



“

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

TÍTULO

**APROXIMACIÓN METAGENÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS PROVENIENTES DE LA ZONA
GEOTÉRMICA “LOS HUMEROS”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Alimentos

Presenta:

Paola Carolina Mora González

Asesores:

Rosamaria Oliart Ros

Rodolfo Quintana Castro

Ma. Guadalupe Sánchez Otero

H. VERACRUZ, VER.

Diciembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi hermano **René Zarate Santos**

A mis padres GRACIAS

Por su apoyo este trabajo es para y por ustedes.

A amigos

De manera especial a:

A mis compañeros y amigos de laboratorio a quienes adoro con todo el corazón

AGRADECIMIENTOS

De manera especial a:

Carlos Chimalpopoca López, Muchas gracias agradezco el haber creído en mí, en esta locura de seguir, varios años de camino todavía me queda que decir y el deseo de pedir que aquellos que no estén a mi lado les digan que sigo peleando que hay heridas y que he muerto un par de veces en el pasado y sin saber si mañana estaremos en el camino y de aquel lado, mientras podamos seguir parados, y si la muerte no me ha tocado seguiremos volando más alto daremos hasta que el tiempo se haya terminado y si el telón no se ha cerrado daremos de qué hablar.

RECONOCIMIENTOS

A CONACYT:

Por el apoyo financiero para el presente trabajo

A mis asesores:

Al comité revisor

RESUMEN

Mora González Paola Carolina, M.C., Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz. “Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas provenientes de la zona geotérmica “Los Humeros”. Asesores Dra. Rosa María Oliart Ros, Rodolfo Quintana-Castro, Ma. Guadalupe Sánchez-Otero.

El interés en el estudio de la diversidad de comunidades microbianas presentes en los ecosistemas ha cobrado auge en los últimos años. Debido a las limitaciones asociadas a la determinación de la diversidad de comunidades microbiana por su heterogeneidad, se han implementado técnicas independientes de cultivo como el uso de la metagenómica ya que permite analizar la estructura y función de un gran número de genes presentes en un ambiente determinado, sin necesidad de aislar y/o cultivar los microorganismos. En los últimos años, la metagenómica se ha convertido en una de las herramientas más sofisticadas para la identificación de nuevos genes, vías metabólicas y metabolitos secundarios a través de la construcción y escrutinio de bibliotecas metagenómicas, resultando útil para la identificación de la composición filogenética y funcional de comunidades microbianas en diversos ecosistemas mediante la secuenciación directa y análisis del DNA ambiental.

El objetivo del presente trabajo fue describir la diversidad bacteriana y determinar la presencia de enzimas lipolíticas en la zona geotérmica “Los Humeros” para lo cual el proyecto se dividió en dos etapas: la primera mediante técnicas dependientes de cultivo y la segunda, independientes de cultivo. Se aislaron un total de 29 cepas del sustrato de una alberca de condensación, de las cuales 10 mostraron actividad lipolítica, pertenecientes a la especie *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus licheniformis*. Las enzimas lipolíticas producidas por seis cepas (intracelular y extracelular) tuvieron un PM entre 26 y 27 kDa, y mostraron propiedades biotecnológicamente atractivas, como actividad en un rango amplio de temperatura, termoestabilidad y resistencia al pH, y a la presencia de detergentes y solventes orgánicos. A partir de la secuenciación masiva del DNA de la muestra enriquecida se identificaron un total de 9 phyla, siendo los predominantes Firmicutes y

Proteobacteria. De los 51,262 ORFs, 920 genes corresponden a enzimas hidrolíticas pertenecientes a 35 familias, de las cuales 31 son Fosfolipasas, 26 Carboxilesterasas, y 18 Lipasas. 152 secuencias no fueron asignadas a ninguna actividad lipolítica específica. El enriquecimiento en medio de cultivo con aceite favoreció la presencia de los phyla Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria, así como la dominancia de géneros productores de enzimas lipolíticas como *Geobacillus* y *Bacillus*. En el caso de las muestras de DNAm analizadas por 16s RNAr se encontró un total de 17 phyla (15 cm, 80 °C) y 18 phyla (50 cm, 90 °C), siendo nuevamente el phylum predominante Firmicutes, seguido de los phyla Chloroflexi, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria. La abundancia relativa de los taxones se vio afectada por la profundidad y la temperatura, siendo los hipertermófilos de los grupos más abundantes en las muestras de suelo a 50 cm de profundidad.

A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que a nivel phylum la diversidad presente en la zona geotérmica “Los Humeros” es consistente con lo reportado en otros puntos del Cinturón Volcánico Transmexicano (Michoacán y Chiapas). Los phyla Firmicutes, Chloroflexi, Proteobacteria y Actinobacteria son los más abundantes. La abundancia relativa en general a todos los niveles taxonómicos se vio afectada por la temperatura, siendo los hipertermófilos de los grupos más abundantes en la muestra a 90°C (50 cm), así como el hallazgo de secuencias sin identificar sugiere una riqueza enzimática y filogenética de la zona geotérmica “Los Humeros”. Este gran número de fragmentos no clasificados podrían ser un indicio de la presencia de nuevos organismos con potencial biotecnológico en esta zona.

ABSTRACT

Mora González Paola Carolina, M.C., Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz. Study of the biocatalytic activity of two recombinant lipases of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11. Advisors: Dra. Rosa María Oliart Ros, Rodolfo Quintana-Castro, Ma. Guadalupe Sánchez-Otero.

The interest in the study of the diversity of microbial communities present in ecosystems has boomed in recent years. Due to the limitations associated with determining the diversity of microbial communities by their heterogeneity, independent culture techniques such as the use of metagenomics have been implemented as it allows to analyze the structure and function of a large number of genes present in a given environment, without the need to isolate and/or cultivate microorganisms. In recent years, metagenomics has become one of the most sophisticated tools for the identification of new genes, metabolic pathways and secondary metabolites through the construction and scrutiny of metagenomic libraries, being useful for the identification of the phylogenetic and functional composition of microbial communities in various ecosystems through direct sequencing and analysis of environmental DNA.

The aim of this work was to describe the bacterial diversity and determine the presence of lipolytic enzymes in the geothermal zone "Los Humeros" for which the project was divided into two stages: the first using culture-dependent techniques and the second, independent of cultivation. A total of 29 strains of the substrate of a condensation pool were isolated, of which 10 showed lipolytic activity, belonging to the species *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus licheniformis*. The lipolytic enzymes produced by six strains (intracellular and extracellular) had a PM between 26 and 27 kDa, and showed biotechnologically attractive properties, such as activity over a wide range of temperature, thermostability and resistance to pH, and to presence of detergents and organic solvents. From the massive sequencing of the DNA of the enriched sample a total of 9 phyla were identified, the predominant being Firmicutes and Proteobacteria. Of the

51,262 ORFs, 920 genes correspond to hydrolytic enzymes belonging to 23 families, of which 31 are Phospholipases, 26 Carboxyesterases, and 18 Lipases. 152 sequences were not assigned to any specific lipolytic activity. Enrichment in the culture medium with oil favored the presence of the Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria phyla, as well as the dominance of genera producing lipolytic enzymes such as *Geobacillus* and *Bacillus*. In the case of DNAm samples analyzed by 16S rRNA a total of 17 phyla (15 cm, 80 °C) and 18 phyla (50 cm, 90 °C) was found again, again the predominant phylum Firmicutes, followed by the phyla Chloroflexi, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria. The relative abundance of taxa was affected by depth and temperature, with hyperthermophiles being of the most abundant groups in soil samples at 50 cm depth.

From the results obtained we concluded that at the phylum level the diversity present in the geothermal zone "Los Humeros" is consistent with what was reported in other points of the Transmexican Volcanic Belt (Michoacán and Chiapas). The Firmicutes, Chloroflexi, Proteobacteria and Actinobacteria phyla are the most abundant. The abundance relative in general to all taxonomic levels was affected by temperature, with the hyperthermophiles of the most abundant groups in the sample at 90 °C (50 cm), as well as the finding of unidentified sequences suggests an enzymatic richness and phylogenetics of the geothermal zone "Los Humeros". This large number of unclassified fragments could be an indication of the presence of new organisms with biotechnological potential in this area.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	
1.1 Metagenómica.....	3
1.1.1 DNA meagenómico.....	13
1.2 Ambientes extremos y extremófilos.....	16
1.2.1 Termófilos.....	19
1.3 Parametros determinantes en ambientes extremos.....	22
1.3.1 Ácidez y alcalinidad.....	22
1.3.2 Salinidad.....	23
1.3.3 Temperatura.....	23
1.4 Metagenómica en ambientes extremos.....	24
1.5 Zonas geotérmicas.....	27
1.5.1 Diversidad a partir de estudios metagenomicos en zonas geotérmicas.....	29
1.5.2 “Los Humeros”	32
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 Lugar de muestreo.....	36
3.2 Obtencion de muestras.....	37
3.3 Etapa dependiente de cultivo.....	38
3.3.1 Medios de cultivo y crecimiento.....	38
3.3.2 Obtencion de cultivos puros.....	40
3.3.3 Pruebas de activida lipolítica.....	41
3.3.3.1 Obtención del extracto crudo para pruebas de actividad lipolítica.....	41
3.3.3.2 Ensayo con Muf-Butirato.....	41
3.3.3.3 Medios de cutivo para actividad lipolítica.....	42

3.3.4 Identificación taxonómica.....	43
3.3.4.1 Obtención de DNA de colonias.....	43
3.3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	43
3.3.4.3 Condiciones de PCR para el gen del 16S RNAr de las cepas aisladas.....	43
3.3.4.4 Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa	44
3.3.4.5 Purificación de los productos de PCR.....	44
3.3.4.6 Secuenciación y análisis de los productos de PCR.....	45
3.3.4.7 Elaboración de árboles filogenéticos.....	45
3.3.5 Determinación del número de enzimas lipolíticas.....	45
3.3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	46
3.3.5.2 Zimograma.....	46
3.3.6 Caracterización.....	47
3.3.6.1 Obtención de los extractos enzimáticos para caracterización.....	47
3.3.6.2 Determinación de la actividad enzimática.....	48
3.3.6.3 Cuantificación de proteínas.....	48
3.3.6.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las enzimas	49
3.3.6.5 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las enzimas.....	49
3.3.6.6 Efecto de la presencia de iones metálicos sobre la actividad enzimática	49
3.3.6.7 Efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la actividad enzimática.....	50
3.3.6.8 Estabilidad en presencia de solventes orgánicos.....	50
3.3.6.9 Determinación de la preferencia de longitud de cadena del sustrato.....	50
3.3.6.10 Obtención de DNA de la muestra enriquecida.....	50
3.4 Etapa independiente de cultivo.....	51
3.4.1 Obtención de DNA metagenómico.....	51
3.4.2 Secuenciación y análisis de DNA metagenómico y enriquecido.....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1 Lugar de muestreo y toma de muestra.....	53
4.2 Etapa dependiente de cultivo.....	56

4.2.1 Aislamiento de bacterias.....	56
4.2.1.1 Morfología colonial.....	57
4.2.1.2 Pruebas preliminares de actividad lipolítica.....	63
4.2.2 Identificación taxonómica.....	64
4.2.3 Determinación de enzimas lipolíticas mediante zimogramas.....	66
4.2.4 Caracterización.....	68
4.2.4.1 Obtención de los extractos enzimáticos.....	68
4.2.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas.....	68
4.2.4.3 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las enzimas.....	72
4.2.4.4 Efecto de la presencia de iones metálicos sobre la actividad enzimática...	75
4.2.4.5 Efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la actividad enzimática.....	77
4.2.4.6 Estabilidad en presencia de solventes orgánicos.....	79
4.2.4.7 Determinación de la preferencia de longitud de cadena del sustrato.....	81
4.2.5 Diversidad microbiana en el cultivo enriquecido.....	83
4.3 Etapa independiente de cultivo	92
4.3.1 Diversidad microbiana de muestras de suelo a 15 y 50 cm de profundidad.	92
CONCLUSIONES	104
RECOMENDACIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	106
APÉNDICES	134

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1.1	Gráfico de distribución de estudios reportados de muestras de suelo y aguas termales.....	6
FIGURA 1.2	Diagrama de flujo esquemático de los enfoques de análisis de una muestra para datos metagenómicos.....	7
FIGURA 1.3	Diagrama de flujo esquemático de los pasos para la obtención de DNA metagenómico.....	13
FIGURA 1.4	Ubicación de la zona geotérmica “Los Humeros” en el marco del cinturón trans-mexicano volcánico.....	33
FIGURA 3.1	Diagrama de flujo de las etapas del proyecto.....	35
FIGURA 3.2	Ubicación de la zona geotérmica "Los Humeros"	36
FIGURA 3.3	Fotografías del punto de muestreo en la zona geotérmica “Los Humeros”	37
FIGURA 3.4	Ciclos de temperatura y tiempos para la PCR del gen 16S RNAr	44
FIGURA 4.1	Ubicación de las tres áreas con manifestaciones térmicas de la zona geotérmica “Los Humeros”	54
54FIGURA 4.2	Color de las muestras de suelo a diferentes profundidades.....	55
FIGURA 4.3	Biopelículas observadas en medio LBN sólido inoculado con suelo.....	57
FIGURA 4.4	Estructuras coloniales más representativas de las cepas aisladas en medio LBN.	58
FIGURA 4.5	Bordes de colonia más representativos de las cepas.....	58
FIGURA 4.6	Ejemplo de la Morfología microscópica G (+) y G (-).	59
FIGURA 4.7	Placas de medio con tributirina y rodamina B con presencia de halos de hidrólisis y fluorescencia, respectivamente.....	63
FIGURA 4.8	Árbol que muestra las relaciones filogenéticas entre las cepas con actividad lipolítica.....	66
FIGURA 4.9	Zimogramas cepa <i>B. licheniformis</i> KMV 837 y <i>B. licheniformis</i> KMV 832	67

FIGURA 4.10	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.	70
FIGURA 4.11	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática.....	71
FIGURA 4.12	Efecto de pH sobre la actividad enzimática.....	73
FIGURA 4.13	Efecto de pH sobre la estabilidad enzimática.....	74
FIGURA 4.14	Efecto de la presencia de iones metálicos sobre la estabilidad enzimática.....	76
FIGURA 4.15	Efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la estabilidad enzimática.....	78
FIGURA 4.16	Estabilidad en presencia de solventes orgánicos sobre la estabilidad enzimática.....	80
FIGURA 4.17	Preferencia de longitud de cadena.....	82
FIGURA 4.18	Phyla predominantes en la muestra enriquecida (ES).....	84
FIGURA 4.19	Géneros predominantes en la muestra enriquecida (ES).....	86
FIGURA 4.20	Phyla dominantes en la muestra enriquecida (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.....	88
FIGURA 4.21	Géneros dominantes en la muestra enriquecida (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.....	88
FIGURA 4.22	Géneros dominantes de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas observados en la muestra (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.....	89
FIGURA 4.23	Familias de enzimas hidrolíticas en la muestra (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.....	90
FIGURA 4.24	Phyla predominantes (≥ 0.1 %) de las muestras P-15 y P-50.....	94
FIGURA 4.25	Comparativa de la abundancia a nivel género de las muestras de suelo P-15 y P-50.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1.1 Herramientas de análisis de datos metagenómicos más utilizadas.....	12
TABLA 1.2 Ejemplos de fuentes de DNA metagenómico.....	15
TABLA 1.3 Ejemplos de termoenzimas obtenidas por metagenómica	21
TABLA 3.1 Formulación de medio LB.....	38
TABLA 3.2 Formulación de medio Schmidt-Dannert modificado.....	39
TABLA 3.3 Formulación de medio LBN.....	40
TABLA 3.4 Formulación del medio con tributirina para determinar actividad lipolítica.....	42
TABLA 3.5 Formulación del medio con Rodamina B para determinar actividad lipolítica.....	42
TABLA 4.1 Composición de las muestras de suelo P-15 y P-50.....	55
TABLA 4.2 Morfología colonial de las cepas aisladas de la planta geotérmica “Los Humeros”.....	60
TABLA 4.3 Morfología microscópica de las cepas aisladas de la planta geotérmica “Los Humeros”.....	62
TABLA 4.4 Cepas positivas a actividad lipolítica.....	64
TABLA 4.5 Porcentajes de identidad y cepas utilizadas para la identificación por secuenciación del gen 16S RNAr de las cepas aisladas con actividad lipolítica.....	65
TABLA 4.6 Indices de diversidad.....	93

INTRODUCCIÓN

El interés en el estudio de la diversidad de comunidades microbianas presentes en los ecosistemas ha cobrado auge en los últimos años. De acuerdo con Amann y col. (1995), solo una mínima parte de los microorganismos provenientes de un ambiente determinado pueden ser cultivados (0.001-0.1 % de agua de mar, 0.25 % de agua de lagos y sedimentos, y entre 0.3 y 5 % de suelo), estimándose que el porcentaje total cultivable de la diversidad microbiana es entre 0.1 % y 10 % (Torsvik y Ovreas., 2002). La inmensa diversidad genética y fenotípica microbiana hace de estas comunidades uno de los objetos más complejos de analizar (Ovreas *et al.*, 1998). Se ha sugerido que al menos 99% de las bacterias observadas bajo un microscopio no pueden ser cultivadas mediante técnicas comunes de laboratorio (Crocchi *et al.*, 2007).

Existen numerosas limitaciones asociadas a la determinación de la diversidad de comunidades microbianas, las cuales surgen no solo de la complejidad de sus metabolismos y mecanismos adaptativos, sino también de la heterogeneidad de la comunidad, así como de su distribución espacial dentro de la misma (Trevors, 1998). Se ha establecido que las comunidades microbianas pueden tener diferentes niveles de organización, y que éstas están relacionadas con la composición de la muestra (Franklin y Mills, 2003). A nivel comunidad microbiana, las interacciones intra e inter específicas resultan de carácter complejo, dependiendo éstas de la presencia, función e interacción de toda la variedad de microorganismos, por lo tanto, los cambios en las poblaciones pueden servir como indicador de la funcionalidad de los ecosistemas (Rinke *et al.*, 2013).

Los métodos que permiten el acceso a la información genómica y metabólica de los microorganismos que habitan determinados ecosistemas se dividen en dos categorías conocidas como: métodos dependientes de cultivo y métodos independientes de cultivo (Torsvik y Ovreas, 2007). Tradicionalmente, la diversidad se ha evaluado mediante el aislamiento y siembra en placa, así como los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC). Estos métodos son rápidos y de bajo costo, y proporcionan información sobre las

características enzimáticas (producción de lipasas, amilasas, proteasas, xilanas, quitinasas, entre otros) y metabólicas (capacidad fermentativa, por ejemplo), así como ciertas capacidades de la población (asimilación de carbohidratos, lípidos, queroseno, entre otros). Las limitantes incluyen: 1) la dificultad para aislar las bacterias o esporas de las partículas del suelo o biopelículas, ya que un organismo puede ser viable en la muestra, pero no cultivable debido a los requerimientos específicos, lo cual conlleva a la selección de un medio de crecimiento adecuado que reduzca el sesgo de la diversidad (Tabacchioni *et al.*, 2000), 2) el potencial de inhibición de colonias o de difusión de colonias (Trevors, 1998), 3) las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, luz), y 4) la incapacidad de cultivar un gran número de microorganismos, ya que el crecimiento en placa favorece a los microorganismos con tasas de crecimiento rápidas y a aquellos que producen un gran número de esporas (Dix y Webster, 1995).

Debido a las limitaciones inherentes a los métodos dependientes de cultivo, se han desarrollado e implementado las técnicas independientes de cultivo (Oulas *et al.*, 2015). Estas técnicas se basan en el análisis de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFA y/o FAME), ácidos nucleicos (metagenómica), proteínas (metaproteómica) (Torsvik y Ovreas, 2002; Keller y Hettich, 2009) y en la utilización de técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia. Los avances de la biología molecular en los últimos años han hecho posible el desarrollo de técnicas que no requieren el aislamiento y cultivo microbiano para la obtención del DNA, estos métodos se basan en la extracción de éste a partir de una muestra ambiental y el análisis funcional y/o filogenético de secuencias específicas mediante técnicas de PCR, hibridación, DNA recombinante o secuenciación masiva (Ansorge, 2016), las cuales han abierto una nueva posibilidad de análisis denominada metagenómica.

En México existen pocos estudios que exploran la diversidad bacteriana en ambientes con condiciones extremas como las zonas geotérmicas, estas áreas están desapareciendo debido a su explotación en la producción de energía y el uso del suelo con fines recreativos. Este tipo de ambientes son habitados por microorganismos extremófilos que son fuente de nuevas enzimas y metabolitos con potencial biotecnológico. Este trabajo es el primero en investigar la diversidad microbiana dentro del campo geotérmico “Los Humeros”

ANTECEDENTES

1.1 Metagenómica

La metagenómica hace referencia al estudio y análisis de la información genética obtenida a partir de comunidades microbianas provenientes de muestras de un hábitat o ambiente definido, como suelo, composta, agua de mar, yacimientos termales, sedimentos, entre otros (Thomas *et al.*, 2012). Meta viene del griego ‘más allá de’ entendiéndolo como ir más allá del genoma, ya que permite analizar la estructura y función en conjunto de un gran número de genes presentes en un ambiente determinado, sin necesidad de aislar y/o cultivar los microorganismos (Gilbert *et al.*, 2014).

En el 2015 Marchesi y Rave propusieron el uso del término Metataxonómica, para referirse al uso específico de amplicones obtenidos a partir de regiones altamente conservadas (el gen 16S RNAr para Bacterias, 18S RNAr para Eucariotas y regiones ribosomales ITS para hongos), para los análisis de diversidad, la clasificación de lecturas y la construcción de perfiles taxonómicos de un microbioma, debido a la gran cantidad de bases de datos disponibles para este tipo de regiones en específico. A pesar de que diferentes autores han comenzado a utilizar el término Metataxonómica (Aguiar- Pulido *et al.*, 2016, Breitwieser *et al.*, 2017, Marić y Šikić., 2019) otros como Gardner y colaboradores (2019) siguen empleando el término Metagenómica, para referirse a dos enfoques en los análisis metagenómicos, basados en las secuencias de DNA obtenidas ya sea por medio de amplicones (secuencia altamente conservada) y todo el genoma (metagenoma), es por eso que aún existe ambigüedad en el uso de éste.

Aunque con los años se han empleado diferentes términos para hacer referencia al estudio de las comunidades microbianas y su funcionalidad, el término “Metagenómica” ha sido avalado por la revista científica *Environmental Microbiology*, cuya definición excluye el uso de PCR para amplificar genes (Holmes *et al.*, 2003) y la utilización de cebadores al azar para identificar genes de interés (Brzostowicz *et al.*, 2003).

Handelsman (2007) define la metagenómica como una nueva aproximación la cual permite entender, descubrir y modelar las relaciones dinámicas de las comunidades microbianas, es decir, se enfoca en el análisis de los genes de una comunidad total y cómo estos podrían influenciar algunas actividades metabólicas o funciones colectivas del ecosistema. Pace y col. (1985) sugirieron de manera inicial el concepto de clonar DNA directamente del ambiente, el cual fue posteriormente implementado por Schmidt y col. (1991), quienes construyeron bibliotecas ambientales del gen 16S RNAr a partir de una muestra de plancton marino utilizando como vector de clonación el fago lambda. En 1995, Healy y col. lograron aislar un gen codificador de una enzima celulolítica a partir de una biblioteca metagenómica proveniente de un digestor anaeróbico. La primera biblioteca ambiental a partir de aguas marinas fue obtenida en 1996, con lo cual se logró analizar aspectos de la organización genómica y de la composición de Archaeas marinas consideradas no cultivables (Stein *et al.*, 1996).

El potencial de esta técnica se reconoció en el año 2000 cuando fue identificada a partir de una biblioteca metagenómica marina, un homólogo bacteriano de las rodopsinas, que se creían exclusivas de las Archaeas (Beja *et al.*, 2000) y con el descubrimiento de enzimas con actividades hemolíticas, lipolíticas y amilolíticas en bibliotecas metagenómicas de muestras de suelo (Rondón *et al.*, 2000; Montaña-Lara, 2015). Venter y col. en el 2004, llevaron a cabo el primer proyecto de metagenómica denominado: Global Ocean Sampling Expedition, en el cual, a partir de la exploración genómica de muestras oceánicas, evaluaron la diversidad génica de las comunidades marinas para entender su papel en los diversos procesos metabólicos. A partir de muestras del mar de los Sargazos, obtuvieron DNA de aproximadamente 2000 especies diferentes, incluyendo 148 tipos de bacterias nunca antes identificadas. Venter ha encabezado varias expediciones: desde la costa oeste de los Estados Unidos (2007-2008), en el año 2009-2010 exploró el mar Báltico, el mar Mediterráneo y el mar Negro. En el 2014, Gilbert y col. llevaron a cabo el estudio denominado: The Earth Microbiome Project, que estudio las interacciones entre los microorganismos y sus ambientes, cuyo objetivo principal fue generar una base de datos global que permitiese catalogar todas las muestras y datos asociados de cada uno de los lugares de estudio para posteriormente secuenciar y consolidar la diversidad microbiana y por ende a la diversidad a nivel de genes y de proteínas en el planeta.

Diversos tipos de ecosistemas han sido estudiados haciendo uso de la metagenómica, incluyendo ambientes extremos, tales como áreas con actividad volcánica (Urich *et al.*, 2014) u otras zonas de temperaturas extremas (Pearce *et al.*, 2012), ambientes altamente ácidos o alcalinos (García-Moyano *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2012), de bajas concentraciones de oxígeno (Ganesh *et al.*, 2014) y alta concentración de metales pesados (Chodak *et al.*, 2014).

En los últimos años, la metagenómica se ha convertido en una de las herramientas más sofisticadas para la identificación de nuevos genes, vías metabólicas y metabolitos secundarios a través de la construcción y escrutinio de bibliotecas metagenómicas, resultando útil para la identificación de la composición filogenética y funcional de comunidades microbianas en diversos ecosistemas (Niu *et al.*, 2017), mediante la secuenciación directa y análisis del DNA ambiental, complementándose con el uso de tecnologías de secuenciación masiva tales como pirosecuenciación (lecturas hasta 700 pb), Illumina Hi-seq (lecturas de 50 a 300 pb), secuenciación Ion Torrent (hasta 400 pb) y AB SOLiD (50 pb a 75 bp), lo cual ha permitido el aumento de proyectos basados en el análisis o aproximación metagenómica, incluidos en bases de datos como GOLD (Genomes OnLine Database) (Ansorge, 2016) . Para octubre del 2019, esta base de datos cuenta con 1,884 proyectos metagenómicos, aproximadamente 66,823 estudios de análisis de genomas a partir de metagenoma, así mismo cuenta con un total de 83,749 estudios de muestras biológicas, de los cuales el 54 % corresponden a muestras ambientales, y de estas el 8.6 % a estudios provenientes de muestras de suelo y solo el 2.5 % corresponden a fuentes de aguas termales (<http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>) (Figura 1.1)

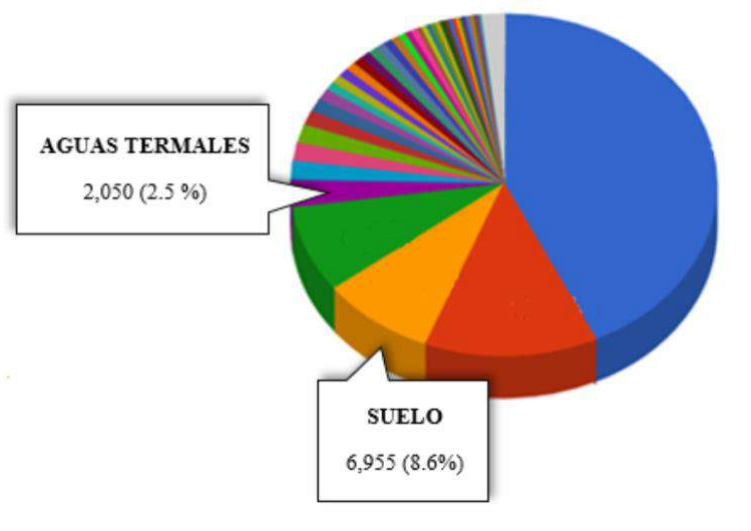


FIGURA 1.1. Gráfico de distribución de estudios reportados de muestras de suelo y aguas termales, proveniente de la base de datos <http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>.

En campos de investigación como el ambiental, especialmente en biorremediación, la metagenómica ha permitido evaluar el efecto de los contaminantes en diversos ecosistemas, al estudiar la estructura de las comunidades microbianas que le hacen frente a este tipo de compuestos contaminantes (Li *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2012). Otras aplicaciones de los análisis metagenómicos incluyen la agricultura, identificación de patógenos, análisis de microbiota intestinal y biocombustibles (Marić y Šikić., 2019). De igual forma, ha permitido el descubrimiento de nuevos genes que codifican para enzimas, metabolitos y productos naturales antes no descritos y que son producidos por microorganismos no cultivables (Niu *et al.*, 2017), teniendo como principales objetivos la identificación taxonómica de especies u otras entidades filogenéticas y el análisis funcional de la muestra ambiental. A manera general, el procedimiento de análisis para datos metagenómicos se muestra en la Figura 1.2.

FIGURA 1.2. Diagrama de flujo esquemático de los enfoques de análisis de una muestra para datos metagenómicos.

La secuenciación de metagenomas permite analizar genes funcionales claves e identificar y caracterizar funciones relevantes en los ecosistemas mediante la correcta asignación de COGs (Cluster Ontology Genes) y vías metabólicas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG). Por otra parte, esta información permite realizar la búsqueda de dominios de proteínas importantes (ORF'S) y asignarlos a grupos microbianos relevantes en los ecosistemas (Buchfink *et al.*, 2015).

El análisis de las secuencias de DNA obtenidas mediante las técnicas de secuenciación masiva, como pirosecuenciación, Illumina o Ion Torrent, ha permitido caracterizar con mayor profundidad y exactitud comunidades microbianas en diversos ecosistemas sin la necesidad de clonar el DNA en un vector, además de promover el desarrollo de algoritmos y programas computacionales indispensables para el análisis a gran escala de la información metagenómica (Oulas *et al.*, 2015, Gardner *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, los estudios metagenómicos se han realizado desde tres enfoques distintos: tamizaje funcional, secuenciación masiva, y tamizaje basado en secuencia (Simon *et al.*, 2009). El primero consiste en la construcción de bibliotecas metagenómicas y su evaluación con sustratos específicos que buscan inducir la producción de enzimas o metabolitos deseados que son evaluados visualmente (Riesenfeld *et al.*, 2004). Este enfoque ha sido utilizado ampliamente ya que permite recuperar la secuencia completa del gen y no requiere conocimiento previo de los genes de interés (Simon *et al.*, 2009). Sin embargo, presenta varias desventajas como la dependencia del hospedero que se emplea para la expresión (Gabor *et al.*, 2004) y, como consecuencia, las diferencias en los sistemas de regulación a nivel transcripcional, traduccional, post-traduccional entre el hospedero (generalmente *E. coli*) y el organismo de donde proviene el gen (Taupp *et al.*, 2011). Además, el tiempo y costo que demanda analizar miles de clones reduce la eficiencia y limita la aplicación de este tipo de tamizaje (Terahara *et al.*, 2010).

La secuenciación masiva de DNA metagenómico o de una biblioteca empleando marcadores específicos se ve facilitada por el uso de tecnologías de secuenciación masiva, como la pirosecuenciación, Illumina Hi-seq, secuenciación Ion Torrent, AB SOLiD, Pacific biosystems, y Oxford nanopore (Ansorge, 2016), las cuales permiten obtener grandes cantidades de datos en corto tiempo y a bajo costo, evitando la pérdida de información debido a la baja abundancia de microorganismos presentes en la muestra (Simon *et al.*, 2009; Suenega, 2011). A pesar de estas ventajas, la secuenciación masiva presenta varias limitantes que restringen su aplicación, como la corta longitud de las lecturas generadas por las distintas plataformas de secuenciación de segunda generación (20 y 700 pb), en las que no se representan regiones importantes o significativas de un gen, por lo que no es posible asignarle una función específica (Wooley *et al.*, 2010). De igual manera, la mayoría de secuencias depositadas en las bases de datos de genes y proteínas están sesgadas hacia organismos modelo y microorganismos cultivados, los cuales no representan la totalidad de especies, genes y rutas metabólicas, por lo tanto, se dificulta la clasificación

taxonómica y funcional de las secuencias, complicando el análisis de la información (Oulas *et al.*, 2015).

El tamizaje de un metagenoma basado en sus secuencias u homología emplea técnicas basadas en PCR o hibridación (Suenega, 2011). A diferencia del tamizaje funcional, no está sujeto a la expresión en un hospedero heterólogo, en cambio sí depende del conocimiento previo de las proteínas a identificar ya que, a partir de dominios o regiones conservadas, se sintetizan sondas e iniciadores. El uso de este enfoque se recomienda cuando se desea identificar nuevos miembros de familias de proteínas conocidas para obtener una colección de proteínas similares, pero con variaciones en sus propiedades (Chistoserdova, 2010). El tamizaje por PCR en general se basa en el uso de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir del alineamiento múltiple de secuencias de proteínas conocidas, con los cuales se hace una amplificación parcial del gen, este fragmento es secuenciado y a partir del mismo se diseñan iniciadores para recuperar las secuencias corriente arriba y corriente abajo mediante la técnica de Genome Walking, hasta obtener el gen completo (Kotik *et al.*, 2009).

Los estudios metagenómicos incluyen dos pasos principales: (1) el procesamiento de las lecturas y (2) análisis de las lecturas. En el procesamiento de las lecturas, se emplean una variedad de herramientas computacionales para el control de calidad, que identifican y eliminan secuencias de baja calidad, contaminantes y cualquier secuencia quimérica que pudiera haberse generado. Éstos incluyen programas como FastQC, Cutadapt, BBtools y Trimmomatic. Por ejemplo, FastQ Scream compara las lecturas contra múltiples genomas de referencia como el humano, el ratón, *Escherichia coli* y levadura, proporcionando una visión general rápida de como estas lecturas se alinean. Diginorm, implementado en el paquete khmer, se emplea para reducir la redundancia de lecturas en áreas de alta profundidad mediante lecturas de muestreo descendente y, por lo tanto, normalizar la cobertura para realizar análisis posteriores. Otro ejemplo es MultiQC, el cual concentra informes de control de calidad de múltiples muestras en un solo informe para que puedan ser analizados más fácilmente. Dichas lecturas pueden ensamblarse en secuencias contiguas más largas denominadas contigs o ser usadas directamente en clasificadores taxonómicos (Breitwieser *et al.*, 2017).

Después del procesamiento de las lecturas, el siguiente paso es clasificar cada lectura en función de los taxones con la mayor probabilidad de ser el origen de esa lectura, por lo general, se requiere una base de datos de referencia para encontrar el valor más cercano a su unidad taxonómica operacional (UTO), de la que se infiere un linaje taxonómico. Los clasificadores se dividen, en función de la cantidad de lecturas que utilizan en: clasificadores de genes marcadores, los cuales utilizan bases de datos reducidas, identificando especies específicas y clasificadores de todas las lecturas, que emplean todo el conjunto de datos obtenidos de lecturas secuenciadas y las asigna a genomas completos. Estos clasificadores usualmente emplean porcentajes de secuencias más altos que los clasificadores basados en genes marcadores y proporcionando mayor información sobre los microorganismos presentes en una muestra metagenómica (Breitwieser *et al.*, 2017, Marić y Šikić., 2019).

La clasificación taxonómica directa es útil para determinar el perfil cuantitativo de la comunidad, para inferir posibles perfiles funcionales en función de la colección de genes presentes en la muestra, así como la identificación de los microorganismos. En comparación con los perfiles de diversidad basados en marcadores de genes (16S RNA), el análisis por Shotgun disminuye los sesgos por la selección del cebador y permite la detección de organismos en todos los dominios de la vida (Aguar-Pulido *et al.*, 2016, Breitwieser *et al.*, 2017).

Una vez que las lecturas han sido asignadas y clasificadas, es posible cuantificar la estructura de las comunidades microbianas utilizando medidas ecológicas y biogeográficas como la diversidad de especies (por ejemplo, Shannon, Chao, Simpson y Berger-Parker) y la riqueza, tradicionalmente se han utilizado para caracterizar las muestras metagenómicas (Chiarucci *et al.*, 2011). La visualización de los perfiles taxonómicos para facilitar su interpretación, es una tarea que ha sido abordada por varias iniciativas. Krona (Ondov *et al.*, 2011), por ejemplo, es una herramienta simple e intuitiva basada en la web para visualizar el perfil taxonómico mediante un gráfico circular interactivo, que muestra varios niveles de jerarquía. En contraste, la herramienta de Visualización y Análisis de Estructura de Población Microbiana (VAMPS) (Huse *et al.*, 2014) permite visualizar las similitudes y las diferencias significativas entre múltiples perfiles taxonómicos de comunidades microbianas complejas.

Uno de los primeros métodos para asignar el linaje taxonómico fue el uso del programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), que clasifica las secuencias al alinearlas con su base de datos de genomas. Desde entonces, muchas herramientas de análisis metagenómico han sido desarrolladas como Kraken, construida a partir de los datos de RefSeq en NCBI (Wood *et al.*, 2014), que es una herramienta que consulta bases de datos de coincidencia exacta de los llamados k-mers (secuencias de nucleótidos de cierta longitud), la cual es capaz de lograr con precisión la asignación taxonómica a nivel de género. CLARK (CLAssifier basado en K-mers reducidos) es otra herramienta de clasificación de secuencias de genomas basada en k-mers. Actualmente Kraken, CLARK y One Codex son las herramienta más precisas y rápidas que existen (Gardner *et al.*, 2019).

Otras herramientas bioinformáticas para el análisis metagenómico, se basan en la secuencia de gen del 16S RNAr como QIIME, UPARSE, Mothur y DADA2 (Marić y Šikić., 2019), que utilizan bases de datos como: Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006), Ribosomal Database Project (RDP) (Cole *et al.*, 2009), Silva (Nilakanta *et al.*, 2014) y Unite (Kõljalg *et al.*, 2013). Estas bases de datos son menos adecuadas para ciertos grupos de organismos, como los protistas y virus, que son extremadamente diversos y para los que la información disponible es considerablemente menor en comparación con los grupos bacterianos. Con el auge del uso de la bioinformática para los análisis de diversidad, se han desarrollado numerosas herramientas y bases de datos para el análisis de secuencias obtenidas a partir de DNA genómico, mejorando su especificidad y eficiencia, como PacBio y ONT las cuales permiten la lectura de secuencias de mayor longitud (Oulas *et al.*, 2015, Marić y Šikić., 2019). En la Tabla 1.1 se enlistan las herramientas más utilizadas hoy en día para el análisis de datos de metagenómica.

TABLA 1.1

Herramientas de análisis de datos metagenómicos más utilizadas.

Programas utilizados para análisis de datos			
Velvet	SolexaQA	TIGRFA	SILVA
SOAP	Lucy	MetaPhlAn	FunFrame
ABYSS44	DUST	HighSSR	PANGEA
MetaVelvet	Bowtie	Blat	FastGroupII
MetaVelvet-SL	MetaGeneMark	IMG/MER	CLOTU
Meta-IDBA	LEfSe	MG-RAST	BBtols
IDBA-UD	Metagene	MEGAN5	Greengenes
Newbler (Roche)	CREST	CAMERA	Ribosomal Database Project (RDP)
MIRA	Prodigal	Parallel-META	CANGS
Mapsembler	mOTU-LG	EBIMetagenomics	Bellerophon
ALLPATHS	Orphelia	METAREP	UCHIME
MetaORFA	FASTXToolkit	PHACCS	JATAC
MetAMOS	Kraken	QIIME2	DADA2
EULER	FragGeneScan	Mothur	AmpliconNoise
TETRA	CRT	JAguc	Uni
S-GSOM	NBC	M-pick	WGSQuikr
PhylopythiaS	MyTa	OTUbase	SPHINX
TACOA	RIT	CopyRighter	MetaPhyler
PCAHIER	PILER-CR	AbundantOTU	SOrt-ITEMS
ESOM	tRNAscan	UniFrac	PhymmBL
ClaMS	KEGG	ESPRIT	MetaCluster
CARMA	MetaCluster TA	ProViDE	FastQC
COG/KOG	SEED	eggNOG	PFAM
Trimmomatic	FastQ Scream	Diginorm	UPARSE
CLARK	MetaPhlAn2	FOCUS	PanPhlan
One Codex	Genometa	GOTTCHA	LMAT
Taxator-tk	ConStrains	Ray meta	MOCAT2
Megahit	SPAdes	MaxBin	MetaBAT
VizBin	AbundanceBin	GroopM	COCACOLA

*adaptado de Oulas *et al.*, 2015, Breitwieser y col. 2017, Marić y Šikić., 2019.**1.1.1 DNA metagenómico**

La obtención de DNA metagenómico (DNAm) juega un papel crítico para todo el flujo de trabajo en un análisis metagenómico. Para asegurarse de que la información genética obtenida es representativa de todo el microbioma, la preparación de DNAm requiere protocolos específicos para preservar, en la medida de lo posible, la calidad y la cantidad de los ácidos nucleicos para garantizar la calidad de la biblioteca metagenómica y el enfoque de secuenciación posterior. A manera general la obtención de DNAm se muestra en la Figura 1.3.

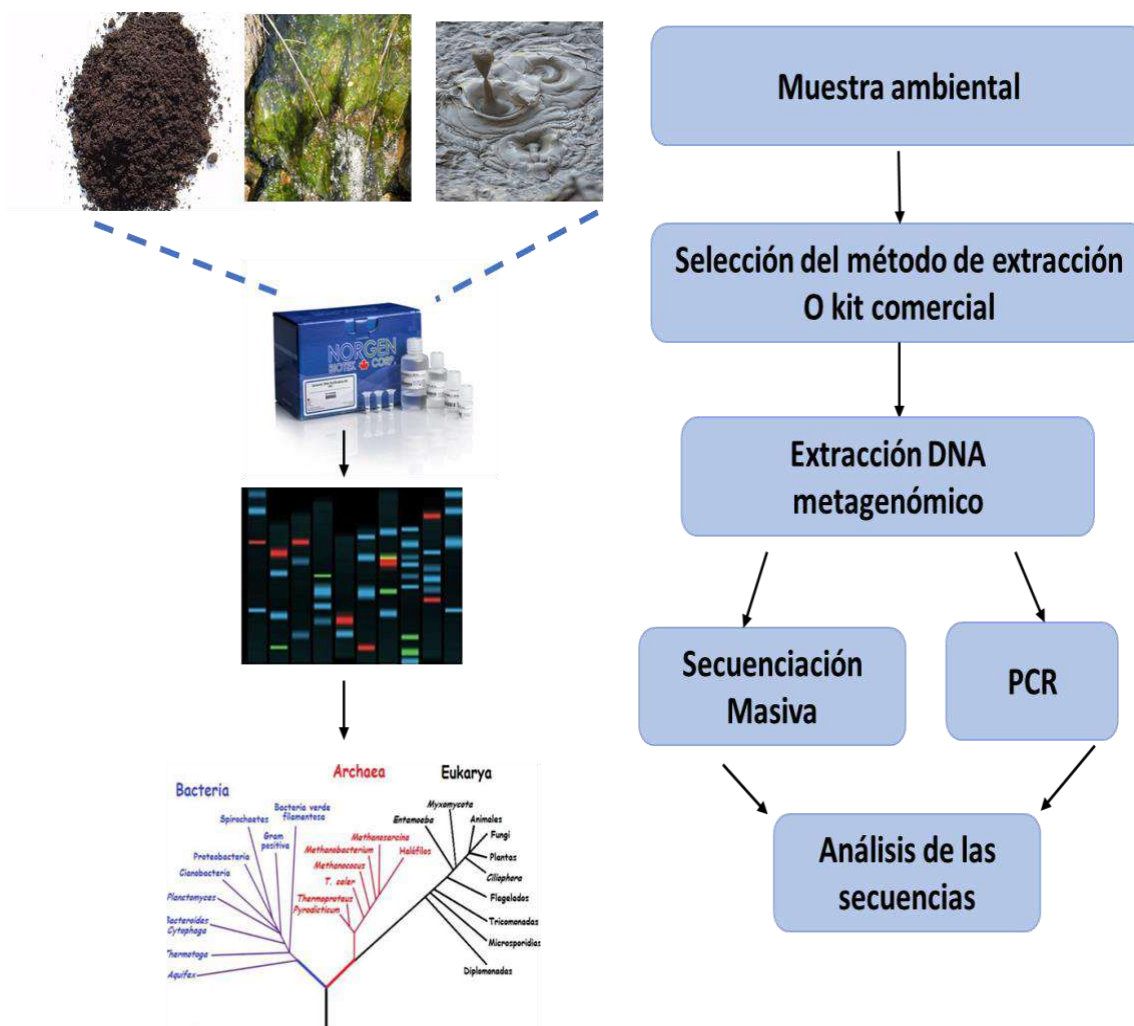


FIGURA 1.3. Diagrama de flujo esquemático de los pasos para la obtención de DNA metagenómico.

Existen varios métodos para la extracción y purificación del DNAm a partir de muestras ambientales (Lemarchand *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007; Montaña-Lara 2015). La obtención de DNA metagenómico se lleva a cabo bajo dos estrategias generales: la lisis directa de las células a partir de muestras ambientales (agua, suelo, sustrato) denominada “in situ”, seguida de la extracción de DNA, que tiene la ventaja de minimizar la co-extracción de inhibidores y generar DNA de alto peso molecular, y la extracción de DNA de microorganismos previamente aislados que genera mayores cantidades de DNA en menor tiempo y probablemente mayor información sobre la diversidad microbiana, aunque suelen presentarse problemas de representatividad (Kirk *et al.*, 2004, Delmont *et al.*, 2011).

La eficiencia de la técnica de lisis celular varía dependiendo de los diferentes grupos microbianos (Prosser, 2002). Las bacterias procedentes de muestras de sustrato o suelo tienden a formar agregados; por lo tanto, la capacidad de separar estas células de los componentes del suelo es primordial para el estudio de biodiversidad (Trevors, 1998). Si el método de extracción celular empleado es demasiado suave, las bacterias Gram-negativas se lisarán, pero no así las Gram-positivas. Si el método es demasiado fuerte, tanto Gram-negativas como Gram-positivas se lisarán, pero su DNA podría degradarse (Wintzingerode *et al.*, 1997). Algunos autores afirman que el método de extracción utilizado, y las características fisicoquímicas del ambiente, pueden influir en los rendimientos de extracción, al igual que en la determinación de la diversidad microbiana y en la recuperación de algunos genes funcionales (Liphay *et al.*, 2004; Thakuria *et al.*, 2008).

Los avances en las técnicas de extracción de DNA han permitido el aislamiento y obtención de DNA metagenómico a partir de diversos ambientes (Tabla 1.2), es por eso que se encuentran disponibles un gran número de kits comerciales para la obtención de DNA a partir de diferentes muestras ambientales, tales como: Power Soil™ DNA Isolation Kit, Ultra Clean™ Mega Soil DNA Kit; PowerWater® DNA Isolation Kit; RapidWater™ DNA Isolation Kit (MoBio® Laboratories); Fast DNA® Spin Kit for Soil (qbiogene®); Soil Master™ DNA Isolation Kit for Water (Epicentre® Biotechnologies).

TABLA 1.2
Ejemplos de fuentes de DNA metagenómico

Fuente DNA	Referencia
Suelo	Zhan <i>et al.</i> , 2013 Tan <i>et al.</i> , 2014 Singh <i>et al.</i> , 2015 Kumar <i>et al.</i> , 2017
Suelo zonas geotérmicas	Rincon-Molina <i>et al.</i> , 2018 Brito <i>et al.</i> , 2014;2019 Schröder <i>et al.</i> , 2017 Prieto-Barajas <i>et al.</i> , 2017 Zarafeta <i>et al.</i> , 2016
Sedimento	Placido <i>et al.</i> , 2015 Gao <i>et al.</i> , 2016 Schröder <i>et al.</i> , 2014
Aguas termales	Gupta <i>et al.</i> , 2012 Schröder <i>et al.</i> , 2017 Biver <i>et al.</i> , 2013 Fu <i>et al.</i> , 2015 Chan <i>et al.</i> , 2017
Composta	Verma <i>et al.</i> , 2013 Kwon <i>et al.</i> , 2010 Okano <i>et al.</i> , 2015
Bioractores Digestores Plantas de tratamiento	Meilleur <i>et al.</i> , 2009 Jabbour <i>et al.</i> , 2013 Vidya <i>et al.</i> , 2011 Wang <i>et al.</i> , 2015 Sharma <i>et al.</i> , 2012 Kim <i>et al.</i> , 2015
Rumen bovino	Li <i>et al.</i> , 2014 Cheng <i>et al.</i> , 2016 Ramírez-Escudero <i>et al.</i> , 2016 Wang <i>et al.</i> , 2015 Jordan <i>et al.</i> , 2016
Intestino de insectos	Arnal <i>et al.</i> , 2015 Lee <i>et al.</i> , 2016 Rashamuse <i>et al.</i> , 2017

*Adaptado de DeCastro *et al.*, 2016

1.2 Ambientes extremos y extremófilos

Es bien sabido desde finales de los años 70's que la vida microbiana puede prosperar en ambientes donde los límites de temperatura superior e inferior son considerados no compatibles con la vida. La temperatura como principal factor determinante ofrece una serie de desafíos para el desarrollo de los microorganismos, desde la ruptura estructural por la formación de cristales de hielo hasta la desnaturalización de las biomoléculas y los componentes celulares debido a las altas temperaturas. Desde el punto de vista antropocéntrico, un ambiente extremo es todo aquel que presenta condiciones que para la perspectiva humana son extremas, los cuales presentan altas o muy bajas temperaturas y pHs muy ácidos o básicos, presiones hidrostáticas altas, alto contenido de sales o de metales pesados, poca disponibilidad de agua, bajas concentraciones de nutrientes; tales como fuentes de aguas termales, fumarolas, géiseres, desiertos y glaciares, entre otros (Cowan *et al.*, 2015). También se ha demostrado que los microorganismos no solo prosperan bajo el espectro de los parámetros en la Tierra, sino que también pueden sobrevivir a las duras condiciones del espacio, un entorno con radiación extrema, presión de vacío, temperatura extremadamente variable y microgravedad (Horneck *et al.*, 2010; Yamagishi *et al.*, 2018).

Se han reportado microorganismos que habitan en estas condiciones particulares (Mesbah *et al.*, 2008; Cowan *et al.*, 2015). Estos microorganismos se denominan extremófilos y con frecuencia son una fuente importante de enzimas y metabolitos con capacidad para funcionar en estas condiciones es homologa, por lo que poseen generalmente los mismos órdenes de magnitud en la actividad y estabilidad (Ciaramella *et al.*, 2002; DeCastro *et al.*, 2016; Rincon-Molina *et al.*, 2018), por lo tanto, puede ser posible encontrar enzimas novedosas o con diferentes rangos de actividad, que complementen las aplicaciones de uso en la industria, la medicina o agricultura estudiando la diversidad en ambientes extremos (Prieto-Barajas *et al.*, 2018).

Los extremófilos pueden ser clasificados de acuerdo a las condiciones en la que habitan (Van den Burg, 2003 adaptado con Seckbach y Rampelotto 2015) en:

- A) Termófilos: con temperaturas óptimas de crecimiento mayores a 45°C. En el caso de los hipertermófilos las temperaturas óptimas pueden estar entre 80°C y 110°C.
- B) Psicrófilos: organismos con temperaturas óptimas no mayores a 5°C.

- C) Halófilos: organismos que requieren de, al menos, concentraciones de sales para crecer entre 3-30%.
- D) Alcalófilos: organismos que tienen un pH óptimo de crecimiento por arriba de 9.
- E) Acidófilos: organismos que tienen un pH óptimo de crecimiento por debajo de 2.
- F) Piezófilos (anteriormente llamados Barófilos): organismos que viven en condiciones óptimas a altas presiones hidrostáticas.
- G) Osmófilos (alta concentración de solutos orgánicos)
- H) Oligótrofos (baja concentración de solutos y / o nutrientes)
- I) Xerófilos (ambientes muy secos).

Los extremófilos como los hipertermófilos, pueden estar sujetos a temperaturas superiores a los 100°C, como por ejemplo *Pyrococcus fumarii* capaz de crecer a 113°C (Stetter, 1999), y *Geogemma barossii* capaz de crecer a 130°C (Kashefi y Lovley, 2003) siendo el organismo más termofílico reportado, o en ambientes donde se combinan varios factores de estrés, tales como altas temperaturas y condiciones ácidas, como es el caso de los campos solfatáricos y sitios geotérmicos donde se han reportado microorganismos como *Sulfolobus solfataricus* (Jeffries *et al.*, 2001), *Sulfolobus hakonensis* (Takayanagi *et al.*, 1996), *Acidianus sulphdivorans* (Plumb *et al.*, 2007), *Vulcanisaeta thermophila* (Yim *et al.*, 2015), *Picrophilus torridus* y *Picrophilus oshimae*, arqueas heterotróficas moderadamente termofílicas que tienen el pH óptimo más bajo para el crecimiento (pH 0.7) (Sharma *et al.*, 2016). También pueden encontrarse en áreas donde la concentración de sal es cinco veces mayor que la concentración de sal del océano. Los ambientes salinos e hipersalinos se encuentran ampliamente dispersos por todo el mundo, ya sea en Lagos de sal (El Mar Muerto), minas de sal como Salzbath-Salzetnan (Austria), Slanic, Turda, Praid (Rumania), Wieliczka (Polonia), Nakhlichevan (Azerbaiyán), Chon-Tous (Kirghizstan), la Cueva Berezniki en Perm (Rusia), Sototvino (Ucrania) entre otros (Yadap *et al.*, 2015), y con valores extremos de pH ya sean ácidos o alcalinos, como lo son las aguas termales, aguas minerales o lagos alcalinos (Stetter, 1999; Zierenberg *et al.*, 2000; Mesbah y Wiegel., 2008).

Los extremófilos generalmente son clasificados por una condición extrema en específico, sin embargo, los ambientes extremos poseen dos o más de estas condiciones, muchas aguas termales poseen variantes de pH ácidas o alcalinas, y generalmente presentan altas concentraciones de metales pesados; los fondos marinos generalmente presentan bajas temperaturas, son de carácter oligotrófico (bajo contenido de nutrientes) y a su vez están sometidos a altas presiones, o las

chimeneas hidrotermales, con elevadas presiones y temperaturas y pH ácido. Dichos organismos se conocen como poliextremófilos y están adaptados a una condición extrema adicional a la condición que los caracteriza, como la temperatura, el pH, la salinidad (Urbietta *et al.*, 2015a), y a menudo también requieren de ésta para sobrevivir. Tal descubrimiento ha impulsado estudios dirigidos a comprender tanto las estrategias de desarrollo y adaptación (Rampelotto *et al.*, 2010; 2013), así como la influencia de este tipo de factores en los perfiles de diversidad, dinámicas de codependencia, relaciones interespecíficas y sus interacciones sintrópicas (Kouzuma *et al.*, 2015, Su *et al.*, 2018), haciendo de estos la base de modelos para estudios sobre la evolución de entidades biológicas (Bernard *et al.*, 2018).

La búsqueda de microorganismos en ambientes extremos representa un gran desafío, limitado por la complejidad de sus nichos ecológicos, así como sus necesidades específicas de crecimiento, que no pueden ser replicadas con técnicas dependientes de cultivo. Se considera que gran parte de los microorganismos extremófilos forman parte de la materia oscura microbiana que aún no se ha descubierto (Bernard *et al.*, 2018). La implementación de técnicas como la amplificación de 16S RNA y secuenciación masiva en ambientes extremos resulta de gran importancia, para entender la dinámica poblacional de estas, así como sus características particulares, dilucidar los mecanismos de adaptación a entornos extremos proporciona nuevas rutas metabólicas y mecanismos de regulación (Chen y Jiang, 2018), proporcionando información clave sobre la capacidad metabólica de las comunidades presentes en sistemas a los que no se accede fácilmente o que no están sujetos a estudios *in situ*, como por ejemplo, la dominancia de genes relacionados con el ciclo del azufre y de la oxidación del H₂ en fuentes hidrotermales profundas (Brazelton *et al.*, 2011, Cao *et al.*, 2014), la prevalencia de genes de oxidación de lípidos en comunidades DSHV en sustratos ricos en petróleo (He *et al.*, 2013), la utilización por las comunidades microbianas de compuestos de azufre reducido como la fuente principal de energía quimioautotrófica (Urich *et al.*, 2014), a su vez se ha reportado que tanto los termófilos como los hipertermófilos, poseen en sus genomas un mayor número de secuencias de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) que los microorganismos mesófilos, sugiriendo así que los virus / fagos desempeñan un papel importante en la estructuras y función dentro de las comunidades termófilas (Cowan *et al.*, 2015). Es por esto que, la información obtenida a través de la secuenciación del metagenoma puede confirmar las funcionalidades metabólicas predichas por los análisis fisicoquímicos, siendo los termófilos e hipertermófilos de los grupos más estudiados.

1.2.1 Termófilos

Llamados organismos amantes del calor, los termófilos y requieren de elevadas temperaturas para su crecimiento y supervivencia. Estos microorganismos son capaces de crecer a temperaturas de 60 ° C y se conocen desde hace más de 90 años, mientras que los organismos hipertermófilos, que son capaces de crecer a más de 80° C, se conocen desde hace solo tres décadas (Sharma *et al.*, 2016). Se han aislado una gran diversidad de microorganismos termófilos presentes tanto en ambientes naturales como artificiales, tales como: zonas geotérmicas, aguas termales, fumarolas, géiseres, respiraderos hidrotermales de aguas profundas, volcanes y también en entornos artificiales, como instalaciones de compostaje y reactores anaerobios (Rastogi *et al.*, 2010; Urbietta *et al.*, 2015b), representados por varios grupos de bacterias como las cianobacterias, enterobacterias, las termoacidófilas siendo en su mayoría arqueas (Morozkina *et al.*, 2010).

Los termófilos e hipertermofilos poseen características bioquímicas que les permiten vivir a altas temperaturas; un mecanismo general es la adaptación de sus proteínas a través de cambios en el arreglo de los aminoácidos de su estructura primaria, aumentando así su estabilidad térmica. En comparación con proteínas mesófilas, las proteínas termofílicas poseen un mayor número de residuos de aminoácidos en las α helices, así como longitudes de cadena de aminoácidos más cortas, que reflejan la importancia en cuanto a estabilidad térmica de tener un número reducido de regiones flexibles en su estructura proteica, mejorando así su estabilidad). Por otra parte, las proteínas de los termófilos a menudo tienen residuos hidrófobos en su interior, promoviendo la estabilidad conformacional en la parte interna de las mismas (Urbietta *et al.*, 2015a; Xu *et al.*, 2018).

Otros mecanismos de importancia son las proteínas de choque térmico (HSP), chaperones y chaperoninas que ayudan en el plegamiento de proteínas, así como los sistemas de reparación (regulones SOS y α - y β - subunidades prefoldinas) y estabilización de DNA como la agmatina y la Girasa inversa, para la estabilización de las membranas, los termófilos emplean ácidos grasos de cadena ramificada y poliaminas (por ejemplo, espermidina) ajustando así la composición de su membrana en cantidad y tipo de lípidos, brindando así mayor resistencia. (Urbietta *et al.*, 2015a; Xu *et al.*, 2018). Otra estrategia de los termófilos es el uso de solutos compatibles para estabilizar

los componentes celulares (Borges *et al.*, 2010; Empadinhas y Da Costa 2011). Este tipo de características explica la alta flexibilidad genómica y metabólica de las comunidades microbianas en ambientes geotérmicos.

La metagenómica es particularmente relevante en ambientes geotérmicos ya que el crecimiento y aislamiento de los termófilos en condiciones de laboratorio sigue siendo una limitación para la comprensión de la diversidad microbiana. En los últimos años, los avances en las técnicas de secuenciación masiva de alto rendimiento (NGS), así como la reducción de costos, ha incrementado el uso de ésta en diferentes ecosistemas de alta temperatura para el análisis y obtención de enzimas de aguas termales (López-López *et al.*, 2015 a,b), desiertos (Neveu *et al.*, 2011), depósitos de petróleo (de Vasconcellos *et al.*, 2010), o ambientes hechos por el hombre, como plantas de biogás (Ilmberger *et al.*, 2012), de los cuales se ha logrado identificar y expresar varias enzimas termoestables, lo que demuestra el potencial de la metagenómica como fuente importante para la búsqueda de nuevas termozimas. En la tabla 1.3 se muestran algunos ejemplos de termoenzimas obtenidas por medio de metagenómica.

Unas de las enzimas de interés, por sus aplicaciones industriales, son las lipolíticas. El primer reporte de una enzima lipolítica obtenida de un clon metagenómico fue publicado por Henne y col. en 2000. Desde entonces se han reportado más de 200 clones con actividad lipolítica provenientes de bibliotecas metagenómicas construidas a partir de muestras de diversos ecosistemas. Estos clones han sido analizados mediante secuenciación y patrones de restricción (Voget *et al.*, 2003) y algunas enzimas han sido sobreexpresadas, purificadas y caracterizadas bioquímicamente (Rhee *et al.* 2005; Elend *et al.*, 2006). Muchos autores han realizado la búsqueda de actividad lipolítica en bibliotecas metagenómicas a través del análisis funcional en sustratos lipídicos (Montaña-Lara, 2015).

TABLA 1.3 Ejemplos de termoenzimas obtenidas por metagenómica

Familia	Actividad	Fuente	Referencia
Enzimas lipolíticas	Lipasa	Biomasa reactor	Meilleur <i>et al.</i> , 2009
		Suelo campo petrolífero	Fan <i>et al.</i> , 2011
		Planta de tratamiento de agua	Sharma <i>et al.</i> , 2012
		Aguas termales	Yang <i>et al.</i> , 2017
		Suelo	Kumar <i>et al.</i> , 2017
	Lipasa/Esterasa	Suelo con aceite	Kim <i>et al.</i> , 2015
	Esterasa	Fuente hidrotermal oceanica Aguas termales, Lodo	Zhu <i>et al.</i> , 2013 Leis <i>et al.</i> , 2015 López-López <i>et al.</i> , 2015. Zarafeta <i>et al.</i> , 2016
	Fosfolipasa (Patatin-like)	Fuente hidrotermal	Fu <i>et al.</i> , 2015
	Carboxylesterasa	Sedimento	Placido <i>et al.</i> , 2015 Gao <i>et al.</i> , 2016
Glicosidasas	Celulasas	Composta Lodos activados	Kwon <i>et al.</i> , 2010 Sharma <i>et al.</i> , 2012
	β -glucosidasa	Aguas termales, lodo y sedimento. Digestor metanogénico termofílico	Schröder <i>et al.</i> , 2014 Wang <i>et al.</i> , 2015
	β -galactosidasa	Aguas termales suelo	Gupta <i>et al.</i> , 2012 Zhan <i>et al.</i> , 2013
	α -Galactosidasa	Aguas termales	Schröder <i>et al.</i> , 2017
	Endoxylanase β -xylosidase	Composta Digestor metanogénico termofílico	Verma <i>et al.</i> , 2013 Wang <i>et al.</i> , 2015
Amilasas	α -amilase	Bioractores	Jabbour <i>et al.</i> , 2013 Vidya <i>et al.</i> , 2011
Fosfatasas	Fitasas	Suelo	Tan <i>et al.</i> , 2014
Proteasa	Serin proteasa	Desierto Suelo Aguas termales	Singh <i>et al.</i> , 2015 Biver <i>et al.</i> , 2013

*Adaptado de De Castro *et al.*, 2016 y Berini *et al.*, 2017.

1.3 Parametros determinantes en ambientes extremos

Dependiendo de las características particulares de cada ambiente extremo, ciertos parámetros pueden influir más en la diversidad microbiana que otros, como la temperatura en aguas geotérmicas (Sharp *et al.*, 2014), el pH del suelo (Rousk *et al.*, 2010), la alta salinidad (Yang *et al.*, 2016), el contenido de agua (Lebre *et al.*, 2017) y el nivel de radiación solar o incidencia del mismo (Brito *et al.*, 2019), estos parámetros (temperatura, pH, presión, salinidad y radiación) se correlacionan entre si, influyendo sobre otros factores como la disponibilidad de nutrientes y fuentes de energía. A nivel de nano y microescala, los dos factores más importantes son la actividad del agua y el pH (Lane y Martin, 2012).

1.3.1 Acidez y alcalinidad

El pH tiene un efecto significativo sobre la diversidad bacteriana en ambientes extremos, influyendo en la composición y abundancia de la comunidad microbiana, siendo mas determinante que cualquier otro parámetro (Zhalnina *et al.*, 2014, Merino *et al.*, 2019), debido a que los microorganismos deben mantener un pH citoplasmático casi neutro para permitir sus funciones celulares y activades metabólicas (Krulwich *et al.*, 2011; Jin y Kirk, 2018). El pH citoplasmático de las bacterias acidófilas es ~6.0, mientras que las bacterias alcalofilas poseen un pH citoplasmático alrededor de 7.2–8.7 (Krulwich *et al.*, 2011). Aunado al pH propio del biotopo, los microorganismos excretan metabolitos, como el ácido láctico o el ácido acético, cambiando así el pH inmediato circundante (Zhang *et al.*, 2016). Se ha demostrado tanto en entornos naturales como en cultivos, que los microorganismos pueden alterar significativamente el pH como resultado de sus actividades metabólicas (Merino *et al.*, 2019).

Los microorganismos que habitan en este tipo de ambientes, ya sea muy ácidos o muy alcalinos, poseen diferentes mecanismos de bioquimicos, como el bombeo activo de protones para mantener el pH, mediante sistemas de flujo de protones, la disminución de la permeabilidad de la membrana celular para suprimir la entrada de protones en el citoplasma, así como un sistema de reparación de proteínas y DNA (Amaro *et al.*, 1991, Christel *et al.*, 2017).

1.3.2 Salinidad

La concentración de sales en los ambientes salinos e hipersalinos tiene un impacto significativo en la composición de la comunidad microbiana (Lozupone y Knight, 2007; Swan *et al.*, 2010), siendo el rango de salinidad óptimo para microorganismos cultivables y aislados entre 0 y 35%. Este tipo de ambientes se encuentran ampliamente distribuidos y van desde ambientes marinos (3–4%), aguas termales (hasta 10.5%) y lagos salados (hasta 37.1%). Una amplia gama de iones, incluidos Na^{++} , Cl^{-} , SO_4^{2-} , Ca^{2+} y Mg^{2+} contribuyen a la salinidad total (Oren, 2013), y pueden influir significativamente en otros parámetros como la actividad de agua (Yakimov *et al.*, 2015). En ambientes salinos terrestres, la concentración de iones y la disponibilidad de agua está influenciada por las tasas de precipitación en relación con la evaporación, lo que resulta en una mayor concentración de sales dependiendo la estación del año (Finlayson *et al.*, 2018). Los microorganismos halófilos poseen propiedades metabólicas únicas para mantener más agua en el citoplasma, desarrollando mecanismos para mantener una concentración de sal intracelular equivalente al medio ambiente, mediante la absorción de cloruro y potasio en las células o manteniendo una baja concentración de sal intracelular, manteniendo el balance osmótico (Oren, 2011).

1.3.3 Temperatura

La temperatura en la superficie de la Tierra varía de -98.6 en la Antártida Oriental a 495° C en respiraderos hidrotermales (Scambos *et al.*, 2018, McDermott *et al.*, 2018). Los gradientes de temperatura demuestran la influencia de ésta en la composición de la comunidad microbiana dentro de un ecosistema (Everroad *et al.*, 2012; Cole *et al.*, 2013; Sharp *et al.*, 2014). Se ha reportado que tanto la complejidad como la abundancia de las comunidades microbianas disminuye con el aumento de la temperatura, y que incluso puede variar de centímetros a metros en el caso de suelos (Li *et al.*, 2015; Rincón- Molina *et al.*, 2018), y respiraderos hidrotermales de aguas profundas y someras (Flores *et al.*, 2012; Giovannelli *et al.*, 2013). En los ambientes geotérmicos, los gradientes de temperatura probablemente tengan una mayor influencia en la comunidad microbiana (Sharp *et al.*, 2014), en comparación con otros entornos, donde el pH y la salinidad han demostrado ser el factor dominante. Las propiedades metabólicas de psicrófilos y termófilos generalmente implican tolerancia a condiciones adicionales tales como altas concentraciones de sal, pH y presión (Merino *et al.*, 2019).

1.4 Metagenómica en ambientes extremos

Los genomas de más de 300,000 bacterias y más de 3,000 arqueas (base de datos en línea de genomas <https://gold.jgi-psf.org>; octubre de 2019) han proporcionado información clave sobre su evolución, así como el papel en los ciclos biogeoquímicos, sus modos de patogénesis, resistencia a antimicrobianos y los determinantes genéticos subyacentes a su potencial biotecnológico. El uso de la metagenómica en ambientes extremos, mediante el análisis de metagenomas comunitarios y el conjunto de datos geoquímicos, en lugar de solo datos filotípicos, ha permitido determinar qué factores influyen tanto en la composición y la función de las comunidades, tradicionalmente restringidas a los enfoques como temperatura, el pH, la salinidad (Alsop *et al.*, 2014), proporcionando información clave sobre la capacidad metabólica en este tipo de entornos complejos (Cowan *et al.*, 2015).

En los últimos años, la aplicación de técnicas para el análisis filogenético como la secuenciación del gen del 16S RNAr, del metagenoma, junto con otras tecnologías 'ómicas', como la transcriptómica (medición de los niveles de transcripción de ARNm), la proteómica (estudio del complemento proteico) y la metabolómica (estudio de los metabolitos celulares), ha llevado al desarrollo de una biología de sistemas sofisticada (Gutleben *et al.*, 2018 y Den Besten *et al.*, 2018) que facilita el estudio de la diversidad en ambientes extremos, lo cual ha permitido dilucidar la verdadera complejidad y dinámica de los filotipos procariotas en biotopos como los termofílicos, los cuales poseen características que abarcan gradientes de pH menores a 0 a más de 10, y temperaturas de 60 °C a más de 120 °C, o los respiraderos hidrotermales de aguas profundas (DSHV) que agregaron una dimensión única de temperatura a los estudios de termófilos y condujo a un rango de aislamiento de especies de arqueas hipertermofílicas con temperaturas superiores a las ya conocidas (Cowan *et al.*, 2015).

Cao y colaboradores en el 2014, analizaron los metagenomas provenientes de chimeneas hidrotermales ubicadas en el Southwest Indian Ridge (SWIR) mediante pirosecuenciación, para dilucidar el papel de los microorganismos relacionados con el ciclo del azufre. El análisis taxonómico reveló que las bacterias dominantes que participan en el ciclo de azufre son las Deltaproteobacterias reductoras de sulfato. Los metagenomas estudiados contenían genes relacionados con la oxidación y reducción de azufre. Se identificaron varias rutas metabólicas de carbono, en particular la ruta de Calvin-Benson-Bassham y los ciclos reductores de ácido tricarbóxico para la fijación de CO₂, en bacterias autótrofas oxidantes de azufre. Además, las bacterias oxidantes de azufre se asociaron con el enriquecimiento de genes involucrados en la vía de desnitrificación, mientras que las bacterias reductoras de sulfato mostraron enriquecimiento de genes responsables de la utilización de hidrógeno. Urich y colaboradores en el 2014, estudiaron los respiraderos hidrotermales de aguas profundas, analizando la estructura y el funcionamiento de las comunidades microbianas en dos sedimentos de venteo difusos de los campos de venteo de Jan Mayen en el Mar de Noruega y Groenlandia, aplicando un enfoque integrado 'ómico' que combina metatranscriptómica, metaproteómica y metagenómica. El perfil de la comunidad demostro que los dos sedimentos albergaban comunidades muy similares dominadas por Epsilonproteobacteria, Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria, además de ciliados, nemátodos y varios taxones arqueales. Se identificaron vías metabólicas activas a través de transcripciones y péptidos, con genes de oxidación de azufre y metano, vías de fijación de carbono altamente expresadas, además de genes de cadenas respiratorias aerobias y anaerobias (nitrato y sulfato). La alta expresión de los genes de quimiotaxis y flagelos reflejaba un estilo de vida en un hábitat dinámico rico en gradientes fisicoquímicos.

En el extremo opuesto del espectro térmico, los ambientes fríos (formaciones de hielo, polos, montañas, aguas oceánicas profundas, fluviales y lacustres, sedimentos marinos y de agua dulce; suelos, cuevas, desiertos, sistemas de salmuera subglaciales y nubes) están poblados por miembros de los tres reinos, y han sido el foco de una investigación intensiva durante décadas. La biodiversidad, la fisiología y las estrategias adaptativas de los psicrófilos se han revisado ampliamente (Cowan *et al.*, 2015; Aliyu *et al.*, 2017), por ejemplo, el análisis del gen 16S RNAr a partir de DNA metagenómico proveniente de glaciares en Groenlandia con más de 120,000 años de edad, y muestras de hielo glacial de 150–400 años de antigüedad de tres glaciares diferentes en la meseta tibetana, revelaron que los grupos filogenéticos dominantes en este tipo de

ambientes son: α -Proteobacteria, β -Proteobacteria y γ -Proteobacteria, Bacteroidetes, Eubacterium, Clostridium, Bacteroidetes y Actinobacteria (Miteva *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). De manera más reciente, Kayani y colaboradores (2018) extrajeron DNA y RNA de muestras del hielo basal del glaciar Matanuska. Usando Illumina MiSeq y Secuenciación HiSeq, determinaron la diversidad microbiana mediante Shotgun y 16S RNA, reportando 9 genomas bacterianos parciales e identificaron vías metabólicas clave como la oxidación de azufre y la nitrificación, sugiriendo una prevalencia de metabolismos litotróficos y heterotróficos en el microbioma subglacial. En el 2019, Zaikova y colaboradores, a partir de dos tipos de biopelículas y suelo adyacente provenientes del lago Vanda en Wright Valley, utilizando análisis metagenómico identificaron genes con roles predichos en ciclo de nitrógeno y degradación de carbohidratos complejos, y vías metabólicas clave en ambientes extremos como respuesta al estrés, reparación del DNA y la esporulación.

En ambientes halófilos extremos, caracterizados por altas concentraciones de sal que pueden alcanzar hasta la saturación y un pH típicamente entre 9.5 y 1, se ha llevado a cabo la secuenciación aleatoria completa de metagenomas como: Santa Polasaltern en España, (13–37% de salinidad), el lago hipersalino Tyrell en Australia (29% de salinidad) y los estanques cristalizados en los EE. UU. (18–38% de salinidad), por mencionar algunos, que muestran niveles igualmente altos diversidad filotípica y el dominio general de Archaeas (Pasic *et al.*, 2009, Ghai *et al.*, 2011 Fernández *et al.*, 2014). El ensamblaje de la secuencia de novo de muestras metagenómicas de ambientes hipersalinos ha permitido el descubrimiento de clases denominadas “no cultivadas” como la Nanohaloarchaea, previamente detectada solo una vez por la secuenciación de amplicones 16S RNAr, pero ahora se sabe que es dominante en estos sistemas en todo el mundo, que posee una combinación única de aminoácidos proteicos que aumentan su resistencia osmótica, así como la flexibilidad de las proteínas (Ghai *et al.*, 2011).

El primer metagenoma completo secuenciado de un ambiente ácido fue obtenido a partir de una biopelícula, por Tyson y colaboradores en el 2004. Desde entonces, se ha reportado un total de 56 genomas de acidófilos que incluye 30 bacterias y 26 arqueas, siendo las especies de *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* y *Acidiphilium* predominantes en las comunidades acidófilas (Chen *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2016). Este tipo de genomas han proporcionado información sobre los mecanismos moleculares para la supervivencia de acidófilos, rutas metabólicas

específicas, como la fijación de C por el ciclo de Calvin-Benson-Bassham y / o la ruta de acetil-CoA, la fijación de N a través de un solo operón, o la generación de energía por oxidación de hierro ferroso, así como el entendimiento del funcionamiento de las comunidades acidófilas (Sharma *et al.*, 2016). Además, los datos metagenómicos de acidófilos se han empleado para desarrollar nuevas estrategias de cultivo para bacterias como *Leptospirillum ferrodiazotrophum*, denominada como no cultivable (Cowan *et al.*, 2015).

1.5 Zonas geotérmicas

Las zonas geotérmicas están presentes en muchos entornos geológicos y no están necesariamente relacionados con el vulcanismo. Los sistemas geotérmicos se distribuyen en todo el mundo de varias maneras en función de la fuente de calor, la transferencia de calor, la temperatura del yacimiento, estado físico, utilización y configuraciones geológicas (Axelsson *et al.*, 2000). Los sistemas geotérmicos se clasifican en: (a) sistemas volcánicos con fuente de calor como intrusiones calientes o cámaras de magma en la corteza, (b) sistemas convectivos con circulación de agua a gran profundidad en áreas tectónicamente activas de alto gradiente geotérmico, (c) sistemas sedimentarios conductores con capas permeables a gran profundidad (2-5 km), (d) sistemas geopresionados a menudo en conjunción con recursos petroleros, (e) sistemas EGS o de roca seca caliente, donde se encuentran masas anormalmente calientes de rocas de baja permeabilidad a profundidades perforables y (f) recursos poco profundos como áreas de gradiente. Pero en general, la clasificación utilizada comúnmente es de baja temperatura (LT) y alta temperatura (HT) (Saemundsson *et al.*, 2011, Masun 2015).

Los sistemas geotérmicos de alta temperatura son de origen volcánico / intrusivo y presentan temperaturas superiores a los 150 ° C a una profundidad de 1 km. Este tipo de sistema es muy utilizado para la generación de energía. Están situados con mayor frecuencia dentro o cerca de complejos volcánicos como las calderas, la mayoría de ellos en los límites de las placas tectónicas, pero algunos en áreas conocidas como puntos calientes. Las fracturas permeables y las zonas de falla controlan principalmente el flujo de agua en los sistemas volcánicos. Los acuíferos están unidos a estratos y / o controlados por las mismas. Muchos campos geotérmicos de alta temperatura se encuentran en áreas tectónicamente perturbadas como calderas, valles de grietas y áreas con fallas de bloques y están caracterizados por fumarolas, respiraderos de vapor, charcos

de lodo y suelo altamente alterado, así como líquidos y emanaciones de vapor. Este tipo de campos se encuentran con frecuencia en el área de la cordillera del Atlántico Medio (Islandia), la Grieta Continental (valle de la falla del África Oriental), el Anillo de Fuego (región del Pacífico) así como en regiones volcánicas (arcos volcánicos de margen continental o microcontinentales, arcos de volcanes jóvenes en islas y cuencas, regiones de compresión entre las placas oceánicas y continentales, puntos calientes, etc.). Estados Unidos, Filipinas, Islandia, Indonesia, Nueva Zelanda, Japón, Italia, México y Costa Rica son los principales países que utilizan las altas temperaturas geotérmicas de este tipo de zonas para la generación de energía (Saemundsson *et al.*, 2011).

Debido a las diferentes manifestaciones térmicas presentes en este tipo de ambientes como: biopelículas, lodos, manantiales, emanaciones de vapor, las zonas geotérmicas constituyen un excelente sitio para el estudio de comunidades microbianas termófilas e hipertermófilas, con capacidades metabólicas asociadas con sus características geotérmicas particulares (Brito *et al.*, 2014; Medrano-Santillana *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de los estudios científicos en este tipo de ambientes extremos se han enfocado a la geología y existen pocos reportes de la diversidad microbiana. Los microorganismos que habitan en este tipo de ambientes extremos pueden ser potencialmente una fuente de enzimas novedosas para biocatalizadores (Raddadi *et al.*, 2015) o podrían desarrollarse bioprocesos farmacéuticos y de biorremediación (Peeples, 2014) utilizando sus capacidades metabólicas. En México, existen varias zonas geotérmicas, la región atravesada por una gran cantidad de sitios geotérmicos y volcanes (maars, cenizas y conos de lava) que forman el Cinturón Volcánico Transmexicano (TMVB), en donde podemos encontrar campos geotérmicos como “Los Azufres” y “Los Humeros”, también se encuentra el Campo Volcánico Michoacán-Guanajuato (MGVF), que atraviesa la parte norte del estado de Michoacán y la parte sur del estado de Guanajuato, donde podemos ubicar el volcán Parícutín (Brito *et al.*, 2019), y en Chiapas donde podemos encontrar el volcán “El Chichón”. Hasta la fecha, la mayoría de los varios sitios geotérmicos en territorio mexicano aún no han sido explorados.

1.5.1 Diversidad a partir de estudios metagenómicos en zonas geotérmicas.

La diversidad biológica total de un ambiente determinado es especialmente alta cuando se considera que el gen 16S RNAr está altamente conservado (Caporasso *et al.*, 2011, Roselli *et al.*, 2016), y esto se ha reafirmado mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva (Vos *et al.*, 2012, Mehetre *et al.*, 2016). La diversidad y el papel de los microorganismos en entornos geotérmicos ha sido estudiada ampliamente alrededor del mundo. Sitios como el Parque Nacional de Yellowstone en EE. UU. ha sido ampliamente estudiado (Colman, 2015), donde los primeros estudios realizados en aguas termales basados en el análisis del gen del 16S RNA revelaron una gran diversidad, en contraste a las estimaciones de estudios previos, por técnicas dependientes del cultivo (López-López *et al.*, 2013). Desde entonces, la misma estrategia se ha utilizado para analizar los perfiles de la comunidad de aguas termales y zonas geotérmicas de todo el mundo, como en aguas termales en Japón (Nishiyama *et al.*, 2013), la Gran Cuenca Artesiana en Australia (Kimura *et al.*, 2005), Manantiales de aguas termales en Sudáfrica: Siloam, Souting, Tshipise, Mphephu y Sagole (Tekere *et al.*, 2011, 2015), aguas termales en India (Mehetre *et al.*, 2016, Saxena *et al.*, 2017), el campo geotérmico “Los Azufres” en Michoacán, México (Brito *et al.*, 2014).

Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han centrado en aguas termales, geiseres lodos y biopelículas, y existen pocos estudios sobre los suelos que rodean los respiraderos, explorando la diversidad microbiana asociada con las fumarolas o a las ventilas de vapor, estructuras predominantes en las zonas geotérmicas, en los que las condiciones geoquímicas locales permiten el desarrollo de microorganismos extremófilos (Costello *et al.*, 2009; Tomova *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Benson *et al.* 2011; Cuecas *et al.*, 2014; Wall *et al.*, 2015, Brito *et al.*, 2019).

A pesar de la ubicuidad de los sistemas geotérmicos en todo el mundo, existen pocos estudios que exploren la diversidad bacteriana asociada a las emanaciones producidas en el suelo de zonas con actividad volcánica. La mayoría de estos estudios se han realizado aplicando técnicas TRFLP o DGGE, frecuentemente acompañadas por análisis de bibliotecas de clones (Costello *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2011; Wall *et al.*, 2015).

Los primeros en describir la diversidad microbiana empleando un enfoque metagenómico en un campo geotérmico en México fueron Brito y colaboradores en el 2014. A partir de cinco muestras: dos esterillas microbianas, dos muestras de lodo y una proveniente de agua de cenote, caracterizadas por una alta acidez (pH entre 1 y 3) y temperaturas de 27 a 87 ° C, analizaron la diversidad en El Parque Nacional “Los Azufres”, que consiste en un sistema de manantiales hidrotermales ubicados en el Eje Volcánico Mexicano. Mediante 16S RNAr y T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism), identificaron las interacciones metabólicas dominantes de la comunidad presente. Los datos obtenidos de ambos enfoques sugirieron una baja diversidad bacteriana en las cinco muestras. A pesar de su proximidad, los puntos de muestreo mostraron diferencias en sus condiciones fisicoquímicas (principalmente temperatura y tipo de matriz), por lo tanto, exhibían diferentes poblaciones bacterianas dominantes, pero teniendo en común el dominio de las bacterias involucradas en los ciclos biogeoquímicos de azufre y hierro como los géneros *Rhodobacter*, *Acidithiobacillus*, *Thiomonas*, *Desulfurella* y *Thermodesulfobium*. Además, realizaron el aislamiento cepas de microorganismos sulfato y azufre reductoras.

Medrano-Santillana y colaboradores en el 2017, caracterizaron mediante el análisis de bibliotecas de genes T-RFLP y 16S RNAr, los parámetros físico-químicos y las comunidades bacterianas que habitan las fumarolas del volcán Parícutín, ubicado en Michoacán (México). Las fumarolas se caracterizaron por tener un rango de pH de 5.34 a 7.89, mostrando diferentes temperaturas (suelo 27–87 ° C; aire 13.6–56 ° C) con altas concentraciones de metales como hierro y arsénico. Las poblaciones bacterianas más abundantes en ambas bibliotecas, estaban relacionadas con miembros de los phyla Firmicutes y Proteobacteria, incluidas secuencias asociadas con termófilos y bacterias reductoras de sulfato. En general, el volcán Parícutín mostró baja diversidad bacteriana y no fue posible amplificar secuencias relacionadas con Archaea.

Prieto-Barajas y colaboradores en el 2018, analizaron la diversidad microbiana del sistema geotérmico de la región de Araró, México, mediante la secuenciación del gen 16S / 18S RNAr y un análisis metagenómico a partir de muestras obtenidas de esteras formadas en los manantiales “Tina-Bonita”, que presentan temperaturas entre 45 ° C y 78 ° C. Encontraron un total de 186 unidades taxonómicas operativas (OTU), de las cuales el 99.7% correspondían a bacterias, el 0.27% a eucariotas y el 0.03% a arqueas. Las bacterias correspondieron a 22 phyla, 36 clases, 74 familias, 105 géneros y 117 especies. Siendo los phyla dominantes Proteobacteria, Cloroflexi,

Firmicutes, Bacteroidetes y las Cianobacterias. Los índices de diversidad indicaron que las esteras microbianas provenientes de estos manantiales poseen una diversidad microbiana moderada. Así mismo detectaron un gran número de genes que participan en la fotosíntesis, incluido el transporte de electrones fotosintético, así como los fotosistemas I y II, y genes que participan en el metabolismo de azufre, nitrógeno y metano.

También en el 2018, Rincón-Molina y colaboradores determinaron la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas presentes en el cráter ácido y termofílico del volcán “El Chichón” Chiapas, a partir de dos muestras de sedimento a diferentes temperaturas (50°C y 92°C), mediante la secuenciación del gen 16S RNAr. El “Chichón” es un volcán activo ubicado en el Arco Volcánico de Chiapas que se caracteriza por altas temperaturas, bajo pH, así como grandes concentraciones de metales pesados. El análisis mostró que tanto la riqueza bacteriana y los índices de diversidad fueron mayores a 50 ° C que a 92 ° C. Reportaron 15 phyla en la muestra a 50 ° C dominado por actinobacterias, proteobacterias y acidobacterias, mientras en el sedimento a 92 °C detectaron nueve phyla, siendo los dominantes Firmicutes y Proteobacteria. El perfil predictivo funcional indicó que las vías metabólicas más importantes presentes en ambas muestras fueron las relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos, el transporte de membrana, la replicación y la reparación de DNA.

En el 2019, Brito y colaboradores estudiaron la diversidad bacteriana en los respiraderos de vapor de los volcanes Parícutín y Sapichu en Michoacán, México, caracterizados por temperaturas de 62 to 80 °C, y un pH de ligeramente ácido a neutro (5.3–7.9). A partir de tres muestras colectadas de piedras calientes ubicadas dentro de los respiraderos a 10–20 cm de profundidad, describieron la estructura de la comunidad procariota que era capaz de crecer en las paredes y rocas en ambos volcanes. Los análisis de las muestras presentaron índices de diversidad similares, con pocos OTUs dominantes, revelando una diversidad moderada de poblaciones bacterianas. Sin embargo, cada salida de vapor mostró un perfil de comunidad particular siendo las muestras PI dominado por bacterias fotosintéticas (Clases Cyanobacteria y Chloroflexy), PII por Actinobacteria y Proteobacteria, y S por clase Ktedonobacteria, Acidobacteria y Cyanobacteria. Con respecto al potencial metabólico, reportaron predominio de las vías celulares de generación de energía con metabolismos para la respiración de azufre, fijación de nitrógeno, metanogénesis, fijación de carbono, fotosíntesis, entre otros. Además, aislaron cuatro cepas anaeróbicas, pertenecientes a la clase Clostridia (*Clostridium sphenoides*, *C.*

swellfunanium y *Anaerocolumna cellulositytica*) y a la clase Bacilli (*Paenibacillus azoreducens*). Los autores concluyeron que las poblaciones bacterianas están adaptadas a las condiciones particulares y específicas de cada ambiente, como altas temperaturas, radiación solar indirecta y diferentes aceptores / donadores de electrones, que varían de un nicho a otro. La mayoría de las poblaciones detectadas fueron similares a las observadas en otros sitios geotérmicos, que muestran cierta capacidad termofílica, formación de esporas y capacidad para crecer en biomats.

1.5.2 “Los Humeros “

El sistema geotérmico "Los Humeros" se ubica en el extremo este del Cinturón Volcánico Trans-mexicano (Figura 1.3), que cubre aproximadamente 225 km del este de Puebla y el oeste de los estados de Veracruz, entre 97 ° 23' a 97 ° 31'W y 19 ° 35' a 19 ° 45'N. Las principales ciudades cercanas son Altotonga (Veracruz) y Teziutlán (Puebla) en el norte, Zacatepec (Puebla) en el sur, y Perote (Veracruz) en el sureste. La capital del estado de Veracruz, Jalapa, se encuentra a 53 km al sureste (Romero, 1991., Lorenzo-Pulido, 2008). Es una estructura de caldera múltiple con manifestaciones térmicas superficiales como fumarolas, suelos con alta temperatura y zonas de alteración (caolín), que liberan pequeñas cantidades de vapor debido a la naturaleza porosa del suelo, fallas y fracturas. Las temperaturas de superficie oscilan entre 50 y 89 ° C producen una mezcla de fluidos de baja salinidad, clasificados como bicarbonato, sulfato y cloruro de sodio, con un alto contenido de boro, amoníaco y arsénico y sobresaturado en sílice y calcita. Se encuentran entre 1400 y 700 msnm (1400 y 2100 m de profundidad) con temperaturas entre 290-360 ° C (Gutiérrez-Negrín y Izquierdo-Montalvo, 2010).

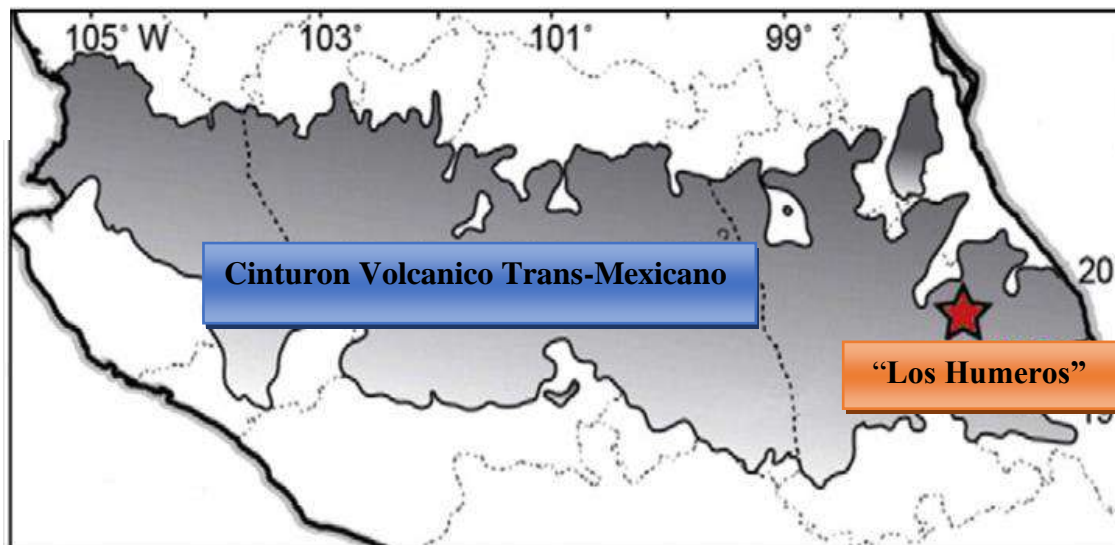


FIGURA 1.4. Ubicación de la zona geotérmica “Los Humeros” en el marco del cinturón trans-mexicano volcánico.

“Los Humeros” es el tercer campo geotérmico más importante en México después de Cerro Prieto y Los Azufres (Romo-Jones *et al.*, 2017). Gran parte de los recursos geotérmicos en México están asociados con entornos tectónicos activos, como complejos volcánicos activos o grandes calderas volcánicas que, combinadas con el flujo del sistema hídrico y los diferentes episodios de super erupciones formadoras de caldera, producen varios puntos de reservorios geotérmicos. Por lo tanto, el origen de muchos sistemas de reservorios geotérmicos en México están directamente vinculados a los procesos magmáticos y eruptivos que ocurrieron a través de complejos volcánicos silíceos (Carrasco- Núñez *et al.*, 2015). Siendo uno de los campos geotérmicos más antiguos de México, “Los Humeros” es bien conocido desde varias perspectivas desde principios de los años 90 y ha proporcionado varias muestras para análisis geoquímicos, litológicos, estratográficos, emanación de gases (Barragán *et al.*, 1991, González-Partida *et al.*, 1991; Martínez y Alibert, 1994, Carrasco -Núñez 2017, Arzate *et al.*, 2018, Peiffer *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes sobre la diversidad de los extremófilos presentes en esta zona geotérmica.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Describir la diversidad bacteriana y determinar la presencia de enzimas lipolíticas en la zona geotérmica “Los Humeros”.

2.1.1 Objetivos específicos

- Obtener cepas lipolíticas de la zona geotérmica “Los Humeros”.
- Caracterizar bioquímicamente las enzimas lipolíticas obtenidas de las cepas nativas.
- Comparar la diversidad bacteriana del metagenoma obtenido de muestras de suelo a diferentes profundidades.
- Realizar la búsqueda de genes para enzimas lipolíticas a partir del metagenoma obtenido de un cultivo de suelo enriquecido.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos se llevaron a cabo en la zona geotérmica los Humeros en el municipio de Chignautla, Puebla. El presente trabajo se dividió en dos etapas: 1) dependiente de cultivo e 2) independiente de cultivo. En la primera, a partir de sustratos provenientes de la alberca de desfogue de la planta geotérmica los Humeros se realizó el aislamiento y obtención de cultivos puros, así como la selección de cepas con actividad lipolítica para su caracterización parcial. Además, se colectaron dos muestras de suelo a diferentes profundidades (15 y 50 cm), provenientes de un punto de vapor. Se utilizó suelo de la muestra obtenida a 15 cm para inocular medio enriquecido con aceite, obteniéndose el DNA total para la secuenciación masiva (Shotgun sequencing) y el análisis de diversidad bacteriana y enzimática. En la etapa independiente de cultivo, se obtuvo el DNA metagenómico (DNAm) de dos muestras de suelo, para la secuenciación del gen del 16S RNAr, así como el análisis de diversidad (Figura 3.1). Los componentes de los medios de cultivo para el presente trabajo, así como los reactivos utilizados adquiridos de las compañías Sigma-Aldrich®, J.T. Baker®, BioRad®, Millipore-Merck® y Promega®.

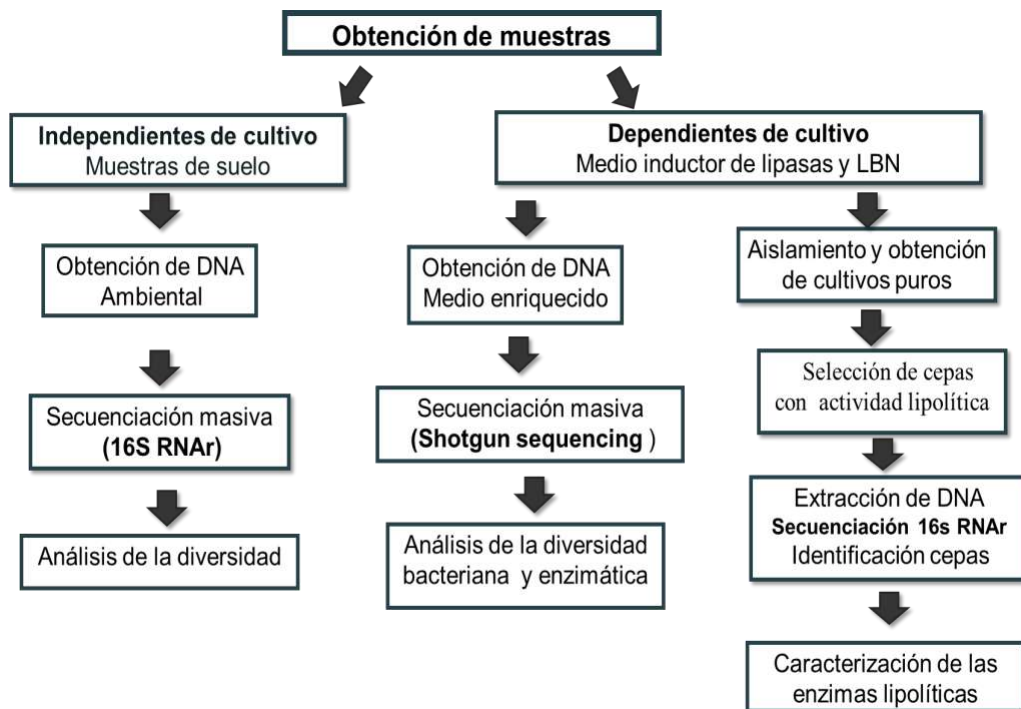


FIGURA 3.1. Diagrama de flujo de las etapas del proyecto.

3.1 Lugar de muestreo

Las muestras de sustrato para el aislamiento de bacteriano y obtención de cultivos puros para la selección de cepas con actividad lipolítica para su caracterización parcial fueron colectadas en la alberca de desfoque de la planta geotérmica “Los Humeros” en la cual se condensa el vapor extraído de las zonas profundas de la caldera a 1.2 Km de profundidad, en el apéndice A se muestra el diagrama de la alberca. Las muestras de suelo para la obtención de DNA metagenómico, enriquecimiento y posterior aislamiento de bacterias fueron colectadas en el mes marzo, en la zona geotérmica “Los Humeros”, situada en el Municipio de Chignautla, al este de Puebla y al oeste de Veracruz (México ($19^{\circ} 40' 41.1''$ N $-97^{\circ} 27' 16.7''$ W), a 2800 metros sobre el nivel del mar. Consta de una estructura de caldera múltiple con manifestaciones térmicas superficiales de temperaturas entre 50 y 90° C (Figura 3.2).

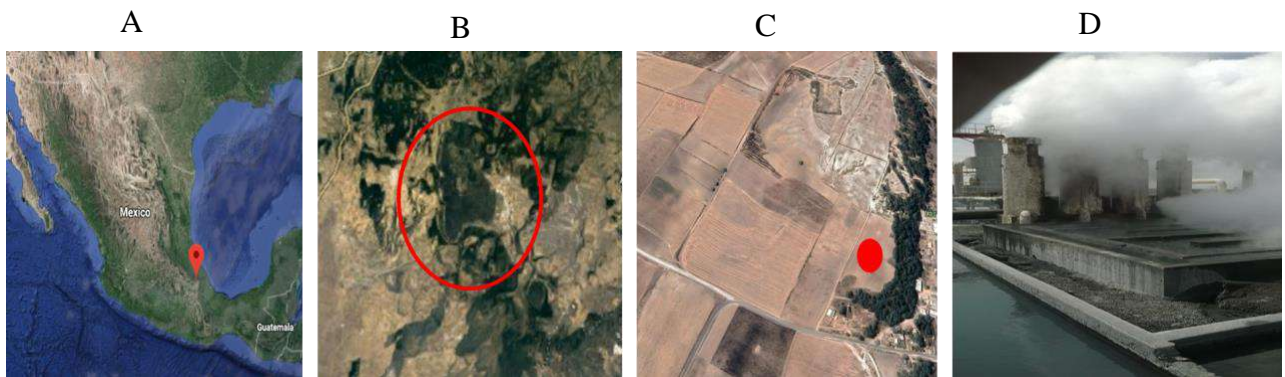


FIGURA 3.2. A) Ubicación de la zona geotérmica "Los Humeros" en el sector oriental del Cinturón Volcánico Transmexicano. B) vista panorámica de la estructura principal de la caldera (círculo rojo) en cuyo interior se encuentra el campo geotérmico, C) el punto rojo indica el sitio de muestreo de suelos y D) alberca de condensación de la planta geotérmica “Los Humeros” (Imagen de satélite Landsat (Google Earth).

Las muestras de suelo fueron tomadas directamente de un punto de vapor (ver Figura 3.3), uno de los únicos tres lugares reportados con una ocurrencia natural de manifestaciones térmicas en “Los Humeros” (Norini *et al.*, 2015, Peiffer *et al.*, 2018), caracterizado por temperaturas de 80° - 90° C.



FIGURA 3.3. Fotografías del punto de muestreo en la zona geotérmica “Los Humeros”

3.2. Obtención de muestras.

Se colectaron dos tipos de muestra: sustratos provenientes de los sedimentos laterales acumulados en la alberca de desfogue de la planta geotérmica los Humeros (Figura 3.4) y de muestras de suelo de aproximadamente 100 g a dos profundidades diferentes, 15 cm y 50 cm, designadas como P-15 y P-50. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas, estériles selladas y rotuladas, y fueron transportadas al laboratorio en una hielera acondicionada con una manta térmica para conservar la temperatura. En el laboratorio las bolsas con sustrato fueron colocadas en un agitador orbital a 80 °C y mantenidas a temperatura constante hasta su procesamiento.

En el sitio de muestreo se inocularon matraces de 250 mL con medio LB y con medio Schmidt-Dannert (Tabla 3.1 y 3.2), con 10 g de sustrato P-15, al inóculo en medio Schmidt-Dannert se designó como ES. Los matraces fueron rotulados y transportados en una hielera acondicionada con manta térmica para conservar la temperatura de las mismas hasta su procesamiento. En el laboratorio, los matraces fueron colocados en un agitador orbital a 80 °C y 40 rpm, hasta que se observó cambio en la turbidez del medio (24-36 h aproximadamente).

3.3 Etapa dependiente de cultivo

3.3.1 Medios de cultivo y crecimiento.

Los componentes de los medios de cultivo para el presente trabajo, así como los reactivos utilizados adquiridos de las compañías Sigma-Aldrich®, J.T. Baker®, BioRad®, Millipore-Merck® y Promega®.

El medio inicial empleado para el aislamiento fue el medio Luria Bertani (LB, Maniatis *et al.*, 1982) cuya composición se muestra en la Tabla 3.1. Previo a la esterilización, el pH del medio fue ajustado a 6.5, utilizando hidróxido de sodio 1N. La temperatura de incubación fue de 60 °C.

TABLA 3.1
Formulación de medio LB.

Componente	Concentración (g/L)
Bacto triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
*Agar bacteriológico	20.0

*Para medio sólido

El medio empleado para el crecimiento de la muestra enriquecida (ES) y la obtención de los extractos enzimáticos fue el medio Schmidt-Dannert modificado por Sánchez-Otero y colaboradores en el 2011, cuya composición se muestra en la Tabla 3.2.

TABLA 3.2
Formulación de medio Schmidt-Dannert modificado

Componente	Concentración (g/L)
Goma arábica	7
Caldo nutritivo	3.8
Cloruro de calcio	1.0
Aceite de cártamo alto oleico	2.5 % (v/v)

Por otro lado, se prepararon cajas Petri con medio LBN a pH 7.0 (Tabla 3.3), en las cuales se agregaron dos gramos de cada sustrato, fueron rotuladas y etiquetadas debidamente y cultivadas en incubadora a 60 °C hasta la formación de colonias. Posteriormente, las cajas fueron etiquetadas y guardadas en refrigeración a 4 °C.

Posteriormente para el crecimiento, aislamiento y conservación se empleó una variante del medio LB cuya composición se muestra en la Tabla 3.3, al cual, se le adicionó en una proporción del 30% (v/v) agua proveniente de la planta geotérmica “Los Humeros”, denominado LBN. Previo a la esterilización, el pH del medio de cultivo fue ajustado a 7.0, utilizando hidróxido de sodio 1 N. La temperatura de incubación fue de 60 °C

TABLA 3.3
Formulación de medio LBN

Componente	Concentración (g/L)
Bacto triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de carne	5.0
*Agar bacteriológico	10.0
** Agua HM	30% (v/v)

* Para medio sólido

** Agua HM = Agua de Los Humeros, el agua fue adicionada previo a la esterilización del medio.

3.3.2 Obtención de cultivos puros

A partir de los matraces y cajas Petri que presentaron crecimiento o turbidez se procedió a realizar resiembras en cajas Petri con agar LBN, las cuales fueron incubadas a 60 °C, hasta la observación de colonias. Para conservar un ambiente húmedo durante la incubación, se colocaron las cajas selladas con parafilm y cinta teflón. Posteriormente se procedió a obtener cultivos axénicos de cada una de las colonias, para lo cual se llevaron a cabo resiembras en el mismo medio bajo las mismas condiciones. Para asegurar la obtención de cultivos puros se realizaron tinciones de Gram y se observaron al microscopio. Una vez obtenidas las cepas puras se conservaron en glicerol estéril al 80 % a -70 °C, para lo cual se cultivó una colonia de cada cepa en 50 mL de LBN en matraces Enrlenmeyer de 250 mL a 60 °C, hasta alcanzar una D. O de 0.6 – 0.8 (600 nm). Del cultivo se tomaron 0.4 mL y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL junto con 0.1 mL del glicerol estéril al 80 % para ser almacenados.

3.3.3 Pruebas de actividad lipolítica.

Obtenidas las cepas, se analizó la posible actividad lipolítica mediante la técnica de Dot Blot, siembra en placas de agar con tributirina o rodamina B y confirmándose dicha actividad mediante zimogramas.

3.3.3.1 Obtención del extracto crudo para pruebas de actividad lipolítica

Para la obtención del extracto crudo se utilizaron tubos de ensayo con 2.5 mL de medio LBN. A cada tubo se le adicionaron 500 μ L de la cepa correspondiente (conservada en glicerol), y se cultivaron durante 12 h en agitación orbital a 40 rpm, a 60 °C. Posteriormente se inoculó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio, durante 12 h a 150 rpm y 60 °C.

Se recuperó el paquete celular por centrifugación a 15,000 xg a 4°C durante 5 min en una microcentrífuga Eppendorff® 5415R y se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M, pH 6.5. Las células fueron mantenidas en hielo y lisadas con un equipo de sonicación Ultrasonic processor mediante nueve pulsos de 30 s con descansos de 35 s entre ellos. Posterior a la ruptura celular, se recuperó la parte soluble por centrifugación 15, 000 xg por 5 min, 10 °C, el cual fue utilizado para la determinación de la actividad lipolítica mediante un ensayo de Dot Blot.

3.3.3.2 Ensayo de Dot Blot.

El tamiz preliminar para la selección de cepas con actividad lipolítica se llevó a cabo mediante la técnica de Dot Blot, utilizando como sustrato 4-metilumbeliferona (MUF). Se colocaron 5 μ l de extracto crudo de cada cepa sobre papel filtro impregnado con 5 μ l de MUF. Las muestras se dejaron secar durante 5 min y fueron observadas en un transiluminador de luz UV a 365 nm. Se tomó como resultado positivo la observación de fluorescencia de las muestras. Las cepas positivas en esta prueba fueron sembradas en placas de agar con tributirina y rodamina B.

3.3.3.3 Medios de cultivo para actividad lipolítica.

Para identificar la actividad lipolítica de los cultivos se realizaron resiembras en placas de agar con tributirina 1.5 % (v/v) como fuente de carbono y medio de inducción, cuya formulación se muestra en la Tabla 3.4, y placas de agar con rodamina B y aceite de cártamo alto oléico al 2.5 %. (Tabla 3.5). Las placas de tributirina que presentaron halo de hidrólisis fueron tomadas como positivas a actividad esterasa. Las cepas de rodamina B fueron analizadas bajo luz UV (365 nm) donde la fluorescencia alrededor del cultivo indicó actividad de lipasa.

TABLA 3.4
Formulación del medio con tributirina para determinar actividad lipolítica

Componente	Concentración
Tributirina	1 % v/v
Caldo nutritivo	8.0 g/L
Cloruro de sodio	4.0 g/L
Agar	10 g/L
*Glucosa	0.2 % p/v

*La glucosa fue disuelta en agua destilada estéril y esterilizada por filtración con membrana de 0.22µm y agregada al medio después de esterilizar

TABLA 3.5
Formulación del medio con Rodamina B para determinar actividad lipolítica.

Componente	Concentración
Aceite de cártamo alto oleico	2.5% p/v
Caldo nutritivo	8.0 g/L
Cloruro de sodio	4.0 g/L
Agar bacteriológico	10.0 g/L
* Rodamina B	0.001 %

*La rodamina B fue disuelta en agua destilada estéril y esterilizada por filtración con membrana de 0.22 µm.

3.3.4 Identificación taxonómica.

La identificación taxonómica de las cepas con actividad lipolítica se basó en el análisis de las secuencias del gen del 16s RNAr, obtenido mediante PCR.

3.3.4.1 Obtención de DNA de colonias.

Las cepas positivas a actividad lipolítica se cultivaron a 60 °C en cajas Petri con agar LBN, y posteriormente se tomó una asada de la colonia, la cual fue resuspendida en condiciones estériles en tubos Eppendorf conteniendo 50 µL de agua libre de nucleasas. Los tubos fueron incubados a 100 °C durante 5 min en un termoblock y se centrifugaron las muestras durante 5 min a 4 °C a 15,000 xg en una microcentrífuga Eppendorff® 5415. El DNA en el sobrenadante fue utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen del 16S RNAr de cada cepa para posterior secuenciación e identificación.

3.3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron en un termociclador Thermal-Cycler T100 (Bio-Rad®). Las mezclas de reacción para la PCR se prepararon utilizando el reactivo Mastermix® de Promega® de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

3.3.4.3 Condiciones de PCR para el gen 16S RNAr de las cepas aisladas.

Para la amplificación del gen del 16S RNAr se utilizaron los primers universales 1030F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) y 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3') (Farrelly *et al.*, 1995; Turner *et al.* 1999). Para el cálculo de la temperatura de fusión (Tm) se utilizó la regla de Wallace (Suggs *et al.*, 1981; Thein y Wallace 1986):

$$T_m = 4\text{ °C} \times (G + C) + 2\text{ °C} \times (A+T)$$

El valor de T_m para la reacción fue de 55 °C; los tiempos, temperaturas de desnaturalización y polimerización para las reacciones de PCR se muestra en la Figura 3.4.

Los ciclos de la PCR fueron los siguientes:

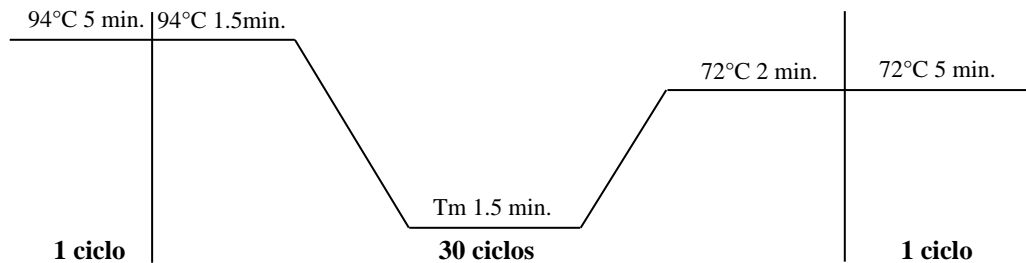


FIGURA 3.4 Ciclos de temperatura y tiempos para la PCR del gen 16S RNAr

3.3.4.4 Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa.

Para el análisis del DNA metagenómico y los productos de PCR se utilizó electroforesis horizontal en geles de agarosa con una celda de electroforesis mini subcell (BioRad). Los geles fueron preparados utilizando el amortiguador TAE (ver apéndice B) y agarosa grado electroforesis. La agarosa fue fundida en horno de microondas durante 40 seg, posteriormente se le adicionaron 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para la carga de las muestras se utilizó una mezcla con 5 μL de DNA y 2 μL de amortiguador carga de la muestra 6X (apéndice B). Los geles se corrieron a 80V durante 40 min. Se utilizó el marcador de tamaño molecular de 1kb de Promega®. Los geles fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador Gel DocTM XR+ Imagin Systemn (Bio- Rad®).

3.3.4.5 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega ®), los cuales utilizan una membrana de sílica para purificar el DNA, que posteriormente es liberado por un cambio en la polaridad de la membrana por el paso de agua miliQ®. Una vez purificados los productos de PCR, se determinó la concentración en un Spectrofotómetro NANODROP 2000 para su posterior secuenciación.

3.3.4.6 Secuenciación y análisis de los productos de PCR.

La secuenciación de los productos de PCR a partir de las cepas positivas a actividad lipolítica, se llevó a cabo por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Estas secuencias fueron visualizadas y analizadas con el programa Snapgene 3.2.1, y posteriormente utilizadas para la identificación taxonómica por comparación con otros microorganismos reportados en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.3.4.7 Elaboración de árboles filogenéticos.

Para realizar el análisis filogenético se utilizaron las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos “Forward” (F) y “Reverse” (R), que se procesaron en el programa SnapGene® Viewer 3.21. Para el caso de la secuencia (R) se obtuvo el reverso complementario (RRC). Tanto las secuencias F como las RRC se analizaron por separado con el programa en línea BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). Para el análisis se eligieron secuencias de microorganismos previamente reportados que presentaron el mayor porcentaje de similitud (97-99 %). Con el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) se compararon las secuencias de estudio (tanto F como las RRC), se eliminaron las zonas más disímiles de cada secuencia (F y RRC), y se unieron en la región donde ambas se empalman. Las secuencias generadas a partir de la unión F y RRC se analizaron nuevamente por Blast y EzBioCloud (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov; www.ezbiocloud.net), determinándose la identidad de cada especie. Con el programa Clustalw GenomeNet (www.genome.jp) se generó el árbol filogenético de los organismos aislados empleándose el producto de la unión de las secuencias F y RRC de las cepas analizadas, junto con las de las especies con mayor porcentaje de similitud de secuencia.

3.3.5 Determinación del número de enzimas lipolíticas.

Para llevar a cabo la caracterización de las cepas lipolíticas, se llevó a cabo la determinación del número de enzimas mediante la visualización de bandas por medio de zimogramas a partir de geles de poliacrilamida. Una vez determinado el número de bandas se realizaron los ensayos correspondientes para la caracterización parcial de aquellas que presentaron una sola banda de actividad.

3.3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (SDS-PAGE) se utilizó para visualizar el patrón de proteínas producidas por las cepas aisladas. Las cepas fueron reactivadas utilizando tubos de ensayo con 2.5 mL de medio LBN (Tabla 3.3). A cada tubo se le adicionaron 500 μ L de la cepa correspondiente (conservada en glicerol), y se cultivaron durante 12 h en agitación orbital a 150 rpm, a 60 °C. Posteriormente se inoculó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio inductor de lipasas descrito en el apartado 3.3.1. Se recuperó el paquete celular por centrifugación a 12857 xg a 10°C durante 15 min en una centrifuga eppendorf 5810 R, el paquete celular fue resuspendido en amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M, pH 6.5 y posteriormente lisadas con un equipo de sonicación Ultrasonic processor mediante nueve pulsos de 30 s con descansos de 35 s entre ellos. Posterior a la ruptura celular, se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 12857 xg por 5 min, 10 °C. Se analizó el sobrenadante y el debris celular por electroforesis, el volumen final de solución de carga fue de 20 μ L. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo ala técnica reportada por Laemmli (1970), que se describe en el apéndice C. La corrida se realizó por 2 h 30 min a 80 V. Los geles fueron teñidos de acuerdo a la técnica reportada por Syrový y Hodny (1991).

3.3.5.2 Zimograma

La identificación de la actividad lipolítica de las bandas de proteínas de los geles de poliacrilamida fue determinada por zimograma de acuerdo a la técnica reportada por Prim *et al.*, (2004). Una vez terminada la corrida, los geles fueron lavados a temperatura ambiente en una solución de Tritón X-100® al 2.5% por 30 minutos. Posteriormente, se retiró la solución de Tritón X-100® y se realizaron dos lavados con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7 por 20 min. Después del segundo lavado, se retiró el amortiguador y se cubrió el gel con una solución de sustrato compuesta por 200 μ L de metilumberiferil-laurato 25 mM más 10 mL de amortiguador de fosfato de potasio pH 7.0. Se incubó por 2 min en agitación orbital a temperatura ambiente y finalmente se colocó el gel en el fotodocumentador bajo luz UV. La aparición de bandas fluorescentes indicó la presencia de proteínas con actividad lipolítica.

3.3.6 Caracterización de las enzimas lipolíticas.

La caracterización bioquímica de las enzimas se realizó a partir del sobrenadante recuperado después de la lisis celular por sonicación, al cual se le denominó intracelular, y del medio libre de células recuperado después del cultivo en medio inductor de lipasas, el cual se designó como sobrenadante. Se evaluó el efecto de la exposición de ambos extractos enzimáticos a diferentes temperaturas, valores de pH, y se determinó la preferencia de cadena, efecto de iones y de inhibidores en la actividad, así como la estabilidad en solventes orgánicos.

3.3.6.1 Obtención de los extractos los enzimáticos para caracterización.

Para la obtención del extracto crudo se utilizaron tubos de ensayo con 2.5 mL de medio LBN. A cada tubo se le adicionaron 500 μ L de la cepa correspondiente (conservada en glicerol), y se cultivaron durante 12 h en agitación orbital a 150 rpm, a 60 °C. Posteriormente, se inoculó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio inductor de lipasas (descrito en el apartado 3.3.1), durante 12 h a 150 rpm y 60 °C. Una vez transcurridas las 12 hrs, se agregó Tritón X-100® al 1% v/v y se cultivaron por 12 h, una vez transcurrido este tiempo, se tomaron 10 mL de medio y se reinocularon en matraces de 250 mL de medio LBN, dejándose en las mismas condiciones 8 h adicionales. Se recuperó el paquete celular por centrifugación a 12857 xg a 10 °C durante 15 min en una centrífuga Eppendorf 5810 R y se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M, pH 6.5. Se realizaron dos lavados a cada paquete celular, centrifugando nuevamente entre lavados. Las células fueron mantenidas en hielo y lisadas con un equipo de sonicación Ultrasonic processor mediante nueve pulsos de 30 s con descansos de 35 s entre ellos. Posterior a la ruptura celular, se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 12857 xg por 15 min 10 °C, el cual se denominó intracelular.

Adicionalmente se recuperaron 50 mL de medio de cultivo libre de células obtenido después de la primera centrifugación, el cual fue filtrado empleando membranas de 0.45 μ m, y se denominó sobrenadante.

3.3.6.2 Determinación de la actividad enzimática

Para la valoración de la actividad lipolítica se utilizó la técnica reportada por Nawani *et al.* (1998). En esta técnica se utilizan p-nitrofenil-ésteres como sustratos, que en presencia de lipasas se hidrolizan, generando un compuesto colorido (p-nitrofenol) el cual es medido espectrofotométricamente a 420 nm.

La mezcla de reacción consistió de 100 μL de extracto enzimático crudo, 800 μL de amortiguador de fosfato de potasio 0.05M (pH 6.5), y 100 μL de p-nitrofenil laurato 0.01 M en etanol absoluto. Se incubó a 60°C durante 30 minutos, adicionando al término de estos 250 μL de Na_2CO_3 0.1M. La mezcla se centrifugó a 13,000 x g durante 15 minutos a 25°C en una microcentrífuga Eppendorff® 5415R, se tomaron alícuotas y se midió la absorbancia a 420 nm en un lector de micro placas Stat Fax® 2100 (Awareness Technologies). Se utilizó un blanco sin extracto enzimático como testigo. Cada experimento se realizó por triplicado. La actividad enzimática se calculó de acuerdo al coeficiente de extinción molar del p-nitrofenil laurato a 420 nm (4.6 $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Una unidad de lipasa está definida como la cantidad de enzima que libera 1 μM de p-nitrofenol bajo las condiciones de ensayo en 30 min. El cálculo de unidades de actividad se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidad} = \frac{\text{Absorbancia a 410 nm}}{(4.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) (1 \text{ cm})} * 1000 * (\text{dilución})^{-1}$$

3.3.6.3 Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteína en las muestras fue determinada por el método de Bradford *et al.* (1976). Se emplearon microplacas para llevar a cabo el ensayo. En cada pozo se colocaron 5 μL de muestra y un blanco con 5 μL de solución amortiguadora de fosfato de potasio al 0.05 M, pH 6.5, se agregaron 0.25 mL de reactivo de Bradford a temperatura ambiente; la placa se colocó en un lector de micro placas Stat Fax® 2100 (Awareness Technologies) donde se agitó por 45 s y se dejó incubar por 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, fueron realizadas las lecturas de absorbancia a 600 nm. Para la elaboración de la curva tipo se utilizó albumina sérica bovina

(ASB) disuelta en solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 en concentraciones de 0.2 a 1 mg/mL.

3.3.6.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de las muestras denominadas intracelular y sobrenadante (medio libre de células), se realizó la determinación de la actividad lipolítica descrita en el apartado 3.3.6.2 a diferentes temperaturas: 30,40, 50, 60,70, 80 y 90°C. El pH del amortiguador de fosfato de potasio (0.05 M) se ajustó a pH 6.5 en función de cada una de las temperaturas de ensayo. La actividad se expresó como actividad relativa (%).

En el caso del efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los extractos, se llevó a cabo la incubación de la enzima a 50, 60,70, 80 y 90°C durante 1 h. Una vez transcurrido ese tiempo, se determinó la actividad lipolítica a 60°C. La actividad se expresó como actividad relativa (%).

3.3.6.5 Efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de los extractos enzimáticos, se realizó la determinación de la actividad lipolítica descrita en el apartado 3.3.6.2, empleando diferentes tipos de amortiguadores: acetato de sodio 0.05 M (pH 4.0, 5.0), fosfato de potasio 0.05 M (pH 6.0, 7.0 y 8.0), CHES 0.05 M (pH 9.0 y 10.0). En todos los casos el pH fue ajustado a 60°C.

En el caso del efecto del pH sobre la estabilidad de los extractos, se llevó a cabo la incubación de la enzima a pH 4.0, 5.0, 6.0,7.0,8.0, 9.0 y 10.0 durante 1 h a 30°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se determinó la actividad lipolítica descrita en el apartado 3.3.6.2.

3.3.6.6 Efecto de la presencia de iones metálicos sobre la actividad enzimática.

Para evaluar el efecto de la presencia de iones metálicos sobre la actividad de ambos extractos enzimáticos, se realizó una incubación de alícuotas de 500 µL de enzima y 500 µL de una solución acuosa de sales mono y divalentes al 1 mM de CaCl₂, KCl, MgCl, NaCl, BaCl₂, HgCl₂ y LiCl durante 1 h a 30°C y enseguida se realizó la determinación de la actividad lipolítica descrita en el apartado 3.3.6.2.

3.3.6.7 Efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la actividad enzimática.

Para evaluar el efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la actividad de ambos extractos enzimáticos, se realizó una incubación de alícuotas de 500 μ L de enzima y 500 μ L de una solución acuosa de EDTA (1mM), β -Mercapto etanol 1% v/v, Tritón X-100® 1% (v/v), Tween 20® 1% (v/v) y SDS (dodecil sulfato de sodio) al 0.1% (p/v). Se mantuvieron en incubación durante 1 h a 30 °C, seguida del ensayo de actividad lipolítica descrita en el apartado 3.3.6.2.

3.3.6.8 Estabilidad en presencia de solventes orgánicos

Para evaluar la estabilidad de ambos extractos enzimáticos en presencia de solventes orgánicos se realizó una incubación de 0.5 mL de cada extracto con 0.5 mL de disolvente (metanol, etanol, butanol, terbutanol, 1-propanol, 2-propanol, octanol, acetona y hexano). Los extractos se incubaron por 1 h a 30 °C y enseguida se realizó el ensayo de actividad lipolítica descrito en la sección 3.3.6.2.

3.3.6.9 Determinación de la preferencia de longitud de cadena del sustrato.

Para determinar la preferencia de longitud de cadena del sustrato de la muestra denominada intracelular y sobrenadante (medio libre de células), se realizó el ensayo de actividad descrito en el apartado 3.3.6.2 con distintos compuestos de p-nitrofenol, variando en cada caso la longitud de la cadena del ácido graso (C:8, C:10, C:12, C:14, C:16 y C:18).

3.3.6.10 Obtención de DNA de la muestra enriquecida.

Para la muestra de enriquecimiento (ES) se inocularon 10 gr de suelo en 120 mL de medio selectivo descrito en el apartado 3.3.1, y se incubó en agitación orbital a 150 rpm durante dos días a 80 ° C; el paquete celular se recuperó por centrifugación. Para la extracción de DNA se utilizó el kit ultraClean Microbial DNA Isolation de MOBIO®. Las extracciones se realizaron según las instrucciones del proveedor. La concentración se determinó en un Spectrofotómetro NANODROP 2000. El procedimiento incluyó una purificación de DNA en columna giratoria y no se necesitó más purificación antes de la PCR y la secuenciación masiva (Shot Gun).

3.3 Etapa independiente de cultivo

3.4.1 Obtención de DNA metagenómico

Para la obtención de DNA proveniente de las dos muestras de suelo (P-15 y P-50), se utilizó el kit PowerMax Soil DNA isolation de MOBIO®. Las extracciones se realizaron según las instrucciones del proveedor. Se utilizaron 10 g de homogeneizado de suelo en suspensión. El DNA extraído se eluyó hasta un volumen final de 5 mL y posteriormente se concentró en un equipo miVac hasta reducir el volumen total a 100 µL. El metagenoma se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5 % p/v descrito en el apartado 3.3.4.4, y la concentración se determinó un Spectrofotómetro NANODROP 2000. No se realizaron purificaciones adicionales. El DNA metagenómico fue conservado a -70 C hasta el envío para la secuenciación del gen del 16S RNAr a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT).

3.4.3 Secuenciación y análisis de DNA metagenómico y enriquecido.

La secuenciación del DNA metagenómico, de las muestras directas de suelo (P15 Y P50), así como del medio enriquecido (ES) se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT), que cuenta con un equipo de secuenciación masiva de DNA de última generación, el Genome Analyzer IIx (GAIIx) de la compañía Illumina.

Para la secuenciación masiva de escopeta (Shot gun), se preparó una biblioteca de Illumina a partir del ADN total de cada muestra, utilizando el kit TruSeq v2 (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo las especificaciones del fabricante con un tamaño medio de los fragmentos de 500 bp. La secuenciación se realizó en la plataforma NextSeq500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) con una configuración de 150 ciclos, generando lecturas emparejadas con una longitud de 75 bp.

Para la secuenciación de amplicones (16S RNAr), el DNA obtenido de la muestra enriquecida en aceite se utilizó para amplificar las regiones variables del gen V3-V4 16S RNAr, utilizando los primers específicos S-D-Bact-0341-b-S-17 y S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth *et al.*, 2013). Las bibliotecas de los amplicones se construyeron de acuerdo con el protocolo 16S

Metagenomic Sequencing Library Preparation de Illumina y se secuenciaron en la plataforma Illumina MiSeq con una configuración de lectura de extremos emparejados de 600 ciclos.

El análisis de control de calidad de las secuencias se llevo a cabo con el programa FASTQC (Andrews, 2010), las secuencias de baja calidad se eliminaron utilizando un script Perl interno. El perfil taxonómico se generó a partir de lecturas crudas filtradas utilizando el software MetaPhlan v2.0 (Duy Tin Truong, Adrian Tett, Edoardo Pasolli, Curtis Huttenhower, 2017) utilizando los siguientes parámetros: `--bt2_ps sensitive-local --min_alignment_len 60 --input_ escriba fastq`. Las lecturas que pasaron los filtros de control de calidad (calidad de lectura Q20) fueron utilizadas para reconstruir la región de amplificación original (450-490 bp de longitud) superponiéndose con el software Flash v1.2.7 (Mago y Salzberg, 2011). Se descartaron todas las secuencias que no fueron superpuestas. La anotación taxonómica y los gráficos Krona se generaron utilizando Parallel-meta pipeline v2.4.1 (Su *et al.*, 2014) contra la base de datos Metaxa2 v2.1.1 (Bengtsson-Palme *et al.*, 2015) como se describe en (Escobar-Zepeda *et al.*, 2018).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Lugar de muestreo y toma de muestra

El muestreo del presente trabajo se llevó a cabo en la zona geotérmica "Los Humeros" la cual se encuentra al este de Puebla y al oeste del estado de Veracruz (México). Con una estructura de caldera múltiple presenta altas temperaturas en el reservorio ($\sim 300 - 400$ ° C) y temperaturas superficiales que oscilan entre 50 y 90 ° C. Presenta manifestaciones térmicas superficiales de emanación de vapor puntuales cuyo flujo ascendente desde el depósito hacia la superficie está limitado por depósitos de ignimbrita soldada que actúan como una barrera de baja permeabilidad (Gutiérrez-Negrín y Izquierdo-Montalvo, 2010). A la fecha han sido reportadas tres áreas con manifestaciones térmicas evidentes (alta temperatura del suelo y emisión de vapor visible) denominadas: Humeros Norte (HN), Humeros Sur (HS) y Xalapazco (XA) (Peiffer *et al.*, 2018) (Figura 4.1). Al igual que otros recursos geotérmicos en México, este sitio está altamente asociado con entornos tectónicos activos y combinado con el flujo del sistema hídrico, por lo tanto, el origen de los sistemas de reserva de vapor geotérmico en "Los Humeros" está directamente relacionado con los procesos magmáticos (Carrasco - Nuñez *et al.*, 2015).

Las muestras de suelo fueron recolectadas en las coordenadas geográficas $19^{\circ} 40' 41.1''$ N $-97^{\circ} 27' 16.7''$, ambas muestras fueron tomadas en el mismo punto a diferente profundidad y denominadas como P-15 y P-50 (15 cm y 50 cm respectivamente). De acuerdo con los datos obtenidos por Norini y colaboradores en el 2015 mediante el uso de imágenes infrarrojas térmicas a través del Radiómetro de Emisión Térmica y Reflexión Avanzada Spaceborne (ASTER), y los datos de medición de flujo en la desgasificación del suelo obtenidos por Peiffer *et al.*, (2018), las muestras P-15 y P-50 fueron colectadas en uno de los únicos tres lugares reportados que presentan una ocurrencia natural de manifestaciones térmicas en "Los Humeros", designado como los Humeros norte, el cual se encuentra alineado en una dirección NNW-SE con la falla principal de la caldera, y presenta emanaciones de CO_2 , CH_4 y H_2S , siendo la única de las tres áreas reportadas que presenta una temperatura elevada del suelo, cercana al punto de ebullición (90.6 ° C) (Norini *et al.*, 2015 Peiffer *et al.*, 2018)

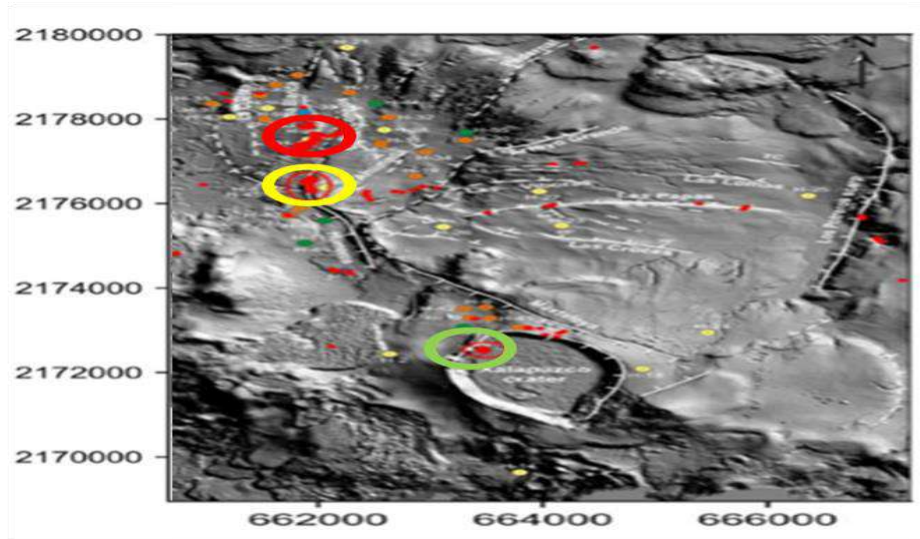


FIGURA 4.1 Ubicación de las tres áreas con manifestaciones térmicas de la zona geotérmica “Los Humeros”. El círculo rojo, corresponde a Humeros Norte (HN), el círculo amarillo a Humeros Sur (HS) y el círculo verde a Xalapazco (XA) (Adaptado de Peiffer *et al.*, 2018).

El análisis de la composición de suelos fue realizado por el laboratorio FyPa ubicado en la Carretera federal Córdoba-Fortín Kilometro Km. 334. Las características fisicoquímicas de las muestras se resumen en la Tabla 4.1. Ambas muestras presentaron características fisicoquímicas similares, contrario a lo esperado, debido a la profundidad y a las características físicas observadas, como la diferencia de color, el cual es atribuida a la cantidad de materia orgánica en suelos (Figura 4.2). Las temperaturas oscilaron entre los 80-90 ° C, ambas muestras consideradas hipertérmicas (P-15 y P-50) presentaron un pH moderadamente ácido (entre 5,72 a 6,26). En términos de concentración de metales, Ca, Mg y K fueron ligeramente más altos para P-50 y el Na y Fe para la muestra de P-15, ambas muestras de suelo mostraron niveles similares de N, P, CU, Zn, Mn y B (Tabla 4.1), los cuales han sido reportados en otros en ambientes extremos.

TABLA 4.1. Composición de las muestras de suelo P-15 y P-50

	T	MO	EC	CIC	pH	N	P	Ca	Mg	Na	K	Fe	Cu	Zn	Mn	B
P15	80°C	0.45	.012	12.12	5.71	0.025	2.73	1591.20	296.70	22.08	110.37	18.43	0.056	0.16	13.51	0.27
P50	90°C	0.53	.038	13.07	6.23	0.028	5.12	1848.46	344.04	12.65	278.07	12.21	0.07	0.21	19.55	0.32

Temperatura (°C), MO materia orgánica (%), EC conductividad (Scm-1), concentración de metales en mg kg excepto por CIC (capacidad de intercambio iónico); sin duplicado.

Las muestras P-15 y P-50 tuvieron una baja concentración de metales pesados, en particular Cu y Zn, si se comparan con otros estudios realizados en zonas geotérmicas en el Cinturón Volcánico (Birkle *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2014; Carrasco-Nuñez *et al.*, 2017). Las concentraciones de Fe y Mn en “Los Humeros” fue ligeramente mayor a los parámetros reportados por Brito *et al.* (2014) en “Los Azufres”. En otros ambientes extremos, se ha observado que las variaciones mínimas de parámetros como el pH, la temperatura y la concentración de metales influyen en la diversidad microbiana, así como en la dominancia de los grupos taxonómicos (Tobler y Benning 2011; Brito *et al.*, 2019).

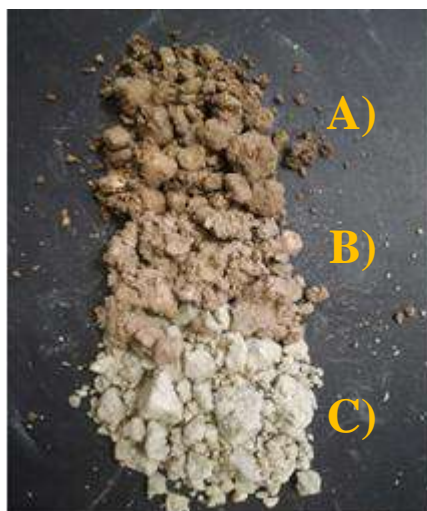


FIGURA 4.2. Color de las muestras de suelo a diferentes profundidades. A) 15 cm, B) 30cm, y C) 50 cm.

El enriquecimiento de una población bacteriana en particular es una práctica común en los estudios metagenómicos, así esta población en particular puede ser dirigida a análisis posteriores (Wilson *et al.*, 2013). Es por eso que, para favorecer las comunidades lipolíticas, se inocularon 10 g de la muestra P-15 en medio Schmidt-Dannert enriquecido con aceite de cártamo alto oleico y se cultivo a 80 ° C hasta la observación de crecimiento bacteriano, esta muestra se denominó ES. Las muestras de suelo P-15 y P-50 fueron mantenidas en el laboratorio a 80°C.

4.2 Etapa dependiente de cultivo

4.2.1 Aislamiento de bacterias

En base al objetivo de obtener cepas lipolíticas de la zona geotérmica “Los Humeros”, se realizaron los aislamientos en placas Petri mediante resiembras por estría hasta la obtención de cultivos axénicos. Las cepas fueron obtenidas en un principio empleando medio Luria-Bertani. Posterior a la obtención de las mismas, se observaron dificultades de crecimiento durante las resiembras en caja Petri, por lo que se optó por emplear un medio enriquecido cuya composición se muestra en el apartado 3.3.1, al cual le fue adicionada agua proveniente de la zona geotérmica “Los Humeros” para favorecer el crecimiento bacteriano al agregar microelementos propios de su entorno de aislamiento (Mobarack-Qamsari *et al.*, 2011) así como una fuente de carbono adicional al agregar extracto de carne. Esta estrategia favoreció el crecimiento de las cepas bacterianas. Se observaron crecimientos bacterianos por resiembras en medio LBN sólido a partir de las muestras obtenidas de cultivos enriquecidos. Los cultivos obtenidos a partir de la muestra P-15 en medio LBN sólido generaron biopelículas (Figura 4.3), coincidiendo con lo reportado por Trevors (1998) y Tabacchioni *et al.* (2000), quienes realizaron aislamientos provenientes de muestras de suelos directamente en placas de medio, y reportaron dificultad para aislar las bacterias debido al potencial de difusión de colonias ya que el crecimiento en placa favorece a los microorganismos con tasas de crecimiento rápidas y a aquellos que producen un gran número de esporas.



FIGURA 4.3. Biopelículas observadas en medio LBN sólido inoculado con suelo.

Posteriormente se llevaron a cabo resiembras en medio LBN bajo las mismas condiciones. Para confirmar la obtención de cultivos puros se realizaron tinciones de Gram y se observaron al microscopio. Se aislaron por estría un total de 29 cepas, 25 a partir de los sustratos de la alberca de desfogue y cuatro del cultivo con medio inductor de lipasas (LIPV). El número de cepas bacterianas obtenidas fue relativamente alto en comparación con otros estudios de aislamientos bacterianos realizados en zonas geotérmicas de México, como *Desulfurella kamchatkensis* aislada en el campo geotérmico “Los Azufres” Michoacan en el 2014, o las cuatro cepas anaeróbicas *Clostridium sphenoides*, *C. swellfunanium*, *Anaerocolumna cellulositytica* y *Paenibacillus azoreducens* aisladas en el volcán Paricutin reportadas por Brito y colaboradores en el 2019.

4.2.1.1 Morfología colonial.

La caracterización de la morfología colonial de las 29 cepas se realizó mediante la observación de cultivos frescos resembrados por estría en placa con agar LBN a pH 7.0, de 12 h a 60 °C mediante un transiluminador de luz visible, así como con el microscopio a la resolución de 10x. Se observaron diversos tipos de morfología, como se muestra en la figura 4.4 y 4.5. Las características coloniales de las cepas se enlistan en la Tabla 4.2.

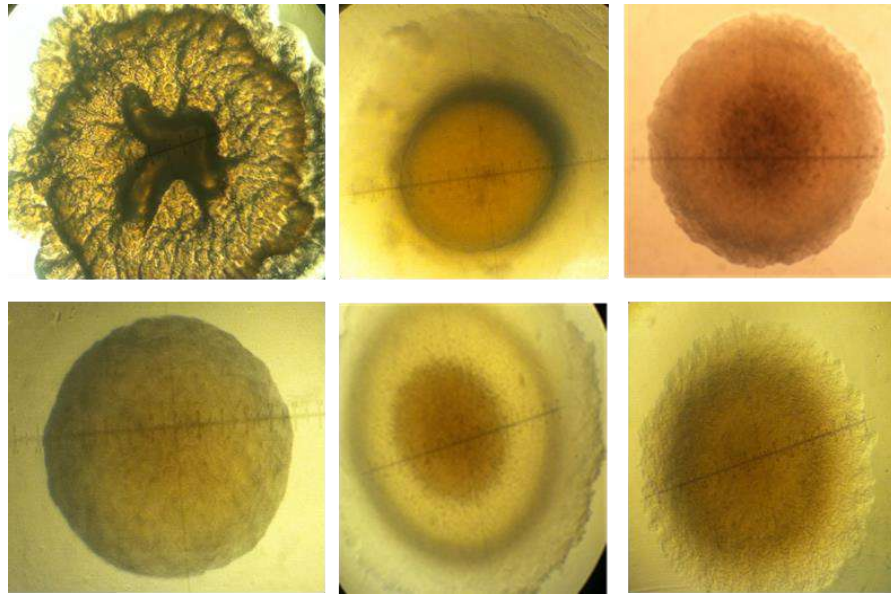


FIGURA 4.4. Estructuras coloniales más representativas de las cepas aisladas en medio LBN. Vista en microscopio a 10x

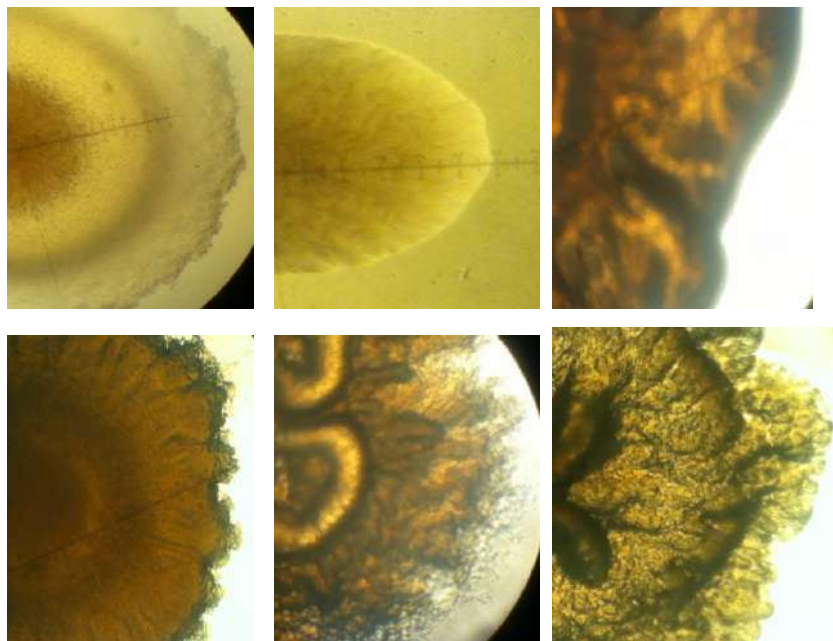


FIGURA 4.5. Bordes de colonia más representativos de las cepas. Vista en microscopio a 10x.

El estudio de la morfología microscópica reveló que las cepas tienen forma bacilar con algunas diferencias en su longitud y organización, algunas ocasiones organizadas en estreptobacilos (Tabla 4.3). Se observaron cepas tanto gram negativas como gram positivas (Figura 4.6).

Algunas cepas mostraron esporas terminales o intermedias bajo las condiciones probadas, la mayoría de las cepas aisladas no mostraron motilidad. Estas observaciones concuerdan con las características de otros bacilos termófilos aislados de otras fuentes geotermales (Pituka *et al.*, 2005; Rodríguez-Gómez, 2002; Pinzón-Martínez, 2007).

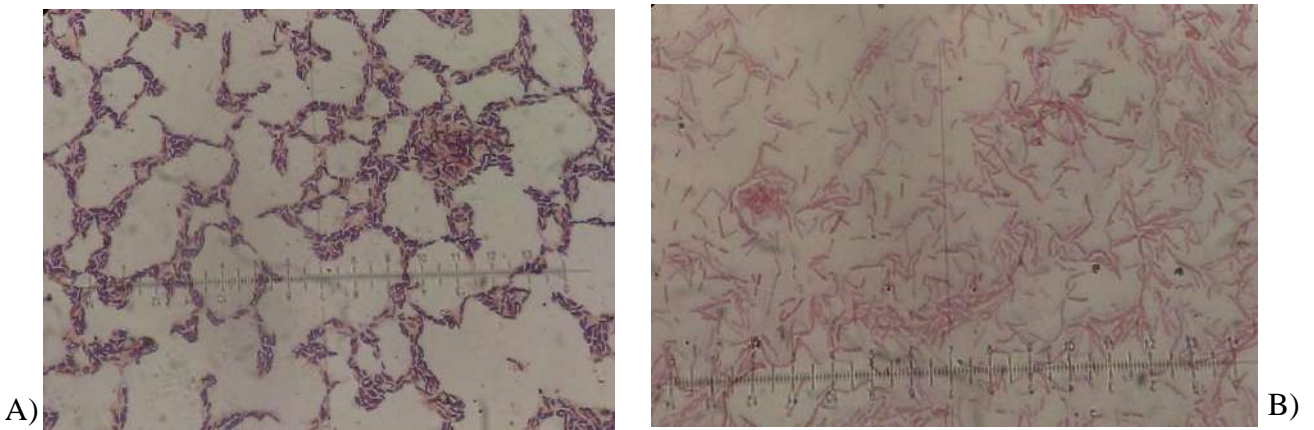


FIGURA 4.6. Ejemplo de la Morfología microscópica G (+) y G (-). Cepas KMV 838 (A) y KMV 413 (B) aisladas de la planta geotérmica “Los Humeros”.

TABLA 4.2. Morfología colonial de las cepas aisladas de la planta geotérmica “Los Humeros”.

Cepa	Tamaño	Color	Elevación	Consistencia	Borde	Superficie	Forma	Luz transmitida	Luz reflejada	Aspecto
KMV 8.2.1	2-3 mm	Beige	Plana	Viscosa	Lobulado	Lisa	Circular	Translúcida	Si	Húmeda
KMV 8.2.2	2-3 mm	Beige	Plana	Viscosa	Lobulado	Lisa	Circular	Translúcida	Si	Húmeda
KMV 8.2.3	2-3 mm	Beige	Plana	Creмоса	Entero	Lisa	Circular	Opaca	No	Húmeda
KMV 8.3.1	3-4 mm	Beige	Plana	Creмоса	Entero	Lisa	Circular	Translúcida	Si	Húmeda
KMV 8.3.2	3-4 mm	Beige rojiza	Plana	Creмоса	Entero	Lisa	Circular	Translúcida	Si	Húmeda
KMV 8.3.3	2-3 mm	Beige	Plana	Viscosa	Entero	Lisa	Circular	Translúcida	Si	Húmeda
KMV 8.3.4	3-4 mm	Beige	Plana	Creмоса	Entero	Lisa	Circular	Translúcida	Si	Húmeda
KMV 8.3.5	3-6 mm	Beige	Plana	Viscosa	Entero	Lisa	Circular	Opaca	No	Húmeda
KMV 8.3.6	2-3 mm	Beige	Plano convexa	Seca	Lobulado	Rugosa mate	Filamentosa	Opaca	No	Seco
KMV 8.3.7	3-4 mm	Beige	Plano convexa	Seca	Filamentoso	Rugosa brillante	Rizoide	Opaca	No	Seco
KMV 8.3.8	3-6 mm	Beige	convexa	Seca	Lobulado	Rugosa mate	Filamentosa	Opaca	No	Seca
KMV 8.3.9	2-3 mm	Beige	convexa	Seca	Lobulado	Rugosa mate	Filamentosa	Opaca	No	Seca
KMV 8.3.10	2-6mm	Beige	convexa	Seca	Lobulado	Rugosa mate	Filamentosa	Opaca	No	Seca
KMV 8.4.1	2-3 mm	Beige	Plana	Creмоса	Entero	Lisa	Circular	Translúcida	Si	Húmeda
KMV 8.4.2	2-4 mm	Beige	Plana	Creмоса	Entero	Lisa	Circular	Opaca	No	Brillante

Continuación TABLA 4.2

Cepa	Tamaño	Color	Elevación	Consistencia	Borde	Superficie	Forma	Luz transmitida	Luz reflejada	Aspecto
KMG 4.1.1	4-5 mm	Amarilla	Plana	Cremosa	Entero	Lisa brillante	Circular	Opaca	No	Húmeda
KMG 4.1.2	2-3mm	Amarilla	Plana	Viscosa	Entero	Lisa opaca	Circular	Translucida	SI	Húmeda
KMG 4.1.3	2-3 mm	Beige	Plana	Cremosa	Entero	Lisa brillante	Circular	Opaca	No	Húmeda
KMG 4.1.4	3-4 mm	Beige	Plana	Cremosa	Entero	Lisa brillante	Circular	Translucida	SI	Seca
KMG 4.1.5	2-3 mm	Beige	Plana	Viscosa	Entero	Lisa brillante	Circular	Opaca	No	Húmeda
KMG 4.1.6	1-2 mm	amarilla	Plana	Cremosa	Entero	Mate rugosa	Circular	Opaca	No	Seca
KMG 4.1.7	3-4 mm	Amarilla	Convexa	Viscosa	Entero	Lisa mate	Circular	Translucida	SI	Húmeda
KMG 4.1.8	2-3 mm	Beige	Plana	Cremosa	Dentado	Lisa brillante	Circular	Translucida	SI	Húmeda
KMG 4.1.9	5-6 mm	Beige	Plana	Cremosa	Ondulado	Lisa mate	Circular	Opaca	No	Seca
KMG 4.1.0	2-3 mm	Amarilla	Plana	Cremosa	Entero	Lisa brillante	Circular	Translucida	SI	Húmeda
KM01	1-2 mm	Beige	Plana	Viscosa	Entera	Mate rugosa	Circular	Opaca	No	Seca
KM02	5-6 mm	Beige	Umbilicada	Seca	Ondulado	Mate rugosa	Circular	Opaca	No	Seca
KM03	3-4 mm	Beige	Plana	Cremosa	Entero	lisa	Circular	Opaca	No	Seca
KM04	2-3 mm	Beige	Plana	Cremosa	Entero	Lisa	Circular	Translucida	Si	Lig.húmeda

*Cepas KMV y KMG son aisladas de los sustratos de la alberca. Las cepas KM son de cultivo con medio Schmidt -Dannert

Tabla 4.3
Morfología microscópica de las cepas aisladas de la planta geotérmica “Los Humeros”.

Cepa	Gram	Tamaño (µm)	Forma	Cepa	Gram	Tamaño (µm)	Forma
KMV 8.2.1	+	1	Bacilar	KMG 4.1.1	+	0.5	Bacilar
KMV 8.2.2	+	0.5-1.5	Bacilar	KMG 4.1.2	+	1	Bacilar
KMV 8.2.3	+	0.5	Bacilar	KMG 4.1.3	-	1-1.5	Bacilar
KMV 8.3.1	+	0.2	Bacilar	KMG 4.1.4	-	0.5	Bacilar
KMV 8.3.2	+	0.3	Bacilar	KMG 4.1.5	-	0.5	Bacilar
KMV 8.3.3	+	0.1	Bacilar	KMG 4.1.6	-	0.5-1	Bacilar
KMV 8.3.4	+	0.5	Bacilar	KMG 4.1.7	-	0.5	Bacilar
KMV 8.3.5	+	0.2	Bacilar	KMG 4.1.8	+	0.5	Bacilar
KMV 8.3.6	+	0.5	Bacilar	KMG 4.1.9	+	1	Bacilar
KMV 8.3.7	+	0.5	Bacilar	KMG 4.1.10	-	0.5	Bacilar
KMV 8.3.8	+	0.5-1.5	Bacilar	KM01	-	0.5	Bacilar
KMV 8.3.9	+	0.5-1.5	Bacilar	KM02	+	1-1.5	Bacilar
KMV 8.3.10	+	1	Bacilar	KM03	-	1	Bacilar
KMV 8.4.1	ND	0.5-1.5	Bacilar	KM04	-	1-1.5	Bacilar
KMV 8.4.2	ND	0.5-1.5	Bacilar				

ND: No determinado

*Las Cepas KMV y KMG son aisladas de los sustratos de la alberca. Las cepas KM son de cultivo con medio Schmidt-Dannert.

4.2.1.2 Pruebas preliminares de actividad lipolítica

En base al objetivo de identificar y caracterizar enzimas lipolíticas de suelo de la zona geotérmica “Los Humeros”, se realizaron pruebas para seleccionar las cepas productoras de enzimas lipolíticas. Se llevó a cabo un Dot Blot con el extracto crudo obtenido de las cepas y la 4-metilumbeliferona (MUF), para realizar un tamiz preliminar sobre actividad lipolítica. Posteriormente, las cepas positivas a esta prueba fueron sembradas en placas con tributirina y rodamina B para confirmar la actividad lipolítica (Figura 4.7). Se tomó como resultado positivo la formación de halos de hidrólisis alrededor de la colonia en el medio de tributirina, así como fluorescencia en las placas de rodamina B al ser observadas bajo luz UV (365 nm). De las 29 cepas aisladas, seis resultaron positivas a actividad lipolítica, mediante este tipo de determinación preliminar. Las cepas se enlistan en la Tabla 4.4

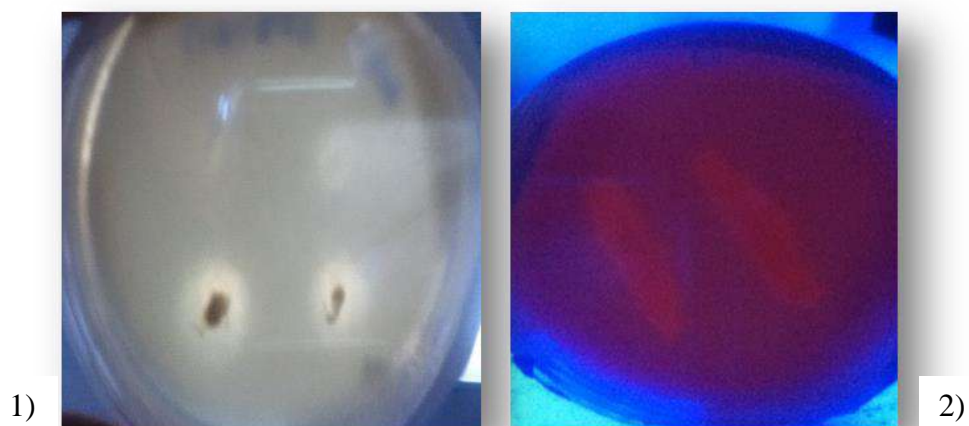


FIGURA 4.7. 1) Placas de medio con tributirina y 2) rodamina B con presencia de halos de hidrólisis y fluorescencia, respectivamente. La formación de halos de hidrólisis en el medio con tributirina, así como fluorescencia alrededor de las colonias en las placas con rodamina B al ser observadas bajo luz UV (365 nm), se consideró como positivo a actividad lipolítica.

TABLA 4.4
Cepas positivas a actividad lipolítica

Cepa	Tributirina	Rodamina B
KM02	+	-
KMV 8.3.1	+	+
KMV 8.3.2	+	+
KMV 8.3.3	+	+
KMV8.3.4	+	+
KMV 8.3.7	+	+

Todas las cepas mostraron afinidad por el medio con tributirina, que es un triglicérido formado por tres ácidos grasos de cadena corta (butírico) y glicerol. En el caso de la prueba en medio con rodamina B, la cepa KM02 no mostró afinidad por el sustrato de cadena larga (aceite de cártamo alto oleico) lo cual podría indicar que se trata de una esterasa y no de una lipasa, debido a que las esterasas tienen mayor afinidad por los sustratos de cadena corta (Bornscheuer, 2002)

4.2.2 Identificación taxonómica

Para la identificación taxonómica de las cepas positivas a actividad lipolítica se recurrió a la amplificación por PCR del gen que codifica para el 16S RNAr, por ser ésta una región altamente conservada (Schluenzen *et al.*, 2000). A partir de la secuenciación de los productos de PCR de las cepas positivas a actividad lipolítica, se obtuvieron seis amplicones de alrededor de 1500 pb. Al compararse con secuencias existentes a través de la herramienta en línea BLAST e EzBioCloud (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y <https://www.ezbiocloud.net/>) se observaron similitudes con genes de 16S RNAr de cepas pertenecientes a los géneros *Geobacillus* y *Bacillus*. Las secuencias de los seis amplicones se muestran en el apéndice D.

Las cepas utilizadas para la elaboración del árbol filogenético (Figura 4.8), fueron seleccionadas de acuerdo a su porcentaje de similitud, siempre y cuando éste fuera igual o mayor al 97 % (Hangström *et al.*, 2002) y fuera una secuencia completa reportada para dicho gen. Tanto las cepas utilizadas como los porcentajes de identidad se muestran en la Tabla 4.5.

TABLA 4.5

Porcentajes de identidad y cepas utilizadas para la identificación por secuenciación del gen 16S RNAr de las cepas aisladas con actividad lipolítica.

Cepas	CONCORDANCIA	% de identidad	No. acceso
KM02	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NBRC 12550(T)	97.92 %	AB271757 CP016552.1
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 458	98.40%	
KMV 8.3.1	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 (T)	97.60 %	AE017333
KMV 8.3.3		97.96 %	
KMV 8.3.2		98.31 %	
KMV 8.3.4		98.52 %	
KMV 8.3.7		98.10 %	

La cepa KM02 pertenece al género *Geobacillus*, mostrando un porcentaje de similitud del 97.92 % con el gen del 16S RNAr de *G. stearothermophilus*, descritos como bacilos anaerobios facultativos, neutrófilos, comúnmente encontrados en ambientes geotermales y ampliamente distribuidos en suelo, aguas termales, alimentos contaminados y sedimentos oceánicos, con una temperatura óptima de crecimiento entre 55y 80 °C. Las cinco cepas restantes pertenecen al género *Bacillus*, mostrando porcentajes de identidad del 97.60 al 98.52 % con el gen del 16S RNAr de *Bacillus licheniformis*, descritos como bacilo gram-positivos, esporulados, anaerobios facultativos, comúnmente aislados de muestras de suelo. En general, todas las secuencias analizadas exhibieron altos porcentajes de identidad con bacterias cultivadas.

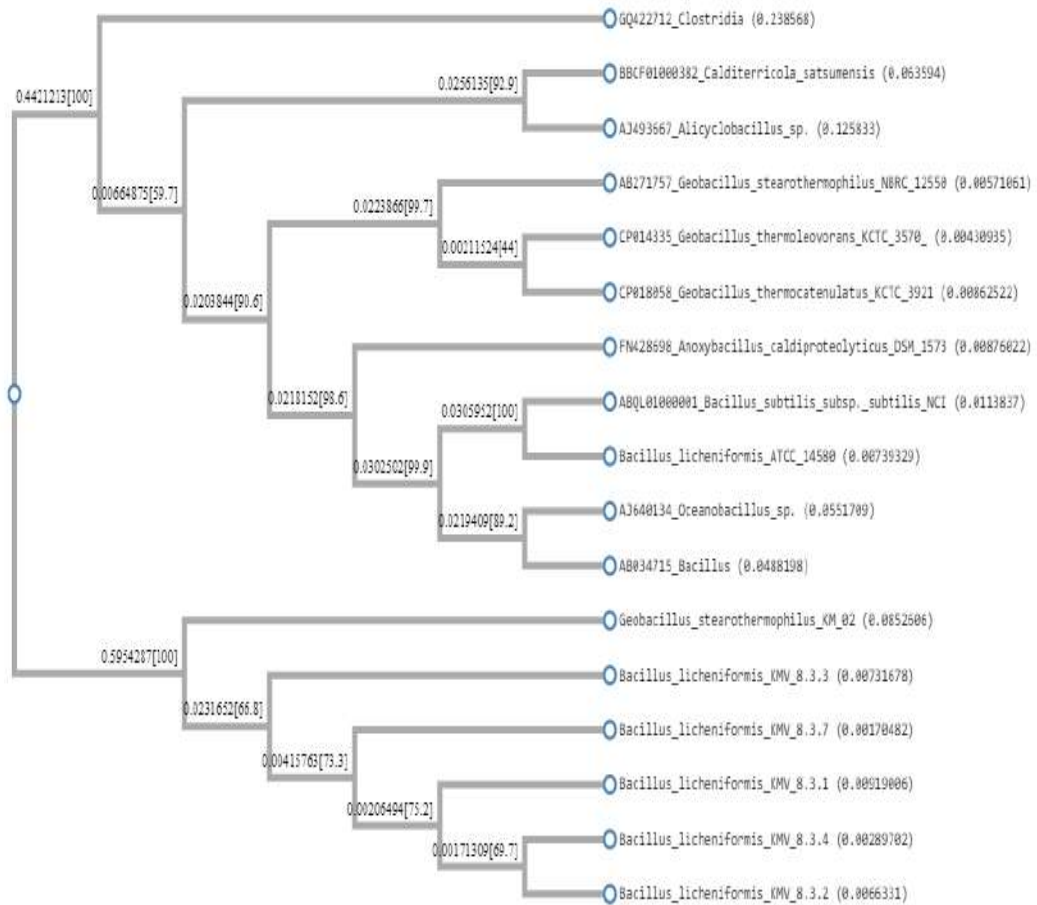


FIGURA 4.8. Árbol que muestra las relaciones filogenéticas entre las cepas con actividad lipolítica identificadas mediante el ensayo con sustrato 4-metilumbeliferona (MUF) y positivas en medio selectivo de lipasas, aisladas de la zona geotérmica “Los Humeros”. (<https://www.genome.jp>).

4.2.3 Determinación de enzimas lipolíticas mediante zimogramas.

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE y zimograma de acuerdo a la técnica reportada por Prim *et al.* (2003) a partir de extractos obtenidos de las cepas aisladas.

De las seis cepas identificadas taxonomicamente, las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832 y *Bacillus licheniformis* KMV 837 presentaron solo una banda con actividad lipolítica con un peso molecular de 26.78 y de 26.29 kDa respectivamente. Mientras que las cepas *Geobacillus stearothermophilus* KM02 y *Bacillus licheniformis* KMV 831 mostraron dos patrones de bandas en

los zimogramas, lo que sugiere la producción de una y dos enzimas lipolíticas respectivamente (Figura 4.9).

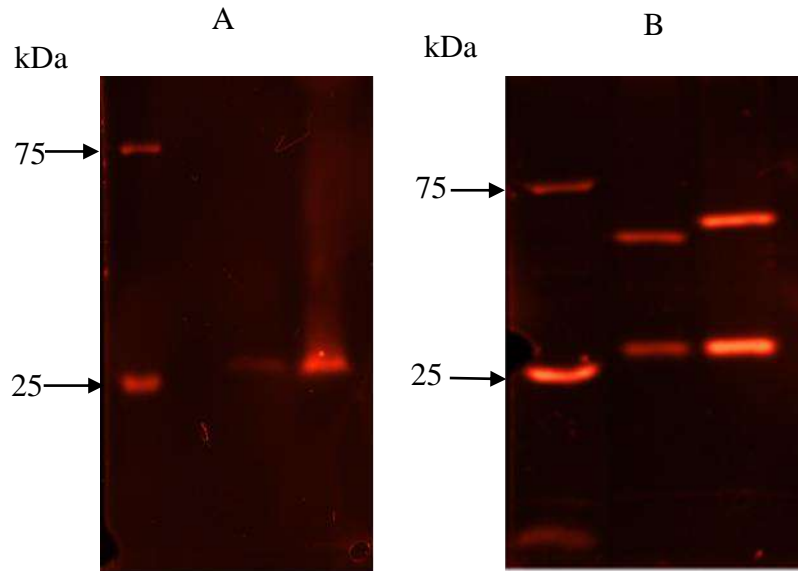


FIGURA 4.9 A) Zimogramas cepa *B. licheniformis* KMV 837 y *B. licheniformis* KMV 832 mostrando una sola banda carril 3 y 4, B) Cepas *Geobacillus stearothermophilus* KM02 y *B. licheniformis* KMV 831 mostrando dos patrones de banda carriles 2 y 3 correspondientes a actividad lipolítica.

Los pesos moleculares observados mediante zimograma de las enzimas lipolíticas de las cepas aisladas coinciden con los pesos moleculares de enzimas lipolíticas reportados para *Bacillus licheniformis* y *Geobacillus stearothermophilus*. (Sharma y Kanwar, 2015; Kaur *et al.*, 2016; Ugras, 2017), y estando dentro de los rangos de los pesos moleculares reportados para lipasas bacterianas (19-96 kDa) (Javed *et al.*, 2018).

Otras cepas aisladas, no identificadas, que mostraron solo un patron de banda en los zimogramas fueron las cepas KMV 417, KMV 413, KMV 412 y KMV 410, con pesos moleculares de 26.60, 26.80, 27.23 y 27.23 kDa respectivamente.

4.2.4 Caracterización

4.2.4.1 Obtención de los extractos enzimáticos.

Se obtuvieron dos tipos de muestras para el análisis de las enzimas lipolíticas, a partir de un cultivo inductor de 50 mL en medio Schmidt-Dannert (Sanchez-Otero *et al.*, 2011) y del cual se tomó un volumen de 10 ml para inocular un volumen de 250 mL de medio LBN como se describe en el apartado 3.3.6.1. Después de los tiempos de crecimiento el medio LBN fue centrifugado a 12857 xg a durante 15 min a 10 °C. El paquete celular recuperado fue sometido a sonicación y centrifugación, denominándose intracelular y 40 mL de medio LBN centrifugado (libre de células) fueron recuperados y denominado “Sobrenadante”. Obtenidos ambos extractos enzimáticos se procedió a llevar a cabo la caracterización parcial de ellos en estado acuoso

Para el análisis se seleccionaron las cepas las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832 y *Bacillus licheniformis* y las cepas no identificadas taxonómicamente KMV 417, KMV 413, KMV 412 y KMV 410.

4.2.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas

Se analizó el efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas presentes en intracelular y sobrenadante, como se describe en el apartado 3.3.6.2, a diferentes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C y a pH 6.5. Se determinó la media de cada tratamiento y la actividad más alta fue considerada como el 100 %. En la figura 4.10 se muestran de forma comparativa los resultados obtenidos expresados como actividad relativa.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas en intracelular y sobrenadante se observó dos rangos temperatura de 60 a 90 °C para las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 837, KMV 417 y KMV 413 y de 30 a 90°C *Bacillus licheniformis* KMV 832, KMV 410 y KMV 412. Donde puede verse que el 100% de la actividad relativa, tanto para la enzima intracelular y sobrenadante de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 837, KMV 417 y KMV 413 se obtuvo a 60 °C. Las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832, KMV 410 y KMV 412 mostraron diferencias en sus patrones de temperatura óptima, en los extractos intracelulares se encontró el 100% a los 60°C, 30°C y 40 °C respectivamente, mientras que en los sobrenadantes el 100% de la actividad relativa se obtuvo a los 90°C.

En la determinación de la estabilidad a distintas temperaturas, bajo la perspectiva de la búsqueda de enzimas termoestables termófilas e hipertermofilas, se llevó a cabo la incubación de los extractos enzimáticos intracelular y sobrenadante a 50, 60, 70,80 y 90°C durante 1 hr. Se determinó la actividad de cada muestra antes de incubar la enzima, y este valor fue considerado el 100% de actividad, el cual fue usado como referencia para determinar el porcentaje de actividad relativa en cada tratamiento. Estos datos se presentan de forma comparativa en la figura 4.11.

De manera general todas las cepas, en ambos extractos enzimáticos (intracelular y sobrenadante) perdieron actividad al ser incubadas durante 1 h en las diferentes temperaturas del ensayo, conservando del 50 al 80 % de su actividad al ser incubadas a 50 y 60 °C y llegando a perder hasta el 80 % al ser incubadas a 90°C. Debemos recordar que la exposición a altas temperaturas es uno de los principales factores que influyen en la desnaturalización de las enzimas, y que a pesar de que se ha reportado que los microorganismos extremófilos poseen diversos mecanismos de respuesta al estrés térmico, las enzimas probadas están en estado nativo. Sin embargo, se observó que en casos como la fracción sobrenadante de la cepa *Bacillus licheniformis* KMV 837 que presentó una temperatura óptima de 60° C mostró un incremento en su actividad del 8 al 10 % al ser incubada a 70 y 80 °C, así como la fracción intracelular de las cepas KMV 410 y KMV 412 mostraron un incremento del 70 y 50% respectivamente al ser incubadas a 50°C, conservando el 90% de su actividad al ser incubadas a 60°C.

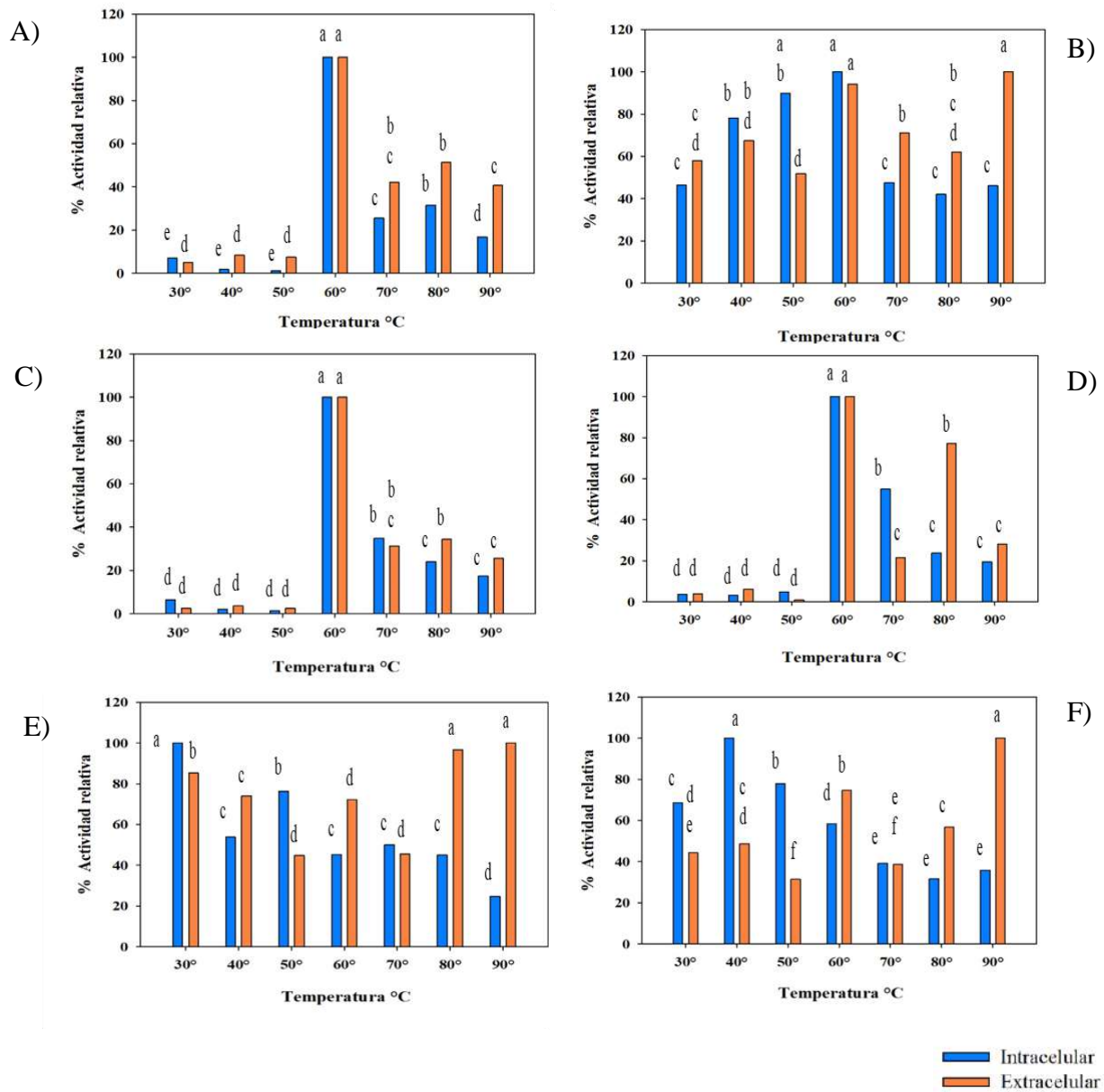


FIGURA 4.10 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KMV 832, C) KMV 417, D) KM413, E) KM412, F) KM410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular.

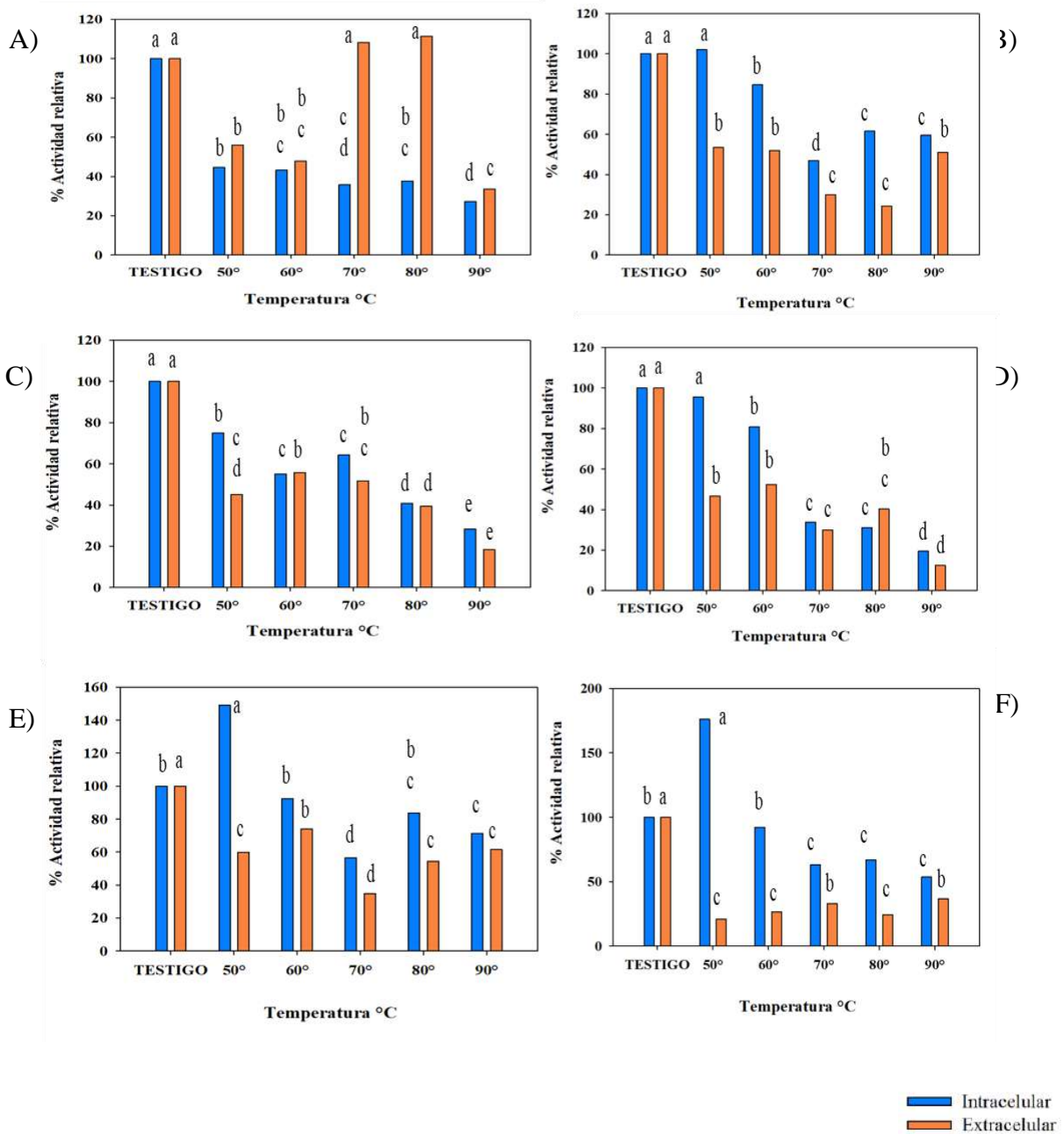


FIGURA 4.11 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KMV 832, C) KMV 417, D) KM413, E) KM412, F) KM410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular

4.2.4.3 Efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas

Para explorar el efecto del pH sobre la actividad de los extractos, se realizó la determinación de la actividad lipolítica descrita en el apartado 3.3.6.2, empleando diferentes tipos de amortiguadores: acetato de sodio 0.05 M (pH 4.0, 5.0), fosfato de potasio 0.05 M (pH 6.0, 7.0 y 8.0), CHES 0.05 M (pH 9.0 y 10.0). Se determinó la media de cada tratamiento y la más alta fue considerada como el 100% para graficar el porcentaje de actividad relativa. Los datos se presentan en la figura 4.12.

El 100 % de actividad relativa, tanto para la fracción intracelular como la sobrenadante de las cepas KMV 410 y KMV 412, se estableció a pH 10 y para la cepa KMV 413 a pH 5. En el caso de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 837, *Bacillus licheniformis* 832 y KMV 417 mostraron patrones diferentes de pH para el intracelular y el sobrenadante. La cepa *Bacillus licheniformis* KMV 837 mostró el 100 % de actividad a pH 7.0 y 10, la cepa *Bacillus licheniformis* KMV 832 a pH 10 y 9, y la cepa KMV 417 a pH de 8 y 9 para las muestras intracelular y sobrenadante, respectivamente. Los pH óptimos obtenidos fueron alcalinos en la mayoría de las cepas, excepto la cepa KMV 413, que tuvo un máximo de actividad en el rango ácido.

En el caso de la determinación del efecto del pH sobre la estabilidad de las enzimas, se llevó a cabo la incubación de los extractos a pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0 durante 1 h a 30°C, previo al ensayo, y se determinó la actividad con las condiciones reportadas en el apartado 3.3.6.2. El valor de la actividad de cada muestra sin incubar fue considerado el 100% de actividad, el cual fue usado como referencia para determinar el porcentaje de actividad relativa en cada tratamiento. Los datos se presentan en la figura 4.13

De acuerdo con los resultados obtenidos, después de 1 h de incubación, la actividad relativa de los extractos intracelular y sobrenadante de la cepa *Bacillus licheniformis* KMV 837 se vio favorecida después de 1 hr de incubación en los rangos de pH 4.0- 10.0. El extracto intracelular, incrementó su actividad entre un 5-50 % en los pH 4.0, 5.0, 6.0 y 9.0 y el sobrenadante incrementó su actividad entre un 10-100 % en los pH 5.0, 6.0, 8.0, 9.0 y 10.0. Otra cepa que mostró incrementos en su actividad después de la incubación tanto en su fracción intracelular como sobrenadante fue la cepa KMV 417. en pH 4.0, 5.0, 6.0, 9.0 y 10.0 entre un 10-70% y de un 10- 40 % a pH 4.0, 5.0 y 8.0 respectivamente. Este tipo de variaciones se derivan de los rearrreglos de la enzima por las distintas cargas que adquiere la proteína en los distintos valores de

pH, brindando así un espectro mas amplio de actividad para las cepas probadas que el mostrado por su pH óptimo, abarcando pH considerados acidos hasta muy alcalinos.

Otros resultados notables despues de 1 h de incubación, fueron los observados en los sobrenadantes de la cepa *Bacillus licheniformis* KMV 832 y KMV 410, en donde incrementó la actividad relativa en un 300 % y 600% respectivamente en todos los tratamientos, en cambio la actividad relattiva de el intracelular de la *Bacillus licheniformis* KMV 832 y los sobrenadantes de las cepas KMV 413 y KMV 412 disminuyó entre un 30- 80 % después de 1 hr de incubación. Los resultados obtenidos en los diferentes pHs de todas las cepas probadas fueron variables, pero en general la actividad relativa de las cepas se vio favorecida en los rangos de 4.0 a 10.0, y solo en casos puntuales se observó una disminución significativa de la actividad.

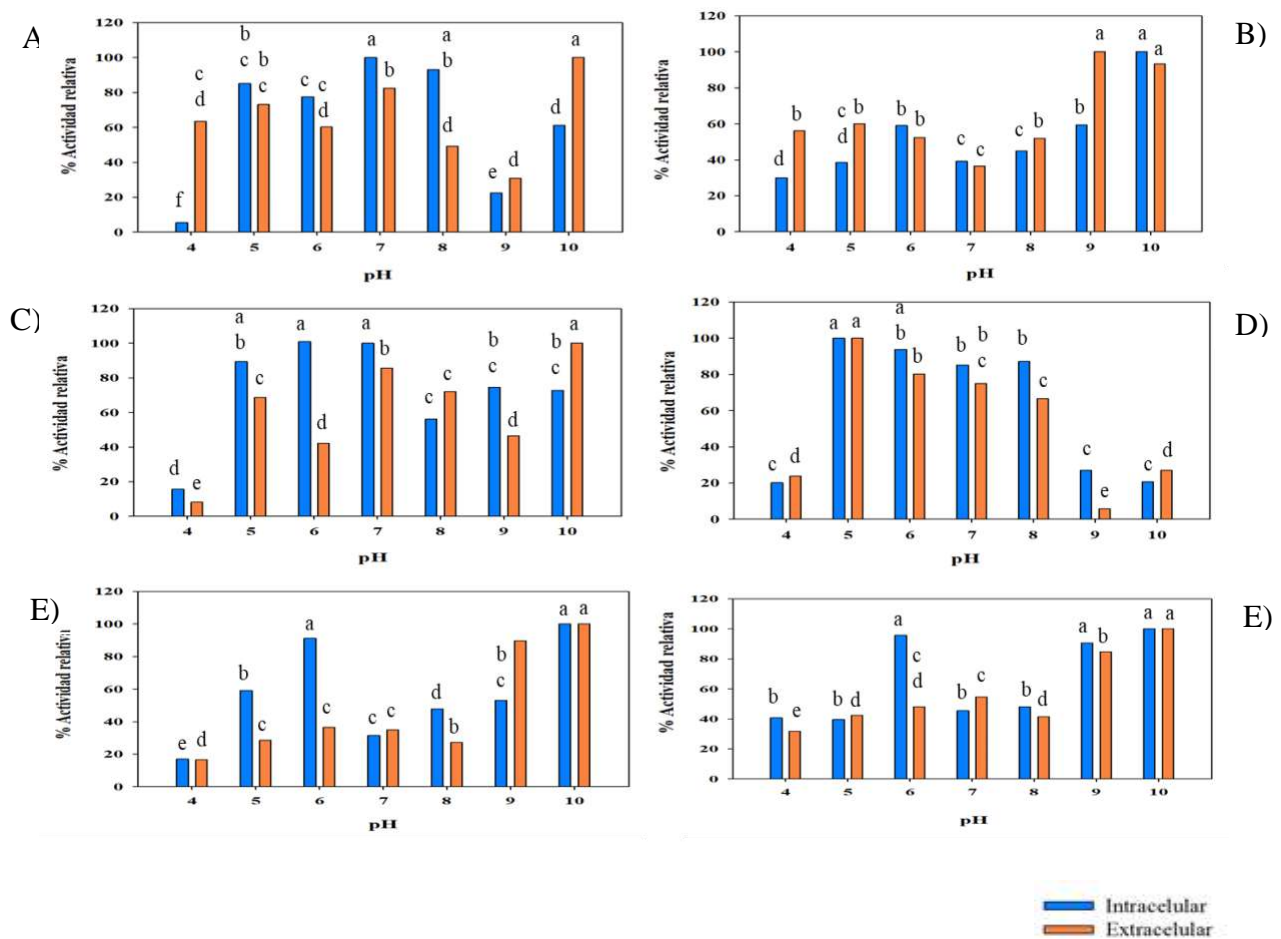


FIGURA 4.12. Efecto de pH sobre la actividad enzimática. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KM 832, C) KM417, D) KM413, E) KM412, F) KM410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular.

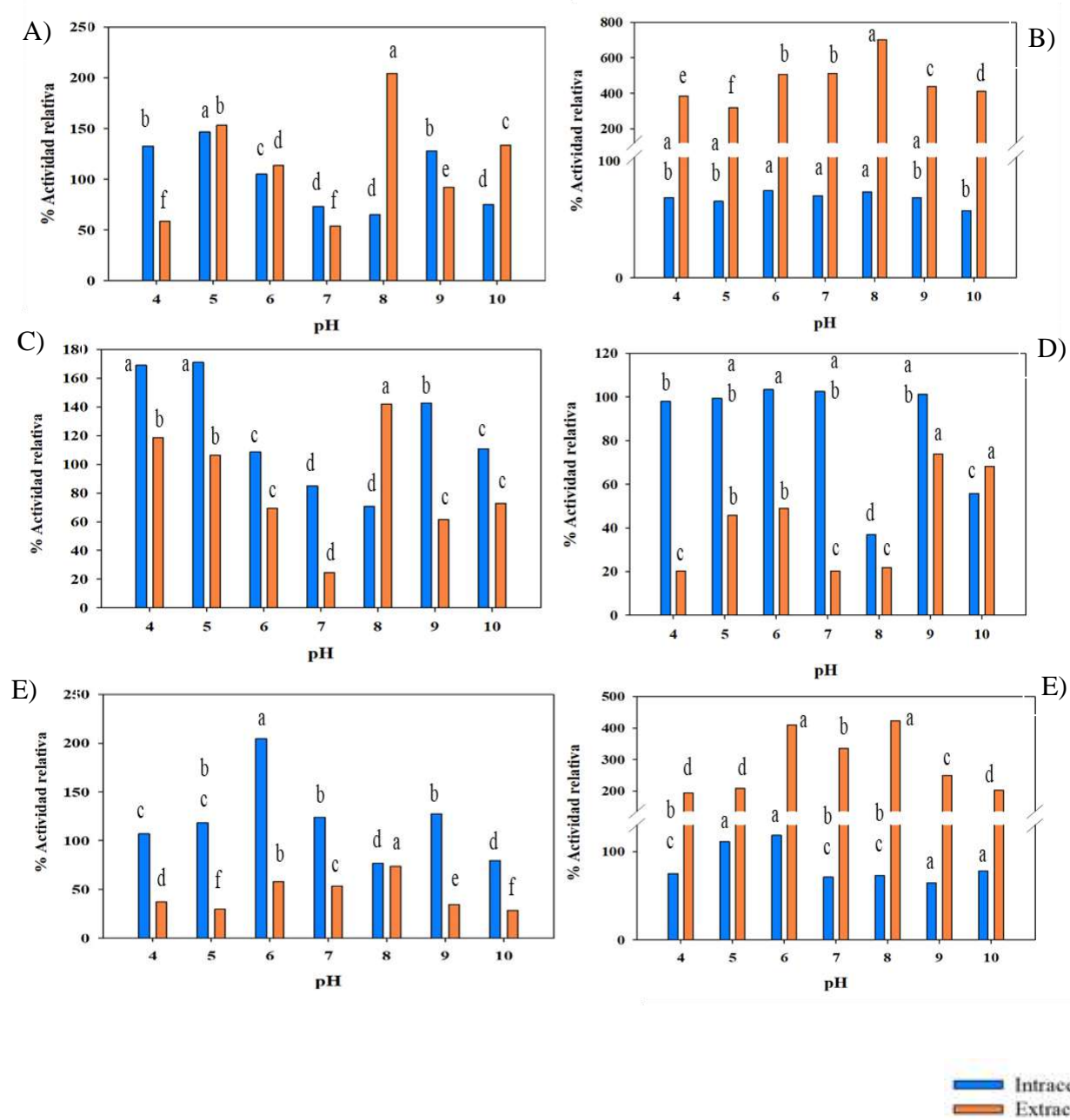


FIGURA 4.13. Efecto de pH sobre la estabilidad enzimática. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KM 832, C) KM417, D) KM413, E) KM412, F) KM410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular.

4.2.4.4 Efecto de la presencia de iones metálicos sobre la actividad enzimática.

Para evaluar el efecto de la presencia de iones metálicos sobre la actividad de ambos extractos enzimáticos, se llevó a cabo la incubación de los extractos enzimáticos denominados intracelular y sobrenadante durante 1 h a 30°C en soluciones acuosas de sales mono y divalentes al 1 mM de CaCl₂, KCl, MgCl₂, NaCl, BaCl₂, HgCl₂ y LiCl y enseguida se realizó la determinación de la actividad descrita en el apartado 3.3.6.2. El 100% de actividad se tomó a partir de una muestra incubada a 30°C sin la presencia de sales, cuyo valor fue considerado como el 100 %. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.14

Como puede apreciarse en los gráficos, el efecto de la presencia de los iones metálicos fue variable en ambos extractos enzimáticos. La actividad enzimática del intracelular y sobrenadante la cepa *Bacillus licheniformis* KMV 837 no se vio afectada por los iones CaCl₂, KCl, MgCl₂, pero disminuyó su actividad significativamente en presencia de HgCl₂. La cepa KMV 417 en su fracción intracelular no se vio afectada por los iones antes mencionados, pero el sobrenadante solo conservó su actividad en presencia de MgCl₂, disminuyendo su actividad en un 30 a 70 % con los demás tratamientos. La actividad del sobrenadante de la cepa KMV 413 no se vio afectada por ninguno de los iones metálicos, sin embargo, el intracelular mostró disminución de su actividad de un 30 a 40% con los iones MgCl₂, HgCl₂ y LiCl. La cepa *Bacillus licheniformis* KMV 832 en presencia de los iones metálicos se vio afectada de un 30 a un 80 % en su actividad en ambos extractos enzimáticos (intracelular y sobrenadante). Las cepas KMV 410 y KMV 412 también mostraron patrones variables en el efecto de la presencia de los iones metálicos sobre la actividad enzimática de las muestras intracelular y sobrenadante, teniendo como punto en común que no se vieron afectadas en presencia de NaCl, y que solo perdieron un 20% de actividad en presencia del LiCl.

Estudios previos sobre el efecto de iones metálicos en la actividad de enzimas lipolíticas han mostrado resultados diversos donde la actividad aumentó en presencia de iones como Ca²⁺, Mg, Cu²⁺, Fe³⁺, FeSO₄ ó fue inhibida en presencia de iones metálicos como el NaCl, HgCl, MnSO₄, Ni²⁺ y Cu²⁺ (Chakraborty y Raj 2008; Sharma y Kanwar, 2015, Kaur *et al.*, 2016). La disminución de la actividad enzimática sugiere que el ion metálico podría estar compitiendo en el sitio activo de la enzima (Ghori *et al.* 2011). Metales como el Cu²⁺ y el Hg¹⁺ han sido reportados como inhibidores de la actividad lipolítica al obstaculizar la actividad enzimática a través de la interacción con grupos de cadena lateral de aminoácidos superficiales que pueden afectar la

estabilidad conformación de la enzima (Rahman *et al.* 2006) En contraste con esto, la mayor actividad de la lipasa en presencia de iones como el Ca^{2+} puede atribuirse a la formación de puentes en el sitio activo que ayudan a mejorar la estabilidad enzimática (Kuar *et al.*, 2016).

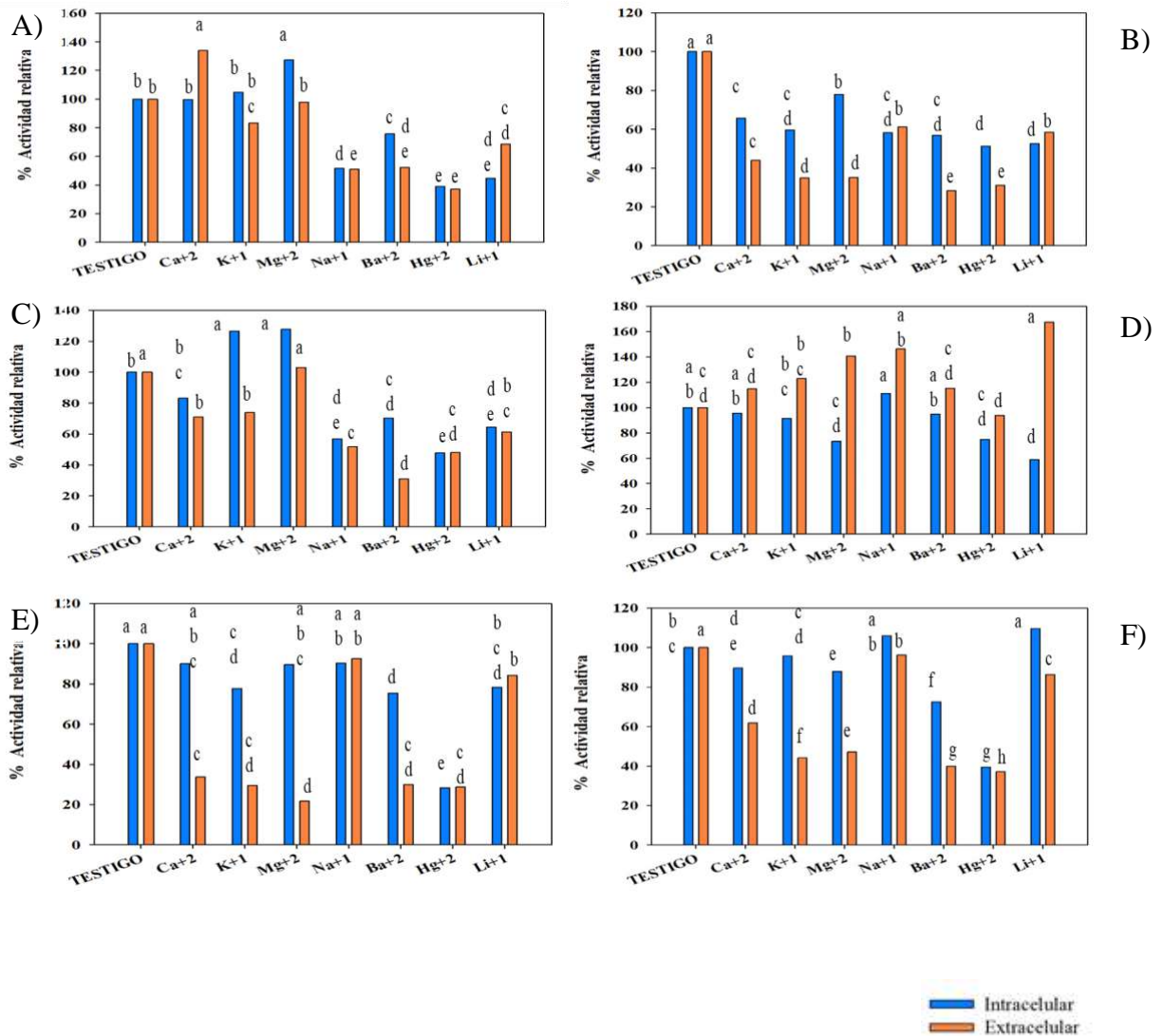


FIGURA 4.14. Efecto de la presencia de iones metálicos sobre la estabilidad enzimática. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KM832, C) KM417, D) KM413, E) KM412, F) KM410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular.

4.2.4.5. Efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la actividad enzimática.

Para evaluar el efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la actividad de ambos extractos enzimáticos, se realizó la incubación de estos en soluciones acuosas de EDTA (1mM), β -Mercapto etanol 1% v/v, Tritón X-100® 1% (v/v), Tween 20® 1% (v/v) y SDS (dodecil sulfato de sodio) al 0.1% (p/v). Se incubaron las muestras intracelular y sobrenadante por 1 h a 30 °C, seguida del ensayo de actividad lipolítica descrita en el apartado 3.3.6.2. Además, se incubó una muestra de enzima sin ninguno de los inhibidores como testigo de la actividad previa a los tratamientos, cuyo valor fue considerado como el 100%. Los datos se muestran en la figura 4.15.

Como se observa en los gráficos, la actividad específica del extracto intracelular de la cepa *Bacillus licheniformis* KMV 837 incrementó en presencia de Tritón X-100 y β -Mercapto etanol un 60 % y un 29 % respectivamente y se mantuvo estable en Tween 20®. Otra cepa donde se observaron incrementos en su actividad relativa en presencia de Tritón X-100 y β -Mercapto etanol fue la fracción sobrenadante de la cepa KMV 413, con incrementos del 90 y 100 % respectivamente, siendo estable también en presencia del Tween 20®.

Como se observa, solo la cepa KMV 417 no disminuyó la actividad en presencia de los inhibidores y detergentes, solo en el sobrenadante en presencia del EDTA disminuyó la actividad de manera significativa. En el caso de los tratamientos con EDTA, se observó una disminución significativa en la mayoría de las cepas, disminuyendo la actividad de un 30 a un 70 %.

Una observación importante fue que las cepas KMV 410 y *Bacillus licheniformis* KMV 832 tanto en los extractos intracelular y sobrenadante, así como los sobrenadantes de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 837 y KMV 412 y el intracelular de la cepa KMV 413 mostraron una disminución significativa de su actividad comparada con los testigos en presencia de β -Mercapto etanol que tiende a romper los puentes disulfuro, esto podría sugerir que dichas enzimas están conformadas por subunidades y en los casos donde no se presentó diferencia significativa podrían tratarse de enzimas monoméricas.

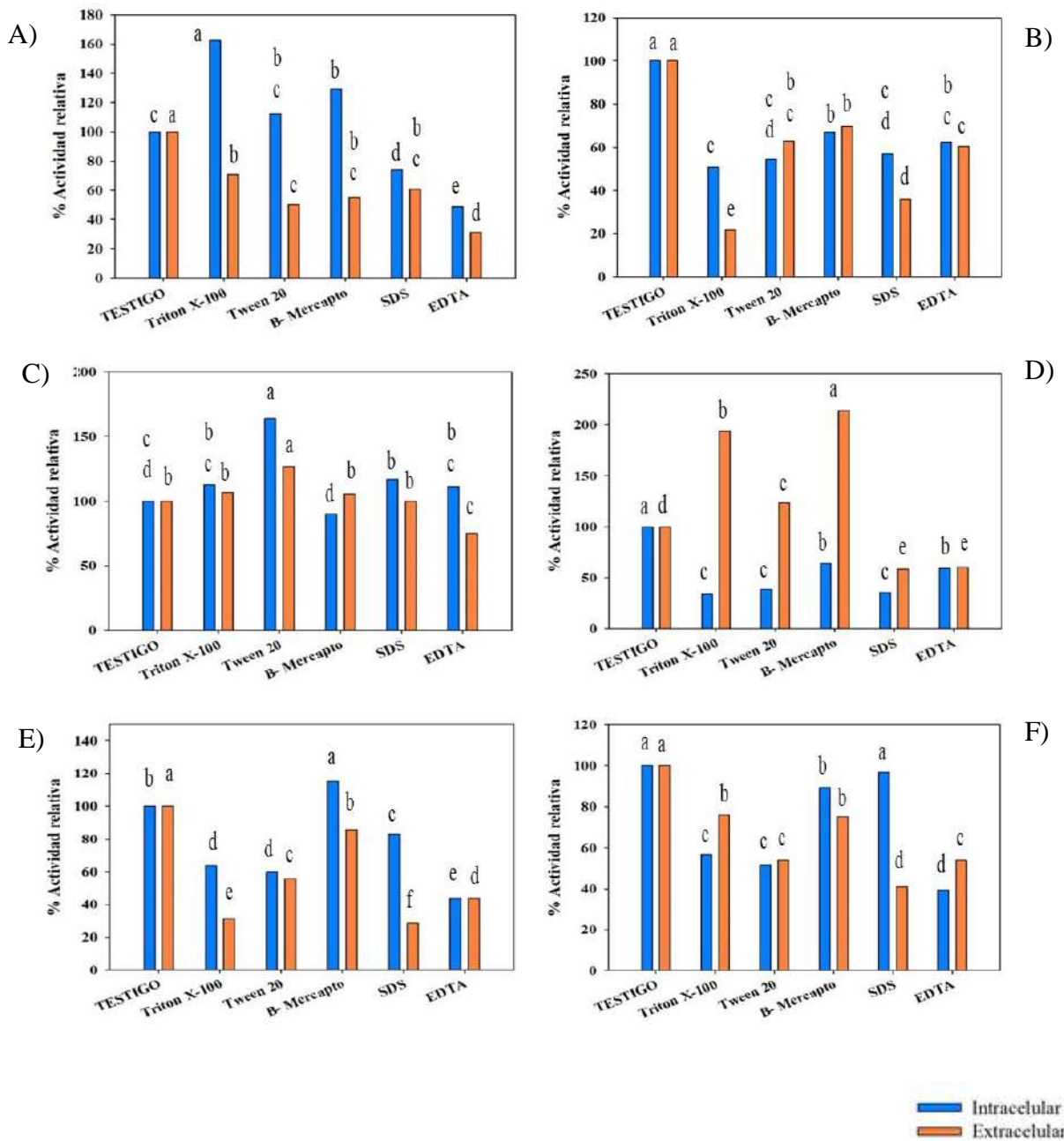


FIGURA 4.15. Efecto de la presencia de inhibidores y detergentes sobre la estabilidad enzimática. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KM 832, C) KM 417, D) KM 413, E) KM 412, F) KM 410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular.

4.2.4.6 Estabilidad en presencia de solventes orgánicos

Para evaluar la estabilidad de ambos extractos enzimáticos en presencia de solventes orgánicos se realizó una incubación de 0.5 mL de cada extracto con 0.5 mL de disolvente. Tanto el extracto intracelular y sobrenadante se incubaron por 1 h a 30 °C y enseguida se realizó el ensayo de actividad. Además, se incubó una muestra de enzima sin disolvente a manera de testigo, cuyo valor fue considerado el 100% de actividad. Los resultados se muestran en la Figura 4.16.

Como se observa en los gráficos tanto los extractos intracelulares y los sobrenadantes de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 837 y KMV 417, la actividad disminuyó después de 1 h de incubación hasta un 90 % en todos los tratamientos, con excepción del extracto intracelular de la cepa KMV 413 que conservó el 100% de su actividad en hexano. En el caso de los extractos intracelulares de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832, KMV 413, KMV 410 y KMV 412 no mostraron diferencias significativas entre el testigo y la actividad al ser incubadas en solventes como Metanol, Butanol y Hexano considerandose estables. También se observó que en solventes como el Terbutanol y Octanol los extractos intracelulares de las cepas KMV 410 y KMV 412 conservaron de un 70 a 80 % de su actividad.

Los extractos intracelular y sobrenadante de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832, KMV 413, KMV 410 y KMV 412 no mostraron una tendencia como tal, en cuanto a su estabilidad en presencia de solventes orgánicos, ya que a pesar de existir diferencias significativas, las enzimas pudieron conservar hasta un 80 % de su actividad tanto en solventes poco hidrofóbicos como el Metanol ($\log P - 0.76$) y Etanol ($\log P -0.24$), así como en solventes más hidrofóbicos como el Hexano ($\log P 3.5$) y Octanol ($\log P 4.5$). El mismo comportamiento se observó para los sobrenadantes de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832, KMV 413, KMV 410 y KMV 412.

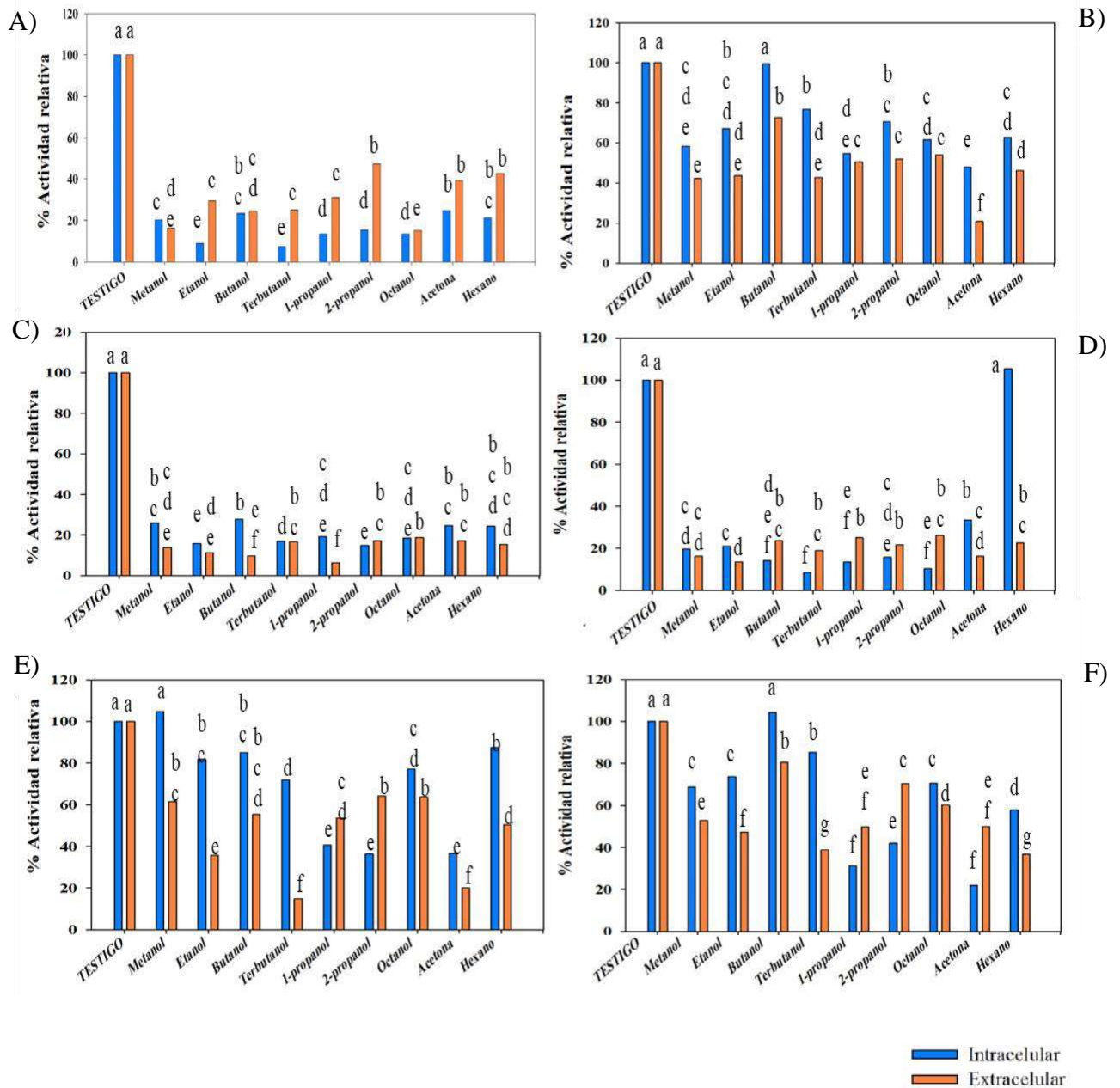


FIGURA 4.16. Estabilidad en presencia de solventes orgánicos sobre la estabilidad enzimática. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KM 832, C) KM 417, D) KM 413, E) KM 412, F) KM 410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular.

4.2.4.7 Determinación de la preferencia de longitud de cadena del sustrato.

Para determinar la preferencia de longitud de cadena del sustrato de las muestras denominadas intracelular y sobrenadante, se realizó el ensayo de actividad descrito en el apartado 3.3.6.2 con distintos compuestos de p-nitrofenol, variando en cada caso la longitud de la cadena del ácido graso (C:8, C:10, C:12, C:14, C:16 y C:18). Se consideró como el valor mas alto como el 100% de actividad y este fue usado como referencia para calcular la actividad relativa de los compuestos. Los resultados de los ensayos se muestran en la Figura 4.17.

Como puede observarse, los extractos enzimáticos intracelular y sobrenadante de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832, KMV 410 y KMV 412 actuaron de manera preferente sobre los sustratos de cadena corta, particularmente sobre los sustratos de 8 y 10 carbonos, pudiendo tratarse de una esterasa, ya que este tipo de enzimas lipolíticas tienen preferencia por sustratos de cadena corta. Sin embargo, los intracelulares de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 837 y KMV 417, así como los sobrenantes de las cepas *Bacillus licheniformis* KMV 832, KMV 410 y KMV 412 también mostraron cierta capacidad para actuar en sustratos de cadenas medias como el sustrato de 12 carbonos con un 60 a 85 % de actividad. Solo las cepas KMV 413 y *Bacillus licheniformis* KMV 837 mostraron cierta preferencia sobre los sustratos de cadena larga (14, 16 y 18 carbonos) con un 50 a un 100% de actividad.

En retrospectiva, con los resultados obtenidos y las diferencias de comportamiento observadas entre las muestras intracelular y sobrenadante en los diferentes tratamientos, podría pensarse que no se trata de una sola enzima lipolítica la que está presente en los extractos de las cepas seleccionadas, si no que se trata de enzimas diferentes, sin embargo, el medio de cultivo y los metabolitos presentes en la muestra denominada sobrenadante, después del crecimiento bacteriano, así como el pH final del medio también pudieron haber influido en dicha actividad.

FIGURA 4.17. Preferencia de longitud de cadena. A) *Bacillus licheniformis* KMV 837 B) *Bacillus licheniformis* KM 832, C) KM 417, D) KM 413, E) KM 412, F) KM410. En donde el color azul corresponde al intracelular y el naranja al extracelular.

Existen diversos reportes sobre enzimas lipolíticas de *Bacillus licheniformis* con pesos moleculares entre los 22 y 35 kDa, coincidiendo con los pesos observados en este estudio y donde también se han observado rangos de actividad variable así como comportamientos diferentes en su actividad en presencia de iones e inhibidores. Por mencionar algunos, Sharma y Kanwar en el 2015 reportaron una lipasa, con una temperatura y pH óptimo de 55 ° C y pH 9,5 respectivamente, con preferencia hacia sustratos con longitud de cadena larga, cuya actividad fue inhibida en presencia de iones metálicos como el NaCl, HgCl y el MnSO₄ y solo se favoreció en presencia de FeSO₄. Los inhibidores (EDTA) y detergentes (Tritón X-100, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y SDS) también tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa. En el caso de los solventes, la lipasa mantuvo su actividad en presencia de disolventes tanto hidrófobos (n-hexano) como hidrófilicos (DMSO). Kaur y colaboradores en el 2016, observaron que la lipasa clonada mostró en un amplio rango de actividad en pH (9.0-14.0) y temperatura (30-80 ° C). Además, en presencia de varios solventes orgánicos, la enzima conservó el 100% de actividad enzimática, siendo inhibida fuertemente en presencia de inhibidores como el β-mercapto etanol y manteniendo su actividad en presencia de varios detergentes (Tritón X-100, Tween 20, Tween 40, SDS). Ugras (2017) aisló cuatro cepas bacterianas de fuentes termales que se identificaron como *Bacillus licheniformis* (B1-Ht1, B1-Ht2, B1-Ht5 y B1-Ht7). Las colonias de las cuatro cepas mostraron un color crema con formas irregulares, opacas y de rápido crecimiento. Todas las cepas son Gram-positivas, termotolerantes con rangos de temperatura de crecimiento de 37 ° C - 60 ° C.

4.2.5 Diversidad microbiana en el cultivo enriquecido.

La temperatura del suelo el día de muestreo fue de 80 ° C-90 ° C. Se analizó la diversidad microbiana del metagenoma del cultivo enriquecido (ES) a través de secuenciación masiva Shotgun. La muestra utilizada fue obtenida a partir del inóculo de 10 g de suelo a 15 cm (P-15) en medio inductor de lipasas (Shmidt-Dannert) y denominada como ES. Los resultados de diversidad y dominancia se analizaron con aquellos taxones que tuvieron una abundancia $\geq 0.1\%$. Se generaron un total de 11,179, 533 lecturas a partir del secuenciador HiSeq 2500, en cuyo análisis previo a la generación de contigs reveló un total de 42 phyla, 85 clases, 161 ordenes, 328 familias, 767 géneros y 1524 especies, donde los phyla predominantes fueron: Firmicutes (85.80%), Proteobacteria (6.35%), Actinobacteria (5.38%), Deinococcus-Thermus (0.55%),

Tenericutes (0.46%), Bacteroidetes (0.29%), Chloroflexi (0.26%), Acidobacteria (0.22%) y Spirochaetes (0.20%) mientras que el resto de los phyla menos dominantes representaron el 0.44% (Figura 4.18) .

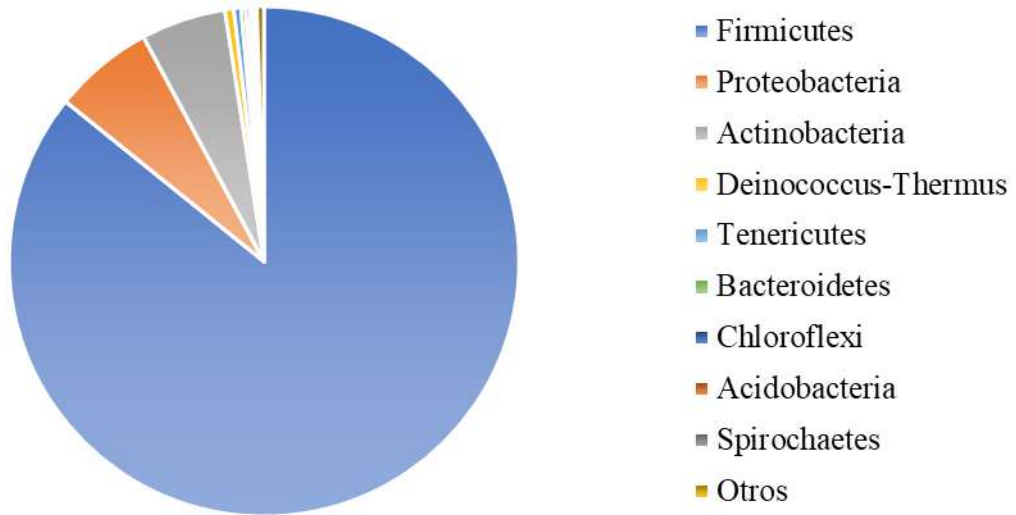


FIGURA 4. 18. Phyla predominantes en la muestra enriquecida (ES).

Las clases dominantes fueron Bacilli (85.10%), Actinobacteria (5,38%), Alphaproteobacteria (2.30%), Betaproteobacteria (1.78%), Gammaproteobacteria (1.71%), Deinococci (0.55%), Deltaproteobacteria (0.52%), Mollicutes (0.46%), Negativicutes (0.42%), Clostridia (0.27%), Spirochaetia (0.20%), Chloroflexi (0.20%), Acidobacteriia (0.19%) y Flavobacteriia (0.16%).

En cuanto a los ordenes los dominantes fueron los Bacillales (84.91%), Actinomycetales (4.97%), Burkholderiales (1.51%), Rhizobiales (0.78%), Pseudomonadales (0.78%), Rhodobacterales (0.46%), Selenomonadales (0.42%) , Thermales (0.39%), Xanthomonadales (0.38%) , Sphingomonadales (0.36%), Rhodospirillales (0.35%), Myxococcales (0.30%), Acholeplasmatales (0.28%), Clostridiales (0.23%), Chromatiales (0.22%), Spirochaetales (0.20%), Chloroflexales (0.20%), Acidobacteriales (0.19%), Lactobacillales (0.18%), Caulobacterales (0.17%), Solirubrobacterales (0.16%), Flavobacteriales (0.16%), Deinococcales (0.16%), Mycoplasmatales (0.14%), Rhodocyclales (0.11%) y Enterobacteriales (0.10%).

En el caso de las familias 47 fueron dominantes, Bacillaceae (83.20%), Streptomycetaceae (0.83%), Pseudomonadaceae (0.70%), Listeriaceae (0.69%), Pseudonocardiaceae (0.57%), Microbacteriaceae (0.46%), Staphylococcaceae (0.42%), Rhodobacteraceae (0.42%), Burkholderiaceae (0.41%), Thermaceae (0.39%), Oxalobacteraceae (0.38%), Veillonellaceae (0.36%), Sphingomonadaceae (0.35%), Xanthomonadaceae (0.28%), Acholeplasmataceae (0.28%), Mycobacteriaceae (0.27%), Corynebacteriaceae (0.26%), Comamonadaceae (0.25%), Gordoniaceae (0.25%), Nocardiosporeae (0.24%), Micromonosporaceae (0.21%), Chloroflexaceae (0.20%), Nocardiaceae (0.19%), Acidobacteriaceae (0.19%), Spirochaetaceae (0.19 %), Rhodospirillaceae (0.18%), Caulobacteraceae (0.17%), Alcaligenaceae (0.17%), Leuconostocaceae (0.16%), Acetobacteraceae (0.16%), Myxococcaceae (0.15%), Ectothiorhodospiraceae (0.15%), Mycoplasmataceae (0.14%), Intrasporangiaceae (0.13%), Thermomonosporaceae (0.12%), Deinococcaceae (0.12%), Actinomycetaceae (0.12%), Sporolactobacillaceae (0.11%), Dermabacteraceae (0.11%), Nocardiodaceae (0.11%), Bradyrhizobiaceae (0.11%), Cellulomonadaceae (0.11%), Rhodocyclaceae (0.11%), Promicromonosporaceae (0.11%), Micrococcaceae (0.11%), Patulibacteraceae (0.10%) y Enterobacteriaceae (0.10 %).

Los géneros más dominantes fueron *Geobacillus* (50.61%) y *Caldibacillus* (31.03%) (Figura 4.19), seguido de géneros como *Streptomyces* (%), *Pseudomonas* (%), *Listeria* (%), *Anoxybacillus* (%), *Gracilibacillus* (%), *Salinicoccus* (%), *Exiguobacterium* (%), *Burkholderia* (%), *Candidatus Zinderia* (%), *Mitsuokella* (%), *Candidatus Phytoplasma* (%), *Mycobacterium* (%), *Gordonia* (%), *Meiothermus* (%), *Nocardiosis* (%), *Bacillus* (%), *Corynebacterium* (%), *Halobacillus* (%), *Amycolatopsis* (%), *Thiomonas* (%), *Leuconostoc* (%), *Borrelia* (%), *Mycoplasma* (%), *Saccharomonospora* (%), *Rhodococcus* (%), *Deinococcus* (%), *Sphingobium* (%), *Sporolactobacillus* (%), *Brachybacterium* (%), *Cellulomonas* (%), *Bordetella* (%), *Granulicella* (%), *Patulibacter* (%), *Anaeromyxobacter* (%), *Sphingomonas* (%) y *Pseudoxanthomonas* (%) Este tipo de asignaciones directas permiten de manera rápida una panorámica de las comunidades microbianas presentes en los diversos ambientes, sin embargo, no brinda información sobre las dinámicas metabólicas de la comunidad o el tipo de enzimas presentes.

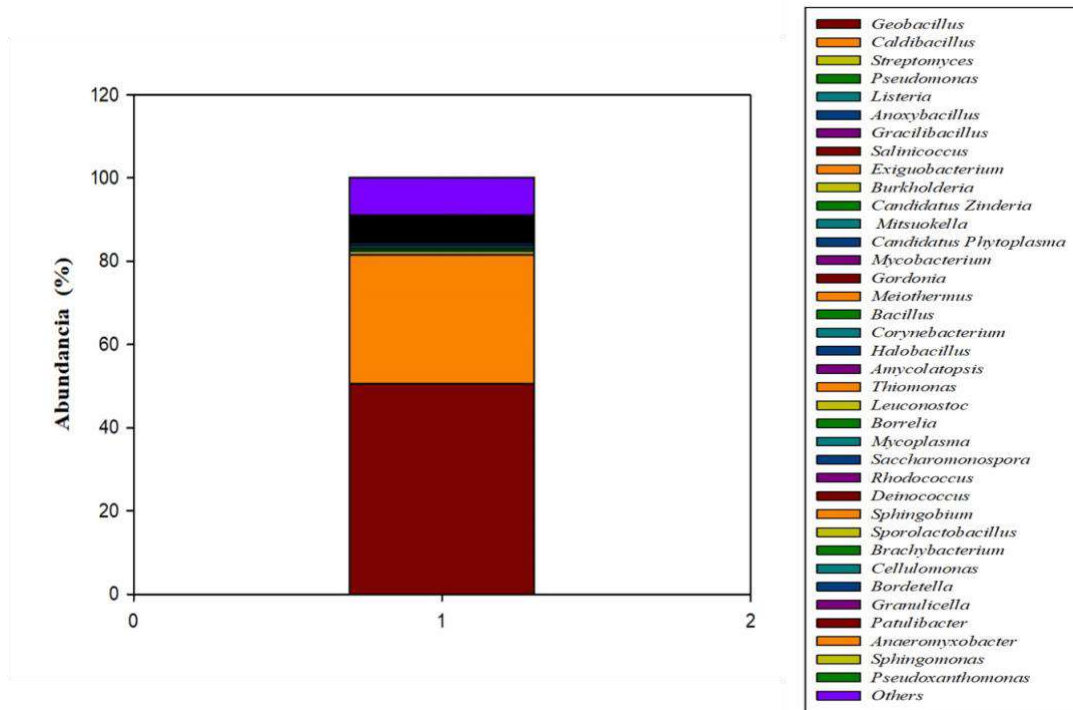


FIGURA 4. 19. Géneros predominantes en la muestra enriquecida (ES).

Dichas lecturas fueron recortadas y ensambladas en secuencias contiguas más largas denominadas contigs los cuales permitieron el análisis de la diversidad enzimática presente en la muestra enriquecida, mediante la asignación taxonómica basada en el nivel de concordancia de los dominios de proteínas (ORF'S) y la asignación de estos a sus respectivos grupos microbianos, permitiendo así identificar genes funcionales de interés. Se generaron más de 100,000 contigs. El análisis de los contigs obtenidos reveló que el 48.06% de los ORF predichos pertenecían a bacterias (51,262 proteínas), y el 4.91% y el 2.4% eran de Archaeas y Eukariota respectivamente (5,239 proteínas para archaea y 2,569 proteínas para Eukaryota). Una pequeña fracción de los ORF totales pertenecía a virus (204 proteínas) y el 44.4 % de los ORF correspondían a secuencias no clasificadas (47,384 proteínas). Este gran número de fragmentos no clasificados no reveló similitudes cercanas en la actual base de datos del NCBI, al parecer, esto podría ser un indicio de la presencia de nuevos organismos en la zona geotérmica "Los Humeros".

Con respecto al número de ORF'S asignados para Bacteria (51,262 proteínas), se identificaron un total de 25 filos, siendo los predominantes en la muestra enriquecida (ES): Firmicutes (68.04%), Proteobacteria (20.15%), Actinobacteria (4.65%), Cyanobacteria (1.93%), Deinococcus-Thermus (0.97%), Thermogogae (0.76%), Aquificae (0.75%), Chloroflexy (0.75%), Acidobacteria (0.33%), Spirochaetes (0.32%), Bacteriodetes (0.28%), Chlorobi (0.22%), Nitrospirae (0.13%), Chlamydiae (0.13%), Dictyoglomi (0.13%) y Tenericutes (0.12%) (Figura 4.20). Así mismo, con respecto a Bacteria, se encontraron más de 250 géneros en la muestra enriquecida, donde el 45.66 % de los ORF se asignaron al género *Bacillus*, otros géneros dominantes de acuerdo al número de ORF fueron *Geobacillus* (12.69 %), *Escherichia* (4.32%) *Pseudomonas* (1.9 %), *Mycobacterium* (1.8%), *Sinorhizobium* (1.17 %), *Haemophilus* (1.1 %) y *Salmonella* (1.05%). Otros géneros presentes en menor proporción (100 a 200 ORF) fueron: *Clostridium* (0.98%), *Shigella* (0.89%), *Anoxybacillus* (0.71%), *Thermus* (0.71%), *Geobacter* (0.63%), *Caldanaereobacter* (0.51%), *Streptococcus* (0.48%), *Listeria* (0.44%), *Brucella* (0.40%), *Morella* (0.40%), *Rickettsiae* (0.38%), *Rhizobium* (0.36%), *Vibrio* (0.35%), *Lactococcus* (0.33%), *Oceanobacillus* (0.33%), *Brevibacillus* (0.32%), *Carboxydotherrmus* (0.31%), *Symbiobacterium* (0.29%), *Streptomyces* (0.28%), *Deinococcus* (0.26%), *Thermoanaerobacter* (0.26%), *Chloroflexus* (0.24%), *Pelotomaculum* (0.24%), *Rhodobacter* (0.24%), *Lactobacillus* (0.22%), *Burkholderia* (0.20%) y *Desulfuromaculum* (0.20%), mientras que el 10.04 % restante fue para aquellos con menos de 100 ORF por género. Los géneros dominantes se muestran en la figura Figura 4.21

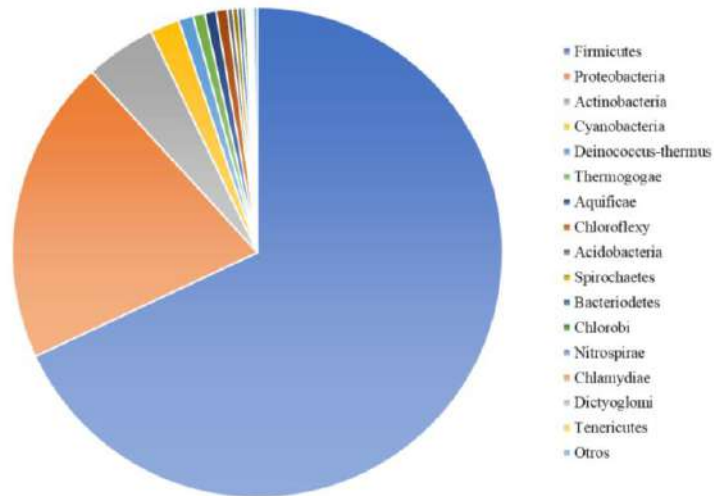


FIGURA 4.20. Phyla dominantes en la muestra enriquecida (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.

FIGURA 4.21. Géneros dominantes en la muestra enriquecida (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.

De los 106,660 contigs correspondientes a los dominios de proteínas (ORF) obtenidos de la muestra enriquecida, 920 corresponden a enzimas hidrolíticas, como peptidasas, pululanasa y serin aminopeptidasas, asociadas a diversas actividades como la esporulación y la exportación de enzimas a través de la pared celular, de las cuales 227 corresponden a enzimas hidrolíticas relacionadas con alguna actividad lipolítica. Como se esperaba, dado a las abundancias relativas observadas previamente, los géneros dominantes corresponden a *Bacillus* (473 dominios de proteína ORF) y *Geobacillus* (58 dominios de proteína ORF) (Figura 4.22), géneros que se sabe que contienen un gran número de microorganismos productores de enzimas lipolíticas, y que han sido aislados de diversos ambientes. Se encontraron 35 familias de enzimas hidrolíticas siendo las más abundantes las Glicosil hidrolasas, Hidrolasas, Peptidasas, Ab-hidrolasas, Carbon nitrógeno hidrolasas. Entre las enzimas hidrolíticas también se encontraron Lipasas GDSL (actividad lipasa/ esterasa) y Esterasas, siendo las esterasas más abundantes que las lipasas en la muestra enriquecida. (Figura 4.23).

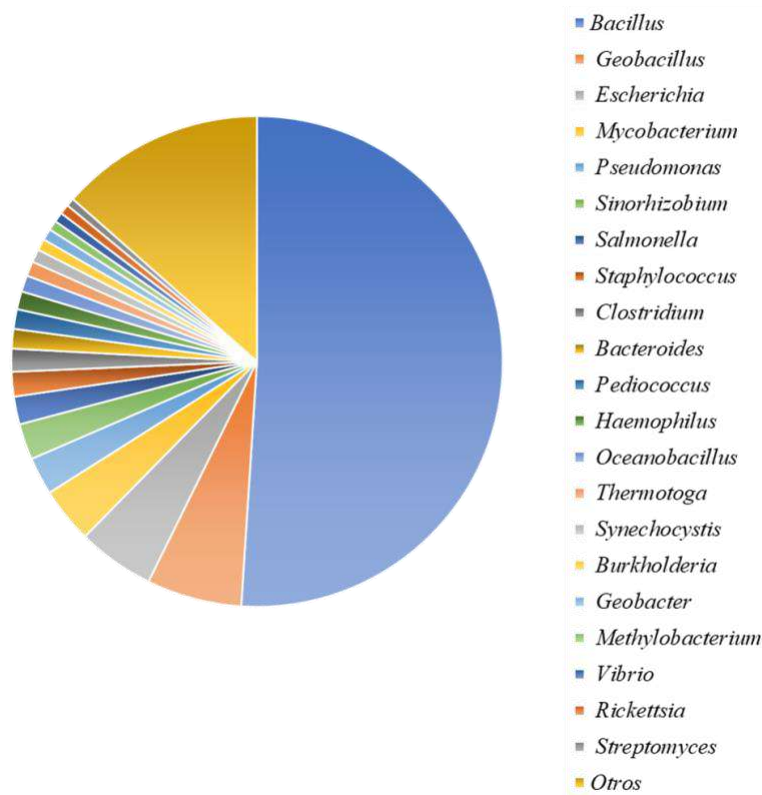


FIGURA 4.22. Géneros dominantes de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas observados en la muestra (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.

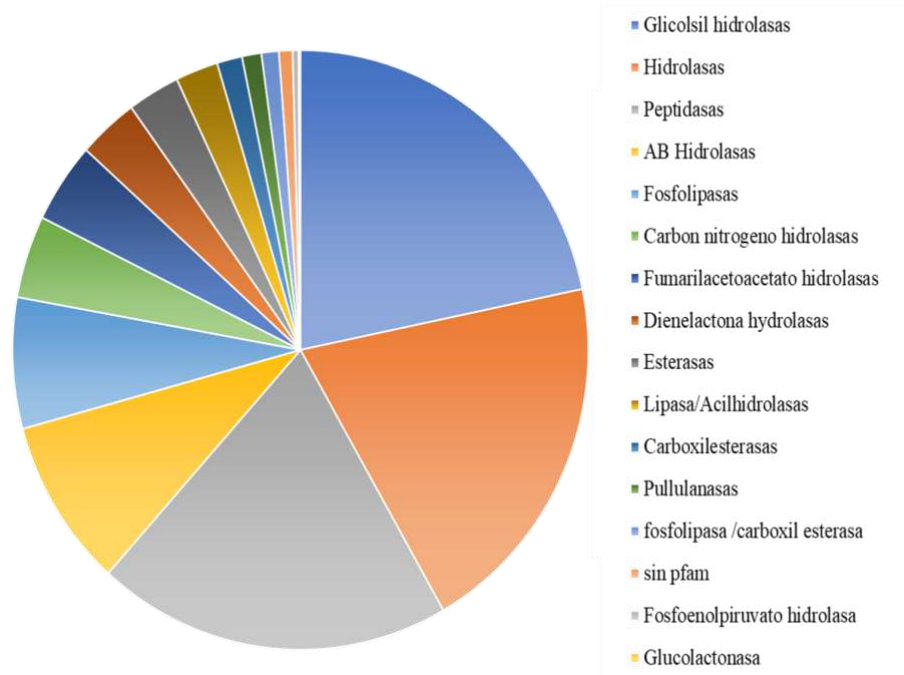


FIGURA 4.23. Familias de enzimas hidrolíticas en la muestra (ES) de acuerdo al número de dominios de proteínas (ORF'S) asignados a cada taxón.

El hallazgo de 920 secuencias correspondientes a algún tipo de enzima hidrolítica y 227 correspondientes a alguna actividad lipolítica (Esterasa, Lipasa) contrasta con la obtención de las nueve cepas con actividad lipolítica aisladas por cultivo, pero abre una oportunidad tanto para la búsqueda por secuencia, clonación e identificación de éstas para evaluar sus posibles aplicaciones en la industria, sobre todo 152 secuencias permanecen bajo el estatus “proteína sin caracterizar” (Uncharacterized protein) o con actividad putativa.

A nivel de especie, a pesar de que el mayor número de secuencias de enzimas hidrolíticas se asignaron a especies como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Geobacillus stearothermophilus* de acuerdo a su porcentaje de concordancia con secuencias ya reportadas y validadas en la base de UNIPROT y NCBI, también se reportaron concordancias con microorganismos como *Pediococcus pentosaceus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Thermotoga maritima*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium meliloti*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus Kaustophilus*, *Geobacter metallireducens* y *Haemophilus influenzae*.

Aunado a lo ya mencionado, también se compararon las asignaciones taxonómicas obtenidas a partir de los ORF identificados en la muestra enriquecida (ES) con los datos metagenómicos obtenidos mediante el análisis del gen del 16S RNAr de las dos muestras de suelo a diferentes profundidades (P-15 y P-50), es evidente que ciertas comunidades microbianas fueron favorecidas por el cultivo en medio rico en aceite, aumentando así sus abundancias haciéndolas detectables, además, apesar del amplio uso del gen del 16S RNAr para la identificación taxonómica de bacterias, existen varios aspectos que limitan la interpretación de los resultados derivados de éste, como el número de copias por genoma que varían de 1 a 15 o más copias, o la variación entre cepas de la misma especie e incluso se ha relacionado el número de copias obtenido con las estrategias adaptativas de las bacterias, ya que el número de copias de algunos taxones esta relacionado con su habilidad de respuesta en condiciones favorables (Vétrovsk y Baldrian 2013), lo que hace importante la comparativa con técnicas de secuenciación como el Shot Gun.

En general, la distribución de la diversidad fue similar a pesar del sesgo esperado al haber sido enriquecida la muestra en un medio selectivo para microorganismos lipolíticos. Los phyla dominantes en las tres muestras fueron Firmicutes y Proteobacteria. Sin embargo, los phyla Armatimonadetes y Thermodesulfobacteria estuvieron presentes en las muestras de suelo P-15 y P-50, pero no en la muestra enriquecida (ES), y phyla como Tenericutes y Fusobacteria presentes en la muestra enriquecida (ES) solo estaban presentes en la muestra P-50 a 90 ° C.

Al realizar la comparativa, se observó que algunos géneros estuvieron presentes solo en el análisis de la muestra enriquecida (Shot gun) como el género *Carboxydotherrmus* un carboxidotrofo hidrogenógeno termofílico (reductor de hierro férrico) que tiene la propiedad interesante de producir hidrógeno como producto de desecho mientras se alimenta de monóxido de carbono y agua (Fukuyama *et al.*, 2019), o el género *Pelotaculum* una bacteria oxidante de propionato sintrófica que es altamente dependiente de la presencia de microorganismos que consumen hidrógeno y Arqueas metanogénicas (Imachi *et al.*, 2002; Kosaka *et al.*, 2008). Además de la presencia de varios acidófilos, como los géneros *Methylacidiphilum* y *Acidimicrobium* (de los phyla Verrucomicrobia y Actinobacteria respectivamente) con el 1% de los ORF, para los cuales la condición de crecimiento óptima es de pH 2-2.5 y la temperatura de crecimiento óptima es 60 ° C (Hou *et al.*, 2008). También se detectó la presencia de *Candidatus desulforudis*, una bacteria monotípica, que vive en profundidades de 1,5 a 3

kilómetros (0,93 a 1,86 millas) por debajo de la superficie de la tierra, en los sistemas hídricos subterráneos, esta es la única bacteria encontrada en muestras de agua obtenidas a 2.8 kilómetros (Chivian *et al.*, 2008) y el incultivable “*Candidatus Solibacter*” (Chan *et al.*, 2015).

A pesar de que no fueron de los géneros más dominantes en ninguna de las tres muestras, (como *Geobacillus* y *Caldibacillus*) se detectó la presencia de los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Thermoanaerobacter* y *Moorella* conocidos reductores de sulfato, hidrogenógenos y acetógenos, que desempeñan un papel importante en la conversión de CO, debido a su capacidad para usar CO potencialmente tóxico y producir H₂ que es utilizado como fuente de carbono por otros microorganismos, haciendolos importantes productores primarios en los entornos extremos (Sokolova y Lebedinsky 2013; Tiquia-Arashiro., 2014, Yoneda *et al.*, 2015).

4.5 Etapa independiente de cultivo

4.5.1 Diversidad microbiana de muestras de suelo a 15 y 50 cm de profundidad.

La obtención de DNAm se realizó a partir de dos muestras de suelo a 15 y 50 cm de profundidad que se designaron como P-15 y P-50. Se obtuvieron 21,623 y 25,425 fragmentos de genes de ARNr 16S para P-15 y P-50 respectivamente. El 99% de los fragmentos del gen 16S RNAr se asignaron a Bacterias en ambas muestras, mientras que del 0,2 al 0,8% pertenecían a Archaea. Los índices de diversidad alfa de las muestras P-15 y P-50 indicaron una diversidad moderada de acuerdo al índice de Shannon-Wiener estos cálculos se presentan en la Tabla 4.6 Sin embargo, el índice de diversidad en la muestra P-50 fue mayor que en la muestra P-15, indicando una mayor riqueza de especies, esto contrasta con lo reportado en otros ambientes geotérmicos donde los índices de diversidad disminuyeron con la temperatura (Chan *et al.*, 2015, Rincón-Molina *et al.*, 2018).

TABLA 4. 6 Índices de diversidad

	P-15	P-50
No. De lecturas	21,623	25,425
Riqueza		
Especies Observadas	650	682
Chao 1	953.88	898.5
Diversidad		
Shannon-Wiener (H')	3.83	4.12

La muestra denominada P-15 mostró un total de de 17 phyla siendo los phyla predominantes: Firmicutes con 66 % de los fragmentos del gen 16S RNAr, Chloroflexi (9.98%), Proteobacteria (7.48%), Actinobacteria (4.63%), Acidobacteria (4.19%), Planctomycetes (1.38%), Verrumicrobia (1.03%), Aquificae (0.81%), Bacteroidetes (0.75%), Armatimonadetes (0.73%), Nitrospirae (0.60%), Cyanobacteria (0.47%), Thermotogae (0.45%), Gemmatimonadetes (0.34%), Deinococcus-Thermus (0.25%), Synergistetes (0.17%) y Dictyoglomi (0.11%).

La muestra denominada P-50 mostró un total de de 18 phyla siendo los phyla predominantes: Firmicutes (48.14%), Chloroflexi (10.94%), Acidobacteria (6.92%), Proteobacteria (6.66%), Actinobacteria (6.10%), Aquificae (4.92%), Nitrospirae (4.47%), Thermotogae (4.08%), Bacteroidetes (3.43%), Dictyoglomi (0.87%), Synergistetes (0.75%), Planctomycetes (0.63%), Deinococcus-Thermus (0.58%), Gemmatimonadetes (0.52%), Verrucomicrobia (0.23%), Thermodesulfobacteria (0.21%), Cyanobacteria (0.16%) y Armatimonadetes (0.15%). En la figura 4.24 se muestran las abundancias a nivel Phylum de ambas muestras.

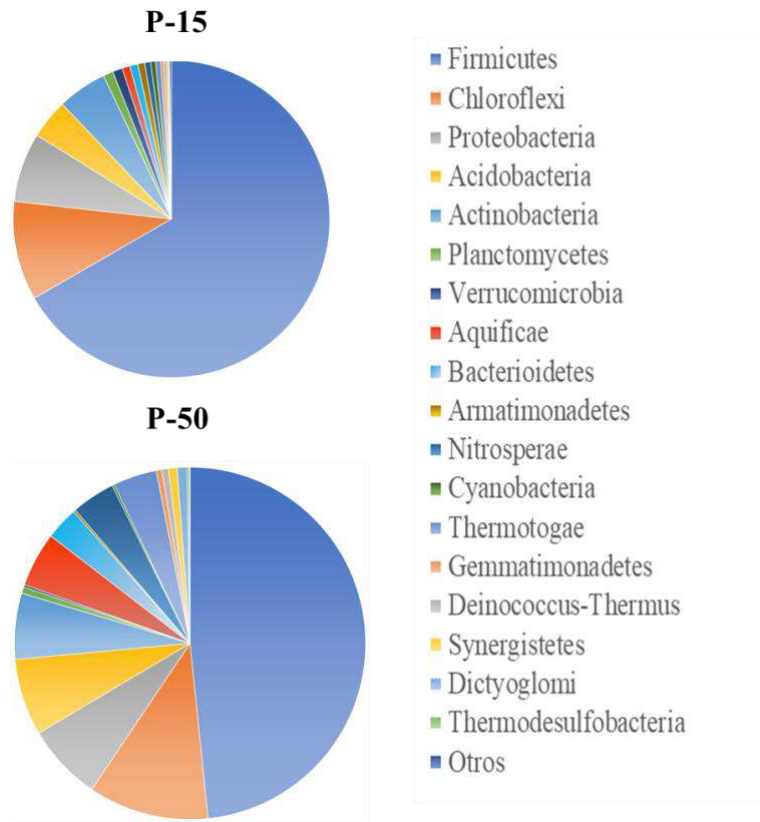


FIGURA 4.24. Phyla predominantes ($\geq 0.1\%$) de las muestras P-15 y P-50.

Los phyla dominantes coinciden parcialmente con otros reportes de zonas geotérmicas en México, como el Paricutín (Michoacán) donde los phyla dominantes en los suelos volcánicos fueron Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria (Medrano-Santillana *et al.*, 2017) o el cráter del lago en el volcán el Chichon en Chiapas, que es de carácter ácido donde los phyla dominantes en el sedimento a 92°C fueron Firmicutes y Proteobacteria (Rincón-Molina *et al.*, 2018).

La muestra P-15 mostró un total de 31 clases, siendo las dominantes Bacilli (60.68%), Ktedonobacteria (6.44%), Clostridia (5.46%), Acidobacteria (4.18%), Actinobacteria (2.88%), Alphaproteobacteria (2.84%), Thermomicrobia (2.32%), Gammaproteobacteria (2.10%), Deltaproteobacteria (1.98%), Planctomycetacia (1.16%), mientras que la muestra P-50 mostró un total de 34 clases siendo las dominantes Bacilli (30.68%), Clostridia (17.47%), Thermomicrobia (7.13%), Acidobacteria (6.93%), Aquificae (4.93%), Nitrospira (4.47%), Thermotogae (4.08%),

Actinobacteria (3.83%), Cytophagia (3.14%), Gammaproteobacteria (2.20%), Deltaproteobacteria (1.71%), Ktedonobacteria (1.70%) y Alphaproteobacteria (1.65%).

En el caso de los ordenes la muestra P-15 mostró un total de 63 ordenes siendo los dominantes Bacillales (60.08%), Ktedonobacterales (4.22%), Thermoanaerobacterales (3.01%), Thermomicrobiales (1.78%), Rhodospirillales (1.61%), Thermogemmatissporales (1.55%), Clostridiales (1.38%), Planctomycetales (1.15%), Acidobacteriales (1.11%) y Thermoanerobacterales (1.02%) y la muestra P-50 mostró un total de 65 ordenes siendo los dominantes Bacillales (29.84%), Thermoanaerobacterales (14.05%), Thermomicrobiales (5.40%), Aquificales (4.92%), Nitrospirales (4.47%), Thermotogales (4.08%), Clostridiales (1.98%), Sphaerobacterales (1.71%), Thermoanerobacterales (1.33%), Streptosporangiales (1.16%) y Thermogemmatissporales (1.12%)

En el caso de las familias la muestra P-15 mostró un total de 82 familias siendo los dominantes Bacillaceae (30.69%), Alicyclobacillaceae (18.18%), Paenibacillaceae (8.37%), Thermoactinomycetaceae (2.18%), Ktedonobacteraceae (2.13%), Thermosporotrichaceae (2.11%), Thermomicrobiaceae (1.79%), Thermogemmatissporaceae (1.56%), Thermoanaerobacteraceae (1.44%), Planctomycetaceae (1.15%), Acidobacteriaceae (1.12%), Thermodesulfobiaceae (1.10%), Acetobacteraceae (1.05%), y Thermoanaerobacteraceae (1.02%). En el caso de las familias ordenes la muestra P-50 mostró un total de 81 familias siendo los dominantes Bacillaceae (23.48%), Thermodesulfobiaceae (6.64%), Thermomicrobiaceae (5.43%), Thermoanaerobacteraceae (4.63%), Nitrospiraceae (4.49%), Thermotogaceae (4.10%), Alicyclobacillaceae (3.46%), Hydrogenothermaceae (3.33%), Rhodothermaceae (3.01%), Sphaerobacteraceae (1.72%), Paenibacillaceae (1.49%), Thermoanaerobacteraceae (1.34%), Thermoactinomycetaceae (1.19%), Thermogemmatissporaceae (1.13%) y Thermomonosporaceae (1.13%).

En cuanto a la diversidad en relación con la temperatura de ambas muestras de suelo denominadas P-15 y P-50 (80°C y 90°C respectivamente), fue similar, variando solo en términos de abundancia relativa de los taxones reportados, en donde la temperatura parece ser un factor que favoreció ciertos grupos taxonómicos con microorganismos termófilos e hipertermófilos. La diferencia más evidente entre ambas muestras a nivel de phylum, es la presencia de Thermodesulfobacteria (0.21%) solo en la muestra de suelo a 90°C (P-50). Thermodesulfobacteria es un phylum de bacterias termófilas anaerobias Gram negativas, sulfato

reductoras, las cuales presentan características inusuales, como las uniones entre sus lípidos y el glicerol mediante enlaces éter, una característica que es típica de las arqueas. Los miembros de este phylum han sido aislados de aguas termales de origen volcánico, aguas profundas sulfurohidrotermales y otros ambientes marinos (Jeanthon *et al.*, 2002), cuyo metabolismo está relacionado con la reducción de compuestos orgánicos, como aminoácidos azufrados, e inorgánicos, como sulfato, sulfito o azufre elemental y la producción de H₂S. Peiffer y su equipo de trabajo en 2018 midieron las fluctuaciones de las emanaciones de gases (CO₂, CH₄ y H₂S) en la zona geotérmica “Los Humeros”, encontrando fluctuaciones en las mismas, así como la ausencia del aroma característico en emanaciones de H₂S en algunas áreas, atribuyendo la disminución de CO₂ y CH₄ a la posible presencia de comunidades bacterianas en el suelo.

La abundancia relativa del phyla Firmicutes fue mayor en P-15 (80 ° C) en comparación con P-50 (90 ° C). Sin embargo, Firmicutes fue el phyla dominante en ambas temperaturas, la abundancia relativa de los phyla Chloroflexi, Proteobacteria Actinobacteria y Acidobacteria no mostró cambios importantes en las dos temperaturas (80 y 90°C), pero, la abundancia relativa phyla como: Aquificae, Nitrospereae, Thermotogae, Bacteroidetes incremento en la muestra de suelo P-50 a 90 ° C.

La dominancia del Phylum Firmicutes, que son conocidos microorganismos formadores de esporas, era de esperarse, ya que se ha reportado que existe una relación entre el incremento de la temperatura y la esporulación, que a su vez se traduce como la dominancia de este tipo de microorganismos en ambientes con temperaturas extremas, aunado al hecho de que la esporulación es un mecanismo de respuesta ante condiciones limitantes o de estrés (altas temperaturas, ambientes pobres en nutrientes, altas concentraciones de metales) hecho reportado por Filippidou y colaboradores en 2016, quienes estudiaron el efecto de ciertas condiciones extremas y su relación con la dominancia de microorganismos formadores de esporas en ambientes extremos, relacionando el hecho de que en conjunto las altas temperaturas, los ambientes pobres en nutrientes y con cierto contenido de metales pesados parecen favorecer la dominancia de los microorganismos formadores de esporas.

Dado que las altas temperaturas afectan la estabilidad de las proteínas y la integridad física de los microorganismos, la estructura y actividad de la comunidad bacteriana se ve afectada (Sawle y Ghosh 2011; Siliakus *et al.*, 2017), reduciendo así la formación de material orgánico, la diversidad bacteriana podría estar directamente relacionada con las fluctuaciones de temperatura

y el contenido de carbono orgánico (Rincon-Molina *et al.*, 2018). Existen numerosos reportes alrededor del mundo en otros sistemas geotérmicos que toman como factor determinante la temperatura, cuyo comportamiento es similar al observado en la zona geotérmica “Los Humeros”, en donde a mayor temperatura se observaron cambios en la diversidad microbiana, así como en la estructura de la comunidad (Benson *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2015, Chan *et al.*, 2017). En México, Rincón-Molina y su equipo de trabajo en el 2018 reportaron que los índices de riqueza y diversidad bacteriana de las comunidades microbianas en el Cráter del Lago del Volcán “El Chichón eran más altos a 50 ° C que a 92 ° C. A su vez notaron una diferencia en el número de phyla en ambas temperaturas. Un total de 15 y 9 phyla se encontraron en el sedimento a 50 ° C y 92 ° C respectivamente, difiriendo de lo encontrado en este estudio donde a 90 ° C se encontraron 18 phyla, así como incrementos en la abundancia relativa de algunos grupos.

Por otro lado, la diversidad presente en las comunidades microbianas y su respectiva abundancia no está limitada a un solo factor (Temperatura, pH, contenido de agua, contenido de metales pesados, nutrientes), sino que también está relacionada con el tipo de ambiente (i.e., suelo, arena, lodo, sedimento, biopelículas, películas microbianas, agua, suelo volcanico) y que cada factor limitante es multiplicativo, debido a que las comunidades microbianas reaccionan al conjunto de factores presentes y no a la variación de uno solo (Filippidou *et al.*, 2016). Por ejemplo, las comunidades bacterianas en sedimentos geotérmicos, suelos volcánicos y aguas termales están dominadas regularmente por los phyla Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria (Medrano-Santillana *et al.*, 2017, Chan *et al.*, 2017, Rincón-Molina *et al.*, 2018). Sin embargo, el phylum Cloroflexi, que incluye microorganismos termófilos aeróbios, reportado en este estudio entre los phyla dominantes y que está presente en ambas muestras de suelo P-15 y P-50 (80°C y 90°C), comúnmente es dominante en aguas termales y tapetes microbianos (microbial mats) (Wang *et al.*, 2013; Prieto-Barajas *et al.*, 2018), pero no son dominantes en ambientes secos como fumarolas y respiraderos de vapor y volcanes (Costello *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2011; Rincon-Molina *et al.*, 2018), sin embargo, se ha reportado dentro de los phyla dominantes en respiraderos y vapor de agua en fumarolas de un volcán en Hawai (Wall *et al.*, 2015), así como en las salidas de vapor de fumarolas de los volcanes Paricutín y Sapichu (Brito *et al.*, 2019), relacionando directamente la incidencia de este grupo con el contenido de agua en el ambiente.

Otros ejemplos de este tipo de variaciones en la diversidad y abundancias es lo reportado por Chan y su equipo de trabajo en el 2017, sobre la diversidad a distintas temperaturas (de 43 ° C a 110 ° C) en aguas termales de Malasia, donde reportaron que los phyla Firmicutes y Proteobacteria eran dominantes en dos de las seis muestras, con temperaturas de 60 -110°C y de 40°C -50°C, donde la composición de la primera mostró que tenía altos valores de carbono total, aluminio, arsénico y sulfuro con un pH de 8.2 y la segunda tenía diferentes concentraciones de hierro y fosfato con un pH de 6.9. En los otros rangos de temperatura observaron que los phyla dominantes fueron Aquificae, Clorobi, Thermotogae, Proteobacteria y Firmicutes (80°C a 110°C) en cuya composición el hierro no fue detectado y presentó menores concentraciones de aluminio y arsénico, pero una mayor cantidad de sulfuro. Elementos como el Fe, contenido de carbono orgánico, así como la humedad y la salinidad parecen ser de los factores ambientales que más impacto y correlación tienen con las comunidades microbianas. Este hecho pudiera estar también relacionado con la diversidad en la zona geotérmica “Los Humeros” donde en términos de concentración de metales, Ca, Mg y K fueron ligeramente más altos para P-50 y el Na y Fe para la muestra de P-15, ambas muestras de suelo mostraron niveles similares de N, P, CU, Zn, Mn y B (Tabla 4.1). Este tipo de resultados muestran que, si bien ciertos grupos taxonómicos son característicos de ambientes específicos y algunos son dependientes de la temperatura, los perfiles de población son muy diferentes, dependiendo de cada característica física como pH, mineralogía, porosidad, altos niveles de metales, incluso contenido de agua en conjunto.

A pesar de que no fueron dominantes Aquificae y Thermotogae son los únicos phyla bacterianos reconocidos como hipertermofílicos. También se sabe que el Phylum Firmicutes posee varios géneros termofílicos y termotolerantes, como *Geobacillus* y *Bacillus*, por ejemplo. Algunos de los fragmentos del gen 16S RNAr del phyla Aquificae mostraron porcentajes de similitud con especies como *Thermosulfidibacter takaii*, *Desulfurobacterium atlanticum*, *Thermovibrio ruber* y *Phorcysium thermohydrophiumum*, que son bacterias termofílicas, quimiolitioautotrófas, nitrato amoniacantes e hidrógenos oxidantes que han sido reportadas en respiraderos hidrotermales (Nunoura *et al.*, 2008, Perez-Rodriguez *et al.*, 2012). Sin embargo, varios de los fragmentos del gen del 16S RNAr para los géneros de Aquificae detectados en este trabajo no muestran similitudes con secuencias reportadas en la actual base de datos de NCBI y los fragmentos permanecen sin clasificar.

En el caso del phylum Thermotogae, la mayoría de los fragmentos del gen 16S rRNA fueron asignados a los géneros *Thermotoga* y *Fervidobacterium*, pero también encontraron algunos fragmentos que muestran similitudes cercanas con *Thermotoga marítima* descubierta por primera vez en el sedimento de un área geotérmica marina cerca de un volcán, y reportada también en aguas termales y respiraderos hidrotermales con una temperatura ideal de crecimiento de 80 ° C, capaz de crecer a 55–90 ° C y siendo la única bacteria que crece a esta temperatura tan alta; los únicos otros microorganismos que se sabe que viven en estos entornos extremos son miembros del dominio Archaea.

En total, tomando en cuenta la abundancia relativa al $\geq 0.1\%$, se encontraron 90 géneros en ambas muestras de suelo (P-15 y P-50). Los géneros dominantes en el suelo a 80° C (P-15) fueron: *Alicyclobacillus* (17.98%), *Bacillus* (13.52%), *Anoxybacillus* (10.20%), *Geobacillus* (6.41%), *Ammoniphilus* (5.45%), *Ktedonobacter* (2.22%), *Thermosporothrix* (2.20%), *Thermomicrobium* (1.87%), *Thermogemmatispora* (1.63%), *Thermoactinomyces* (1.25%), *Moorella* (1.19%), *Coprothermobacter* (1.15%), *Calditerricola* (1.01%), *Ammonifex* (1.07%), y *Brevibacillus* (1.06%). Los géneros dominantes en el suelo a 90° C (P-50) fueron: *Anoxybacillus* (11.38%), *Coprothermobacter* (7.14%), *Geobacillus* (6.53%), *Thermomicrobium* (5.84%), *Moorella* (4.52%), *Thermodesulfovibrio* (4.44%), *Calditerricola* (4.19%), *Fervidobacterium* (3.99%), *Alicyclobacillus* (3.64%), *Rhodothermus* (3.24%), *Sulfurihydrogenibium* (2.78%), *Bacillus* (2.63%), *Fervidicola* (1.92%), *Sphaerobacter* (1.85%), *Thermosulfidibacter* (1.68%), *Ammonifex* (1.44%), *Thermogemmatispora* (1.21%) y *Caldilinea* (1.01%). En la figura 2.25 se muestra la comparativa de la abundancia a nivel género de ambas muestras de suelo.

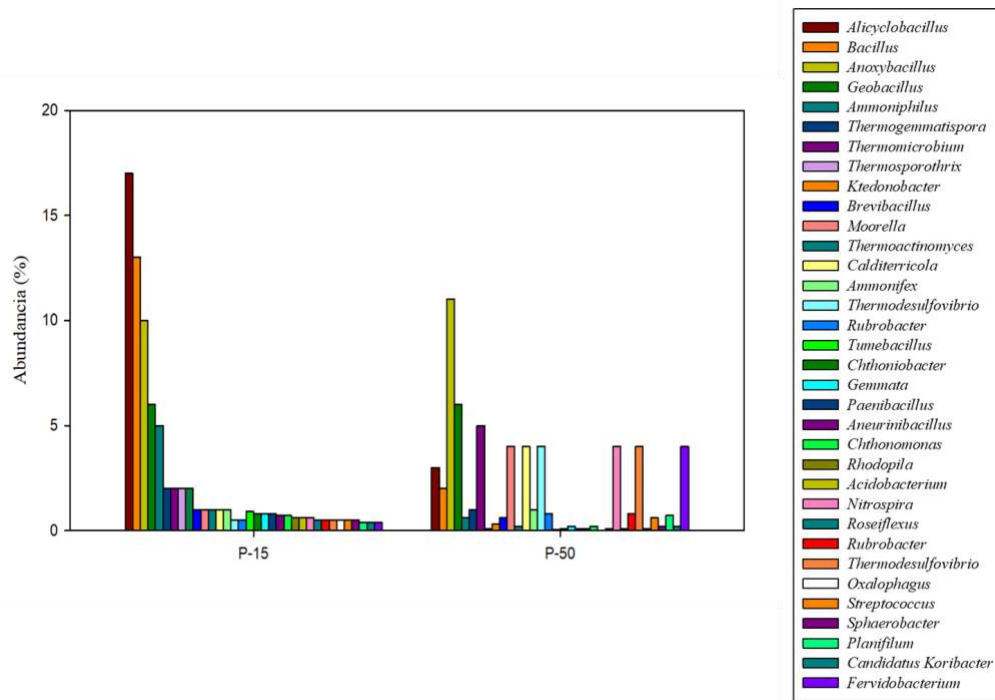


FIGURA 4.25 Comparativa de la abundancia a nivel género de las muestras de suelo P-15 y P-50.

La abundancia relativa a nivel género también se vio influenciada por la temperatura, donde la mayoría de los géneros pertenecientes a la clase Bacilli fue alta en la muestra de suelo P15 a 80° C en comparación con la de 90 ° C, pero no en los pertenecientes a las Ktedonobacteria. Los géneros *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus* y *Geobacillus* que son poblaciones de microorganismos termófilos comunes en muchos ambientes de aguas termales (Chan *et al.*, 2015), también fueron identificados como los géneros con el mayor número de secuencias del gen del 16S RNAr a 80°C en este estudio. Los géneros *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Ammoniphilus* *Thermogemmatospira*, *Thermomicrobium*, *Thermosporothrix*, *Ktedonobacter* y *Brevibacillus* tuvieron menos abundancia a 90°C, mientras que géneros como *Thermomicrobium*, *Moorella*, *Calditerricola*, *Thermodesulfovibrio*, *Fervidobacterium*, *Coprothermobacter*, *Sphaerobacter*, *Rhodothermus*, *Sulfurihidrogenibium* y *Thermosulfidibacter* se vieron favorecidos con el incremento de la misma. El género *Geobacillus* no mostró diferencias en su abundancia en ambas temperaturas.

Alicyclobacillus fue el género más abundante en la muestra P-15 a 80°C, pero su abundancia disminuyó con el incremento de la temperatura (90 °C). Aunado a esto, con el incremento de la temperatura y la profundidad los ambientes tienden a volverse más anaerobios (Li et al., 2015), esto también puede estar relacionado con el hecho de que el género *Anoxybacillus* fue más abundante en la muestra a 50 cm (90°C). Muchos microorganismos son anaerobios bajo condiciones de altas temperaturas, pero varios microorganismos aerobios fueron encontrados en la muestra a 50 cm (P-50), por ejemplo *Ammoniphilus* sp. CC-RT-E, *Alicyclobacillus pohliae*, *Bacillus niacini*, *Ktedonobacteria bacterium Hsw-67*, *Rhizobium* sp. CAF431, *Thermomicrobium roseum*, *Bacillus pseudomegaterium*, *Calditerricola satsumensis*, *Thermoactinomyces intermedius*, *Bacillus clausii*, *Thermogemmatispora foliorum*, *Thermogemmatispora onikobensis* y *Geobacillus thermoleovorans*.

Un género, que, aunque no fue dominante, pero que se detectó en ambas muestras fue *Chloroflexus*, que son bacterias fotosintéticas termofílicas, filamentosas y anoxigénicas que pueden crecer fototróficamente en condiciones anaeróbicas, cuya presencia parece tener una relación cercana con el grupo Cianobacteria, ya que *Chloroflexus* consume fuentes de carbono orgánico (es decir, acetato, lactato, propionato y butirato) que son liberados por la asociación con las Cianobacterias. (Tang et al., 2011). En las tres muestras (ES, P-15 y P50) la abundancia relativa tanto de *Chloroflexus* como de *Cianobacteria* fue baja (menos del 0.1%). Pero este es un claro ejemplo de que las interacciones entre los microorganismos en las comunidades microbianas resultan de carácter complejo, dependiendo de la presencia, función e interacción de toda la variabilidad de los microorganismos presentes y, por lo tanto, los cambios en las poblaciones como los aumentos de las abundancias pueden servir como un indicador de la funcionalidad de los ecosistemas. La baja abundancia relativa de autótrofos, como el phylum Cianobacteria y *Chloroflexus*, respaldan la idea de que, en estos entornos extremos, la biodiversidad de los microorganismos pioneros responsables de la colonización del sitio puede variar en gran medida incluso en pequeñas escalas espaciales y que probablemente está colonización depende mucho de los procesos geobiológicos que están influenciados por mecanismos geológicos subterráneos profundos y está a su vez influye en la diversidad (Crossey et al., 2016).

A nivel de especie, *Calditerricola satsumensis*, *Thermomicrobium roseum*, *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* y *Fervidobacterium sp. TC25* *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus*, *Sulfurihydrogenibium rodmanii*, *Coprothermobacter sp. 3* se vieron favorecidos en el suelo a 90 ° C en comparación con el de 80 ° C. *Alicyclobacillus sp. CCUG 53762* fue la especie dominante a 80 °C. En la figura 4.28 se muestra la comparativa de la abundancia a nivel de especie de ambas muestras de suelo.

A pesar de que el pH en la zona geotérmica “Los Humeros” es catalogado como moderadamente ácido se detectaron, aunque en baja proporción, acidófilos como: *Acidicaldus organivorans*, la proteobacteria acidófila más termofílica o *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus sp.* y *Aciditerrimonas ferrireducens* involucrados en los ciclos de hierro y azufre, *Acidomonas methanolica*, una bacteria acidófila, facultativamente metilotrófica. Otro punto a resaltar fueron las bacterias mesófilas aerobias *Acidicapsa borealis* y *Acidicapsa ligni*, con temperaturas óptimas de crecimiento de 22-28 ° C que también se detectaron. Los acidófilos juegan un papel importante en la minería y la biorremediación, las enzimas producidas por estos microorganismos tienen varias aplicaciones en la industria alimentaria, ya que estas tienen una estructura y estabilidad en ambientes ácidos y son catalíticamente activas en un pH tan bajo como 1.0 (Sharma *et al.*, 2016).

La presencia, así como sus variaciones de abundancia relativa en "Los Humeros" de las especies descritas anteriormente con características metabólicas involucradas en los ciclos del hierro y del azufre, así como otras comunidades con fuertes relaciones dependientes, ya sea en un cofactor mutualista, sintrófico o dependiente, como *Carboxydotherrmus Pelotomaculum*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Thermoanaerobacter* y *Moorella*, podrían estar altamente relacionados a las emanaciones de gases de CO₂, CH₄ y H₂S y su concentración en el suelo en lugar de la profundidad. Las comunidades microbianas termofílicas juegan un papel importante en la conversión de CO y, según los datos disponibles, son las más importantes en la biotransformación de CO en ambientes extremos (Sokolova *et al.*, 2009). Por lo tanto, la determinación de la diversidad de las estructuras bacterianas, así como de las comunidades es de gran importancia para comprender las interacciones sintróficas microbianas y los mecanismos de conversión (Su *et al.*, 2018), ya que se debe considerar también el hecho de que los microorganismos pueden comunicarse con otros grupos específicos para promover la cooperación metabólica.

Considerando la distribución de géneros termofílicos, así como los incrementos de las abundancias en este grupo en particular a 90 ° C, en donde se observó que la dominancia de géneros termófilos en P-15 (*Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Anoxybacillus* y *Geobacillus*) y el aumento de la abundancia relativa de géneros hipertermófilos (*Thermomicrobium*, *Moorella*, *Calditerricola*, *Thermodesulfovibrio*) en la muestra P-50. podemos decir que la temperatura es un parámetro decisivo que determina el perfil de una comunidad. El hecho de que microorganismos reportados como mesófilos se hayan encontrado adaptados a un ambiente con 80 ° C abre la puerta a nuevas enzimas que no solo son estables en pH ácidos, sino que tienen características termofílicas.

A pesar de la ubicuidad de los sistemas geotérmicos, en México, solo existen pocos estudios que exploren la diversidad bacteriana en los campos geotérmicos. Estos estudios se han realizado bajo diversos enfoques metagenómicos: secuenciando el gen 16S RNAr y el análisis de bibliotecas generadas (Rincón-Molina *et al.*, 2018), TRFLP acompañado de análisis de las clonas (Brito *et al.*, 2014, Medrano-Santillana *et al.*, 2017), Metagenómica Illumina MiSeq y pyrosecuenciación del gen del 16S y 18S RNAr (Prieto-Barajas *et al.*, 2018), así como secuenciación de alto rendimiento (HTS) (Brito *et al.*, 2019). Al igual que otros entornos geotérmicos que presentan condiciones fisicoquímicas extremas, estas áreas están desapareciendo debido a su potencial como fuente de producción de energía, y la diversidad aún desconocida o afectada por la intromisión antropogénica del uso del suelo. Por lo tanto, su biodiversidad necesita ser investigada, preservada y dirigida para lograr nuevas vías biotecnológicas. Este trabajo es el primero en investigar la diversidad microbiana dentro del campo geotérmico de "Los Humeros" y su estrecha relación con las fuentes hidrológicas subterráneas. Finalmente, la detección de poblaciones bacterianas tales como reductores de sulfato, lipolíticos, ciclos involucrados en hierro en el sitio geotérmico "Los Humeros" es prometedora para la búsqueda de nuevas enzimas que involucren farmacéutica, biolixiviación y bioremediación.

CONCLUSIONES

A nivel phylum la diversidad presente en la zona geotérmica “Los Humeros” es consistente con otros phyla reportados en otras zonas geotérmicas. Los phyla Firmicutes, Chloroflexi, Proteobacteria y Actinobacteria son los más abundantes.

La abundancia relativa en general a todos los niveles taxonómicos se vio afectada por la temperatura, siendo los hipertermófilos de los grupos más abundantes en la muestra a 90°C (50 cm).

Se detectaron microorganismos reportados en bentos marinos, lo cual indica la estrecha relación entre el sistema hídrico profundo en la zona geotérmica “Los Humeros”.

El medio de cultivo Schmidt-Dannert favoreció la presencia de los phyla Firmicutes y Proteobacteria, así como la dominancia de géneros productores de enzimas lipolíticas como *Geobacillus* y *Bacillus*.

De acuerdo a las características de las enzimas lipolíticas obtenidas de las bacterias aisladas, se sugiere que las enzimas que actúan a nivel intracelular son diferentes a aquellas que se secretan al medio

Las enzimas lipolíticas producidas por las bacterias aisladas en la zona geotérmica “Los Humeros”, presentan características deseables para la industria biotecnológica.

El hallazgo de secuencias sin identificar sugiere una riqueza enzimática y filogenética de la zona geotérmica “Los Humeros”. Este gran número de fragmentos no clasificados podrían ser un indicio de la presencia de nuevos organismos con potencial biotecnológico en esta zona.

RECOMENDACIONES

Realizar el análisis metagenómico de suelos mediante secuenciación masiva de escopeta (Shotgun).

En base a las comunidades microbianas encontradas, elaborar medios de cultivo específicos para el aislamiento de microorganismos de la zona.

Purificar y secuenciar las enzimas lipolíticas identificadas.

Caracterizar las enzimas purificadas y liofilizadas en su pH óptimo y en el pH donde presentaron incremento en su actividad después de 1 h de incubación.

Clonar y sobreexpresar las enzimas que presenten características de interés a la industria.

BIBLIOGRAFÍA

Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 12(Suppl 1), 5–16. doi:10.4137/EBO.S36436.

Aliyu, H., De Maayer, P., Sjöling, S., y Cowan, D.A., (2017). Metagenomic analysis of low-temperature environments. In: Margesin, R. (Ed.), *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Springer, Cham. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_16.

Alsop, E.B., Boyd, E.S., y Raymond, J. (2014). Merging metagenomics and geochemistry reveals environmental controls on biological diversity and evolution. *BMC Ecol* 2014, 14:16.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Amann, R., Ludwig, W., y Schleifer, K. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.

Amaro, A. M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I., y Jerez, C. A. (1991). Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173, 910–915. doi:10.1128/jb.173.2.910-915.1991.

Andrews, (2010). *FastQC: a Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, twentieth ed. (Washington, DC, USA).

Ansorge, W.J. (2016). Next Generation DNA Sequencing (II): Techniques, Applications. *Journal of Next Generation. Sequencing & Applications*. <http://dx.doi.org/10.4172/2469-9853.S1-005>.

Arnal, G., Bastien, G., Monties, N. (2015). Investigating the function of an arabinan utilization locus isolated from a termite gut community. *Appl Environ Microb* 2015; 81:31–9.

Arzate, J., Corbo-Camargo, F., Carrasco-Núñez, G., Hernández, J., & Yutsis, V. (2018). The Los Humeros (Mexico) geothermal field model deduced from new geophysical and geological data. *Geothermics*, 71, 200–211. doi: 10.1016/j.geothermics.2017.09.009.

Axelsson, G, y Gunnlaugsson, E. (2000). Long-term monitoring of high- and low enthalpy fields under exploitation. World Geothermal Congress Pre-Congress Course, Kokonoe, Japan, 226 pp.

Barragán, R.M., Nieva, D., Santoyo, E., Verma, M.P., Izquierdo, G., González, E., 1991. Geoquímica de fluidos del campo geotérmico de Los Humeros Pue (Mexico). *Geotermia* 7, 23–47.

Beja, O., Aravind, L., y Koonin, E. (2000). Bacterial Rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*. 289: 1902-1906.

Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. G. J., (2015). METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1403–1414. doi: 10.1111/1755-0998.12399.

Benson, C.A., Bizzoco, R.W., Lipson, D.A., Kelley, S.T. (2011). Microbial diversity in nonsulfur, sulfur and iron geothermal steam vents. *FEMS Microbiol Ecol* 76:74–88.

Berini, F., Casciello, C., Marcone, G.L., y Marinelli, F. (2017). Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 364, Issue 21. fnx211, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx211>.

Bernard, G., Pathmanathan, J. S., Lannes, R., López, P., y Bapteste, E. (2018). Microbial dark matter investigations: how microbial studies transform biological knowledge and empirically sketch a logic of scientific discovery. *GenomeBiol.Evol.*10,707–715.doi:10.1093/gbe/evy031.

Birkle, P., Merkel, B. (2001). Mineralogical–chemical composition and environmental risk potential of pond sediments at the geothermal field of Los Azufres, Mexico. *Environ Geol* 41:583–592.

Biver, S., Portetelle, D., y Vandebol, M. (2013). Characterization of a new oxidant-stable serine protease isolated by functional metagenomics. *Springerplus* 2:410. doi: 10.1186/2193-1801-2-410.

Borges, N., Matsumi, R., Imanaka, T., Atomi, H. y Santos, H. (2010). *Thermococcus kodakarensis* mutants deficient in di-myo-inositol phosphate use aspartate to cope with heat stress. *J Bacteriol* 2010; 192:191–7.

Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 73–81.

Brazelton, W.J., Nelson, B. y Schrenk, M.O. (2011) Metagenomic evidence for h₂ oxidation and h₂ production by serpentinite-hosted subsurface microbial communities. *Front Microbiol* 2011:2.

Breitwieser, F. P., Lu, J., Salzburg, S. L., (2017). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in bioinformatics*. DOI:10.1093/bib/bbx120.

Brito, E.M., Romero-Núñez, V.M., Caretta, C.A., Bertin, P., Valerdi-Negreros J.C., Guyoneaud, R. y Goñi-Urriza, M. (2019). The bacterial diversity on steam vents from Paricutín and Sapichu volcanoes. *Extremophiles* 23: 249. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01078-8>.

Brito, S. E., Villegas-Negrete, N., Sotelo-González, I., Caretta, C., Goni, M., Gassie, C., Hakil, F., Colin, Y., Duran, R., Gutiérrez-Corona, J., Castillo, H., Cuevas-Rodríguez, G., Malm, O., Machado-Torres, J. P., Fahy, A., Georgina, R., y Guyoneaud, R. (2014). Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers. *Extremophiles: life under extreme conditions*. 18. 10.1007/s00792-013-0624-7.

Brzostowicz, P., Walters, D., Thomas, S., Nagarajan, V., y Rouviere, P. (2003). mRNA differential display in a microbial enrichment culture: Simultaneous identification of three cyclohexanone monooxygenases from three species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 334–42.

Buchfink, B., Xie, C., Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12:59-60.

Cao, H., Wang, Y., Lee, O.O., Zeng, X., Shao, Z. y Qian, P.Y. (2014). Microbial sulfur cycle in two hydrothermal chimneys on the southwest Indian ridge. *MBio* 2014, 5 e00980–00913.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, Noah., y Knight R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108, 4516–4522 DOI: 10.1073/pnas.1000080107.

Carrasco-Núñez, G., Hernández, R. J., De León, B. L., Dávila, H. P., Norinic, G., Bernal, J. P., Jicha, B., Navarro, M., López-Quiroz, P. (2017) Geologic Map of Los Humeros volcanic complex and geothermal field, eastern Trans-Mexican Volcanic Belt. 10.22201/igg.terradigitalis.2017.2.24.78.

Carrasco-Núñez, G., Arzate, J., Bernal, J. P., Carrera, J., Cedillo, F., Dávila-Harris, P., Hernández, J., Hurwitz, S., Lermo, J., Levresse, G., López, P., Manea, V., Norini, G., Santoyo, E., y Willcox, C. (2015). A New Geothermal Exploration Program at Los Humeros Volcanic and Geothermal Field (Eastern Mexican Volcanic Belt). *Proceedings World Geothermal Congress*. P-10.

Chakraborty, K., y Raj, R.P. (2008). An extra-cellular alkaline metalloprotease from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: purification and biochemical characterization. *Food Chem* 109:727–736.

Chan, C. S., Chan, K.-G., Tay, Y.-L., Chua, Y.-H., and Goh, K. M. (2015). Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Front. Microbiol.* 6:177. doi: 10.3389/fmicb.2015.00177.

Chan, C.S., Chan, K.G., Ee, R., Kar-Wai, H., Urbietta, M.S., Donati, E.R., Shamsir, M.S., y Goh, K.M. (2017). Effects of physiochemical factors on Prokaryotic biodiversity in Malaysian circum neutral hot springs. *Front Microbiol* 8:1252.

Chen, G. Q., y Jiang, X. R. (2018). Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 50, 94–100. doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016.

Chen, L. X., Hu, M., Huang, L.N., Hua, Z.S., Kuang, J.L., Li, S.J., y Shu, W.S. (2014). Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. *Int Soc Microb Ecol* 9:1–14.

Cheng, J., Huang, S., Jiang, H. (2016). Isolation and characterization of anon-specific endoglucanase from a metagenomic library of goat rumen. *World J Microb Biot* 2016; 32:12.

Chiarucci, A. Bacaro, G., Scheiner, S.M. (2011). Old and new challenges in using species diversity for assessing biodiversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366:2426-37.

Chistoserdova, L. (2010). Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechno Lett.* 32:1351–1359.

Chivian, D., Brodie, E.L., Alm, E.J., Culley, D.E., Dehal, P.S., DeSantis, T.Z., Gihring, T.M., Lapidus, A., Lin, L.H., Lowry, S.R., Moser, D.P., Richardson, P.M., Southam, G., Wanger, G., Pratt, L.M., Andersen, G.L., Hazen, T.C., Brockman, F.J., Arkin, A.P., Onstott, T.C. (2008). Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Science.* 2008; 322:275–278. doi: 10.1126/science.1155495.

Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K. y Niklińska, M. (2013). Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Appl Soil Ecol.* 64:7–14.

Christel, Stephan & Herold, Malte & Bellenberg, Sören & El Hajjami, Mohamed & Buetti-Dinh, Antoine & Pivkin, Igor & Sand, Wolfgang & Wilmes, Paul & Poetsch, Ansgar & Dopson, Mark. (2017). Multi-omics Reveals the Lifestyle of the Acidophilic, Mineral-Oxidizing Model Species *Leptospirillum ferriphilum* T. *Applied and Environmental Microbiology.* 84. AEM.02091-17. 10.1128/AEM.02091-17.

Ciaramella, M., Francesca, Pisani, M. y Mose., R. (2002). Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic Archeon *Sulfolobus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81: 85-97.

Cole, J. K., Peacock, J. P., Dodsworth, J. A., Williams, A. J., Thompson, D. B., Dong, H. (2013). Sediment microbial communities in Great Boiling Spring are controlled by temperature and distinct from water communities. *ISMEJ.* 7,718–729. doi:10.1038/ismej.2012.157.

Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M. y Tiedje, J. M. (2009). The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37 (Data-base issue): D141–D145. doi:10.1093/nar/gkn879.

Colman, D. (2015). "Diversity of understudied archaeal and bacterial populations of Yellowstone National Park: from genes to genomes." http://digitalrepository.unm.edu/biol_etds/18.

Costello, E.K., Halloy, S.R., Reed, S.C., Sowell, P., y Schmidt, S.K. (2009). Fumarole-supported islands of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape on Socoma volcano, Puna de Atacama, Andes. *Appl Environ Microbiol* 75:735–747.

Cowan, D. A., Ramond, J. B., Makhalyane, T. P. y De Maayer, P. (2015). Metagenomics of extreme environments. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 97–102.

Croci, L., Sufredini, E., Cozzim, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., Serratore, P., Fischetti, R., Goffredo, E., Loffredo, G. y Mioni, R. (2007). Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* 102: 229-237.

Crossey, L.J., Karlstrom, K.E., Schmandt, B., Crow, R.R., Colman, D.R., Cron, B., Takacs-Vesbach, C.D., Dahm, C.N., Northup, D.E., Hilton, D.R., Jason, W.R., Lowry, A.R. (2016). Continental smokers couple mantle degassing and distinctive microbiology within continents. *Earth Planet Sci Lett* 435:22–30.

Cuecas, A., Portillo, M., Kanoksilapatham, W., y Gonzalez, J. (2014) Bacterial distribution along a 50°C temperature gradient reveals a parceled out hot spring environment. *Microbial Ecol* 68:729–739.

Culligan, E.P., Sleator, R.D., Marchesi, J.R. y Hill, C. (2014). Metagenomics and novel gene discovery: promise and potential for novel therapeutics. *Virulence* 2014; 5:399–412.

De Vasconcellos, S. P., Angolini, C. F. F., García, I. N. S., Martins Dellagnezze, B., da Silva, C. C., Marsaioli, A. J., et al. (2010). Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Org. Geochem.* 41, 1067–1073. doi: 10.1016/j.orggeochem.2010.08.003.

DeCastro, M. E., Rodríguez-Belmonte, E., y González-Siso M. I. (2016). Metagenomics of Thermophiles with a Focus on Discovery of Novel Thermozyms. *Frontiers in Microbiology* 7:1521 DOI: 10.3389/fmicb.2016.01521.

Delmont, T.O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P., y Vogel, T.M. (2011). Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J Microbiol Methods* 86:397–400. doi: 10.1016/j.mimet.2011.06.013.

Den Besten, H.M.W., Amézquita, A., Bover-Cid, S., Dagnas, S., Ellouze, M., Guillou, S., Nychas, G., O'Mahony, C., Pérez-Rodríguez, F., y Membré, J.M. (2018) Next generation of microbiological risk assessment: Potential of omics data for exposure assessment *Int. J. Food Microbiol*, 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.006.

DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. y Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7):5069.

Dix, N. J. y Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. Chapman & Hall, London, UK.

Elend, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J., Steele, H., Reymond, J., Jaeger, K.E. y Streit, W. (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome derived esterases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3637–3645.

Empadinhas, N. y Da Costa, M.S. (2011). Diversity, biological roles and biosynthetic pathways for sugar-glycerate containing compatible solutes in bacteria and archaea. *Environ Microbiol* 2011; 13:2056–77.

Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E. E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez-Rios, R. M. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: defining standards for progressive metagenomics. *Sci. Rep.* 8:12034. doi: 10.1038/s41598-018.

Everroad, R. C., Otaki, H., Matsuura, K., y Haruta, S. (2012). Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. *Microbes Environ.* 27, 374–381. doi: 10.1264/jsme2.ME11350.

Fan, X., Liu, X., Wang, K., Wang, S., Huang, R., y Liu, Y. (2011). Highly soluble expression and molecular characterization of an organic solvent-stable and thermotolerant lipase

originating from the metagenome. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 72, 319–325. doi: 10.1016/j.molcatb.2011.07.009.

Fernández, A.B., Ghai, R., Martín-Cuadrado, A.B., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A. (2014). Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiol Ecol* 2014, 88:623-635.

Filippidou, S., Wunderlin, T., Junier, T., Jeanneret, N., Dorador, C., Molina, V., Johnson, D.R., Junier, P. (2016). A combination of extreme environmental conditions favour the prevalence of endospore-forming Firmicutes. *Front Microbiol* 7:1707.

Finlayson, C. M., Milton, R., Prentice, C., and Davidson, N. C. (eds) (2018). *The Wetland Book II, Distribution, Description, and Conservation*. Berlin: Springer.

Flores, G. E., Shakya, M., Meneghin, J., Yang, Z. K., Seewald, J. S., y Geoff Wheat, C., (2012). Inter-field variability in the microbial communities of hydrothermal vent deposits from a back-arc basin. *Geobiology* 10, 333–346. doi:10.1111/j.1472-4669.2012.00325. x.

Franklin, R.B. y Mills, A.L. (2003). Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an Eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microb. Ecol.* 44, 335–346.

Fu, L., He, Y., Xu, F., Ma, Q., Wang, F., y Xu, J. (2015). Characterization of a novel thermostable patatin - like protein from a Guaymas basin metagenomic library. *Extremophiles* 19, 829–840. doi: 10.1007/s00792-015-0758-x.

Fukuyama, Y., Omae, K., Yoshida, T., Sako, Y. (2019). *Extremophiles* <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01091-x>.

Gabor, E. M., Alkema, W. B. y Janssen, D. B. (2004). Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ. Microbiol.* 6: 879-886.

Ganesh, S., Parris, D. J., DeLong, E. F., y Stewart, F. J. (2014) Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *ISME J* 8, 187–211 doi:10.1038/ismej.2013.144.

Gao, G., Wang, A., Gong, B., Li, Q., Liu, Y., He, Z. (2016). A novel metagenome-derived gene cluster from termite hindgut: encoding phosphotransferase system components and high

glucose tolerant glucosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 84, 24–31. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.12.005.

García-Moyano, A., González-Toril, E., Aguilera, Á., Amils, R. y Aguilera, A. (2012). Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol Ecol.* 81(2):303–14.

Gardner, P.P., Watson, R.J., Morgan, X.C., Draper, J.L., Finn, R.D., Morales, S.E., Stott, M.B. (2019). Identifying accurate metagenome and amplicon software via a meta-analysis of sequence to taxonomy benchmarking studies. *PeerJ* 7: e6160 <https://doi.org/10.7717/peerj.6160>.

Ghai, R., Pasic, L., Fernández, A.B., Martin-Cuadrado, A.B., Mizuno, C.M., McMahon, K.D., Papke, R.T., Stepanauskas, R., Rodriguez-Brito, B., Rohwer, F.(2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* 2011:1.

Gilbert, J. A., Jansson, J. K. y Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology* 12:69 <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/12/69>.

Giovannelli, D., D’Errico, G., Manini, E., Yakimov, M., y Vetriani, C. (2013). Diversity and phylogenetic analyses of bacteria from a shallow-water hydrothermal vent in Milos island (Greece). *Front. Microbiol.* 4:184. doi: 10.3389/fmicb.2013.00184.

González-Partida, E., Barragán-Reyes, R.M., Nieva-Gómez, D., Quijano-León, J.L., López-Mendiola, J.M., y Gutiérrez-Puente, H., (1991). Estudio de inclusiones fluidas en cuatro pozos del campo geotérmico de Los Humeros, Pue. *Geoterm. Rev. Mex. Geoenergía* 7 (2), 185–199.

Gupta, R., Govil, T., Capalash, N., y Sharma, P. (2012). Characterization of a glycoside hydrolase family 1 β -galactosidase from hot spring metagenome with transglycosylation activity. *Appl.Biochem. Biotechnol.*168,1681–1693.doi: 10.1007/s12010-012-9889-z.

Gutiérrez-Negrín, L., Izquierdo-Montalvo, G. (2010) *Proceedings World Geothermal Congress* pp 1-7.

Gutleben, J., De Mares, M. C., Van Elsas, J. D., Smidt, H., Overmann, J., y Sipkema, D. (2018). The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate, *Critical Reviews in Microbiology*, 44:2, 212-229, DOI: 10.1080/1040841X.2017.1332003.

Hagström, A., Pommier, T., Rohwer, F., Simu, K., Stolte, W., Svensson, D., Zweifel, U.L. (2002). Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7):3628-2633.

Handelsman, J. (2007). *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. The National Academies Press. Washington D.C.

He, Y., Xiao, X. y Wang, F. (2013). Metagenome reveals potential microbial degradation of hydrocarbon coupled with sulfate reduction in an oil-immersed chimney from guaymas basin. *Front Microbiol* 2013:4.

Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R., y Gottschalk, G. (2000). Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7): 3113-3116.

Holmes, A., Gillings, M., Nield, B., Mabbutt, B., y Nevalainen, K. (2003). The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ. Microbiol.* 5: 383–94.

Horneck, G., Klaus, D. M., and Mancinelli, R. L. (2010). Space microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 121–156. doi: 10.1128/MMBR.00016-09.

Hou, S., Makarova, K. S., Saw, J. H. W., Senin, P., Ly, B. V., y Zhou, Z. (2008). Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylophilum infernorum*, a representative of the bacterial phylum Verrucomicrobia. *Biol. Direct.* 3:26. doi: 10.1186/17456150-3-26.

Huang, Q., Dong, C.Z., Dong, R.M., Jiang, H., Wang, S., Wang, G., Fang, B., Ding, X., Niu, L., Li, X., Zhang, C., y Dong, H. (2011). Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan plateau, China. *Extremophiles* 15:549–563.

Huse, S.M., Welch, D.B.M., Voorhis A, Shipunova, A., Morrison, H.G., Eren, A.M., y Sogin, M.L. (2014). VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. *BMC Bioinformatics.* 15(1):41.

Ilmberger, N., Meske, D., Juergensen, J., Schulte, M., Barthen, P., Rabausch, U., et al. (2012). Metagenomic cellulases highly tolerant towards the presence of ionic liquids - Linking

thermostability and halotolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 135–146. doi: 10.1007/s00253-011-3732-2.

Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. (2002). *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52:1729–1735.

Jabbour, D., Sorger, A., y Sahm, K. (2013). A highly thermoactive and salt-tolerant α -amylase isolated from a pilot-plant biogas reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2971–2978. doi: 10.1007/s00253-0124194-x.

Javed, S., F. Azeem, S. Hussain, I. Rasul, M.H. Siddique, M. Riaz y H. Nadeem (2018). Bacterial Lipases: A review on purification and characterization. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 132:23-34.

Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cuffe V., Banta, A., Reysenbach A. L., Prieur, D. "Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*." (2002). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol 52, 765-772. 10.1099/ijs.0.02025-0.

Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A., Sensen, C.W. y Vander-Oost, J. (2001). The complete genome of the Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7835–7840.

Jin, Q., y Kirk, M. F. (2018). pH as a primary control in environmental microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front. Environ. Sci.* 6:21. doi: 10.3389/fenvs.2018.00021.

Jordan, D.B., Braker, J.D., Wagschal, K. (2016). Isolation and divalent metal activation of a β -xylosidase, RUM630-BX. *Enzyme Microb Technol* 2016; 82:158–63.

Kashefi, K., y Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science* 301: 934. doi:10.1126/science.1086823.

Kaur, G., Singh, A., Sharma, R., Sharma, V., Verma, S., Sharma, P. K. (2016). Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from

hot spring of Himachal Pradesh, India. *3 Biotech.* 2016 jun;6(1):49. doi: 10.1007/s13205-016-0369-y. Epub 2016 Feb 8. PMID: 28330118; PMCID: PMC4746201.

Kayani, M., Doyle, S., Sangwan, N., Wang, G., Gilbert, J., Christine, B., Zhu, T., (2018). Metagenomic analysis of basal ice from an Alaskan glacier. *Microbiome.* 6. 10.1186/s40168-018-0505-5.

Keller, M., y Hettich, R. (2009). Environmental Proteomics: A paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level. *Microbiol. Mol. Biol.Rev.* 73 (1): 62–70.

Kim, H. J., Jeong, Y. S., Jung, W. K., Kim, S. K., Lee, H. W., Kahng, H. Y. (2015). Characterization of novel family IV esterase and family I.3 lipase from an oil-polluted mud flat metagenome. *Mol. Biotechnol.* 57, 781–792. doi: 10.1007/s12033-015-9871-4.

Kimura, H., Sugihara, M., Yamamoto, H., Patel, B.K., Kato, K., Hanada, S. (2005). Microbial community in a geothermal aquifer associated with the subsurface of the Great Artesian Basin, Australia. *Extremophiles* 9:407–414.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis P., Klironomos, J. N., Lee, H. y Trevors, J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58:169– 188.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1. doi:10.1093/nar/gks808.

Kõljalg, U., Nilsson, R. H. y Abarenkov, K., (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol.* 22(21):5271–7.

Kosaka, T., Kato, S., Shimoyama, T., Ishii, S., Abe, T., y Watanabe, K. (2008). The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota. *Genome research*, 18(3), 442–448. doi:10.1101/gr.7136508.

Kotik, M. (2009). Novel genes retrieved from environmental DNA by polymerase chain reaction: Current genome-walking techniques for future metagenome applications. *J. Biotechnol.* 144: 75–82.

Kouzuma, A., Kato, Souichiro., Watanabe, K. (2015). Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia. *Frontiers in Microbiology* 6: 477. DOI:10.3389/fmicb.2015.00477.

Krulwich, T. A., Sachs, G., y Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 330–343. doi: 10.1038/nrmicro2549.

Kumar, R., Banoth, L., Banerjee, U.C. (2017). Enantiomeric separation of pharmaceutically important drug intermediates using a metagenomic lipase and optimization of its large scale production. *Int J Biol Macromol* 2017; 95:995–1003.

Kwon, E. J., Jeong, Y. S., Kim, Y. H., Kim, S. K., Na, H. B., Kim, J. (2010). Construction of a metagenomic library from compost and screening of cellulase- and xylanase-positive clones. *J. Appl. Biol. Chem.* 53, 702–708. doi: 10.3839/jksabc.2010.106.

Lane, N., y Martin, W. F. (2012). The origin of membrane bioenergetics. *Cell* 151,1406–1416.doi: 10.1016/j.cell.2012.11.050.

Lebre, P. H., De Maayer, P., y Cowan, D. A. (2017). Xerotolerant bacteria: surviving through a dry spell. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 285–296. doi: 10.1038/nrmicro.2017.16.

Lee, Y.S., Seo, S.H., Yoon, S.H. (2016). Identification of a novel alkaline amylopullulanase from a gut metagenome of *Hermetia illucens*. *Int J Biol Macromol* 2016; 82:514–21.

Leis, B., Angelov, A., Mientus, M., Li, H., Pham, V. T. T., Lauinger, B. (2015). Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermusthermophilus*. *Front.Microbiol.*6: 275.doi:10.3389/fmicb.2015.00275.

Lemarchand, K., Berthiaume, F., Maynard, C., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Masson, L., y Brousseau, R. (2005). Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *J. Microbiol. Methods.* 63: 115–126.

Li, H., Yang, Q., Li, J., Gao, H., Li, P., y Zhou, H. (2015). The impact of temperature on microbial diversity and AOA activity in the Tengchong Geothermal Field, China.*Sci.Rep.*5: 17056.doi:10.1038/srep17056.

Li, Y., Liu, N., Yang, H. (2014). Cloning and characterization of a new β -glucosidase from a metagenomic library of rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. *BMC Biotechnol* 2014; 2:14– 85.

Lipthay, J., Enzingerb, C., Johnsen, K., Aamanda, J., y Sorensen, S. (2004). Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1607–1614.

López-López, O., Cerdán, M. E. and M. I. González-Siso. (2013). Hot Spring Metagenomics. 2, 308-320; doi:10.3390/life3020308.

López-López, O., Cerdán, M. E., y González-Siso M. I. (2015a). *Thermus thermophilus* as a source of thermostable lipolytic enzymes. *Microorganisms.* 3, 792-808.

López-López, O., Knapik, K., Cerdán, M. E., and González-Siso, M. I. (2015b). Metagenomics of an alkaline hot spring in Galicia (Spain): microbial diversity analysis and screening for novel lipolytic enzymes. *Front. Microbiol.*6: 1291.doi:10.3389/fmicb.2015.01291.

Lorenzo-Pulido, C. (2008). Borehold Geophysics and Geology of Well H-43. Los Humeros Geothermal Field, Puebla, Mexico. United Nations University. Geothermal Training Program, IS -108 Reykjavik, Iceland, 40 pp.

Lozupone, C.A., y Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.*104,11436–11440.doi:10.1073/pnas.0611525104.

Maniatis, T., Fritsch, E. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Marchesi, J. R., y Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3 (1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>.

Maric, J. & Sikic, M. (2019). Approaches to metagenomic classification and assembly. 348-356. 10.23919/MIPRO.2019.8756644.

Martinez, S.R., Alibert, C., (1994). Características geoquímicas de las rocas volcánicas del sistema geotérmico Los Humeros, Puebla y su relación con la mineralogía de alteración. *Geofís. Int.* 33 (4), 585–605.

Masum, M., (2015) Low-Temperature Geothermal Systems in Sedimentary Basin and Their Prospect in Bangladesh. Proceedings World Geothermal Congress 2015 Melbourne, Australia, 19-25 April 2015.

McDermott, J. M., Sylva, S. P., Ono, S., German, C. R., y Seewald, J. S. (2018). Geochemistry of fluids from Earth's deepest ridge-crest hot-springs: piccard hydrothermal field, Mid-Cayman Rise. *Geochim. Cosmochim. Acta* 228,95–118 doi: 10.1016/j.gca.2018.01.021.

Medrano-Santillana, M., Souza-Brito, E.M., Duran, Robert., Gutierrez-Corona, F., y Reyna-López, G. E. (2017). Bacterial diversity in fumarole environments of the Paricutin volcano, Michoacán (Mexico). *Extremophiles*. 21, pp.499-511.

Mehetre, G.T., Paranjpe, A., Dastager, S.G., y Dharne, M.S. (2016). Investigation of microbial diversity in geothermal hot springs in Unkeshwar, India, based on 16S rRNA amplicon metagenome sequencing. *Genome Announc* 4(1): e01766-15. doi:10.1128/genomeA.01766-15.

Meilleur, C., Hupé, J. F., Juteau, P., y Shareck, F. (2009). Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 853–861. doi: 10.1007/s10295-009-0562-7.

Meilleur, C., Hupé, J. F., Juteau, P., y Shareck, F. (2009). Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 853–861. doi: 10.1007/s10295-009-0562-7.

Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova D. P., Feyhl-Buska J., Wong M. L., Zhang, S. y Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology* 10 :780. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00780.

Mesbah, N. y Wiegel, J. (2008). Life at Extreme limits The anaerobic halophilic alkalithermohiles. *New York Academy of Sciences* 1125:44-57.

Miteva, V.I., Sheridan, P.P., y Brenchley, J.E. (2004). Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep greenland glacier ice core. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:202–13.

Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., & Moosavi-Nejad, Z. (2011). Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iranian journal of microbiology*, 3(2), 92–98.

Montaña-Lara, J.S. (2015). Tesis de Doctorado. Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas en suelo de bosque alto andino del parque nacional natural los nevados. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Morozkina, E.V.; Slutskaya, E.S.; Fedorova, T.V.; Tugay, T.I.; Golubeva, L.I.; Koroleva, O.V. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010, 46, 1-14.

Neveu, J., Regeard, C., and Dubow, M. S. (2011). Isolation and characterization of two serine proteases from metagenomic libraries of the Gobi and Death Valley deserts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 635–644. doi: 10.1007/s00253011-3256-9.

Nilakanta, H., Drews, K. L., Firrell, S., Foulkes, M. A., Jablonski, K. A., (2014). A review of software for analyzing molecular sequences. *BMC Res Notes.* 7(1):830–830.

Nishiyama, M., Yamamoto, S., y Kurosawa, N. (2013). Microbial Community Analysis of a Coastal Hot Spring in Kagoshima, Japan, Using Molecular- and Culture-based Approaches. *Journal of microbiology (Seoul, Korea).* 51. 413-22. 10.1007/s12275-013-2419-z.

Niu, S.-Y., Yang, J., McDermaid, A., Zhao, J., Kang, Y., y Ma, Q. (2017). Bioinformatics tools for quantitative and functional metagenome and metatranscriptome data analysis in microbes. *Briefings in Bioinformatics,* 19 (6), 1415–1429. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx051>.

Norini, G., Gropelli, G., Sulpizio, R., Carrasco-Núñez, G., Davila-Harris, P., Pellicoli, C., Zucca, F., De Franco, R., (2015). Structural analysis and thermal remote sensing of the Los Humeros Volcanic Complex: implications for volcano structure and geothermal exploration. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* 301, 221–237.

Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, M., Suzuki, Y. (2008). *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008 Mar;58(Pt 3):659-65. doi: 10.1099/ijs.0.65349-0.

Okano, H., Hong, X., Kanaya, E. (2015). Structural and biochemical characterization of a metagenome-derived esterase with a long N-Terminal extension. *Protein Sci* 2015; 24:93–104.

Ondov, B.D., Bergman, N.H., y Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a web browser. *BMC Bioinformatics.* 12(1):385.

- Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ. Microbiol.* 13, 1908–1923. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x.
- Oren, A. (2013). “Life in magnesium-and calcium-rich hypersaline environments: salt stress By Chaotropic Ions,” in *Polyextremophiles. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, eds J. Seckbach, A. Oren, y H. Stan-Lotter (Dordrecht: Springer), 215–232. doi:10.1007/978-94-007-6488-0.
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A. Papanikolaou, N., Kotoulas, G., CARvanitidis, C. y Iliopoulos, I. (2015). Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinf. Biol. Insights*: 9 75–88 doi: 10.4137/BBI.S12462.
- Ovreas, L., Jensen, S., Daae, F. L. y Torsvik, V. (1998). Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2739-2742.
- Pace, N., Stahl, D., Lane, D., y Olsen, G. (1985). Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News.* 51: 4–12.
- Pas'ic', L., Rodriguez -Mueller, B., Martin-Cuadrado, A.B., Mira, A., Rohwer, F., Rodriguez-Valera, F. (2009). Metagenomic islands of hyperhalophiles: the case of *Salinibacter ruber*. *BMC Genom* 2009, 10:570.
- Pearce, D. A., Newsham, K. K., Thorne, M. A., Calvo-Bado, L., Krsek, M., Laskaris, P., Hodson, A., y Wellington, E. M. (2012). Metagenomic analysis of a southern maritime antarctic soil. *Front Microbiol.* 3:403–403.
- Peeples, T. L. 2014. *Bioremediation Using Extremophiles*. Department of Chemical and Biochemical Engineering, Seamans Center, The University of Iowa, Iowa City, IA. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Pages 251-268. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00010-8>.
- Peiffer, L., Carrasco Núñez, G., Mazot, A., Villanueva-Estrada, R. E., Inguaggiato, C., Bernard R. R., Miller, R. R., Rojas, H. J., (2018). Soil degassing at the Los Humeros geothermal field (Mexico). doi: 10.1016/j.jvolgeores.2018.03.001.

Pérez-Rodríguez, I., A. Grosche, L. Massenburg, V. Starovoytov R.A. Lutz, C. Vetriani 2012. *Phorcysium thermohydrogeniphilum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 2388-2394.

Pinzón-Martínez, D. L. (2007). Tesis de Maestría. Aislamiento de lipasas termofílicas a partir de aguas termales de Veracruz. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Pituka, E. V. Hoover, R.B. y Tang, J (2007). Microbial Extremophiles at the limits of life. *Critical Rev. Microbiol.* 33:183-209.

Placido, A., Hai, T., Ferrer, M. (2015). Diversity of hydrolases from hydrothermal vent sediments of the Levante Bay, Vulcano Island (Aeolian archipelago) identified by activity-based metagenomics and biochemical characterization of new esterases and an arabinopyranosidase. *Appl Microbiol Biot* 2015; 99:10031–46.

Placido, A., Hai, T., Ferrer, M. (2015). Diversity of hydrolases from hydrothermal vent sediments of the Levante Bay, Vulcano Island (Aeolian archipiélago) identified by activity-based metagenomics and biochemical characterization of new esterases and an arabinopyranosidase. *Appl Microbiol Biot* 2015; 99:10031–46.

Plumb, J. J., Haddad, C.M., Gibson, J.A. y Franzmann, P.D. (2007). *Acidianus sulfidivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1418–1423.

Prieto-Barajas, C.M., Alcaraz, L. D., Valencia-Cantero, E. y Santoyo, G. (2018): Life in Hot Spring Microbial Mats Located in the Trans-Mexican Volcanic Belt: A 16S/18S rRNA Gene and Metagenomic Analysis, *Geomicrobiology Journal*, DOI: 10.1080/01490451.2018.1454555.

Prim, N., Sánchez, M., Ruiz, C., Pastor, J., y Díaz, P. (2003). Use of methylumbeliferyl-derivative substrate for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22:339-346.

Prosser, J. I. (2002). Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil* 244, 9– 17.

Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D. Neifar, M. y Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7907–7913 DOI 10.1007/s00253-015-6874-9.

Ramirez-Escudero, M., Del Pozo, M.V., Marín-Navarro, J. (2016). Structural and functional characterization of a ruminal β -glycosidase defines a novel subfamily of glycoside hydrolase family 3 with permuted domain topology. *J Biol Chem* 2016; 291:24200–14.

Rampelotto, P. H. (2010). Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*, 2, 1602–1623.

Rampelotto, P.H. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life*,3,482–485.

Rashamuse, K., Sanyika-Tenda, W., Mathiba, K. (2017). Metagenomic mining of glycoside hydrolases from the hindgut bacterial symbionts of a termite (*Trinervitermes trinervoides*) and the characterization of a multimodular β -1,4-xylanase (GH11). *Biotechnol Appl Biochem* 2017; 64:174–86.

Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., y Sani, R.K. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour. Technol.* 101, 8798–8806. doi: 10. 1016/j.biortech.2010.06.001.

Rhee, J. K., Ahn, D. G., Kim, Y. G. y Oh, J. W. (2005). New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormonesensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2), 817-825.

Riesenfeld, C., Schloss, P. y Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Reviews in Advance.* 38: 525-552.

Rincón-Molina, C. I., Hernández-García, J. A., Rincón-Rosales, R., Gutiérrez-Miceli, F. A., Ramírez-Villanueva, D. A., González-Terrerros, E., Peña-Ocaña, B. A., Palomeque-Domínguez, H., Dendooven., L. y Ruíz-Valdiviezo V. M. (2019). Structure and Diversity of the Bacterial Communities in the Acid and Thermophilic Crater-Lake of the Volcano “El Chichón”, Mexico, *Geomicrobiology Journal*, 36:2, 97-109, DOI: 10.1080/01490451.2018.1509158.

Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F, (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature.* 499(7459):431–7.

Rodríguez-Gómez, C. (2002). Tesis de Maestría. Aislamiento y caracterización parcial de bacterias termófilas de agua termales y su posible aplicación en la biodesulfuración y recuperación mejorada del petróleo. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Romero, F. R., (1991). "Los Humeros geothermal field, Puebla", *Economic Geology*, Mexico, Guillermo P. Salas.

Romo-Jones, J.M., Gutiérrez-Negrín, L.C., Flores-Armenta, M., del Valle, J.L., García, A., 2017. 2016 Annual Report. IEA Geothermal, 72-78.

Rondón, M., August, P. y Bettermann, A. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541-2547.

Rosselli, R., Romoli, O., Vitulo, N., Vezzi, A., Campanaro, S., De Pascale, F., Schiavon, R., Tiarca, M., Poletto, F., Concheri, G., Valle, G. y Squartini, A. (2016). Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxón. *Scientific Reports.* 6:32165 DOI: 10.1038/srep32165.

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISMEJ*.4,1340–1351.doi:10.1038/ismej.2010.58.

Saemundsson, K., Gudni, A., y Benedikt, Steingrímsson. (2011). *Geothermal Systems in Global Perspective. ÍSOR—Iceland GeoSurvey.*

Sánchez-Otero, M. G., Ruiz-López, I.I., Ávila-Nieto, D.E. Oliart-Ros, R.M. (2011). Significant improvement of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkalophilic lipase production using Response Surface Methodology. *New Biotechnology.* 28(6), 761-766. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678411000367>.

Sawle, L., y Ghosh, K. (2011). How do thermophilic proteins and proteomes withstand high temperature? *Biophys J* 101:217–227.

Saxena, R., Dhakan, D.B., Mittal, P., Waiker, P., Chowdhury, A., Ghatak, A., y Sharma, V.K. (2017). Metagenomic Analysis of Hot Springs in Central India Reveals Hydrocarbon

Degrading Thermophiles and Pathways Essential for Survival in Extreme Environments. *Front. Microbiol.* 7:2123. doi: 10.3389/fmicb.2016.02123.

Scambos, T. A., Campbell, G.G., Pope, A., Haran, T., Muto, A. y Lazzara, M. (2018). Ultra-low surface temperatures in East Antarctica from satellite thermal infra-red mapping: the coldest places on earth. *Geophys. Res. Lett.* 45,6124–6133.doi:10.1029/2018GL078133.

Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. yYonath, A. (2000). Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell.* 102: 615–623.

Schmidt, T., Delong, E. y Pace, N. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173: 4371-4378.

Schmidt-Dannert, C., Rúa, L., Atomi, H. y Schmid, R. (1996). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1301:105-114.

Schröder, C., Elleuche, S., Blank, S., y Antranikian, G. (2014). Characterization of a heat-active archaeal β -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome. *Enzyme Microb. Technol.* 57, 48–54. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.01.010.

Schröder, C., Janzer, V.A., Schirmacher, G. I. (2017) Characterization of two novel heat-active α -galactosidases from thermophilic bacteria. *Extremophiles* 2017; 21:85–94.

Seckbach, Joseph & Rampelotto, Pabulo. (2015). *Polyextremophiles*.

Sharma, A., Deepak, Parashar., y Satyanarayana, T. (2016). *Acidophilic Microbes: Biology and Applications*. 10.1007/978-3-319-13521-2_7.

Sharma, P. K., Singh, K., Singh, R., Capalash, N., Ali, A., Mohammad, O. y Kaur, J. (2012). Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Mol.Biol. Rep.* 39(3), 2795-2804.

Sharma, S. y Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci. World J.* doi:10.1155/2014/625258.

Sharma, S. y Kanwar, S.S. Purification and bio-chemical characterization of a solvent-tolerant and highly thermostable lipase of *Bacillus licheniformis* strain SCD11501. (2017). *Proc.*

Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci. (2017) 87: 411. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0612-z>.

Sharp, C. E., Brady, A. L., Sharp, G. H., Grasby, S. E., Stott, M. B., y Dunfield, P.F. (2014). Humboldt spa: microbial diversity is controlled by temperature in geothermal environments. *ISMEJ*.8,1166–1174.[doi:10.1038/ismej.2013.237](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.237).

Siliakus, M.F., Van der Oost, J., y Kengen, S.W.M. (2017). Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles* 21:651–670.

Simon, C., y Daniel, R. (2009). Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:265–276.

Singh, R., Chopra, C., Gupta, V.K. (2015). Purification and characterization of CHpro1, a thermotolerant, alkali-stable and oxidation-resisting protease of Chumathang hot spring. *Sci Bull* 2015; 60:1252.

Sokolova, T., y Lebedinsky, A. (2013). CO-oxidizing anaerobic thermophilic prokaryotes. In: Satyanarayana T, Littlechild JK (eds) *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology*, 2nd edn. Springer, Dordrecht, pp 203–231.

Stein, J., Marsh, T. y Wu, K. (1996). Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* 178: 591-599.

Stetter, K.O. (1999). Extremophiles y their adaptation to hot environments. *FEBS Letters* 452:22–25.

Su, X., Pan, W., Song, B., Xu, J., Ning, K. (2014). Parallel-META 2.0: Enhanced Metagenomic Data Analysis with Functional Annotation, High Performance Computing and Advanced Visualization. *PLoS ONE* 9(3): e89323. [doi: 10.1371/journal.pone.0089323](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089323).

Su, X., Zhao, W. y Xia, D. (2018). The diversity of hydrogen-producing bacteria and methanogens within an in-situ coal seam. *Biotechnol Biofuels* 11, 245 [doi:10.1186/s13068-018-1237-2](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1237-2).

Su, X., Zhao, W. y Xia, D. (2018). The diversity of hydrogen-producing bacteria and methanogens within an in situ coal seam. *Biotechnol Biofuels* 11, 245 [doi:10.1186/s13068-018-1237-2](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1237-2).

Suenaga, H. (2011). Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environ. Microbiol.* 14(1), 13–22.

Swan, B. K., Ehrhardt, C. J., Reifel, K. M., Moreno, L. I. y Valentine, D. L. (2010). Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 757–768. doi:10.1128/AEM.02409-09.

Tabacchioni, S., Chiarini, L., Bevivino, A., Cantale, C. y Dalmastri, C., (2000). Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microb. Ecol.* 40, 169–176.

Takayanagi, S., Kawasaki, H., Sugimori, K., Yamada, T., Sugai, A., Ito, T., Yamasato, K., y Shioda, M. (1996). *Sulfolobus hakonensis* sp. nov., a novel species of acidothermophilic archaeon. *Int J Syst Bacteriol* 46:377–382.

Tan, H., Mooij, M.J., Barret, M. (2014). Identification of novel phytase genes from an agricultural soil-derived metagenome. *J Microbiol Biotech* 2014; 24:113–8.

Tang, K.H., Barry, K., Chertkov, O., Dalin, E., Han, C.S., Hauser, L.J. (2011). Complete genome sequence of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *BMC Genomics* 12:334. doi: 10.1186/14712164-12-334.

Taupp, M., Mewis, K. y Hallam, S. (2011). The art and design of functional metagenómica screens. *Curr. Opin. Biotechnol* 22: 1–8.

Tekere, M., Lötter, A., Olivier, J., Jonker, N., y Venter, S. Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 2011, 10, 18005±18012.

Tekere, M., Lotter, A., Olivier, J., y Venter, S. (2015). Bacterial diversity in some South African thermal springs: a metagenomic analysis. *Proceedings World Geothermal Congress.* Melbourne, Australia, 19–25 Apr, 2015.

Terahara, T., Yamada, K., Kurata, S., Yokomaku, T., Tsuneda, S. y Harayama, S. (2010). Direct cloning and expression of putative esterase genes from environmental DNA. *Enzyme Microb. Technol.* 47:17–23.

Thakuria, D., Schmidt, O., Egan, D. y Doohan, F. (2008). Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biol. Biochem.* 40 (6):1390-1403.

Thomas, T., Gilbert, J. y Meyer F. (2012). Metagenomics a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and experimentation* 2:3. <http://www.microbialinformaticsj.com/content/2/1/3>.

Tin Truong, D., Tett, A., Pasolli, E., Huttenhower, C., y Segata. N., (2017). Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes. *Genome Res.* 27, 626e638.

Tiquia-Arashiro, S. (2014). Thermophilic Carboxydrotrophs and their Applications in Biotechnology. 10.1007/978-3-319-11873-4.

Tobler, D.J., y Benning, L.G. (2011). Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects. *Extremophiles* 15:473–485.

Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lyutskanova, D., Pascual, J., Petrov, P., y Kambourova, M. (2010). Phylogenetic analysis of the bacterial community in a geothermal spring, rupi basin, Bulgaria. *World J Microbiol Biotechnol* 26:2019–2028.

Torsvik, V. y Ovreas L. (2007). Microbial Phylogeny and Diversity in Soil. In: *Modern soil Microbiology*. 2nd ed. CRC Taylor and Francis Group. New York: 23:53.

Torsvik, V., y Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:240-245.

Trevors, J.T., (1998). Molecular evolution in bacteria: cell division. *Rev. Microbiol.* 29, 237– 245.

Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, J.R., Richardson, M.P., Solovyev, V.V., Rubin, M.E., Rokhsar, S.D., y Banfield, F.J. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37–43.

Ugras, Serpil. (2017). Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus licheniformis* Ht7 Isolated from Hayran Thermal Springs in Giresun. *Romanian Biotechnological Letters*.

Urbietta, M. S., Donati, E. R., Chan, K. G., Sin, L. L., y Goh, K. M. (2015a). Thermophiles in the genomic era: biodiversity, science, and applications. *Biotechnol.Adv*33,633–647.doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.007.

Urbietta, M. S., Gonzalez-Toril, E., Bazán, A. A., Giaveno, M. A., and Donati, E. (2015b). Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acidic geothermal area of Copahue (Neuquen, Argentina). *Extremophiles*19,437–450.doi:10.1007/s00792-015-0729-2.

Urich, T., Lanzén, A., Stokke, R., Pedersen, R. B., Bayer, C., Thorseth, I. H., Schleper, C., Steen, I. H. y Ovreas, L. (2014). Microbial community structure and functioning in marine sediments associated with diffuse hydrothermal venting assessed by integrated meta-omics. *Environ Microbiol.* 16(9):2699–710.

Van Den Burg B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curren Opinion in Microbiology* 6:213-218.

Venter, J., Remington, K., Heidelberg, J., y Halpern, A. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science.* 304: 66–74.

Verma, D., Kawarabayasi, Y., Miyazaki, K., y Satyanarayana, T. (2013). Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (Mxyl) retrieved from compost-soil metagenome. *PLoS ONE* 8: e52459. doi: 10.1371/journal.pone.0052459.

Větrovský T., y Baldrian P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses, *PLoS One* vol. 8 pg. e57923.

Vidya, J., Swaroop, S., Singh, S., Alex, D., Sukumaran, R., y Pandey, A. (2011). Isolationandcharacterizationofanovel α -amylasefromametagenomiclibrary of Western Ghats of Kerala, India. *Biologia* 66, 939–944. doi: 10.2478/s11756011-0126-y.

Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K., y Streit, W. (2003). Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (10): 6235–6242.

Vos, M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M & Kowalchuk GA (2012) A Comparison of rpoB and 16S rRNA as Markers in Pyrosequencing Studies of Bacterial Diversity. PLOS One 7: e30600.

Wall, K., Cornell, J., Bizzoco, R.W., Kelley, S.T. (2015). Biodiversity hot spot on a hot spot: novel extremophile diversity in hawaiian fumaroles. Microbiol Open 4:267–281.

Wang, M., Lai, G. L., Nie, Y., Geng, S., Liu, L., Zhu, B. (2015). Synergistic function of four novel thermostable glycoside hydrolases from a long-term enriched thermophilic methanogenic digester. Front. Microbiol. 6:509. doi: 10.3389/fmicb.2015.00509.

Wang, S., Hou, W., Dong, H., Jiang, H., Huang, L., Wu, G., Zhang, C., Song, Z., Zhang, Y., Ren, H., Zhang, J., Zhang, L. (2013). Control of temperature on microbial community structure in hot springs of the tibetan plateau. PLoS One 8: e62901.

Wilson, M. C., y Piel, J. (2013). Metagenomic Approaches for Exploiting Uncultivated Bacteria as a Resource for Novel Biosynthetic Enzymology. Volume 20, Issue 5, 23 May 2013, Pages 636-647. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.011>.

Wintzingerode, F.V., Gobel, U. B. y Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. 21: 213– 229.

Wood, D. E., y Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biology, 15(3), R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>.

Wooley, J. C., Godzik, A. y Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. PLoS Comput Biol 6: e1000667.

Xiong, J., Liu, Y., Lin, X., Zhang, H., Zeng, J., Hou, J., Yang, Y., Yao, T., Knight, R. y Chu, H. (2012). Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. Environ. Microbiol. 14(9):2457–66.

Xu, L., Wu, Y.H., Zhou, P., Cheng, H., Liu, Q., y Xu, X.W. (2018). Investigation of the thermophilic mechanism in the genus Porphyrobacter by comparative genomic analysis. BMC Genomics 19:385. doi: 10.1186/s12864-0184789-4.

Yadav, D., Singh, A., y Mathur., N. (2015). Halophiles-A Review. *Int.J. Curr.Microbiol. App.Sci* (2015) 4(12): 616-629.

Yakimov, M. M., La Cono, V., Spada, G. L., Bortoluzzi, G., Messina, E., Smedile, F. (2015). Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos sea water brine interface is active below the chaotropicity limit of life as revealed by recovery of mRNA. *Environ. Microbiol.* 17, 364–382. doi: 10.1111/1462-2920. 12587.

Yamagishi, A., Kawaguchi, Y., Hashimoto, H., Yano, H., Imai, E., Kodaira, S., Uchihori, Y., y Nakagawa, K. (2018). Environmental data and survival data of *Deinococcus aetherius* from the exposure facility of the Japan experimental module of the international space station obtained by the tanpopo mission. *Astrobiology* 18, 1369–1374. doi: 10.1089/ast.2017.1751.

Yang, H., Xiao, Y., Zeng, G., Xu, Y. y Liu, Y. (2007). Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 918–925.

Yang, J., Ma, L., Jiang, H., Wu, G., y Dong, H. (2016). Salinity shapes microbial diversity and community structure in Surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Sci.Rep.6:* 25078. doi:10.1038/srep25078.

Yim, K.J., Cha, I.T., Rhee, J.K., Song, H.S., Hyun, D.W., Lee, H.W., Kim, D., Kim, N., Nam, Y.D., Seo, M.J., Bae, J.W. y Roh, S.W. (2015). *Vulcanisaeta thermophila* sp. nov., a hyperthermophilic and acidophilic crenarchaeon isolated from solfataric soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:201–205.

Yoneda, Y., Kano, S.I., Yoshida, T. (2015). Detection of anaerobic carbon monoxide-oxidizing thermophiles in hydrothermal environments. *FEMS Microbiol Ecol* 91: fiv093. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv093>.

Zaikova, E., Goerlitz, D.S., Tighe, S.W., Wagner, N.Y., Bai, Y., Hall, B.L., Bevilacqua, J.G., Weng, M.M., Samuels-Fair, M.D. y Johnson, S.S. (2019). Antarctic Relic Microbial Mat Community Revealed by Metagenomics and Metatranscriptomics. *Front. Ecol. Evol.* 7:1. doi: 10.3389/fevo.2019.00001.

Zarafeta, D., Moschidi, D., Ladoukakis, E. (2016). Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes: uncovers a new family of bacterial esterases. *Sci Rep* 2016; 6:38886.

Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P. D., Davis-Richardson, A., Camargo, F. A. O., y Clark, I. M. (2014). Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microb. Ecol.* 69, 395–406. doi:10.1007/s00248-014-0530-2.

Zhang, L., Su, F., Kong, X., Lee, F., Day, K. y Gao, W. (2016). Ratiometric fluorescent pH-sensitive polymers for high-throughput monitoring of extracellular pH. *RSC Adv.* 6, 46134–46142. doi: 10.1039/c6ra 06468j.

Zhang, X., Li, H., Li, C.-J., Ma, T., Li, G., y Liu, Y.-H. (2013). Metagenomic approach for the isolation of a thermotolerant β -galactosidase with high tolerance of galactose and glucose from soil samples of Turpan Basin. *BMC Microbiol.* 13:237. doi: 10.1186/1471-2180-13-237.

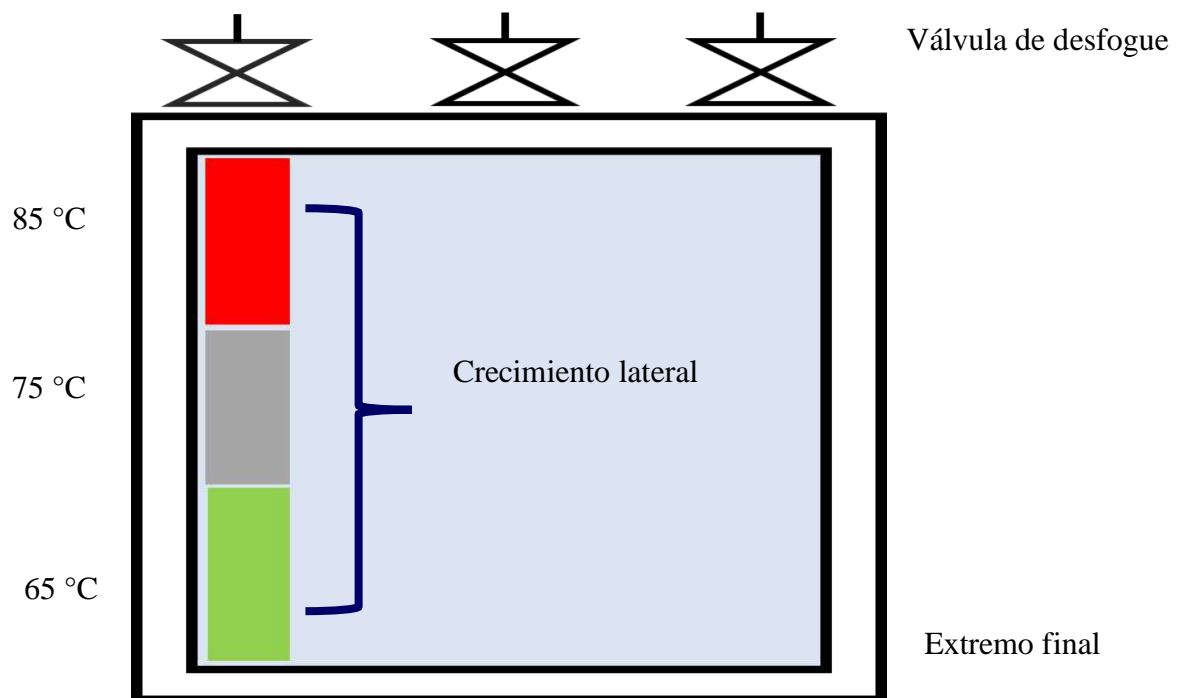
Zhang, X., Ma, X., Wang, N., y Yao T. (2009) New subgroup of Bacteroidetes and diverse microorganisms in Tibetan plateau glacial ice provide a biological record of environmental conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009; 67:21–9.

Zhu, Y., Li, J., Cai, H., Ni, H., Xiao, A., y Hou, L. (2013). Characterization of a new and thermotolerant esterase from a metagenomic library. *Microbiol. Res.* 168, 589–597. doi: 10.1016/j.micres.2013.04.004.

Zierenberg, R., Adams, M. y Arp, A. (2000). Life in extreme environments: Hydrothermal vents. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America, USA* 97:12961-12962.

APÉNDICE A

Diagrama de la alberca de desfogue en la planta geotérmica “Los Humeros”. En donde se muestren las tres temperaturas de la alberca de condensación. Los sustratos fueron colectados en la zona gris y verde de la alberca con temperaturas de 65 a 75 °C.



APÉNDICE B

Electroforesis en geles de agarosa al (1%)

Solucion Stock

Amortiguador TAE 50X

Tris base 242 g

Ácido acético glacial 57.1 mL

EDTA 0.5 M (pH 8.0) 100 mL

Mezclar los componentes y aforar a 1 L, conservar a temperatura ambiente.

Preparacion del gel de agarosa al 1%

Pesar 0.3 g de agarosa grado electroforesis y disolver en 30 mL de amortiguador TAE 1X calentando en horno de microondas, por 40 s en potencia alta. Agregar 2 μ L de bromuro de etidio, mezclar cuidadosamente y dejar gelificar en un soporte con peine de 7.0 x 7.0 cm por 40 min para obtener un gel de 0.75 cm de espesor.

Preparar amortiguador TAE 1X adicional para llenar la cámara de electrofóresis y hacer a corrida a 110 V por un tiempo de 20 a 25 min.

Amortiguador de carga de la muestra 6X

Azul de bromofenol 0.25% (p/v)

Xilen cianol 0.25% (p/v)

Glicerol en H₂O 30 % (v/v)

APÉNDICE C

Geles de poliacrilamida (Condiciones disociantes)

Soluciones Stock

- Bis/ Acrilamida (30% T, 2.67% C): 146 g d acrilamida (29g/100 mL), 4 g de N'N'-metilen-bis-acrimalida (0.8 g/100 mL). Aforar a 500 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.
- Tris-HCl 1.5 M, Ph 8.8: Disolver 92 g de Tris base en agua destilada, ajustar a pH 8.8 con HCl 1 N. Aforar a 500 mL con agua destilada y almacenar a 4 °C.
- Tris-HCl 0.5 M, Ph 6.8: Disolver 12 g de Tris base en agua destilada, ajustar a pH 6.8 con HCl 1 N. Aforar a 200 mL con agua destilada y almacenar a 4 °C.
- SDS 10% (p/v): Disolver 10 g de SDS en agua destilada y aforar a 100 mL.
- Persulfato de amonio 10 (p/v): Disolver 100 mg de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada, esta solucion debe prepararse al momento.
- Amortiguador de carga 2X:

Agua destilada	3.0 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.0 mL
Glicerol	1.6 mL
SDS al 10% (p/v)	1.6 mL
B-Mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.5 % (p/v) en agua	0.4 mL

- Amortiguador de corrida 5X

Tris base	45 g
Glicina	216 g
SDS	15 g

Llevar a 3 L con agua destilada. Almacenar a 4°C

- Preparación de gel de separación al 12% -Tris 0.375 M, pH 8.8

Agua destilada	33.5 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	25 mL
SDS al 10% (p/v)	1.0 mL
Acrilamida /Bis	40 mL
Persulfato de amonio 10%	500 mL
TEMED	50 μ L

- Preparación del gel de empaquetamiento al 4% -Tris 0.125 M, pH 6.8

Agua destilada	6.1 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
SDS al 10% (p/v)	100 μ L
Acrilamida /Bis	1.3 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
TEMED	10 μ L

APÉNDICE D

GMCACCTCGGCGGCTGGCTCCCTTGCGGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAGCTC
 TCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGAT
 CCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGA
 GAGCGGCTTTTTGGGATTGCTCCCTCGCGGGTTCGAGCCCTTTGTACCGCCATTG
 TAGCACGTGTGTAGCCAGGTACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTCC
 CGGAACCTGTCCCCAGCCAGTCCCTTAGAGTGACC-ACCTGATGCT-GCAGCTAGAGGC
 GAAGG-TGCGCTCGGTGCGGGACTT-ACCCAACATCTCAGCACGAGCTGACGACACCC
 ATGCACCA-CTGTACCCTGTCCCCAGAAGGGGAACG-CCAATCTCTGGG-TGTCAG
 GGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGC
 GGAGTGTATTATCGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGTGTGACCCCTTAACACTTAGCACT
 CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTTCGCG
 CCTCAGCGTCAGGTACAGGCCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCACATCTCT
 ACGCATTTCACCGCTACAGTGGAATTCGCTCTCTCTCTCAAGTCCCCAGT
 TTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTACATCAGACTTAAGAGACCGCCTG
 CGCGCGCTTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTCGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTG
 CTGGCACGTAGTTAGCC-GGGGCTTCTCGTGAGGTACCGTCACCGCGCCGCCCTCTTCG
 AACGGCGCTCCTTCGTCCTCACAACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCTTCGCTCAC
 GCGGCGTCGCTCCGT CAGGCTTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCCT
 AGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTCAACCTCTCAGGCCGGCTACGC
 ATCGTCGCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCGC
 AAGTGACAGCCAAAGGCCGCTTTCAACCGAAGACCATGCGGTCTTCGGTGTATCCGG
 TATTAGTCCGGTTTTCCCGAGTTATCCCGTCTTCGCGGCAGGTTGCCACGTGTTACT
 CACCCGTCCGCGCTGACCGAACAAGAGCAAGCCCCGTTCCGGTCCGCTCGACTGCATGTA
 TAGCTGCGCT

>KMV8.3.3

GATCACGTTTCGGCGGCTGGCTCCAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCT
 CGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATC
 CGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTTCAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGA
 AACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATGTT
 AGCAGTGTGTAGCCAGGTACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCT
 C--GGTTGT--CCGT CAGT---CCTAGAGTG--CAACTGAATGCTG--CACT-AGATCAA
 GGG-TGCGCTCG-TGCGGGACT--ACCC-ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAG-CAT
 GCA-CACCTGTCACTCTG-CCCCGAAGGGGAAG-CCTATCTCTAGGGTTGT CAGAGGATG
 TCAAGA-CTGGTAAGGTTT-TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGT
 GCGGGCCCCGTC AATTCCCTTTGAGTTTCAGTCTTCGACCCGTA CTCCCCAGGCGGAGTG
 CTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAACCCCTTAACACTTAGCACTCATCGT
 TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTTCGCGCTCAG
 CGT CAGTTACAGACCAGAGAGTTCGCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCACATCTCTACGCAT
 TTCACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCTTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAA
 TGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCG
 CTTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
 CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAACGGTA
 CTTGTTCTTCCCTAACACAGAGTTTACGATCCGAAAA-CCTTCATCACTACGCGCGG
 TTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
 CTGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTTCGGCTACGCATCGTC
 GCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTATTGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGG
 TAGCTAAAAGCCACCTTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGC
 CCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGT
 CCGCCGCTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCCGGTCCGCTCGACTGCATGTATAGATGCG
 A

>KMV8.3.1

GATCACCTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTC
 TCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGAT
 CCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGA
 GAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTG
 TAGCACGTGTGAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC
 TCCG---TGTC-CCGGCAGTCA-GTTAGAGTGC---ACTG-ATGCT-GCAACT-AGATC-
 AGGATTGCGCTCGGTGC-GGACT---ACCACCATCTCACGACACGAGCTGACGACA--CA
 TGCACCA-CTGTCACTCTGCCCC--GAAGGGAAG-CCTATCTCTAGGG-TGTCAGAGGAT
 GTCAAGA-CTGGTAAGGTTTC-TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTG
 TGCGGGCCCCCGTCAATTCC-TTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGAGT
 GCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCG
 TTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCTTCA
 GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCA
 TTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCA
 ATGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGC
 GCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
 ACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAACGGT
 ACTTGTCTTCCCTAACACAGAG-TTTTACGATCCGAAAACC-TTCATCACTCACGCGG
 CGTTG-CTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACT-GCTGCCT-CCCGTA
 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTGCGCTACGCA
 TCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTA
 AGTGGTAGCTAAAAGCCACCTTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTA
 TTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA
 CCCGTCGCGCTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCGGTCCGCTCGACTGCATGTATAG
 CCGCCGCC

>KMV832

GTCACGTTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCT
 CGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATC
 CCGGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAG
 AACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGT
 AGCACGTGTGAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCT
 TCGGTTTGTCA-CGGCAGTCG--TTAGAGTGAC--ACTG-ATGCCTGCCACT-AGATC-A
 TGTTTGGCTCG-TGCGGGACT--ACCCACATCTCACGACACGAGCTGACGACCA-CAT
 GCAC--ACTGTCACTCTGCCCCGAAAGGGAAGCCCTATCTCTAGGG-TGTCAGAGGATG
 TCAAGA-CTGGTAAGGTTTC-TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGT
 GCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTGGGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTG
 CTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGT
 TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAG
 CGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCAT
 TTCACCGCTACACGTGAATTCACCTCT-CTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAA
 TGACCCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCG
 CTTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
 CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAACGGTA
 CTTGTTCTTCCCTAACACAGAGTTTTTACGATCCGAAAACCTTTCATCACTCACGCGCGT
 TGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC
 TGGCCGTGTCTCAGTCCCAGGTGGCTATCACCTCTCAGTTCGGCTACGCATCGTTCGC
 CTTGGTGAGCCGTTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGTA
 GCTAAAAGCCACCTTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCC
 CGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTC
 GCCGCTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCGGTCCGCTCGACTGCATGTATAGCCGCC
 CT

>KMV837

GATCACTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCT
 CGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATC
 CGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACGAG
 AACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTTGT
 AGCAGGTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCT
 CCGGGTTGTCA-CGGCAGT--CCCTAGAGTGCC--ACTG-ATGCTG--CACT-AGATC-A
 GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT--ACC--ACATCTCACGACACGAGCTGACGAC-ATCAT
 GCAC--ACTGTCACTCTGCCCCGAAAGGGAAG-CCTATCTCTAGGG-TGTCAGAGGATG
 TCAAGA-CTGGTAAGGTTTC-TCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGT
 GCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGACTCCCCAGGCGGAGTG
 CTTAATGCGTTTGTGCGAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGT
 TTACGGGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAG
 CGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCAT
 TTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAA
 TGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCGCCTGCGCGG
 CTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
 CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCT-GGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAACGGT
 ACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAG-TTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC-TCACGCGG
 CGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
 GTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTGCGCTACGCATCG
 TCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGT
 GGTAGCTAAAAGCCACCTTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTA
 GCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCC
 GTCCGCGCTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCCGCTCCGCTCGACTTGCATGTATAGAT
 GCGCT

>KMV8.3.4

GATCACGTTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTC
 TCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGAT
 CCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACGAG
 GAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTG
 TAGCAGTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC
 GCCG--TTGTCA-CGGCAGTC-CATTAGAGTGAC--ACTG-ATGCT-GCAACT-AGATCA
 TGA--TGCCTCGGTGCGGGAC-TACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC-ATCA
 TGCAC--ACTGTCACTCTG-CCCCGAAGGGAAG-CCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGAT
 GTCAAGA-CTGGTAAGGTTTC-TCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTG
 TGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGACTCCCCAGGCGGAGT
 GCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCG
 TTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCA
 GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCA
 TTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCA
 ATGACCCCTCCCCGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCGCCTGCGCGC
 GCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
 ACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAACGGT
 ACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAG-TTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGC
 GTTGTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
 TCTGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCAGGTGCGCTACGCATCGT
 CGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTG
 GTAGCTAAAAGCCACCTTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTA
 CCCCAGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCG
 TCCGCGCTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCCGCTCCGCTCGACTGTCATGTATAGCTCC
 CC