palmita, Baja California Sur, Mexico. *J. Coastal. Re.* 13: 216-225.

López Cortés A. 1998. Diversidad de bacterias fotótrofas informe final, comunidades microbianas bentónicas de Bahía Concepción, B.C.S., resultados: México. CIBNOR S.C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G035. México D. F.

López-Cortés A., F. García-Pichel, U. Nubel, R. Vázquez-Juárez. 2001. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. *Int. Microbiol.* 4: 227–236.

López-Cortés A., P. Schumann, R. Pukall, E. Stackebrandt. 2006. *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov., isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (3): 183-190.

López-Cortés, A. 1999. Marine cyanobacteria from Bahía Concepción BCS Mexico. En: Charpy L, A.W.D. Larkum (eds). *Marine cyanobacteria*. Editorial Musée océanographique. Edición 19. Mónaco. 87-93 pp.

Lu, J., J.W. Santo-Domingo, R. Lamendella, T. Edge, S. Hill. 2008. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3969–3976.

Lu, Q. 2014. *Ornithinibacillus Halotolerans* Sp. Nov., isolated from a saline soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 1685-1689.

Lunn M., W.T. Sloan, T.P. Curtis. 2004. Estimating bacterial diversity from clone libraries with fiat rank abundance distributions. *Environ. Microbiol.* 16: 1081-1085.

MacKinnon, D.J., K.L. Tanaka. 1989. The impacted martian crust: Structure, hydrology, and some geologic implications. *J. Geophys. Res.* 94:17359–17370.

Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap, D.P. Clark. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*. Editorial Pearson Benjamin-Cummings. Edición 13. San Francisco, Ca. 1061p.

Maugeri, T. L., V. Lentini, C. Gugliandolo, F. Italiano, S. Cousin, E. Stackebrandt. 2009. Bacterial and archaeal populations at two shallow hydrothermal vents off Panarea Island (Eolian Islands, Italy). *Extremophiles* 13:199–212.

Mason, B.1952. *Principles of geochemistry*. Editorial John Wiley y Sons. Primera edición. New York, N.Y. 276p.

McFall, C.C. 1968. Reconnaissance geology of the Concepcion bay area, Baja California, Mexico. *Geol. Soc.* 10: 1-25.

McKay, C.P., C.R. Stoker. 1989. The early environment and its evolution on Mars: Implications for life. *Rev. Geophys.* 27: 189–214.

Miura, T. 1997. Two new species of the genus *Ophryotrocha* (*Polychaeta phitimidae*) from Kagoshima Bay. *Bull. Mar. Sci.* 60: 300–305.

Monty, C. 1977. Evolving concepts on the nature and the ecological significance of stromatolites. *Fossil Algae*. Editorial Springer. Primera edición, New York, N.Y. 1110 p.

Morris, R.M., M.S. Rappe, S.A. Connon, K.L. Vergin, W.A. Siebold, C.A. Carlson, S.J. Giovannoni. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*. 420: 806–810.

Mouginis-Mark, P.J. 1985. Volcano ground ice interactions in Elysium Planitia, Mars. *Icarus*. 64: 265–284.

Mouginis-Mark, P.J. 1990. Recent water release in the Tharsis region of Mars. *Icarus*. 84: 362–373.

Munson, M.A., T.P. Ford, B. Chong, A.J. Weightman, W.G. Wade. 2002. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J. Dent. Res.* 81: 761–766.

Muyzer G., K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* 73 (1): 127-141.

Muyzer G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer, C. Wawer. 1999. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 2(3): 317-322.

Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer, C. Wawer. 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: Kowalchuk, G.A.; F.J. de Bruijn, I.M. Head, A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas (Ed.) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Editorial Kluwer academic publishers. Segunda edición. Dordrecht, the Netherlands. pp 40.

Nazina, T. N., T.P. Tourova, A.B. Poltarau, E.V. Novikova, A.A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A.M. Lysenko, V.V. Petrunyaka, G.A. Osipov. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 433–446.

Neethu M, Sherli V, R.N. 2014. Present and Future Prospect of Research on Hydrothermal Vents. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 27: 182–187.

Newsom, H.E. 1980. Hydrothermal alteration of impact melt sheets with implications for Mars. *Icarus*. 44: 207–216.

Nicholson, W.L., N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh, P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 548–572.

Nübel, U., F. Garcia-Pichel, G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 8: 3327–3332.

Oremland, R.S., D.G. Capone, J.F. Stolz, J. Fuhrman. 2005. Whither or wither geomicrobiology in the era of community metagenomics. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 572–578.

Ossaka, J., J. Hirabayashi, K. Nogami, M. Kurosaki, J. Hashimoto. 1992. Variation chemical composition of volcanic gases from northern part of Kagoshima Bay. *Deep. Sea. Res.* 8:75–80.

Palop, A., F.J. Sala, S. Condón. 1999. Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures. *Appl. Env. Microbiol.* 65(3): 1316–1319.

Peryt, T.M. 1981. Phanerozoic oncoids an overview. *Facies.* 4: 197–214.

Peryt, T.M. 1983. *Oncoids: a comment to recent developments. Coated grains.* Editorial Springer. Primera edición. New York. 275p.

Petri, R., J. F. Imhoff. 2000. The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of narH gene sequences and comparison of narH and 16S rDNA based phylogeny." *Syst. Appl. Microbiol.* 23(1): 47-57.

Pichler, T., G. Dix. 1996. Hydrothermal venting within a coral reef ecosystem, Ambitle island, Papua New Guinea. *Econ. Geol.* 24, 435–438.

Playford, P.E, A.E. Cockbain. 1976. Modern algal stromatolites at Hamelin Pool, a hypersaline barred basin in Shark Bay, Western Australia. En: Walter M.R (ed). Editorial Elsevier. *Stromatolites.* Primera edición. Amsterdam. pp 389–411.

Prakash, Om, S. Yogesh, J. Kamlesh, J. E. Kostka. 2013. Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. 97: 51–62.

Prol-Ledesma, R.M., C. Canet, J.C. Melgarejo, G. Tolson, M.A. Rubio-Ramos, J.C Cruz- Ocampo, A. Ortega-Osorio, M.A. Torres-Vera, A. Reyes. 2002. Cinnabar deposition in submarine coastal hydrothermal vents, Pacific Margin of Central Mexico. *Econ. Geol.* 97:1-10.

Prol-Ledesma, R. M., C. Canet, M. A. Torres-Vera, M. J. Forrest, M. A. Armienta. 2004. Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *J. Volc. Geot. Research*. 137: 311-328.

Rappé, M.S., S.J. Giovannoni. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.

Rauchfuss, H. 2008. *Chemical evolution and the origin of life*. Editorial Springer, Primera edición. Berlín, Alemania. 339 pp.

Reid A, Buckley M. Washington. 2011. *The Rare Biosphere: A report from the American Academy of Microbiology*.

Riding, R. 1977. The nature of Stromatolites: 3,500 million years of history and a century of research. *Microb. Ecol.* 2: 79-105.

Riding, R. 1983. Cyanoliths (cyanoids): oncoids formed by calcified cyanophytes. En Peryt T.M. (ed) *Coated grains*. Editoria Springer, Primera edición. New York, N.W. pp276–283.

Riesenfeld, C. S., P.D. Schloss, J. Handelsman. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Ann. Rev. Gen.* 38: 525–552.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury B., Herdman M., Stanier R. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61.

Roberts, J.A. 2004. Inhibition and enhancement of microbial surface colonization: the role of silicate composition. *Chem. Geol.* 212: 313–327.

Rubio-Ramos, M.A., R.M Prol-Ledesma. 2000. Estudio preliminar petrográfico y de inclusiones fluidas en ventilas hidrotermales, Punta Mita, México. *Unión Geofis. Mex. GEOS* 20: 250-251.

Ruger, H. J., D. Fritze, C. Sproer, C. 2000. New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1305–1313.

Sarano, F., R. C. Murphy, B. F. Houghton, J. W. Hedenquist. 1989. Preliminary observations of submarine geothermal activity in the vicinity of White Island Volcano, Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *J.Roy Soc. New. Zeal.* 19: 449-459.

Saitou, N., M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

- Schloss, P.D., R.A. Girard, T. Martin, J. Edwards, J.C. Thrash. 2016. Status of the archaeal and Bacterial Census : an update. 7: 1–10.
- Sedwick, P., D. Stuben. 1996. Chemistry of shallow submarine warm springs in an arc-volcanic setting: Vulcano island, aeolian Archipelago. Italy. Mar. Chem. 53: 47–161.
- Sievert, S.M., J. A. N. Kuever. 2000. Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island. 66: 3102–3109.
- Simon C., R. Daniel. 2011. Metagenomic analyses: past and future trends. Appl. Environ. Microbiol. 77: 1153–1161.
- Schulze-Makuch, D., J.M. Dohm, C. Fan, A.G. Fairén, J.A.P. Rodriguez, V.R. Baker. 2007. Exploration of hydrothermal targets on Mars. Icarus 189: 308–324.
- Skirnisdottir, S., G.O. Hreggvidsson, S. Hjo, J.K. Kristjansson. 2000. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2835–2841.
- Slepecky, R., J. W. Foster. 1959. Alterations in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect of some spore properties. J. Bacteriol. 78:117–123.
- Sogin, +M. L., H. Morrison, J.A. Huber, D.M Welch, S.M Huse, P.R. Neal. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the under explored “rare biosphere”. Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A. 103: 12115–12120.
- Squyres, S.W., D.E. Wilhelms, A.C. Moosman. 1987. Large-scale volcano ground ice interactions on Mars. Icarus. 70: 385–408.
- Staley, J.T., Konopka A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. 39: 321–346.
- Stein, J.L. 1984. Subtidal gastropods consume sulfur-oxidizing bacteria: evidence from coastal hydrothermal vents. Science 223: 696-698.
- Stuben, D., P. Sedwick, P. Colantoni. 1996. Geochemistry of submarine warm springs in the limestone cavern of Grotta Azzurra, Capo Palinuro, Italy: evidence for mixing-zone dolomitisation. Chem. Geol. 131: 113–125.
- Takeda, M., H. Takeuchi, H. Suganuma. 1993. Occurrence of *Xenograpsus novaeinsularis* Takeda Kubata (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in the Tokara and Iwo Islands. Nat. Environ. Sci. Res. 6: 59–64.

- Takeda, M., Y. Kubata. 1977. Crabs of the Ogasawara Islands: IV. A collection made the new volcanic island, Nishinoshinashinto, in 1975. *Bull. Natl. Sci. Mus.* 3: 91–111.
- Tanaka, K.L., J.M. Dohm, J.H. Lias, T.M. Hare. 1998. Erosional valleys in the Thaumasia region of Mars: Hydrothermal and seismic origins. *J. Geophys. Res.* 103: 31407–31419.
- Tang, K., K. Liu, N. Jiao, Y. Zhang, C.A. Chen. 2013. Functional metagenomic investigations of microbial communities in a shallow sea hydrothermal system. *Plos One.* 8: 1–11.
- Taran, Y.A., S. Inguaggiato, M. Marin, L.M. Yurova. 2002. Geochemistry of fluids from submarine hot springs at Punta de Mita, Nayarit, Mexico. *J. Volcanol. Geoth. Res.* 115: 329-338.
- Tarasenko, N.Y, L.P. Shabalina LP, V.S. Spiridonova. 1976. Comparative toxicity of metal stearates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 37(3):179-92.
- Tarasenko, N.Y, O. A. Pronin, A. A. Silyev. 1977. Barium compounds as industrial poisons (an experimental study). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 21:361-373.
- Tarasov, V.G., A.V. Gebruk, A.N. Mironov, L.I. Moskalev. 2005. Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: two different phenomena?. *Chem. Geol.* 224: 5–39.
- Tekin, E., K. Kayabali, T. Ayyidiz, O. Ileri. 2000. Evidence of microbiologic activity in modern travertines: Sicakcermik geothermal field, central Turkey. *Carbonates and Evaporites.* 15: 18–27.
- Tilden J. 1968. The mixophyceae of North America and adjacent regions. Editorial Wheldon y Wesley. Primera edición. New York, N.Y. 328p.
- Thiermann, F., R. Windoffer, O. Giere. 1994. Selected meiofauna around shallow water hydrothermal vents off Milos (Greece): ecological and structural aspects. *Vie. Milieu.* 44: 215–226.
- Turner, S., K.M. Pryer, V.P.W. Mia, J.D. Palmer. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Euk. Microbiol.* 46: 327–338.
- Vidal, V.M.V., F.V. Vidal, J.D. Isaacs, D.R. Young. 1978. Coastal submarine hydrothermal activity off Northern Baja California. *J. Geophys. Res.* 83: 1757-1774.
- Wang Y., S. Wang, X. Pingping. 2014. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae. *Rev. Environ. Sci. and Biotech.* 14: 427-451.

Whitman W.B., D.C. Coleman, W.J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6578–6583.

Wilson, L., J.W. Head. 1997. Mars geothermal and volcanic evolution: Volcanic intrusions as heat sources to maintain viable ecosystems? *Phys. Chem. Env.* 96: 85–87.

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

Wright V.P. 1982. Morphogenesis of Oncoids in the Lower Carboniferous Llanelly Formation of South Wales. Coated grains. En Peryt T.M. (ed) Editorial Springer. Primera edición. New York. 275p. pp 424-434.

Zeigler R. 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiol.* 160: 1–11.

Zengler, K. 2009. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73: 712–729.

Zhang, P., P. Setlow, Y. Li. 2009. Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy. *Op. Ex.* 17: 16480-16491.

Zhang, Y., Z. Zhao, C.A. Chen, K. Tang, J. Su, N. Jiao. 2012. Sulfur metabolizing microbes dominate microbial communities in Andesite-Hosted shallow-sea hydrothermal systems. *Plos One.* 7(9): 445-453.

Zhou X., S.J. Bent, M.G. Schneider, C.C. Davis, M.R. Islam L.J. Forney. 2004. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiol.* 150: 2565–2573.

Zobell C. 1941. Studies on marine bacteria. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J. Mar. Res.* 4:42–75.