



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de la comunidad bacteriana en tapetes
microbianos y estromatolitos terrestres del sistema de
tubo de lava de Chimalacatepec, Morelos, México.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MAIRA NAYELI LUIS VARGAS



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROCÍO JETZABEL ALCÁNTARA
HERNÁNDEZ**

Ciudad Universitaria, CDMX, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre (s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del alumno Luis Vargas Maira Nayeli 55 45067197 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 31017246-2
2. Datos del tutor Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dra. Itzel Becerra Absalón
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombres(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 Dra. Ana María Lizeth Caballero García
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 Dr. Rafael Antonio López Martínez
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 Dra. Nathalie Roberte Chantal Cabirol
7. Datos del trabajo escrito Título	7. Datos del trabajo escrito Caracterización de la comunidad bacteriana en tapetes microbianos y estromatolitos terrestres del sistema de tubo de lava de Chimalacatepec, Morelos, México.
Número de páginas Año	68 p. 2018

Agradecimientos Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México; en especial, a la Facultad de Ciencias, por la formación académica y profesional brindada.

Esta investigación fue realizada gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica con el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA103518; y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el proyecto SEP-CONACYT 256332.

A mi directora de tesis, la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández por el apoyo y la instrucción que me brindó durante todo el proceso.

A mi jurado de tesis: Dra. Itzel Becerra Absalón, Dra. Ana María Lizeth Caballero García, Dra. Nathalie Roberte Chantal Cabirol, Dr. Rafael Antonio López Martínez por sus comentarios y el tiempo dedicado a este trabajo.

A Osiris Gaona, Olivia Zamora Martínez, Maricarmen Salazar Ledesma y Javier Tadeo León, por su apoyo técnico en la realización de este proyecto. Al Dr. Alfredo Rafael Vilchis por su apoyo en los análisis de microscopía.

Este trabajo se realizó en coordinación con los siguientes laboratorios: Laboratorio de Genómica y Biotecnología del Instituto de Geología, UNAM; Laboratorio del Cromatografía del Laboratorio Nacional del Geoquímica y Mineralogía (LANGEM), Sección de ICP del Laboratorio Nacional del Geoquímica y Mineralogía (LANGEM), y Laboratorio de Microscopía del Centro de Investigación en Química Sustentable (CIQS) de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Agradecimientos a título personal

A mi familia, en primer lugar, a mis padres, por el amor y el apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi vida, por todas sus enseñanzas, sus motivaciones, por creer en mí y por su presencia en los momentos más difíciles. Por hacerme saber que sin importar nuestras diferencias siempre van a estar ahí. A mis hermanas, por su lealtad, los ratos de ocio y las diferencias, significan mucho para mí. A mi tía Lucy por tu constante ayuda, tu generosidad y tolerancia. Y a mi abuela por tus historias y el cariño con el que haces todas las cosas.

A Edurne por las conversaciones que no puedo tener con nadie más, por las caminatas que van hacia ningún lado, por tu paciencia y tu valentía y por hacerme querer cada día ser una mejor persona. Por escucharme siempre hablar de cosas de mi carrera. Por todo lo que piensas y por tu forma de ver la vida. Te quiero por todo lo que eres.

A Itzel, Ele, Roscas, Maru e Ibra (les Jóvenes Ilustres) por su amistad, la carrera sin ustedes no hubiera sido la misma. Gracias por todos los momentos que han compartido conmigo, por las prácticas de campo, los desvelos, las charlas hasta el amanecer, las risas, los consejos, la música y la fiesta. Por hacerme saber cuándo estoy equivocada y por dejarme ser tan yo cuando estoy con ustedes. Por ser tan diferentes. Les quiero y espero conservar su amistad por mucho tiempo.

A Zoar y a Carla porque con ustedes aprendí lo que es el trabajo en equipo en términos no académicos. Por su apoyo, la comprensión y las palabras de aliento en los momentos de pánico. Porque siempre me he sentido cómoda en compañía suya. Por las charlas que incluyen nada y todo al mismo tiempo y viceversa. Por los horarios estrictos y los tiempos de snack y claro, por el sushi con mayonesa.

A mi tutora, la Dra. Rocío, por ser una investigadora ejemplar y una persona increíble. Por permitirme conocer sus ideas más allá de la academia y por permitir que yo le comparta las mías. Por el tiempo que dedica a nuestra formación, y por tomar en cuenta siempre a sus estudiantes. Gracias por la motivación que me ha inculcado para continuar por el camino de la investigación e incluso hacer que me apasione de nuevo. Trabajar con Ud siempre es excepcional. La admiro y la estimo mucho.

A todo el equipo del Laboratorio de Genómica y Biotecnología (Jaz, tío Yisus, Kari, David, Lali, Jess y Bogdan) por ayudarme con mis dudas de noob y por hacer de nuestro lugar de trabajo un sitio tan ameno y agradable.

Índice

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Tubos de lava	10
2.1.1. <i>Formación</i>	10
2.1.2. <i>Tipos de espeleotemas en tubos volcánicos</i>	10
2.1.2.1. <i>Espeleotemas cilíndricos</i>	11
2.1.2.2. <i>Espeleotemas planos</i>	12
2.1.3. <i>Biogénesis de los espeleotemas</i>	12
2.2. Comunidades microbianas en cuevas y tubos volcánicos	13
2.2.1. <i>Diversidad funcional</i>	15
2.3. Técnicas independientes de cultivo para la caracterización ambiental microbiana	16
2.3.1. <i>La región V4 del 16S rRNA</i>	17
2.3.2. <i>Técnicas de secuenciación masiva y análisis de datos</i>	18
3. ANTECEDENTES	21
3.1. El Sistema Chimalacatepec	21
3.2. Estudios espeleológicos en el Sistema Chimalacatepec	22
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	26
6.1. Objetivo General	26
6.2. Objetivos particulares	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Sitio de estudio y muestreo	27
7.2. Caracterización elemental de los estromatolitos terrestres y agua de goteo	27
7.3. Extracción y cuantificación de DNA	28

7.4.	Amplificación y secuenciación de gen 16S rRNA	29
7.5.	Análisis de las secuencias 16S rRNA	30
7.6.	Análisis de diversidad y comparación con otros tubos de lava	30
7.7.	Análisis <i>in silico</i> de la diversidad funcional	31
7.8.	Análisis de la diversidad funcional mediante PCR	31
8.	RESULTADOS	33
8.1.	Registro y documentación de tapetes y estromatolitos terrestres	33
8.1.1.	<i>Análisis microscópico y elemental de los estromatolitos terrestres</i>	34
8.1.2.	<i>Detección de estructuras biomórficas en estromatolitos terrestres de opal-A</i>	38
8.2.	Análisis de las secuencias 16S rRNA	39
8.2.1.	<i>Rarefacción y diversidad del 16S rRNA de bacterias y arqueas</i>	41
8.2.2.	<i>Afiliación filogenética de las secuencias 16S rRNA</i>	42
8.3.	Comparación de la diversidad microbiana entre tubos de lava de diferentes partes del mundo	45
8.4.	Análisis de la diversidad funcional de las comunidades procarióticas del tubo de lava del sistema Chimalacatepec	46
9.	DISCUSIÓN	48
9.1.	Microscopías y análisis elemental de los estromatolitos terrestres	48
9.2.	Rarefacción y diversidad del 16S rRNA de bacterias y arqueas	49
9.3.	Afiliación filogenética de las secuencias 16S rRNA	49
9.4.	Comparación de la diversidad microbiana entre tubos de lava de diferentes partes del mundo	51
9.5.	Análisis de la diversidad funcional de las comunidades procarióticas del tubo de lava del sistema Chimalacatepec	51
9.6.	Formación de estromatolitos terrestres	53
10.	CONCLUSIONES	57
11.	BIBLIOGRAFÍA	58
12.	ANEXOS	66

Resumen

Los sistemas de tubo de lava son considerados sistemas extremos para la vida debido a la ausencia de luz y sus condiciones oligotróficas. El sistema de tubo de lava de Chimalacatepec está caracterizado por albergar una gran diversidad de espeleotemas y estromatolitos terrestres conformados principalmente por opal-A; y aunque se ha sugerido su origen biótico, a la fecha no existe ningún estudio microbiológico que confirme esta hipótesis. Por ende, en este estudio i) se exploró la diversidad microbiana de los tapetes microbianos y estromatolitos terrestres de este tubo de lava a través de fragmentos de 16S rRNA obtenidos por secuenciación masiva, ii) se caracterizó la composición elemental de los estromatolitos mediante Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Dispersión de Energía para contextualizar los datos obtenidos de la secuenciación, iii) se comparó la diversidad bacteriana obtenida en otros tubos de lava ubicados en otras partes del mundo y iv) se llevó a cabo un rastreo de genes funcionales involucrados en el ciclo del C y N para analizar el potencial genético de las comunidades bacterianas encontradas.

En total se obtuvieron 811 652 secuencias, de las cuales, el 93% correspondieron al dominio Bacteria. Entre las más relevantes se encontraron Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi y Acidobacteria. No hubo diferencias significativas entre la diversidad de 16S rRNA de los tapetes microbianos y los estromatolitos, lo que sugiere que su composición procariótica es similar. Los análisis por microscopía confirmaron la naturaleza silíceo de los estromatolitos y la presencia de una estructura laminada intercalada en capas de opal-A, carbonatos de calcio y depósitos orgánicos. Estos estromatolitos están contiguos a los tapetes microbianos, donde se notaron principios de biomineralización. Por otra parte, el tubo de lava de Chimalacatepec comparte 67 OTUs con otros tubos de lava en diferentes partes del mundo, por tanto, hay organismos clave para la dinámica de este tipo de sistemas. Finalmente, se logró detectar la presencia de genes asociados con la fijación de carbono, la oxidación de metano, la fijación de nitrógeno y la oxidación del amonio mediante ensayos de PCR de punto final.

Los resultados de este estudio sugieren que los organismos procariontes están altamente relacionados con la formación de las estructuras estromatolíticas en el sistema de tubo de lava de Chimalacatepec. Los tapetes microbianos de la cueva cuentan con organismos que pueden inducir la litificación, posiblemente mediante procesos de fijación de carbono en oscuro, además de contar con procesos quimiolitotróficos que les permite vivir en este ambiente oligotrófico.

1. Introducción

Los procariontes son los microorganismos más abundantes y diversos metabólicamente hablando de toda la Tierra; por lo que su relevancia en los ecosistemas y en los ciclos biogeoquímicos es actualmente, incuestionable (Falkowski et al., 2018). Sus diversas estrategias para la obtención de nutrientes y energía les han permitido habitar casi cualquier sistema del planeta, sea terrestre, marino o atmosférico, incluyendo los subterráneos. Asimismo, estos microorganismos son considerados clave para comprender el origen de la vida (Seckbach, 2006; Northup et al., 2011).

México está caracterizado por su constante actividad volcánica, la cual está principalmente relacionada con la zona de subducción de las placas de Rivera y Cocos bajo la placa Norteamericana; siendo el Eje Neovolcánico Transversal, su principal expresión geomorfológica (Espíndola & Macías Vázquez, 1996). Este Eje es un conjunto de elevaciones volcánicas (con orientación este-oeste) que se extienden a lo largo de ~1,000 km, y con ~8,000 estructuras volcánicas junto con algunos cuerpos intrusivos (Gómez-Tuena et al., 2007). Asimismo, cuenta con varios sistemas subterráneos de origen volcánico, como los tubos de lava.

Los tubos volcánicos son formados por flujos de lava que se desplazan y dejan estructuras tubulares al enfriarse (Tarbuck & Lutgnes, 2005). Estas cavidades subterráneas son consideradas sistemas extremos para la vida debido a la ausencia de luz, las condiciones oligotróficas (ausencia de nutrientes y baja productividad primaria), y sus rangos de humedad y temperatura (Riquelme & Northup, 2013). Sin embargo, cuentan con varios ejemplos de desarrollo microbiano como lo son los tapetes e interacciones mineral-microorganismo, las cuales comienzan a estudiarse (López-Martínez et al., 2016). Por lo que el estudio de estos sistemas subterráneos desde una perspectiva microbiológica, es de suma importancia para observar las diferentes formas en que los microorganismos se desarrollan y diversifican (Lavoie et al., 2017), así como forman consorcios en una serie de interacciones aún no estudiadas (Cheeptham, 2013).

El campo volcánico del Chichinautzin alberga el tubo de lava más largo de América Latina Continental (Espinasa-Pereña, 1999) y aunque algunos estudios han descrito su geomorfología (López-Martínez et al., 2016), poco se sabe de su microbiología. De allí, la importancia de realizar trabajos de exploración bacteriana en estos sistemas y compararlos con otros ya analizados en el mundo, como en el archipiélago de Azores (Portugal) y Hawai'i (Estados Unidos).

2. Marco Teórico

2.1. Tubos de lava

2.1.1. *Formación*

Los tubos de lava son formaciones geológicas con forma cilíndrica, tipo túnel y con pendiente. Estas formaciones se generan a partir de lavas basálticas, generalmente pahoehoe aunque también se pueden formar tubos volcánicos con lava tipo A'a (Constantino Rodríguez, 2011). La lava tipo pahoehoe se desplaza en pulsos sucesivos a poca velocidad en comparación con la lava tipo A'a. De esta manera, la lava se acumula progresivamente y presenta entonces dos fenómenos que pueden ocurrir al mismo tiempo: i) el apilamiento de la lava hasta que se adquiera un cierto volumen que va a desencadenar un nuevo desplazamiento, y ii) la solidificación en algunas partes exteriores del fluido. De esta forma, el movimiento del fluido se lleva a cabo por debajo de una costra rígida que paulatinamente se va solidificando; lo que, además, evita el enfriamiento del sector central (Llambías, 2001). A medida que la erupción del volcán cesa, se limita el suministro de lava al conducto y la lava restante fluye por acción de la gravedad, dejando así una cavidad en forma de túnel con una longitud considerable (Constantino Rodríguez, 2011).

Cabe mencionar que se han registrado cuatro procesos principales de génesis de los tubos volcánicos: i) algunas placas de corteza solidificada flotan sobre el canal de lava formando así un techo, ii) el exterior del tubo se forma desde la orilla del canal de lava hacia el centro, iii) se presentan desbordamientos los cuales desarrollan *levees* para al final formar techos arqueados, y iv) las *lenguas* de lava que se extienden progresivamente debajo de una costra ya solidificada (Valerio et al., 2008; 2010). Una vez que se ha formado el techo del tubo, la lava de las paredes se enfría dando lugar eventualmente a formaciones geológicas secundarias, tales como los espeleotemas (Detay, 2011).

2.1.2. *Tipos de espeleotemas en tubos volcánicos*

Los espeleotemas son depósitos secundarios de minerales que se forman en las paredes de las cuevas. En los tubos de lava, los espeleotemas están clasificados en función de su morfología, génesis y mineralogía (Hill & Forti, 1995); siendo el opal-A, la principal forma mineral en los ambientes de origen volcánico (Daza & Bustillo, 2014). Este tipo de espeleotemas son cuarzos polimorfos y muestran una gran variabilidad en su morfología, v.g., estalagmitas, estalactitas y

flowstones. Éstas están conformadas químicamente por sílice (Si), agua (H₂O), y en menor cantidad, por otros minerales como el calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) y potasio (K) (Vidal Romaní et al., 2010). En general, los espeleotemas de las cuevas volcánicas están formados por tres tipos de componentes: i) compuestos inorgánicos derivados de la descomposición fisicoquímica de la roca, ii) compuestos biológicos derivados de los microorganismos que allí habitan y, iii) biominerales, es decir, minerales formados por la interacción entre la roca y los productos de la actividad metabólica de los microorganismos (Vidal-Romaní et al., 2015).

En cuanto a su morfología, en varios tubos de lava de diferentes partes del mundo (v.g., Argentina, Australia, Portugal, España y Suecia) se han identificado dos tipos principales de espeleotemas: i) cilíndricos y ii) planos (Vidal-Romaní et al., 2015). Los cuales se describen a continuación.

2.1.2.1. *Espeleotemas cilíndricos*

Como su nombre lo indica, estos espeleotemas son cilíndricos y se encuentran cementados en opal-A. El cuadro 1 resume las características principales de los subtipos de estas de formaciones secundarias.

Cuadro 1. Características de los espeleotemas cilíndricos (Vidal-Romaní et al., 2015).

Tipo de espeleotema cilíndrico	Características generales	Formación	Sitio de desarrollo
Espeleotemas cilíndricos solitarios	Generalmente son delgados. Tienen ~4 mm de diámetro y entre 1-15 mm de longitud.	Se forman por el movimiento capilar del agua.	Se desarrollan en las paredes, el techo y/o el piso de la cueva.
Espeleotemas tipo-pasto	Conformados por numerosas asociaciones entre espeleotemas cilíndricos delgados (diámetro máx. 2mm).	Se forman con la combinación del crecimiento de bacterias filamentosas dirigidas por el movimiento de agua capilar.	Se desarrollan en el techo o en las paredes de las cavidades

Cuadro 1. Características de los espeleotemas cilíndricos. *Continuación.*

Tipo de espeleotema cilíndrico	Características generales	Formación	Sitio de desarrollo
Microestomatolitos terrestres		Se forman por el crecimiento de tapetes bacterianos que viven mientras haya humedad en la cueva. Nunca están relacionados con el movimiento capilar del agua.	Se desarrollan en el techo, las paredes o el piso de la cueva.

2.1.2.2. Espeleotemas planos

Este tipo de espeleotemas se caracterizan por formar una capa de microgranos de aproximadamente de 1 μm de diámetro. Éstos están formados por clastos de minerales desprendidos por la meteorización de la roca, y transportados por el agua a corta distancia de la roca original. Por lo general, el agua se mueve arrastrando los microgranos, primero depositándolos en películas pequeñas y luego –cuando el flujo del agua disminuye–, comienza la evaporación y la tensión superficial produce la división de la película en gotas de agua. El resultado final es una red de estanques o campos de microgours (Vidal-Romaní et al., 2015).

2.1.3. Biogénesis de los espeleotemas

En general, los primeros espeleotemas de los tubos volcánicos son formados por el proceso de enfriamiento de la lava (Forti, 2005). La siguiente etapa está dada por una serie de procesos físicos y químicos, entre los que destaca el transporte de los minerales a causa del agua de infiltración (Forti, 2005; White, 2010). Sin embargo, para que los minerales sean solubles en el agua, es indispensable la participación de diversos microorganismos (Vidal-Romaní et al., 2010); pues su actividad metabólica puede cambiar la composición geoquímica de las estructuras mediante intercambio iónico o la secreción de sustancias orgánicas e inorgánicas (Norhutp et al., 2011). Ya que los sistemas volcánicos tienen rocas con un alto contenido de sílice, es común que los espeleotemas contengan ópalo-A (Aubrecht et al., 2008). En particular, estos espeleotemas se forman por la precipitación, sobresaturación y evaporación del agua con sílice disuelto, donde algunos microorganismos participan de manera activa (Bustillo et al., 2010).

Puesto que las cavidades subterráneas son susceptibles a convertirse en un hábitat para los microorganismos, no es sorprendente que éstos interactúen constantemente con los minerales. El análisis de espeleotemas de opal-A en varios tubos de lava ha revelado que la superficie de estos depósitos minerales presenta sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés, *Extracellular Polymeric Substances*); así como estructuras filamentosas mineralizadas y tapetes microbianos regularmente amarillos y blancos (de los Ríos et al., 2011; Hathaway et al., 2014a; López-Martínez et al., 2016). La presencia de estas estructuras reafirma que el proceso de mineralización llevado a cabo por las bacterias es vital para la transformación de los espeleotemas en los tubos de lava.

En los últimos años, el uso combinado de métodos microbiológicos y químicos ha determinado cómo los microorganismos están involucrados en los procesos de transformación de los ambientes subterráneos (Barton & Northup, 2007); los cuales pueden ser constructivos o destructivos. Cabe destacar que, las comunidades bacterianas de estos sitios albergan microorganismos con una gran diversidad metabólica; por lo que sus interacciones pueden ser tanto cooperativas como competitivas. Promoviendo así, una evolución a través de la adaptación a las condiciones de estos ambientes (Riquelme & Northup, 2013).

2.2. Comunidades microbianas en cuevas y tubos volcánicos

En el campo de la microbiología de los sistemas subterráneos, se han realizado estudios desde la década de 1940. Sin embargo, debido a las limitaciones de los métodos utilizados, estos estudios no representan un análisis exhaustivo sobre el estado y la actividad de los microorganismos que habitan estos sistemas. Hoy en día, con el avance de las técnicas en biología molecular, es posible realizar investigaciones en estos sistemas únicos para la vida (Cheeptham, 2013).

En los estudios que se han realizado en los últimos años, los principales filos encontrados en cuevas son Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, Chloroflexi, Nitrospirae, y Bacteroidetes (Northup et al., 2011; Hathaway et al., 2014a; Lavoie et al., 2017). Además, en algunas de las cavidades se encontraron Firmicutes, OP10 y TM7. La mayoría de las investigaciones se han realizado en cuevas kársticas y tapetes microbianos (Cuadro 2). En algunos de éstos, se han notado diferencias en la composición microbiana de los micrositos (de los Ríos et al., 2011; Northup et al., 2011); mientras que en otros no fue

concluyente si el color del tapete está condicionado por la diversidad de bacterias presentes (Lavoie et al., 2017). Los estudios de los tubos de lava de diferentes localidades sugieren que, a nivel fila, la composición bacteriana es muy similar; sin embargo, a otros niveles taxonómicos, existen grupos únicos en cada tubo de lava (Hathaway et al., 2014a).

Cuadro 2. Estudios previos del microbioma de cuevas y tubos de lava.

Sitio (País)	Tipo de sistema	Formación estudiada	Referencia
Colorado (EUA)	cueva kárstica	sedimentos de la cueva	Barton et al., 2004
Dakota del Sur (EUA)	cueva kárstica	sedimentos de la cueva	Chelius & Moore, 2004
Colorado (EUA)	mina geotérmica	espeleotemas	Spear et al., 2007
Wyoming (EUA)	cueva kárstica	tapetes microbianos	Engel et al., 2010
Durganval (Irlanda)	cueva kárstica	depósito de <i>moonmilk</i>	Rooney et al., 2010
Córdoba (España)	cueva kárstica	tapete microbiano	Urzi et al., 2010
Isla de Terceira (Portugal)	tubo de lava	espeleotema ocre	de los Ríos et al., 2011
Nuevo México (EUA), Hawai'i (EUA) e Isla de Terceira (Portugal)	tubos de lava	tapetes microbianos	Northup et al., 2011
Arizona (EUA)	cueva kárstica	espeleotemas	Ortiz et al., 2013
Roraima Tepui (Venezuela)	cueva kárstica	sedimentos de la cueva	Barton et al., 2014
Hawai'i (EUA), Isla de Terceira (Portugal)	tubos de lava	tapetes microbianos	Hathaway et al., 2014a
Argentina, Australia, España, Portugal, Suecia.	cuevas desarrolladas en rocas magmáticas	espeleotemas	Vidal-Romaní et al., 2015
Indo-Burma (noreste de India)	cueva kárstica	sedimentos de la cueva	De Mandal et al., 2016
Tjuv-Antes (Suecia)	cueva pseudokárstica	espeleotemas	Zepeda Mendoza et al., 2016
California (EUA)	tubo de lava	tapetes microbianos	Lavoie et al., 2017
Islas Canarias (España)	tubos de lava	tapetes microbianos amarillos	Gonzalez-Pimentel et al., 2018

EUA: Estados Unidos de América

2.2.1. *Diversidad funcional*

La dinámica de las comunidades bacterianas está influenciada por diversos factores como los procesos geoquímicos, la historia geológica del sistema y su entorno fisicoquímico. En este contexto, los ciclos biogeoquímicos regulan las tasas de reciclaje de los nutrientes esenciales para la vida, como el carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Además, estos elementos son adquiridos y empleados para la síntesis de biomoléculas por las células, y al morir, estos elementos retornan al sistema principalmente en forma de compuestos orgánicos.

De manera general, es posible conocer el potencial genético de los microorganismos para realizar un proceso biogeoquímico mediante el análisis de los genes funcionales. Los genes funcionales son aquellos responsables de codificar la información para la síntesis de las enzimas involucradas en las rutas biogeoquímicas, y que han permitido a los organismos desarrollarse en un sistema en específico. El estudio de la diversidad funcional en cuevas y tubos de lava es reciente, ya que, al tratarse de sitios oligotróficos, hay mayores posibilidades de que microorganismos tengan metabolismos quimiolitotróficos. Es decir, que los procariontes de los sistemas de cuevas obtienen su energía a partir de compuestos inorgánicos en sedimentos o disueltos en el agua, incluyendo gases generados en la cueva como CH_4 e H_2 (Kumaresan et al., 2014; Karwautz et al., 2018).

La mayoría de este tipo de estudios funcionales se han llevado a cabo en cuevas tipo *karst*. En 2009, Chen y sus colaboradores analizaron la diversidad de las bacterias responsables de la oxidación del nitrógeno y de la fijación de carbono a través de los genes *amoA*, *cbbL* y *cbbM* en la cueva kárstica de Movile en Rumania. El gen *amoA* codifica para la síntesis de subunidad α de la enzima amonio monooxigenasa (AMO) tanto en Bacteria como en Archaea (Rotthauwe et al. 1997; Francis et al. 2003). Mientras que, el gen *cbbL* y *cbbM* codifican para la forma I y II de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) respectivamente, la cual se encarga de la fijación de dióxido de carbono (CO_2) a través de la ruta de Calvin-Benson-Bassham (Berg, 2011). En este estudio hallaron que los microorganismos oxidadores de amonio son los principales productores del sistema y que hubo pocos fijadores de CO_2 . Posteriormente, otro estudio reportó la presencia de organismos metanótrofos en ese mismo sitio empleando como marcador el gen *pmoA*, el cual codifica para la metano monooxigenasa (MMO), la enzima encargada de la oxidación del metano (CH_4) (Stephenson, 2014).

Otro estudio de gran relevancia se llevó a cabo en otra cueva tipo *karst* ubicada en Bavaria, Alemania. Esta cueva está caracterizada por su gran actividad geoquímica, pues se ubica encima de un basamento de hidrocarburos. Los investigadores llevaron a cabo un análisis cualitativo de varios genes funcionales para la identificación de la presencia de organismos metanótrofos y metilótrofos en las biopelículas de la cueva. El análisis arrojó un resultado positivo para el gen *mxhF* que codifica para la metanol deshidrogenasa, y para también fue positivo para *pmoA* (Karwautz et al., 2018).

En sistemas de tubo de lava se ha reportado sólo un estudio, en donde se analiza la diversidad de las bacterias que oxidan y fijan nitrógeno a través de las enzimas amonio monooxigenasa y nitrogenasa, respectivamente. La primera es sintetizada gracias a la transcripción del gen *amoA*, mientras que la segunda es codificada por *nifH* (Hathaway et al., 2014b). Otro estudio en una cueva volcánica en Antártica, estudió los genes *cbbM*, *cbbL* y *aclB*; los dos primeros codifican para la enzima RuBisCO, mientras que el último para la ATP citrato liasa, la cual interviene en la ruta reductiva del ciclo del ácido cítrico (rTCA) para la fijación de CO₂ (Tebo et al., 2015). En esta investigación se reportó una amplia diversidad para los genes que codifican a la enzima RuBisCO, por esto los autores sugirieron que los organismos del sistema eran quimilitoautotróficos.

2.3. Técnicas independientes de cultivo para la caracterización ambiental microbiana

Puesto que el 99% de los microorganismos que existen no son cultivables en condiciones de laboratorio, el análisis del DNA metagenómico ha sido –desde la década de 1980–, la herramienta por excelencia para la caracterización de los microorganismos en muestras ambientales (Amann et al., 1995; Kumar et al., 2015). Este análisis independiente de cultivo ha permitido el estudio completo del componente genético de un sitio, y gracias a ello, ha sido esencial para comprender la diversidad de los procariontes, sus relaciones filogenéticas y la estructura de las comunidades microbianas de diversos ambientes (Schmeisser et al., 2007).

A finales de 1970, se descubrió la clave para clasificar a los organismos procariontes: el componente 16S del RNA ribosomal de las bacterias (Woese & Fox, 1977). Sin embargo, fue Norman Pace y su equipo de trabajo quienes llevaron a cabo los primeros experimentos de extracción de ADN metagenómico y su análisis. Ellos se percataron de que los métodos

convencionales de ecología microbiana no detectaban las especies no cultivables, las cuales estaban lejanamente relacionadas con los linajes que se conocían hasta entonces (Tringe & Rubin, 2005). Y ya que la secuencia del RNA ribosomal proporciona un indicador para las especies bacterianas, ésta permitía conocer su contexto evolutivo y ecológico en muestras ambientales. Consecuentemente, fue seleccionado como un marcador adecuado para los estudios de caracterización de los microorganismos.

Cabe destacar que en estas primeras investigaciones se utilizaron los componentes 5S, 16S y 23S del RNA ribosomal (Stahl et al., 1985; Olsen, 1986). También era frecuente hacer una selección o *screening* de las librerías antes secuenciarlas (clonación-secuenciación). Posteriormente, Pace y sus colaboradores (1986) propusieron el uso de 16S rRNA con el fin de estandarizar el protocolo para la identificación de los organismos existentes en los diversos ambientes. Esta propuesta fue rápidamente aceptada debido a que este componente posee suficiente variabilidad para diferenciar con precisión a los organismos en los distintos niveles taxonómicos, además su tamaño (1500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas, y la conservación de su estructura secundaria favorece el alineamiento durante la comparación de secuencias (Rodicio & Mendoza, 2004).

2.3.1. La región V4 del 16S rRNA

La razón por la que el 16S rRNA permite clasificar a los organismos con bastante exactitud es debido a las nueve regiones hipervariables (V1-V9) que contiene, y que están distribuidas a lo largo de ~1500 pb. Estas regiones son las menos conservadas y dan información para establecer relaciones filogenéticas y taxonómicas en Bacteria y Archaea (Baker et al., 2003; Valenzuela et al., 2015). Los primeros métodos de secuenciación detectaban ~100 nucleótidos; mientras que actualmente, las técnicas Sanger permiten obtener entre 800 y 1000 nucleótidos, –dependiendo de la cantidad inicial de amplicón–. Las nuevas plataformas de secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés de *Next-generation sequencing*) permiten la obtención de un mayor número en lecturas o *reads*, que van desde 150 hasta 450 pb (Loman et al., 2012). Debido a esta característica técnica, se han considerado el uso de sólo algunas regiones hipervariables para el estudio de la ecología microbiana.

La heterogeneidad intragenómica del gen 16S rRNA provoca que cada región hipervariable muestre diferentes grados de variabilidad (Chakravorty et al., 2007; Valenzuela et al., 2015). En consecuencia, se han hecho comparaciones entre algunas regiones y el gen completo para determinar las regiones más adecuadas para cada fin científico. Sun y colaboradores (2013) menciona que la heterogeneidad intragenómica tiende a concentrarse en posiciones específicas, de forma que, las regiones V4 y V5 presentan un menor grado de heterogeneidad; por lo que emplearlas como marcador molecular, reduce la sobreestimación de los análisis de diversidad. También Yang et al. (2016) reconocen que, para el estudio metagenómico de ambientes extremos, es recomendable la utilización de la región V4 a la V6. Consecuentemente, la región V4 han sido de las más utilizadas entre los investigadores, y bajo la cual se ha generado el *Earth Microbiome Project*, para el estudio de taxonomía y de la estructura de las comunidades bacterianas en diversos sitios del planeta (Gilbert et al., 2011).

Asimismo, se pueden emplear oligonucleótidos iniciadores (o primers) que: i) identifiquen taxones tanto de Bacteria como de Archaea y ii) produzcan un amplicón con el tamaño adecuado para la secuenciación masiva. Además, en la actualidad existe una amplia base de datos con secuencias encontradas a través de la región V4, lo que permite comparaciones significativas (Aprill et al., 2015).

2.3.2. Técnicas de secuenciación masiva y análisis de datos

Los primeros estudios genómicos en bacterias se llevaron a cabo en 1995 a través del método Sanger (Metzker, 2005; Loman et al., 2012). Este método fue mejorado y fue el predominante en la investigación de genomas por al menos dos décadas. No obstante, con los años se identificaron sus limitaciones y se desarrollaron nuevas tecnologías para la secuenciación de nucleótidos. De forma que, en la actualidad, el método Sanger es clasificado como un método de primera generación mientras que las plataformas de secuenciación recientes son referidas como de segunda generación (NGS). Estas nuevas plataformas incluyen una serie de pasos universales que se agrupan, en términos generales, en la preparación del templado, las librerías de clonas, la reacción de secuenciación y el análisis de los datos (Metzker, 2010).

Existe una gran variedad de plataformas de secuenciación masiva en el mercado, éstas se distinguen entre sí por la combinación única de protocolos específicos, lo que determina el tipo,

la calidad y la cantidad de datos producidos. Hasta la fecha, no existe un consenso que determine una calidad mínima en los datos, por lo que no se ha logrado hacer una equivalencia entre una plataforma y otra (Metzker, 2010). Cabe mencionar que la única característica que comparten es la producción de datos a partir de la secuenciación masiva en paralelo en el orden de *Gigabases* o *Terabases* (Cadena-Zamudio et al., 2016).

Se hace referencia a instrumentos de segunda generación, como todos aquellos métodos dependientes de una etapa de amplificación a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). Entre las plataformas incluidas en esta clasificación se encuentran: 454 Life Sciences de Roche®, las plataformas de Illumina® (HiSeq2000 y MiSeq), la plataforma SOLiD de Life Technologies® y la plataforma PacBio RS de Pacific Biosciences® (Loman et al., 2012; Cadena-Zamudio et al., 2016). Las características de las plataformas mencionadas se encuentran resumidas en el Cuadro 3.

En la actualidad, los estudios enfocados en la caracterización del componente bacteriano ambiental incluyendo el *Earth Microbiome Project*, utilizan las plataformas de Illumina debido a que permiten una amplia cobertura de las secuencias microbianas sin mencionar que son relativamente más económicas que otras plataformas (Caporaso et al., 2012).

Cuadro 3. Especificaciones tecnológicas de plataformas de secuenciación masiva. Modificado de Loman et al. (2012).

Plataforma	Principio de secuenciación	Longitud de la lectura (bases)	Tiempo del proceso	Cantidad de datos generados (GB)
454GS FLX+ (Roche)	Pirosecuenciación	700-800	23 horas	0.7
HiSeq2000/2500 (Illumina)	Secuenciación por síntesis	2x100	2-11 días	120-600
MiSeq (Illumina)	Secuenciación por síntesis	2x300	65 horas	15
5500xl SOLiD	Secuenciación por ligación.	75+35	8 días	350,000
PacBio RS (Pacific Biosciences)	Secuenciación en tiempo real	3,000-15,000	20 minutos	3 por día

Derivado la generación masiva de secuencias por analizar, en los últimos años se han generado diversas plataformas para el análisis bioinformático. Entre estas plataformas, destaca QIIME, cuyo nombre deriva de *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (Caporaso et al., 2010). El análisis en dicho sistema consiste en una serie de comandos en una ventana terminal y luego visualizar el resultado de forma gráfica y textual (Kuczynski et al., 2012). QIIME2 es una plataforma robusta para combinar conjuntos de datos experimentales y heterogéneos que permite conocer el componente microbiano de muestras ambientales. Además, se adapta a millones de secuencias y puede utilizarse en dispositivos con diferentes características en hardware (Caporaso et al., 2010). Sin mencionar que es un software libre y de código abierto, lo que facilita la generación del conocimiento en el área de la microbiología.

3. Antecedentes

3.1. El Sistema Chimalacatepec

La Sierra del Chichinautzin es una zona ubicada en la faja Neovolcánica Transversal, la cual se extiende desde el sur de la Ciudad de México hasta el estado de Morelos, y está caracterizada por presentar estructuras volcánicas monogenéticas (del Pozzo, 1982; Gómez-Tuena et al., 2007). Entre sus volcanes, se destaca el volcán Suchiooc por la gran cantidad de tubos de lava que están asociados a éste. El volcán Suchiooc es un cono cinerítico holocénico de 200 metros de alto. La estructura volcánica tiene un diámetro de base de 1100 m, un cráter de 150 m de profundidad y 350 m de diámetro en forma de embudo. El Suchiooc emitió un derrame de lava basáltica de tipo pahoehoe de 18 km de longitud y 0.4 km³ de volumen. Se aproxima que la erupción de este volcán duro 2.5 años (Espinasa-Pereña, 1999)

De acuerdo con Espinasa-Pereña (1999), la erupción de dicho volcán se llevó a cabo en fases. En la primera, la erupción fue de tipo estromboliana. Mientras que, en la siguiente, se emitió lava a un ritmo constante, de forma que el derrame rodeó el volcán Tepemecac siguiendo las pendientes situadas hacia el sur en forma de varias *lenguas* de lava, las cuales desarrollaron *levees* que se cerraron formando tubos. El mayor de estos tubos está identificado en tres cavidades: Tiro Perdido, Cueva del Árbol y Chimalacatepec; siendo este último el de mayor longitud.

El sistema de Chimalacatepec consiste en un largo cañón de 1,400 m de longitud y 200 m de profundidad. El cañón está interceptado por varias claraboyas que estuvieron abiertas durante la actividad del volcán Suchiooc y reciben los nombres de: Cueva de Tamasquío, Cueva de Chimalacatepec y Cueva Iztaxiatla, en ese orden (Fig. 1) (Espinasa-Pereña, 1999). La mayoría de los estudios que se han hecho en este sistema son antropológicos, pues en la década de los 90 se descubrió una ofrenda que al parecer fue depositada en la última época prehispánica (Broda & Eshelman, 2004); así como estudios geomorfológicos.

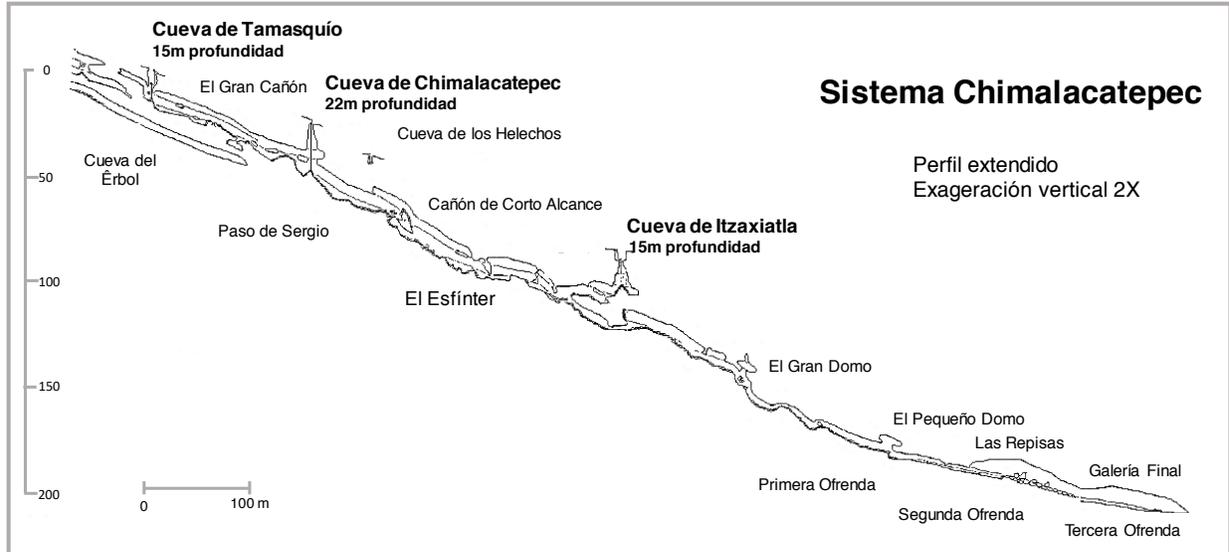


Figura 1. Estructura subterránea del sistema de tubo de lava de Chimalacatepec. Tomado de Espinasa-Pereña, 2006.

3.2. Estudios espeleológicos en el Sistema Chimalacatepec

En la actualidad, existe sólo un estudio que ha caracterizado los espeleotemas de este sistema (López-Martínez et al., 2016). En el mismo se reportan una gran diversidad de formaciones con interacciones microorganismo-mineral, y cabe mencionar que es posible encontrar espeleotemas cilíndricos como planos, así como estromatolitos terrestres asociados a tapetes microbianos.

Los espeleotemas cilíndricos se forman generalmente cerca de zonas de infiltración de agua verticales o semiverticales (López-Martínez et al., 2016). Por otra parte, los espeleotemas planos muestran un relieve ondulado y están divididos por una red de pequeñas depresiones o *microgours* formados por la circulación del agua (Vidal-Romaní, 2015). En el sistema Chimalacatepec se identificaron tres subtipos cuyas características están enlistadas en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Características de los subtipos de espeleotemas planos en el sistema Chimalacatepec (López-Martínez et al., 2016)

Subtipo de espeleotemas cilíndricos	Características
<i>Flowstones</i> de opal-A	Estas estructuras forman una cubierta continua en la superficie de las rocas. Su formación en los tubos de lava de Chimalacatepec es incipiente. Se encuentran en el piso y las paredes de la cavidad, y están relacionadas directamente con la dinámica del agua.
Microgours de opal-A	Se encuentran en superficies verticales de 10 a 15 grados de inclinación. Son acumulaciones de clastos minerales, tienen un desarrollo lineal o sinuoso, y actúan como trampas de agua temporales.
Estromatolitos terrestres de opal-A	Estos espeleotemas presentan dos principales morfologías: i) botrioidal y ii) en forma de galleta. Los espeleotemas con forma de galleta muestran una laminación estromatolítica terrestre en la base y en la parte superior. El centro es poroso y el crecimiento microestromatolítico (<1 cm de diámetro), se sostiene a través de diferentes cortezas laminadas, llegando a la parte superior para formar pequeños nudos.

En la descripción de López-Martínez y colaboradores (2016) se encontraron biopelículas en los espeleotemas planos, además de una estructura laminada (estromatolitos terrestres de opal-A). Sin embargo, no hay estudios que identifique a estos microorganismos.

4. Justificación

A pesar de que México es un país con varios sistemas subterráneos derivados de la actividad volcánica, a la fecha no existe algún estudio que describa la estructura de las comunidades bacterianas en éstos. El sistema Chimalacatepec es el tubo de lava de mayor longitud en América Latina Continental, y se encuentra localizado en el campo volcánico del Chichinautzin. Este tubo de lava ha sido ampliamente estudiado desde una perspectiva geomorfológica, y hasta el momento, sólo existe una investigación que describe los depósitos minerales secundarios de éste. López-Martínez y colaboradores (2016) describieron la existencia de tapetes microbianos en las paredes, los cuales se encuentran relacionados con la presencia de estromatolitos terrestres. Sin embargo, su origen microbiológico no ha sido aún descrito, y tampoco se tiene información sobre el componente bacteriano que posiblemente está involucrado en la formación de estas estructuras organosedimentarias.

Asimismo, estos ambientes son de interés para el estudio de la diversidad microbiana y el desarrollo de la vida en sistemas extremos, debido a las condiciones que presenta. Por ello, también queda como pregunta cómo los microorganismos obtienen sus fuentes de C y N, y el potencial genético que tienen en los ciclos de estos elementos. Por lo que, la descripción e identificación de estos microorganismos es de suma importancia para observar las diferentes formas en las que se mantiene y diversifica la vida.

5. Hipótesis

La estructura de la comunidad procariótica de los estromatolitos terrestres y de los tapetes microbianos del sistema de tubo de lava de Chimalacatepec será diferente, y se destacará por un número menor de especies en los estromatolitos que en los tapetes.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

Describir los tapetes microbianos y las estructuras órgano-sedimentarias del sistema Chimalacatepec, así como su diversidad procariótica y su potencial en los ciclos biogeoquímicos del C y N.

6.2. Objetivos particulares

- Registrar y documentar las estructuras órgano-sedimentarias dentro del tubo de lava y su asociación con las biopelículas.
- Determinar la estructura y la diversidad procarionte en las biopelículas y estromatolitos terrestres empleando técnicas independientes de cultivo, utilizando como marcador el 16S rRNA.
- Comparar la diversidad procariótica encontrada en el sistema de Chimalacatepec con tubos de lava de diferentes regiones del mundo, empleando las bases de datos 16S rRNA reportadas.
- Buscar el potencial genético de procesos relacionados con los ciclos biogeoquímicos del C y N tales como fijación, nitrificación, oxidación y generación de metano a través de análisis *in silico* y PCR.

7. Materiales y Métodos

7.1. Sitio de estudio y muestreo

El sistema de tubo de lava de Chimalacatepec se encuentra al sur del volcán Suchiooc, en la Sierra del Chichinautzin, cerca del pueblo de San Juan Tlacotenco, Morelos, México. El muestreo se llevó a cabo cerca de la cueva de Itzaxiatla en noviembre de 2015, en un día lluvioso. En el sitio se tomaron fotografías para registrar los estromatolitos terrestres y describirlos; así como para denotar sus relaciones con los tapetes microbianos.

Una vez documentados, se tomaron muestras de los tapetes y estromatolitos (grosor de ~ 1.5 cm). El muestreo se realizó con material estéril (tubos, espátula) y guantes para evitar su contaminación. Los espeleotemas (~ 2 g) se almacenaron en tubos Falcon estériles de 15 mL, mientras que los tapetes microbianos se recogieron en tubos tipo Eppendorf de ~ 1.5 mL (Fig. 2). Las muestras se cubrieron para evitar el traspaso de la luz, y se mantuvieron a 4°C durante su traslado al laboratorio, donde finalmente se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Paralelamente, se tomaron muestras de los estromatolitos para la caracterización elemental.

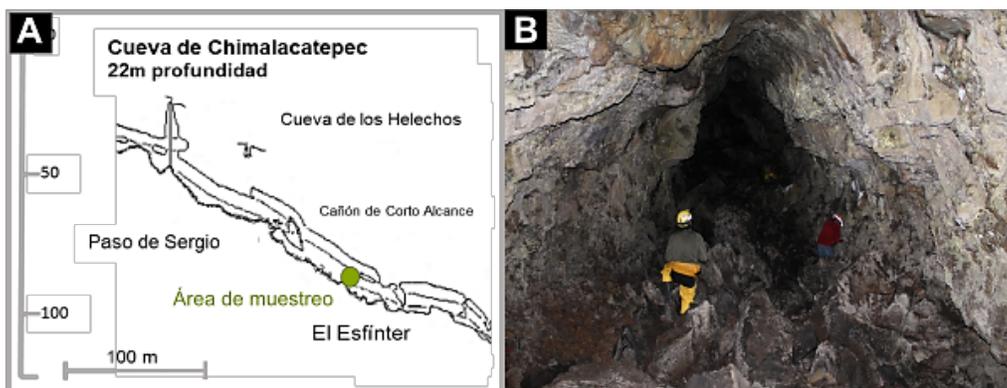


Figura 2. Muestreo. A. Sitio de muestreo. B. Vista del tubo de lava.

7.2. Caracterización elemental de los estromatolitos terrestres y agua de goteo

Para comprender mejor la composición química de los estromatolitos, se realizó una caracterización de su superficie mediante Microscopía Electrónica de Barrido con detector de Espectroscopía de Dispersión de Energía (SEM-EDS), y una caracterización elemental total mediante Plasma de Acoplamiento Inductivo y detector de Espectrometría de Emisión Óptica (ICP-OES). Para la microscopía SEM-EDS las muestras fueron secadas a punto crítico y luego

analizadas en un JEOL JSM-6510LV, con voltaje de aceleración de 1 a 30 kV, y filamento de tungsteno, y un EDS 300,000x marca OXFORD, con una resolución de 137 eV. Las muestras fueron analizadas bajo dos tratamientos: sin moler (para observar la estructura superficial), y molidas (para ver la estructura interna).

Para el análisis ICP-OES, 0.5 g de muestra se digirieron con HNO₃ concentrado (9 mL, JT. Baker Instra 69-70%) y HCl (3 mL, JT Baker Instra 36.5-38%); en un horno Anton Paar Multiwave 3000. Las muestras digeridas fueron filtradas y llevadas a un volumen final de 50 mL con agua Milli Q; y analizadas en un equipo Perkin Elmer ICP-OES Optima 8300 empleando Ytrio como estándar interno. Así mismo se determinó el porcentaje de C total, C orgánico, C inorgánico y N total en submuestras de los dos estromatolitos terrestres, en donde se utilizó un analizador elemental CHNS/O Perkin Elmer 24000 series II en modo CHN. Cabe destacar que el C orgánico se determinó destruyendo previamente los carbonatos con HCl 5N.

También se tomaron seis muestras de agua de goteo a lo largo del tubo de lava. Se determinó pH y conductividad eléctrica mediante las sondas HI 9125 y HI 9033, respectivamente. Las muestras se filtraron *in situ* mediante membranas de 0.45 µm y se transportaron y guardaron a 4 °C hasta su análisis. Se determinó los iones mayoritarios mediante cromatografía de iones Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, HCO⁻, Cl⁻, NH₄⁺ and NO₃⁻ (Zamora Martínez et al., 2016) y el sílice disuelto mediante ICP-OES.

7.3. Extracción y cuantificación de DNA

Para determinar la estructura y la diversidad microbiana de los tapetes microbianos y estromatolitos terrestres, se extrajo DNA metagenómico a partir de ~0.25 g (en peso húmedo). Para ello, se siguió el protocolo dado por el kit de extracción DNeasy PowerSoil Kit (MoBio Laboratories, Inc; ahora Qiagen). El DNA obtenido se eluyó en 30 µL de la solución C6 del kit (10 mM Tris, sin EDTA). Una vez obtenido el DNA se cuantificó con el equipo Qubit Fluorometric Quantitation (ThermoFisher Scientific) empleando el ensayo Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific). El DNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su empleo.

7.4. Amplificación y secuenciación de gen 16S rRNA

El protocolo de amplificación se llevó a cabo de acuerdo con lo estipulado con el *Earth Microbiome Project* (Gilbert & Dupont, 2011), para luego ser secuenciado en la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq. Para ello, el DNA metagenómico extraído se empleó como templado para la amplificación de secuencias 16S rRNA con los primers 515F y 806R (Cuadro 5). El primer forward, incluyó una secuencia Golay específica para identificación en el proceso bioinformático (Cuadro 12) (Caporaso et al., 2011; 2012).

Cuadro 5. Secuencias de los primers utilizados para diversidad de Bacteria y Archaea (Caporaso et al., 2011; 2012).

Primer	Secuencia
515 (directo)	5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'
806 (reverso)	5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'

La reacción de PCR fue preparada con 2.5 μ L de buffer 10X Takara ExTaq PCR buffer, 3 μ L de BSA (10 mg/mL), 0.5 μ L desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) a 200 μ M, 0.75 μ L de cada primer (10 μ M), 0.125 U de Taq Polimerasa (TaKara Taq TM, Clontech) y 2 μ L (2-20 ng) de DNA extraído. La reacción se llevó a un volumen final de 25 μ L con H₂O grado molecular. El PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen®MaxyGene TM, en donde se programó el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de elongación a 95 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s y extensión final a 72 °C por 12 min. La presencia y el tamaño del gen fue verificada en un gel de agarosa al 1% (30 mL agua MiliQ, 0.45 g de agarosa (Axygen), 0.6 mL TAE 50X y 3 μ L de SYBR Safe (Invitrogen) visto a través de luz UV. Los amplicones fueron secuenciados en la plataforma Illumina MiSeq de la Universidad de Yale (*Yale Center for Genome Analysis*), Estados Unidos de América. Se logró obtener secuencias de tres muestras de tapetes (T-1, T-2 y T-3), así como de cuatro estromatolitos terrestres (E-1, E-2, E-3 y E-4).

7.5. Análisis de las secuencias 16S rRNA

El análisis de las secuencias 16S rRNA fue llevado a cabo bajo la línea de comandos QIIME2 (<https://qiime2.org>). Las secuencias de extremo pareado (*pair-ended*) fueron primeramente demultiplexadas y visualizadas para su calidad, empleando el complemento ‘q2-demux’ (<https://github.com/qiime2/q2-demux>). Después, las secuencias se unieron y filtraron con DADA2 (Callahan et al., 2016), lo que dio como resultado un total de 439,888 secuencias curadas y verificadas. Estas secuencias fueron colapsadas en variantes de la secuencia del amplicón o ASVs por su nombre en inglés (*Amplicon Sequence Variants*). A partir de estos ASVs, se realizaron los análisis de afiliación taxonómica con el complemento ‘q2-feature-clasificador’ (<https://github.com/qiime2/q2-taxa>). Este clasificador se comparó con una base de datos de Greengenes 13₈, que sólo incluye 250 bases del 16S (región V4, delimitada por el par de primers 515F/806R) (gg-13-8-99-515-809-nb-calssifier-qza). Las tablas de abundancia a diferentes niveles taxonómicos (dominio, filo, clase, orden, género y especie), fueron transformadas a abundancia relativa para posteriormente analizarse en gráficos de barra.

7.6. Análisis de diversidad y comparación con otros tubos de lava

Los análisis de diversidad estuvieron disponibles a través del complemento (‘q2-diversity’) de QIIME2, a una profundidad de muestreo de 23,000. A partir de ésta se realizó una curva de rarefacción para verificar el esfuerzo de muestreo. El análisis de la diversidad alfa de las comunidades bacterianas se calculó con los índices de Chao1, Simpson y Shannon, los cuales fueron estimados a través de una línea comandos de QIIME2. Para su visualización se utilizó la librería ‘phyloseq’ (<https://joey711.github.io/phyloseq/>) en la plataforma R (R Development CoreTeam 2011).

Para comparar la distribución geográfica de la diversidad microbiana encontrada en el sistema de Chimalacatepec, con tubos de lava de diferentes regiones del mundo, se realizó una revisión bibliográfica de estudios previos. Adicionalmente, se descargaron del NCBI las secuencias 16S rRNA previamente reportadas (Cuadro 6). Éstas fueron agrupadas según su lugar de origen, y analizadas mediante la línea de comandos de Mothur (Schloss et al., 2009). Las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas operaciones u OTUs (*Operational Taxonomic Units*) al 3% de distancia (97% identidad), y se computaron aquellas compartidas y no

compartidas. Los resultados se visualizaron en diagramas de Venn realizados con el mismo software. Los grupos creados para la comparación se encuentran especificados en el Cuadro 6. Las secuencias utilizadas se encuentran en el cuadro A1 (Anexo).

Cuadro 6. Especificaciones de los grupos con los que se llevó a cabo la comparación de la distribución de la diversidad bacteriana en tubos de lava

Grupo	Región	Referencia
A	Hawai'i, Estados Unidos de América	Hathaway et al., 2014
C	Isla Terceira, Portugal	Northup, no publicado
D	Pico de Azores, Portugal	Riquelme et al., 2015
E	Chimalacatepec, Morelos, México	Este estudio

7.7. Análisis *in silico* de la diversidad funcional

Para hacer el análisis de la diversidad funcional de las comunidades bacterianas del tubo de lava en estudio, se realizó primeramente un estudio *in silico* para hacer predicciones funcionales de empleando las abundancias de los ASVs encontrados y su taxonomía. Para ello se empleó el paquete abierto Tax4Fun (Aßhaue et al., 2015) en R. este programa implementa la aproximación de MoP-Pro usada para secuenciación tipo *shotgun* (Aßhauer & Meinicke, 2013). El perfil taxonómico se computa a través de Taxy-Pro (Klingenberg et al., 2013) y perfiles metabólicos de la base de datos KEGG (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa et al., 2014). De este perfil, se seleccionaron las enzimas claves en procesos del ciclo del C y el N, incluyendo fijación, nitrificación, oxidación y generación de metano.

7.8. Análisis de la diversidad funcional mediante PCR

El potencial genético de las comunidades bacterianas del tubo de lava también fue evaluado con diversas amplificaciones de DNA mediante PCR, empleando el DNA metagenómico extraído de tapetes y estromatolitos. Así, se determinó de manera cualitativa la presencia de algunos genes que están involucrados con los ciclos biogeoquímicos de N y C. Los primers empleados se encuentran descritos en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Primers utilizados para el análisis funcional en metabolismo del C y N.

Gen	Secuencia 5' → 3'	pb*	Ta* (°C)	Referencia	
<i>ccbL</i> , subunidad mayor de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa forma IC (fijación de C, ruta CCB)					
ccbLR1F	GAACATCAAAYTCKCAGCCCTT	~818	57	Alfreider et al., 2003	
ccbLR1R	TGGTGCATCTGVCCGGCRTG			Alfreider et al., 2003	
<i>hcd</i> , 4-hidroxitubiril-CoA deshidratasa (fijación de C, ruta HP/HB)					
hcd-465F	GGHGGTGCWATGACTGA	~840	53	Offre et al., 2011	
hcd-1267R	CTCATTCTGTTTTCHACATC			Offre et al., 2011	
<i>pmoA</i> , subunidad alfa de la metano monooxigenasa (oxidación de metano, quimiolitotrofia) PCR anidado					
A189	GGNGACTGGGACTTCTGG (F1, F2)	~500	PCR1	Holmes et al., 1995	
A682	GAASGCNGAGAAGAASGC (R1)				62
mb661	CCGGMGCAACGTCYTTACC (R2)			PCR2	Costello & Lidstrom, 1999
A650	ACGTCCTTACCGAAGGT (R2)				
<i>mcrA</i> , subunidad alfa de la coenzima M-metil reductasa (metanogénesis)					
ME1	GCMATGCARATHGGWATGTC	~760	50	Hales et al., 1996	
ME2	TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT			Hales et al., 1996	
<i>nifH</i> dinitrogenasa reductasa dependiente de Fe (fijación de nitrógeno)					
IGK3	GCIWHTHTAYGGIAARGGIGGIATHGGIAA	~395	58	Ando et al., 2005	
DVV	ATIGCRAAICCICCRCAIACIACRTC			Ando et al., 2005	
<i>amoA</i> , subunidad alfa de la amonio monooxigenasa (oxidación de amonio por bacterias, quimiolitotrofia)					
amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	~600	56	Rotthauwe et al., 1997	
amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			Rotthauwe et al., 1997	
<i>amoA</i> , subunidad alfa de la amonio monooxigenasa (oxidación de amonio por arqueas, quimiolitotrofia)					
Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	~600	53	Francis et al., 2003	
Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT			Francis et al., 2003	

*pb: pares de bases del amplicón esperado, Ta: Temperatura de alineamiento del primer en el PCR; en el PCR anidado PCR1: primer PCR, primers A189/ A682, PCR2: segundo PCR, primers A189/mb661/A650

La mezcla de PCR (volumen final de 25 µL) contenía: 0.75 µL de primer (10 µM), 3 µL de DNA (2-20 ng), 2.5 µL de buffer de PCR (10X), 0.5 µL de dNTPs (200 µM), 3 µL de BSA (10 mg/mL), 0.75 µL de MgCl₂ (50mM), y 0.2 µL Taq polimerasa (5U/µL) (TaKara Taq TM, Clontech). Las condiciones de PCR para los genes estudiados se encuentran especificadas en el Cuadro 7. Cabe mencionar que la PCR para evaluar *pmoA* fue realizada en un protocolo anidado, como está descrito en Horz y colaboradores (2005), empleando 3 µL del PCR1 como templado para la PCR2.

8. Resultados

8.1. Registro y documentación de tapetes y estromatolitos terrestres

En el tubo de lava del sistema de Chimalacatepec las paredes se encontraban cubiertas de tapetes microbianos de color amarillo y blanco (Fig. 3A), los cuales tenían máximo 1.5 cm de grosor. A un lado de estos tapetes, fue posible observar estromatolitos terrestres planares (Fig. 3B), lo que sugiere que su formación está relacionada con una intervención biológica. Los estromatolitos terrestres con forma de galletas se encontraron en zonas cercanas a los 180° y en grupos (Fig. 3C). Estas estructuras miden entre 10-12 cm y tienen una textura porosa en el centro. Es importante mencionar que en su superficie presentan brotes de microestromatolitos y bordes aserrados (Fig. 3D).

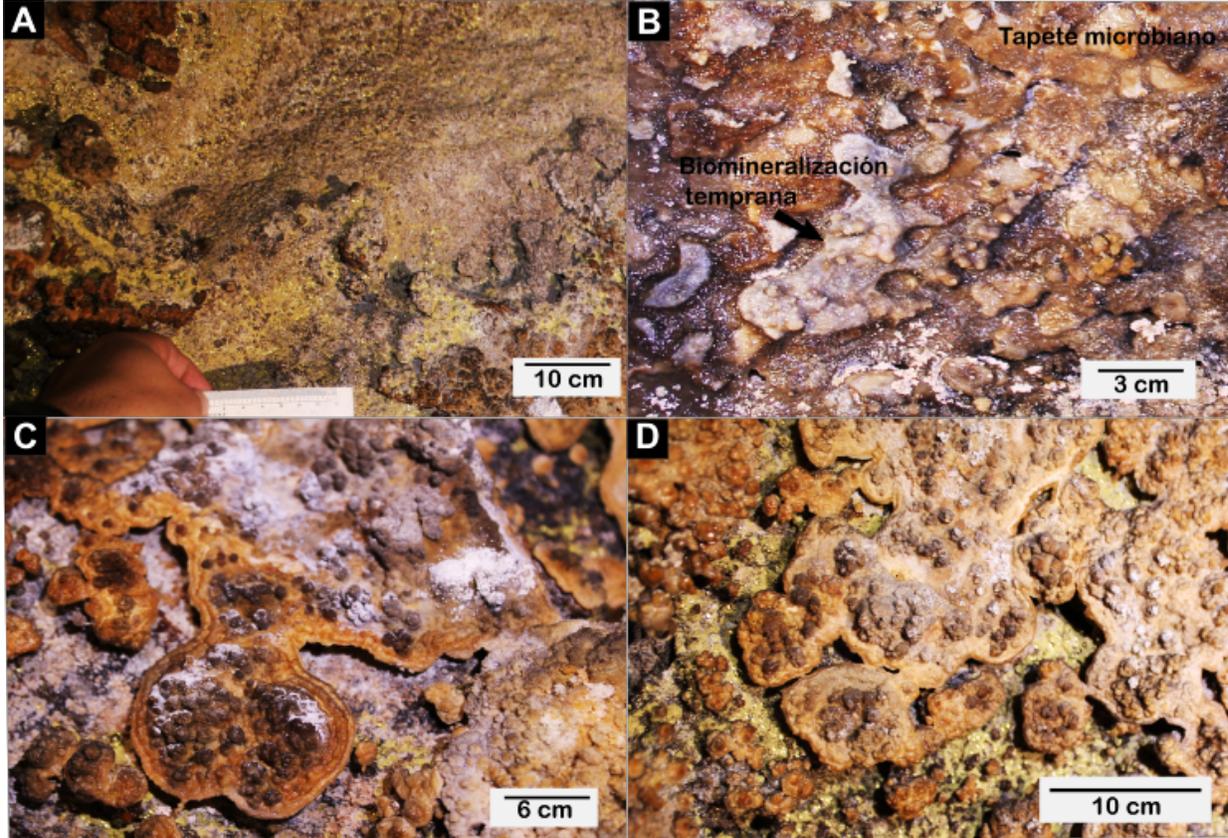


Figura 3. Tapetes microbianos y estromatolitos terrestres del tubo de lava del sistema de Chimalacatepec. A. Tapete microbiano en la pared de la cueva. B. Indicios de biomineralización temprana en tapete microbiano. C. Estromatolito terrestre planar. D. Conjunto de estromatolitos terrestres en pared del tubo de lava.

8.1.1. *Análisis microscópico y elemental de los estromatolitos terrestres*

Se realizó un análisis petrográfico para confirmar la naturaleza estromatolítica de las muestras tomadas en el tubo de lava del sistema de Chimalacatepec (Fig. 4). En las imágenes se denota la naturaleza laminada donde se intercalan capas de opal-A (sílice) y carbonatos (en rojo, por la tinción con azurina).

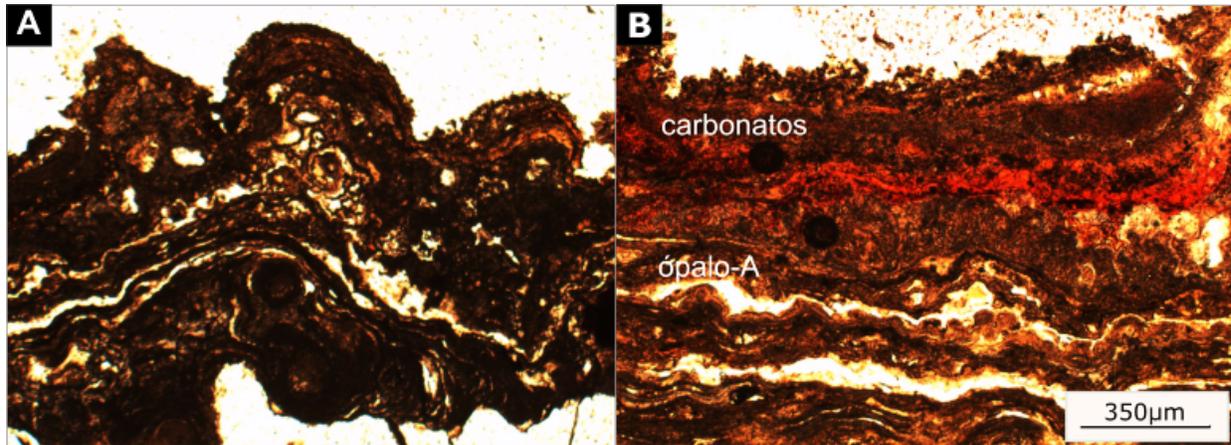


Figura 4. Petrografía de estromatolitos de sílice del tubo de lava del sistema de Chimalacatepec. A. Petrografía sin tinción. B. Petrografía con tinción.

El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de dispersión de energía de rayos X (EDS) se llevó a cabo en dos estromatolitos terrestres (1 y 2). Dicho análisis se realizó en muestras molidas, para ver al interior de la estructura; y sin moler, para ver la estructura intacta (Fig. 5). Las microscopías mostraron que, aparentemente, la superficie de los estromatolitos terrestres no cuenta la presencia de biomorfos, y tiene una capa superficial formada principalmente de opal-A (Fig. 5A-B). Mientras que, en las muestras molidas hay presencia de cocoides (Fig. 5B-C) que posiblemente corresponden a organismos procariontes.

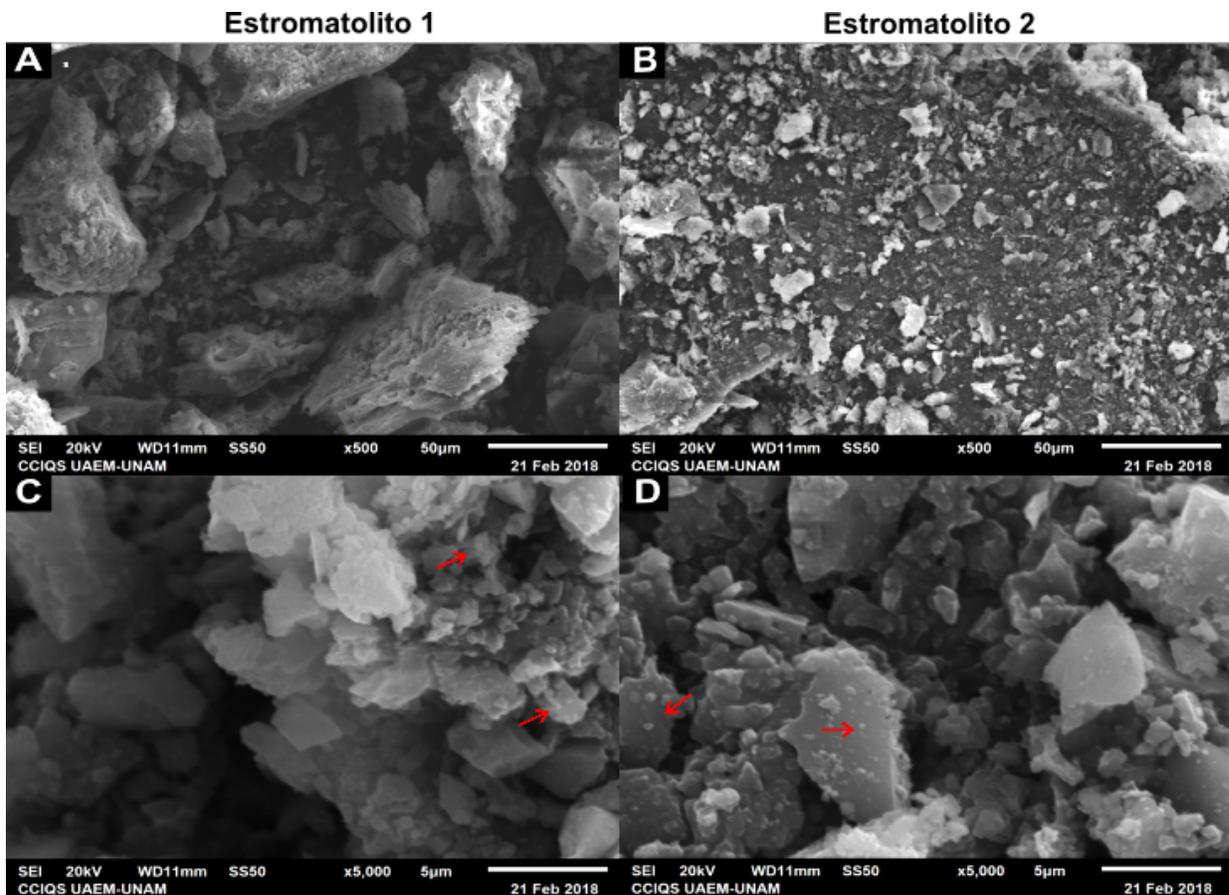


Figura 5. Microscopías SEM de los estromatolitos terrestres del tubo de lava del sistema Chimalacatepec. A y B, muestras sin moler. C y D, muestras molidas. Las flechas rojas muestran la presencia de cocoides.

A la par de la microscopía, se realizaron análisis elementales por EDS (Fig. 6). Los espectros de ambos estromatolitos, sin moler y molidos, muestran que los elementos con mayor dominancia son Si, C, O y Mg, y en menor medida se detectó también Ca.

Figura 6. Microscopías y análisis EDS de dos estromatolitos terrestres planares del tubo de lava del sistema Chimalacatepec. A-B. Estromatolito1 sin moler y molido, respectivamente. C-D. Estromatolito2 sin moler y molido, respectivamente.

Los análisis sugieren que los elementos encontrados están principalmente en forma de dióxido de silicio (SiO₂), wollastonita (CaSiO₃), óxido de magnesio (MgO) y carbonato de calcio (CaCO₃) (Cuadro 8). Sin embargo, la composición porcentual varía entre cada estromatolito y las modalidades en las que éstos se encuentran, ya que cuando las muestras se muelen, se detectan más compuestos al interior.

Cuadro 8. Ausencia o presencia de los minerales encontrados en los estromatolitos terrestres de acuerdo al análisis EDS.

Compuesto	Estromatolito1		Estromatolito2	
	Sin moler	Molida	Sin moler	molida
SiO ₂	×	×	×	×
CaSiO ₃	×	×		×
MgO		×	×	×
CaCO ₃			×	×

El análisis por ICP-OES –donde la muestra fue digerida totalmente en ácido para solubilizar los elementos–, mostró que el Mg es uno de los principales componentes (13 g/kg), seguido del calcio (12.6 g/kg). También el Al, Si, K, S, Na, Fe y P aparecen con 163-300 mg/kg. Esto sugiere que al interior del estromatolito hay más compuestos minerales con elementos propios de los sistemas volcánicos, los cuales pueden estar en minerales amorfos, y no son detectables por EDS.

Cuadro 9. Composición elemental de un estromatolito terrestre por ICP-OES (en mg/kg)

Mg	Ca	Al	Si	K	S	Na	Fe	P	Sr	V
13077	12600	298.4	267.6	232.2	203.8	199.1	182.4	163.3	45.5	37.9
Cu	Ti	Zn	Li	Cr	Mn	Ni	Ba	Pb	Co	As
34.7	11.9	8.02	7.59	7.44	5.55	3.44	3.27	1.31	0.32	<LOD*

*<LOD debajo del límite de detección, otros no detectados fueron Cd, Mo, Sb, Se, Sn y Tl.

Adicionalmente, se determinó la concentración de C total, C orgánico, C inorgánico y N total en dos estromatolitos terrestres (Cuadro 10). El análisis arrojó una mayor concentración para el C orgánico con respecto al C inorgánico.

Cuadro 10. Determinación de C y N en dos estromatolitos terrestres.

Muestra	C total (g/kg)	C orgánico (g/kg)	C inorgánico (g/kg)	N total (g/kg)
Estromatolito1	13.1	11.85	1.25	2.25
Estromatolito2	14.7	12.70	2.00	2.65

La química del agua de goteo, sugiere que ésta tiene una naturaleza circumneutral y pocas sales disueltas, debido a una conductividad de $\sim 40 \mu\text{S}/\text{cm}$. Las sales disueltas incluyeron Ca^{2+} y Mg^{2+} , así como Si (Cuadro 11).

Cuadro 11. Características fisicoquímicas del agua de goteo del tubo de lava del sistema de Chimalacatepec.

Muestra	pH	CE* $\mu\text{S}/\text{cm}$	mg/L								
			Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	NH_4^+	NO_3^-	SO_4^{2-}	Si
W1	6.93	41	3.24	1.29	1.26	1.23	1.48	<LOD*	0.88	5.08	15.0
W2	7.25	33.1	2.88	1.38	1.62	1.12	0.85	<LOD	<LOD	6.34	13.1
W3	7.00	37	3.82	1.49	1.74	0.94	0.96	<LOD	<LOD	1.80	17.0
W4	6.30	41	3.02	1.24	2.97	1.33	0.31	<LOD	<LOD	2.00	16.3
W5	6.10	40	3.28	2.18	2.31	0.86	1.16	<LOD	<LOD	2.81	15.1
W6	7.05	32	4.21	0.93	1.67	0.90	1.01	<LOD	<LOD	3.29	23.7

*CE, conductividad eléctrica; <LOD debajo del límite de detección.

8.1.2. Detección de estructuras biomórficas en estromatolitos terrestres de opal-A

El análisis de microscopía electrónica de barrido que se llevó a cabo en los estromatolitos terrestres mostró diversas estructuras derivadas asociadas a organismos procarióticos. Entre éstas se destacó la presencia de filamentos bacterianos (Fig. 7A), sustancias poliméricas extracelulares (*EPS* por sus siglas en inglés) mineralizadas con nanoesferas de opal-A (Fig. 7B) y cocoides (Fig. 7C y D). Además, es posible observar nanoesferas de opal-A (Fig. 7C) y una laminación marcada en los estromatolitos (Fig. 7D).

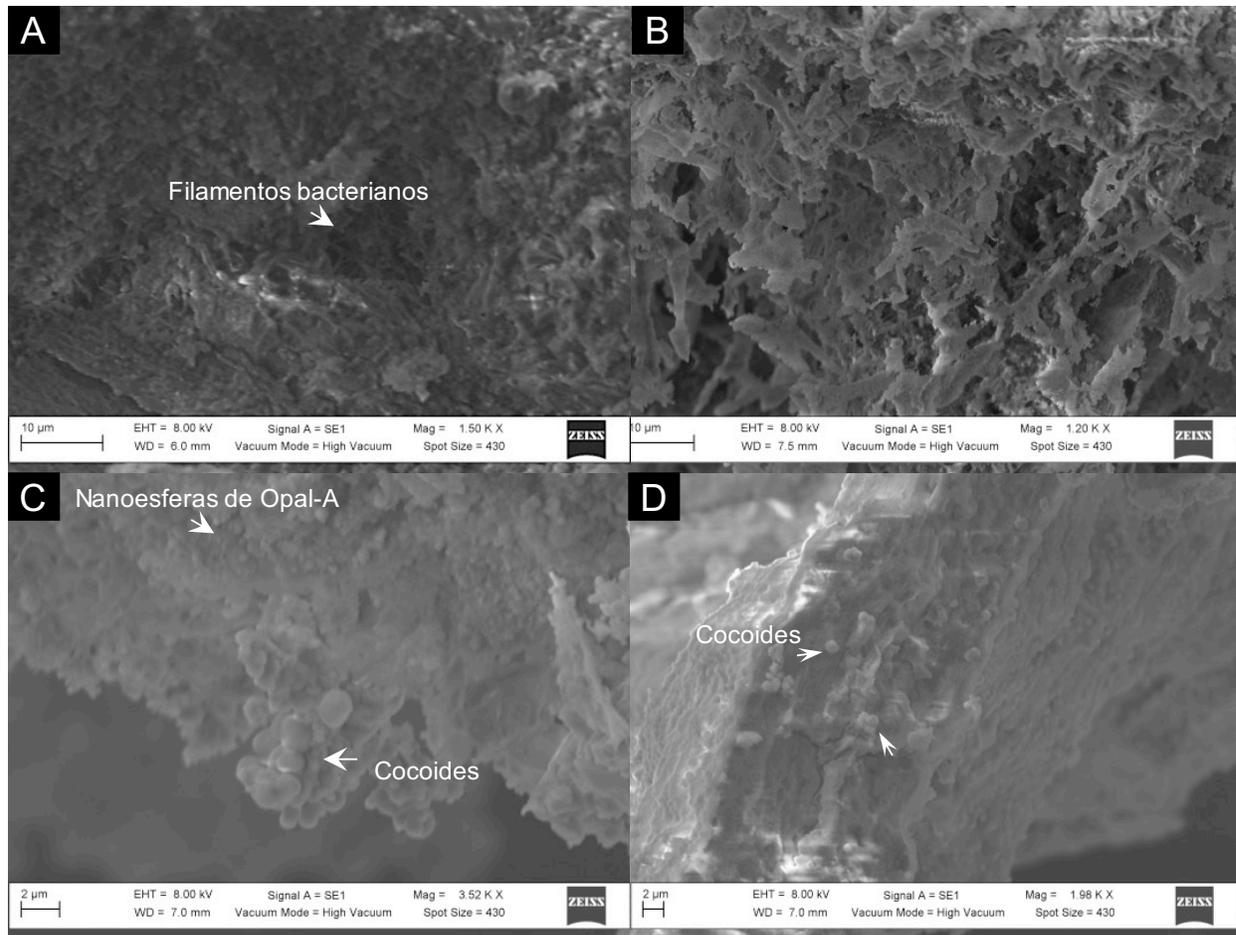


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido realizada en un estromatolito terrestre en donde se muestran estructuras biomórficas

8.2. Análisis de las secuencias 16S rRNA

En este estudio se obtuvieron un total de 811,652 secuencias de la región hipervariable V4 16S rRNA (~290 pb) de los dominios Bacteria y Archaea (Cuadro 12). Tras el filtrado de las secuencias –que implicó la remoción de secuencias de baja calidad y quimeras–, se recuperaron 417,386 secuencias (~54% de eficiencia). De estas secuencias filtradas, el 51% perteneció a los tapetes microbianos, y el resto a los estromatolitos terrestres del tubo del sistema Chimalacatepec. Asimismo, estas secuencias fueron agrupadas en un total de 3,095 variantes de la secuencia del amplicón o ASVs por su nombre en inglés (*Amplicon Sequence Variants*), de las cuales 724–1107 se encontraron en los tapetes, y 379–778 en los estromatolitos.

Cuadro 12. Número de secuencias obtenidas, filtradas y variantes de las secuencias de amplicón (ASVs) obtenidas de tapetes microbianos y estromatolitos en este estudio.

Muestra	Id	Secuencia identificadora Golay	No. de secuencias obtenidas	No. de secuencias filtradas	ASVs encontrados
<i>Tapetes microbianos</i>					
Tapete1	T-1	TACACGATC	171 409	95 747	1025
Tapete2	T-2	TATCGTTGA	157 079	90 211	1107
Tapete3	T-3	GTTGGTCAA	97 182	52 706	724
Total			425 670	238 664	
<i>Estromatolitos terrestres</i>					
Estromatolito1	E-1	CACGCCATA	88 428	40 833	506
Estromatolito2	E-2	AGGCTACAC	65 504	23 890	379
Estromatolito3	E-3	TCCTCTGTC	101 793	53 961	646
Estromatolito4	E-4	ACGTGTACC	130 257	60 038	778
Total			385 982	191 328	
TOTAL			811 652	417 386	

8.2.1. Rarefacción y diversidad del 16S rRNA de bacterias y arqueas

Respecto a la profundidad del muestreo, se realizó un análisis de rarefacción considerando el número mínimo de secuencias filtradas (*i.e.*, 23,000). La curva de rarefacción mostró que el esfuerzo de muestreo fue adecuado considerando los ASVs observados. Ya que las curvas de rarefacción de las muestras de los tapetes microbianos y los estromatolitos terrestres se aproximan a la asíntota al corte del muestreo de 23,000 secuencias (Fig. 8).

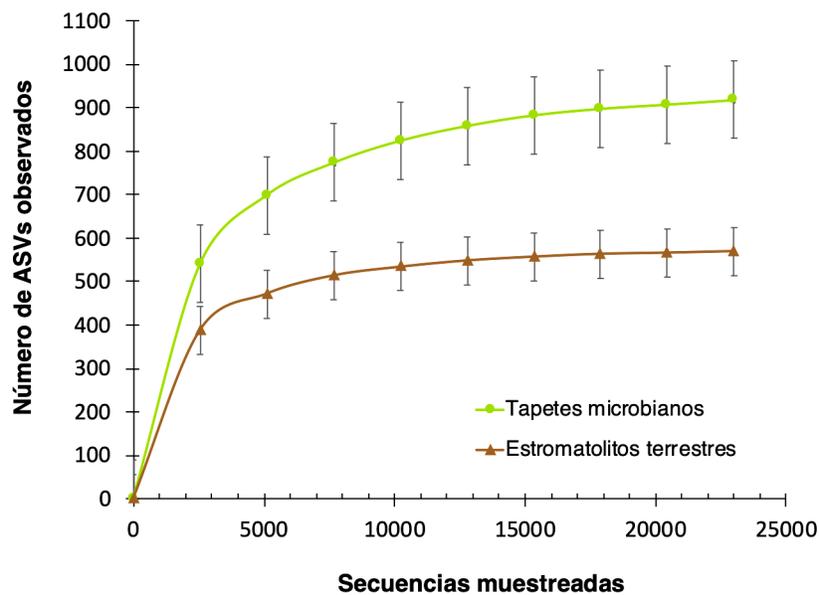


Figura 8. Curva de rarefacción del número de ASVs observados con diferentes esfuerzos de muestreo.

La diversidad α de las comunidades bacterianas fue estimada con los índices de Chao1, Shannon y Simpson para todas las muestras (Fig. 9). El índice de Chao mostró que el Tapete1 y Tapete2 tienen mayor riqueza, que el Tapete3 y los estromatolitos terrestres (E1-4). Mientras que, el índice de diversidad de Shannon tuvo valores similares que no muestran una tendencia entre el tipo de muestra, *i.e.*, tapetes microbianos (4.91-4.60) y estromatolitos terrestres (4.52-4.94). Para el índice de Simpson se observó algo similar, ya que las muestras oscilaron entre 9.40 y 9.89, lo que sugiere que hay similitud de las comunidades, ponderando las especies dominantes de un sitio.

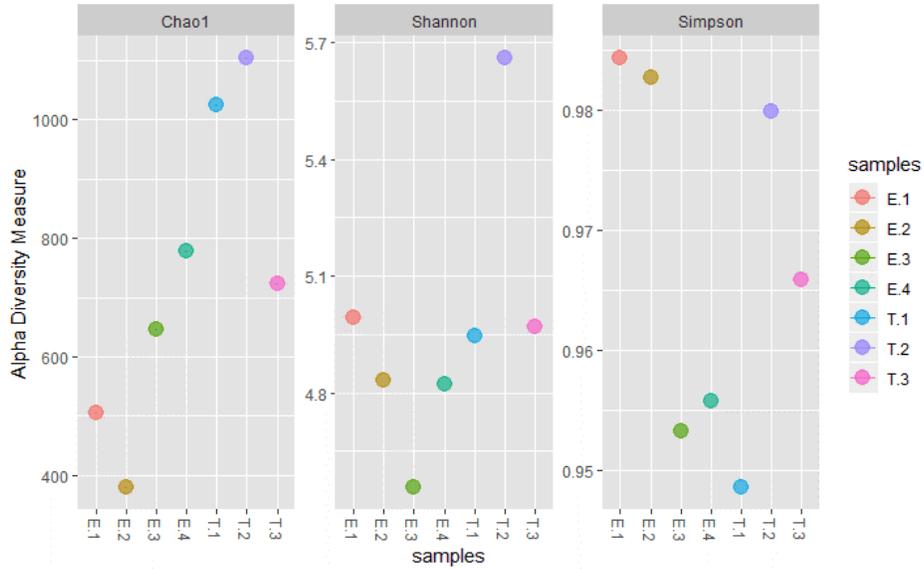


Figura 9. Índices de diversidad α de los tapetes microbianos y estromatolitos estudiados.

8.2.2. Afiliación filogenética de las secuencias 16S rRNA

Los ASVs fueron clasificados taxonómicamente a nivel dominio, filo, clase, orden, familia, género y especie mediante la base de datos de GreenGenes. La mayoría de las secuencias (>70%) pudieron ser clasificadas hasta nivel orden; sin embargo, no pudieron ser clasificadas a niveles inferiores (v.g., género y especie) (Fig. 10). Esto sugiere que los tapetes microbianos y los estromatolitos terrestres del tubo de lava del sistema de Chimalacatepec, cuenta con un gran número de microorganismos procarionticos aún no reportados en las bases de datos.

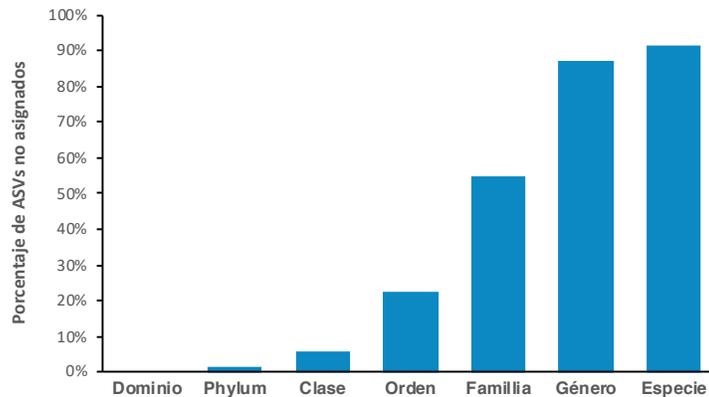


Figura 10. Porcentajes de ASVs de tapetes microbianos y estromatolitos terrestres de un tubo de lava del sistema Chimalacatepec no asignados con la base de datos de GreenGenes.

A nivel de dominio, se observó una mayor abundancia relativa de Bacteria que de Archaea. Bacteria representó >92% de las secuencias 16S rRNA en todas las muestras, mientras que Archaea obtuvo una abundancia <7% (Fig. 11). En Archaea se detectaron los filas Crenarchaeota/Thaumarchaeota, Parvachaeota y Euryarchaeota, en donde el primero tuvo mayor abundancia en todas las muestras (1.4–6.7%), en especial en los tapetes microbianos.

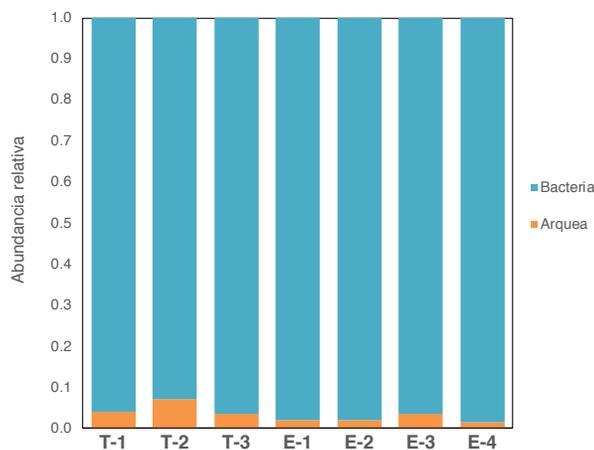


Figura 11. Abundancia relativa 16S rRNA de Bacteria y Archaea en los tapetes microbianos y estromatolitos terrestres analizados.

En Bacteria, se encontraron los siguientes filas en todas las muestras: Acidobacteria, Actinobacteria, Chloflexi, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Firmicutes y WS3; en donde Proteobacteria presentó la mayor abundancia (Fig. 12-A). Cabe destacar que a pesar de que los grupos mencionados están presentes en todas las muestras, es posible observar diferencias en la abundancia relativa de éstos entre los tapetes y estromatolitos terrestres.

Proteobacteria fue el filo con mayor abundancia en los tapetes microbianos. Mientras que, Actinobacteria y Firmicutes tuvieron mayor presencia en los estromatolitos terrestres. A nivel de clase se registró la presencia de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Anaerolineae, Actinobacteria, Thermoleophila, Acidimicrobiia, Nitriliruptoria, Chloroacidobacteria, Acidobacter-6 y Nitrospira en todas las muestras (Fig. 12-B). La clase Gammaproteobacteria fue dominante en todas las muestras; sin embargo, presentó una mayor abundancia en las muestras de los tapetes microbianos. En cambio, el grupo Actinobacteria fue mayor en los estromatolitos terrestres.

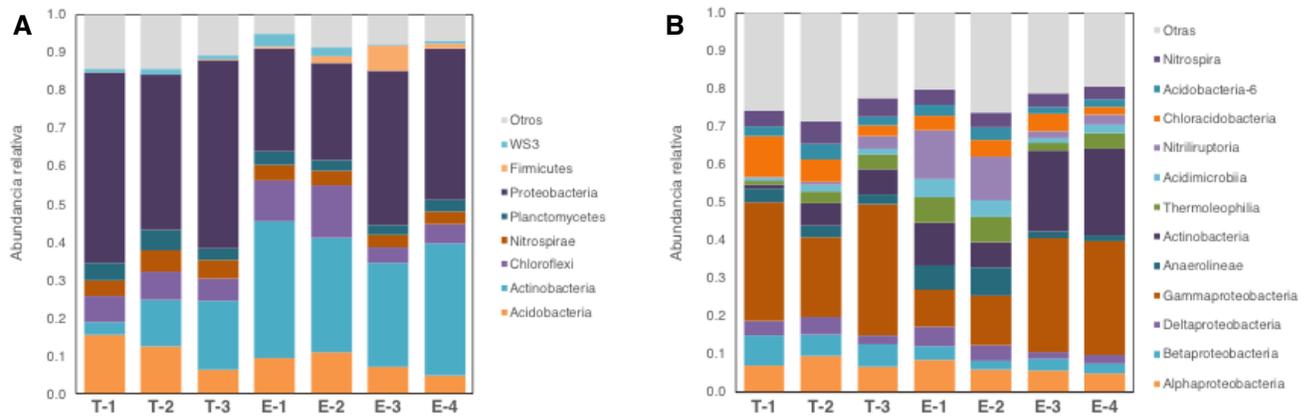


Figura 12. Abundancia relativa 16S rRNA de tapetes microbianos y estromatolitos terrestres a nivel Filo (A) y Clase (B).

Entre los grupos y los microorganismos con mayor abundancia en los estromatolitos terrestres destacaron principalmente las bacterias del filo Actinobacteria (Cuadro 13). Entre los que se notó la familia Pseudonocardiaceae y *Pseudonocardia* sp., la familia Gaiellaceae y *Euzebya* sp. Asimismo, se notaron Firmicutes como *Paenibacillus* sp.

Cuadro 13. Bacterias relevantes encontradas en los tubos de lava

Grupo taxonómico	Abundancia promedio (%)	
	Tapetes microbianos	Estromatolitos terrestres
Actinobacteria	11.3	32.2
Pseudonocardiaceae	3.06	10.06
<i>Pseudonocardia</i> sp.	0.85	2.01
Gaiellaceae	0.01	5.26
Streptomycetaceae	0.07	1.83
Euzebyales	1.48	7.17
<i>Euzebya</i> sp.	1.48	7.17
Firmicutes	0.1	2.5
<i>Paenibacillus</i> sp.	0.02	1.29
Alphaproteobacteria	7.84	6.38
Rhizobiales	5.59	3.33
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	2.47	0.82

8.3. Comparación de la diversidad microbiana entre tubos de lava de diferentes partes del mundo

Se comparó la diversidad procariótica encontrada en este estudio con tubos de diferentes regiones del mundo como Hawai'i, Estados Unidos de América (Hathaway et al., 2014a); Isla Terceira, Portugal (Northup, no publicado); y Pico de Azores, Portugal (Riquelme et al., 2015). En el diagrama de Venn computado se observó que las cuatro regiones se comparten 67 OTUs (Fig. 13). Sin embargo, gran parte de las secuencias reportadas para cada uno de los tubos de lava son únicas a su sistema de origen. Por ejemplo, Hawai'i cuenta con 48% OTUs únicos (234/485); Isla Terceira, 41% (198/481); Pico de Azores, 33% (100/300) y Chimalacatepec, 90% (3056/3388).

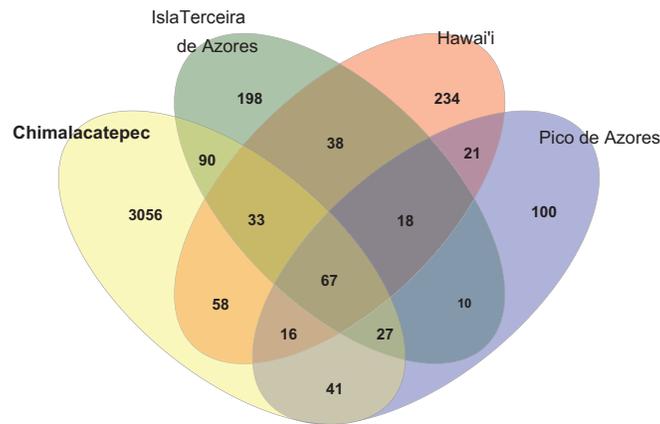


Figura 13. Diagrama de Venn de los OTUs compartidos en tubos de lava de diferentes regiones del mundo. Los OTUs fueron definidos a un 97% de identidad nucleotídica.

8.4. Análisis de la diversidad funcional de las comunidades procarióticas del tubo de lava del sistema Chimalacatepec

Se realizó un estudio *in silico* para explorar la diversidad funcional de las comunidades procarióticas del tubo de lava de Chimalacatepec basados en las secuencias 16S rRNA y su abundancia relativa. La abundancia relativa de las enzimas detectadas sugiere que los tapetes microbianos y los estromatolitos terrestres cuentan con la capacidad de fijar C mediante el ciclo de Calvin-Benson-Bassam a través de la enzima RubisCO y la ruta 3-hidroxiacetil-CoA/4-hidroxiacetil-CoA a través de la enzima 4-hidroxiacetil-CoA carboxilasa (*hcd*) (Fig. 14). Mientras que, los procesos de metanogénesis (ME- α) y metanotrofia (MMO- α) se encuentran en menores proporciones, pero están presentes, en especial la metanotrofia.

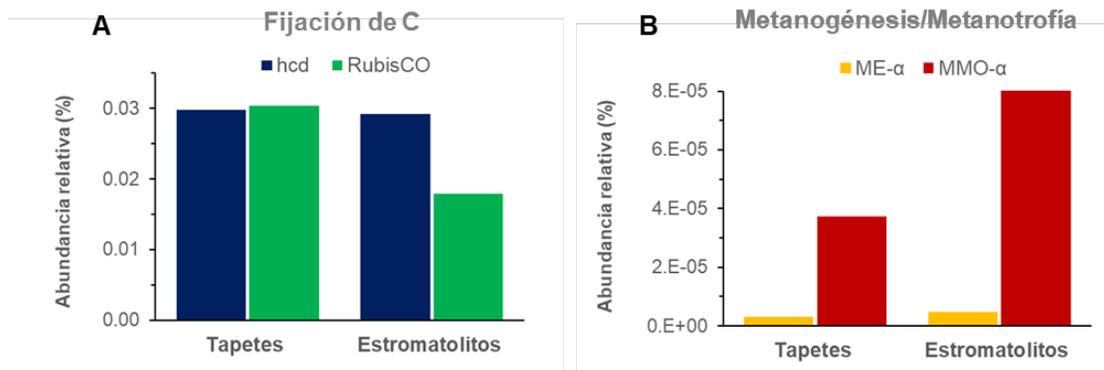


Figura 14. Abundancia relativa predicha por Tax4Fun para la fijación de C (A) y la metanogénesis/metanotrofia (B) en tapetes microbianos y estromatolitos.

Respecto al N, se detectó un alto potencial para la fijación de N (*nifH*) tanto en tapetes microbianos como en estromatolitos terrestres, mientras que el primer paso de la nitrificación (AMO- α) tuvo menor proporción, pero estuvo presente (Fig. 15).

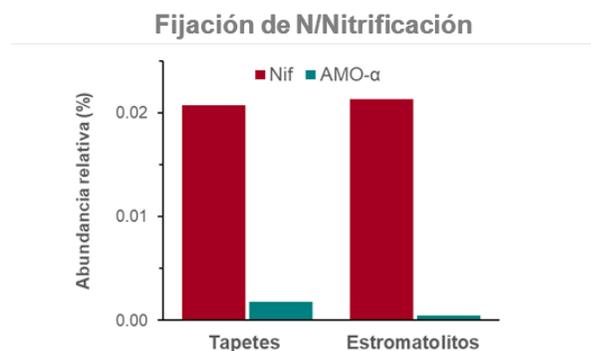


Figura 15. Abundancia relativa predicha por Tax4Fun para la fijación de N y la nitrificación.

Para comprobar estas predicciones, se realizaron reacciones de PCR empleando oligonucleótidos iniciadores (*primers*) específicos para detectar los genes codificantes para i) la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, *cbbL*; ii) la 4-hidroxitiril-CoA deshidratasa, *hcd*; iii) la subunidad α de la metano monooxigenasa, *pmoA*; vi) la subunidad α de la coenzima M-metil reductasa, *mcrA*; v) la subunidad alfa de la amonio monooxigenasa, *amoA* y vi) la nitrogenasa dependiente de Fe, *nifH*. El rastreo de los genes funcionales arrojó un resultado positivo para los genes *cbbL* (Fig.16-A), *pmoA* (Fig.16-B), *nifH* (Fig. 16-C) y *amoA* para Archaea (Fig. 16-D).

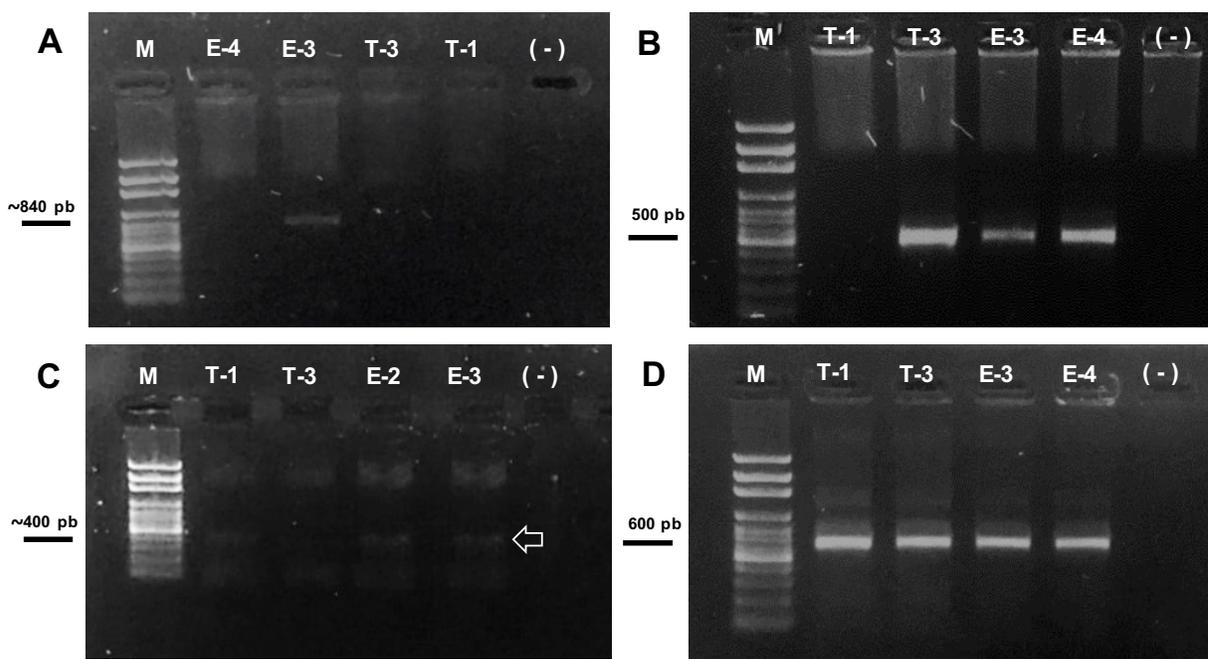


Figura 16. Resultados obtenidos a partir de las PCR. A. Fijación de carbono, *cbbLR*. B. Metanotrofia, *pmoA*. C. Fijación de nitrógeno, *nifH*. D. Nitrificación, *amoA* para Archaea.

9. Discusión

9.1. Microscopías y análisis elemental de los estromatolitos terrestres

El análisis petrográfico denotó láminas de opal-A y carbonatos intercaladas, de manera que la formación estromatolítica de estas estructuras está dada por periodos, en donde el ambiente y la actividad microbiana pueden modificar las tasas de acreción (Fig. 4). Algunas investigaciones han reportado que el recambio en las comunidades procariontes está involucrada en este tipo de formación cíclica laminada (Seong-Joo et al., 2000); sin embargo, también puede estar dada por factores ambientales como la disponibilidad de agua.

Las microscopías por EDS mostraron la presencia de compuestos típicos en este tipo de estructuras, tales como SiO_2 , MgO y CaSiO_3 y CaCO_3 . Los primeros dos compuestos son parte de las rocas máficas (Rogers, 2015) y la wollastonita se forma bajo condiciones de alta temperatura (Ibañez & Sandoval, 1993; Watters, 1995). La formación de calcita y otros carbonatos está influenciada por la actividad metabólica de los procariontes del sistema (Banks et al., 2010). Asimismo, los estudios de ICP-OES indicaron la presencia de otros elementos en los estromatolitos tales como el Al, K, S y Na. Estos elementos también son parte del magma (Rogers, 2015) y algunos se encontraron en el agua de goteo de la cueva. La razón por la que no se notaron en SEM-EDS, es porque probablemente se encuentren adsorbidos o en minerales amorfos.

La química de agua indicó una alta concentración de Si en todas las muestras. En la muestra que fue tomada del goteo de un tapete microbiano (W2) se registró la menor cantidad de Si (13.1 mg/kg). Esto puede deberse a la capacidad de adsorción del EPS, donde se retiene la sílice disuelta. La matriz del EPS saturada en Si funciona después como sitio de nucleación para la deposición (Konahuser et al., 2001), formando filamentos y EPS silicificados que se encuentran en la microscopía por SEM (Fig. 7B). Asimismo, las microscopías realizadas por SEM (Fig. 7) también mostraron una amplia distribución de estructuras biomórficas en los estromatolitos terrestres parecidas a las reportadas en otros estudios (Northup et al., 2011; Riquelme et al., 2015; López-Martínez et al., 2016), esto es indicador de la asociación entre los microorganismos y la deposición de sílice.

9.2. Rarefacción y diversidad del 16S rRNA de bacterias y arqueas

En este estudio, se observó que el esfuerzo de secuenciación para determinar la diversidad 16S rRNA fue suficiente, dado que las curvas de rarefacción para ambas muestras se aproximaron a la asíntota al mínimo de secuencias obtenidas, *i.e.*, 23,000 (Magurran, 2004). Esto implica que, en este estudio se colectó la mayoría de los organismos procariontes en los tapetes microbianos y estromatolitos del sistema de tubo de lava de Chimalacatepec. El índice de Chao1 estimó que, en general, hay mayor riqueza en las de los tapetes microbianos que en los estromatolitos terrestres. Sin embargo, los índices de Shannon y Simpson calculados mostraron valores altos para ambos. Tanto el índice de Shannon como el de Simpson aumentan en función de la riqueza y de la equitatividad (Magurran, 2004). Esto quiere decir que el número de especies y el número de individuos por especie de los tapetes microbianos y de los estromatolitos terrestres, es similar. Por ende, los índices calculados muestran que: (i) la diversidad de cada una de las muestras es alta y (ii) no hay una diferencia significativa entre la diversidad de éstas. Estos resultados contradicen la hipótesis de trabajo, donde se pensó que las condiciones de litificación de los estromatolitos reducirían la diversidad procariótica. Sin embargo, la diversidad parece no afectarse de manera significativa en los tapetes y estromatolitos estudiados.

9.3. Afiliación filogenética de las secuencias 16S rRNA

Los grupos encontrados en este estudio concuerdan con los obtenidos en diversos sistemas subterráneos, incluyendo cuevas de origen volcánico (Northup et al., 2011; Hathaway et al., 2014a; Riquelme et al., 2015a, 2015b; Gonzalez-Pimentel et al., 2018) y cuevas tipo *karst* (Quintana et al., 2013; Barton et al., 2014; Zepeda Mendoza et al., 2016). Los grupos dominantes en el sistema de tubo de lava de Chimalacatepec fueron Proteobacteria (46.8%) para los tapetes microbianos y Actinobacteria (30.4%) para los estromatolitos terrestres. Dentro del filo Actinobacteria, los órdenes con mayor abundancia fueron Actinomycetales, Euzebyales, Gaielleales y Acidomicrobiales; siendo Actinomycetales el orden dominante (Fig. 17). Estos resultados son los mismos que reportó Riquelme y sus colaboradores (2015b) en algunos tubos de lava de Hawai'i y del archipiélago de Azores. Esto sugiere que las condiciones ambientales y geoquímicas de los tubos de lava favorecen el desarrollo de microorganismos pertenecientes a estos grupos.

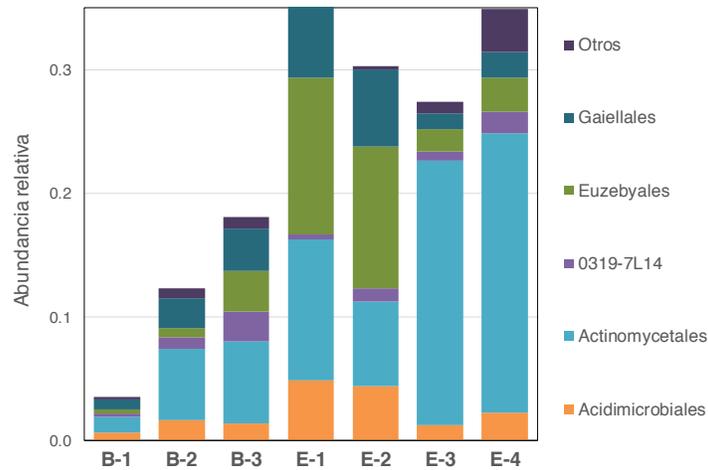


Figura 17. Principales órdenes del filo Actinobacteria.

El filo Actinobacteria fue dominante en los estromatolitos terrestres. La familia Streptomycetaceae y el género de *Pseudonocardia* sp. fueron los grupos con mayor abundancia dentro de este filo. Se ha observado que Actinobacteria se encuentra de manera natural en ambientes considerados extremos, y que es uno de los grupos con mayor impacto en la meteorización de las rocas volcánicas, favoreciendo la disolución de elementos como el Mg, Ca, Si, Fe, Na y K (Cockell et al., 2013). Asimismo, el color amarillo de los tapetes microbianos en los sistemas subterráneos de origen volcánico aún es tema de discusión. Pero algunos estudios sugieren que grupos como Pseudonocardiaceae, Chromatiales y Actinobacteria proporcionan el color mencionado (Porca et al., 2012; Lavoie et al., 2017).

El tubo de lava de Chimalacatepec también cuenta con la presencia de los órdenes Euzebyales y Gaiellales en gran proporción. El primero de éstos ha sido reportado en tubos de lava de Hawai'i (Riquelme et al., 2015a) y de las Islas Canarias, España. Mientras que el segundo, ha sido hallado en un tubo de lava de la isla de Azores (Riquelme et al., 2015a). A la fecha se desconoce qué papel pueden jugar estos organismos en los sistemas subterráneos; sin embargo, es posible que tengan un papel fundamental en éstos.

9.4. Comparación de la diversidad microbiana entre tubos de lava de diferentes partes del mundo

Los tubos de lava de Hawai'i, Isla Terceira, Pico de Azores y Chimalacatepec comparten 64 OTUs, esto indica que existen organismos que son clave para la formación de las estructuras minerales dentro de este tipo de sistemas. Por otra parte, existen OTUs únicos para cada sitio, incluso si estos se encuentran en la misma región. Tal es el caso de la Isla Terceira y Pico de Azores, ambos tubos se localizan en el archipiélago de Azores en Portugal y sólo comparten 10 OTUs. Esto sugiere que los organismos tienen una biogeografía específica y que responden a factores ambientales únicos de cada región (Hathaway et al., 2014a). Los factores ambientales involucrados pueden estar dados por las tasas de precipitación, la latitud de la cueva, la temperatura, la ubicación del sistema y la composición química de las rocas.

Hathaway y colaboradores (2014a) llevaron a cabo un estudio en donde compararon la diversidad bacteriana tomando en cuenta la composición química de la roca basáltica de cuatro tubos de lava de Hawai'i y cuatro de la isla de Azores. En dicho estudio encontraron pequeñas diferencias en la química de las rocas. Al comparar la geoquímica hallada en este estudio con el que llevó a cabo Hathaway y su equipo se encontraron diferencias importantes, entre ellas, la presencia de SiO₂ como compuesto dominante en los estromatolitos terrestres de Chimalacatepec. Esto sugiere que la composición basáltica juega un papel relevante en las diferencias estructurales de las comunidades microbianas.

9.5. Análisis de la diversidad funcional de las comunidades procarióticas del tubo de lava del sistema Chimalacatepec

Las comunidades microbianas del tubo de lava del sistema Chimalacatepec fueron analizadas para observar sus capacidades funcionales en procesos del ciclo biogeoquímicos del C y del N. Respecto a la fijación de C, el análisis predictivo con Tax4Fun sugiere que los tapetes microbianos y estromatolitos terrestres cuentan con la presencia de la enzima 4-hidroxiubutiril-CoA-deshidratasa, implicada en la fijación de C mediante la ruta del 3-hidroxiopropionato/4-hidroxiubutirato (HP/HB). Esta enzima ha sido reportada en el grupo Thaumarchaeota (Pester et al., 2011; Alfreider et al., 2017), el cual fue encontrado en el microbioma del tubo de lava estudiado. Sin embargo, el gen que codifica para dicha enzima no fue detectado mediante ensayos

de PCR con los primers empleados (Alfreider et al., 2017). Es probable que las condiciones de amplificación no hayan sido las adecuadas, que los primers empleados sean poco específicos para este tipo de genes o que el número de copias sea demasiado bajo para ser detectado por el método empleado, ya que el grupo de Thaumarchaeota ha sido descrito como quimiolitotrófico autotrófico (Berg et al., 2010).

Por su parte, la enzima RuBisCO (Ciclo de Calvin) presentó mayor abundancia en los tapetes microbianos que en los estromatolitos según el análisis predictivo. Sin embargo, los fragmentos del gen que codifica para una de las enzimas involucradas -*cbbR*- fueron solamente amplificados por PCR en la muestra de un estromatolito (E-3). Es importante mencionar que no es el único gen que codifica para la enzima RuBisCO, y que existen varias formas de esta enzima en los procariontes (Tabita et al., 2008). De forma similar a la ruta HP/HB para la fijación de C, es probable que en este trabajo no se cuente con los primers o las condiciones adecuadas de PCR. Generalmente se considera que hay materia orgánica alóctona que puede llegar a los tapetes microbianos del tubo de lava de mediante infiltración, y cubrir los requerimientos de C de las comunidades microbianas. Sin embargo, estudios metagenómicos en cuevas kársticas sugieren que los tapetes microbianos en estos sistemas cuentan con el repertorio para fijar carbono mediante las seis rutas de fijación de C conocidas a la fecha (Ortiz et al., 2014), siendo el ciclo de Calvin una de las más importantes para la fijación en oscuro.

Respecto al proceso de generación de metano o metanogénesis, no se logró detectar el gen *mcrA* en ninguna de las muestras a través de PCR. Esto confirma los resultados *in silico* para *mcrA*, pues reportó una abundancia <0.000001 (Fig. 13-B). Contrariamente, hubo un resultado positivo para la oxidación del metano, ya que el gen *pmoA* fue detectado en las muestras de estromatolitos terrestres y en una de tapete microbiano, lo que puede indicar que la metanotrofia tiene mayor incidencia en las estructuras organosedimentarias, tal como indicó el análisis predictivo. Esto sugiere que algunos microorganismos del sistema de tubo de lava de Chimalacatepec pueden estar utilizando CH₄ como fuente de energía. Sin embargo, el ensayo de PCR también pudo ser un falso positivo, ya que los genes *amoA* y *pmoA* están estrechamente relacionados evolutivamente (Holmes et al., 1995), y como mencionaremos más adelante, la señal 16S rRNA mostró oxidadores de amonio, pero no se encontraron grupos oxidadores de metano.

Con respecto a los genes involucrados en el ciclo del N, el análisis predictivo sugirió una alta presencia de la enzima nitrogenasa tanto en tapetes como en estromatolitos. Los ensayos de

PCR para el gen *nifH* fueron positivos para todas las muestras, por lo que se confirmó el análisis predictivo. La actividad de los organismos fijadores de N indica que el N₂ atmosférico es transformado a NH₃ y fijado en la biomasa microbiana. Posteriormente, por procesos de amonificación se genera NH₄⁺ que puede ser empleado por oxidadores de amonio, u otro organismo que asimile esta molécula. El resultado positivo para la oxidación de amonio para Archaea indica que en la comunidad microbiana de los tubos de lava hay microorganismos quimiolitótrofos que utilizan el amonio como fuente de energía (Ward, 2012). De forma similar, no se detectaron formas disueltas de N en el agua de goteo en la cueva, lo que indica que la fijación de N es importante para la formación de la biomasa y el establecimiento de grupos quimiolitotróficos en los tapetes microbianos y estromatolitos de los tubos de lava.

9.6. Formación de estromatolitos terrestres

Con base en los resultados obtenidos, es bastante probable que la formación de los estromatolitos terrestres del tubo de lava de Chimalacatepec esté influenciada por la actividad de las comunidades microbianas. La primera fase para la formación de estas estructuras es la colonización de la superficie de la roca basáltica por organismos quimiolitotróficos autótrofos que son capaces de fijar N y C para la generación de biomasa, formando así una biopelícula. La formación de biomasa y la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) sirven como sustrato para los organismos heterótrofos. Entonces comienzan a establecerse redes metabólicas más complejas e incrementa la diversidad procariótica, consolidando la biopelícula y estableciendo un tapete microbiano (Severin & Stal, 2010).

El tapete microbiano formado induce cambios físicos y químicos en la roca, promoviendo el deterioro y la meteorización de ésta (Gorbushina, 2007). La síntesis de EPS y ácidos orgánicos son componentes clave para llevar a cabo los procesos mencionados. El EPS funciona como contenedor de agua por lo que: i) se incrementa la probabilidad de disociación de los minerales de la roca, ii) existe un medio acuoso continuo en donde pueden realizarse diversas reacciones químicas y iii) se mantiene la viabilidad de las células (Welch et al., 1999; Gorbushina, 2007). Por su parte, los ácidos orgánicos, sintetizados en su mayoría por organismos heterótrofos, i) son capaces de liberar protones que debilitan los enlaces de los óxidos metálicos (Me-O) tales como el SiO₂, MgO y CaSiO₃, lo que ocasiona que los cationes metálicos permanezcan disponibles en

la superficie de la roca; y ii) funcionan como fuentes quelantes, inmovilizando los iones metálicos (Welch & Ullman, 1993).

En el tubo de lava de Chimalacatepec, los procesos llevados a cabo por el EPS y los ácidos orgánicos pueden incrementar el estado de saturación de Si en el agua. Ha sido comprobado que bacterias pertenecientes a *Pseudomonas* sp. son capaces de sintetizar ácido 2-quetoglucónico a partir de la glucosa, el cual puede disolver silicatos de calcio como la wollastonita (CaSiO_3) (Konhauser, 2016). Es importante mencionar que la meteorización hídrica juega un papel importante en la disolución de elementos como el Mg, Si y Ca en el sistema de tubo de lava de Chimalacatepec, tal como se mostró en la química de agua de goteo (Fig. 18A). Estos elementos comienzan a difundir en el EPS y a formar una matriz enriquecida en estos elementos. El sílice, en una solución sobresaturada, es forzado a formar polímeros, a encontrar zonas de nucleación y finalmente, a precipitar (Konhauser, 2007). Se ha documentado que las envolturas y las membranas celulares funcionan como zonas de nucleación para este elemento, de manera que son fundamentales para el proceso inicial de silicificación (Konhauser et al., 2001). El sílice precipita en la zona epitelular en forma de microsferas, las cuales tienen una medida de 0.1-0.5 μm (Konahuser et al., 2001; Daza et al., 2014). A medida que el sílice se vuelve más cristalino, las microsferas se agregan para formar un pequeño botrioide con una corteza externa a la que se adhieren más (Westall et al., 1995).

La acreción mineral fuerza a las comunidades procariotas a desplazarse, de manera que los organismos colonizan rápido otra superficie con el fin de mantenerse (Konhauser et al., 2001). Es importante mencionar que el proceso de silicificación no está limitado a un taxón en específico (Fein, 2000) (Fig. 18A). La formación laminada de los estromatolitos terrestres se debe a que existen oscilaciones en la actividad microbiana o en la sedimentación durante su formación. En el sistema de tubo de lava de Chimalacatepec la actividad microbiana puede ser interrumpida por la disponibilidad de agua. En lapsos donde la lluvia es abundante los tapetes microbianos se encuentran humectados y la actividad metabólica es óptima. El tapete microbiano acumula biomasa durante los periodos en donde la tasa de sedimentación es baja. Durante este periodo, los filamentos son capaces de crecer hacia los lados y hacia arriba, y de atrapar algunos cristales, granos boitroideos, entre otras cosas (Seong-Joo et al., 2000).

Por el contrario, en intervalos en donde la lluvia disminuye en el tapete microbiano pierde H₂O, lo que promueve la deposición de sílice. Además, la acumulación de material silicificado induce el movimiento de la interfaz acuosa restante y de las comunidades bacterianas hacia la parte superior (Seong-Joo et al., 2000). Mientras esto ocurre, algunos de los organismos que se encuentran en la zona inferior del tapete comienzan a morir, mientras que otros pierden actividad metabólica. Los primeros provocan la formación de una capa de materia orgánica (MO), mientras que los segundos se encargan de degradarla a través de rutas anaeróbicas, hasta que finalmente mueren y la materia orgánica restante se litifica (Konhauser et al., 2001) (Fig. 18B). Esto es confirmado por la determinación de las formas de C que se llevó a cabo, en donde se encontró mayor cantidad de C orgánico derivado de la biomasa microbiana la cual, como se ha explicado, se litifica y forma parte del estromatolito.

La desecación del tapete microbiano facilita la formación de grietas y poros. Los poros crean microambientes en donde las bacterias consumen CO₂ lo que provoca el aumento local del pH y por ende, la precipitación de carbonatos de calcio (Anbu et al., 2016). Con base en los resultados obtenidos en este estudio, es probable que los grupos responsables del proceso mencionado sean Actinobacteria y en menor medida Proteobacteria y Thaumarchaeota, a través de la fijación de CO₂. Se ha reportado que *Streptomyces* sp. es capaz de fijar CO₂ de la atmósfera de las cavidades, facilitando así la formación de polimorfos de carbonatos como el CaCO₃ (Cañaveras et al., 2001; Cuezva et al., 2012). Así mismo, otras investigaciones mencionan que es posible que *Pseudonocardia* sp. utilice la ruta de Calvin-Benson-Bassham para fijar CO₂ (Groster & Alvarez-Cohen, 2013; Lynch et al., 2014) (Fig. 18B).

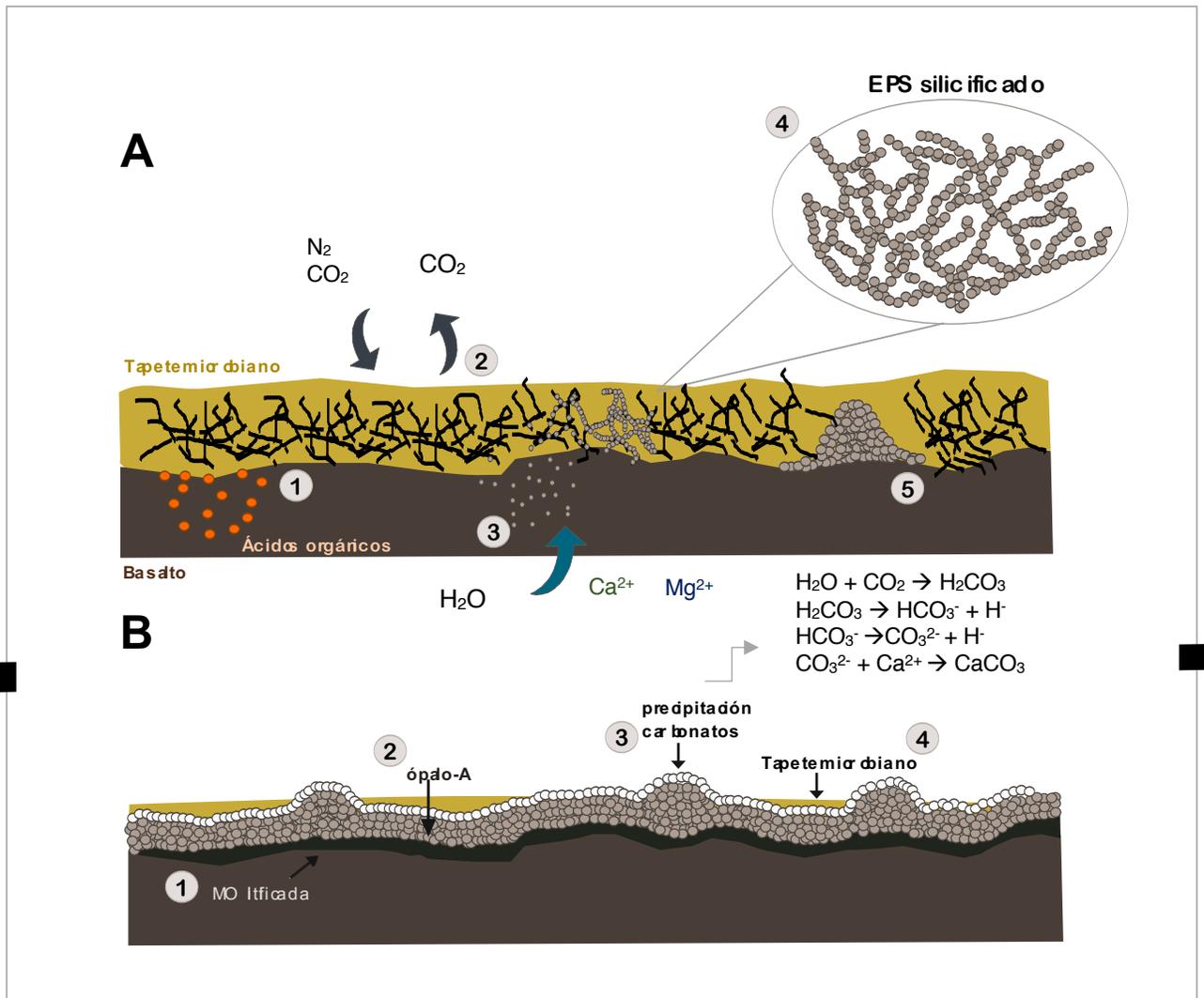


Figura 18. Formación de los estromatolitos terrestres. **A.** 1. Síntesis de ácidos orgánicos. 2. Fijación de nitrógeno y carbono, liberación de CO₂ por la actividad metabólica. 3. Disolución de iones metálicos. 4. EPS silicificado por sobresaturación de Si. 5. Formación de boitroides. **B** 1. Litificación de MO. 2. Formación de capa de ópalo-A. 3. Precipitación de carbonatos. 4. Nuevo tapete microbiano.

10. Conclusiones

El presente trabajo es el primero en caracterizar el componente procarionte de las estructuras organosedimentarias y tapetes microbianos de un sistema subterráneo originado por actividad volcánica en México. El sistema de tubo de lava de Chimalacatepec es el más largo de América Latina Continental, y al ser un sistema oligotrófico y afótico brinda la posibilidad de estudiar las maneras en la que la vida se establece.

Las fotografías obtenidas por EDS sugieren que los estromatolitos terrestres están compuestos principalmente de opal-A, y otros minerales como wollastonita y calcita. Las microscopías por SEM indican la presencia de biomorfos adheridas a la estructura sedimentaria, por lo que es altamente probable que las estructuras poliméricas extracelulares funcionen como zonas de nucleación para la sílice. Los resultados de este estudio sugieren que la estructura de las comunidades bacterianas no es diferente entre los tapetes microbianos y los estromatolitos terrestres. Así mismo, en el sistema se encontraron grupos filogenéticos que han sido reportados en otros sistemas de tubo de lava alrededor del mundo, sin mencionar que el tubo de lava del sistema de Chimalacatepec comparte 67 OTUs con tubos de lava de Portugal y Hawai'i. Por lo que es posible que estos organismos sean fundamentales para el proceso de formación de las estructuras organosedimentarias de este tipo de sistemas. Además, cada región contiene OTUs únicos, debido a los factores ambientales que afectan a cada sistema, tales como la temperatura, la humedad y la composición química de las rocas.

El análisis llevado a cabo para conocer el potencial genético de las comunidades procariontes sugiere que los organismos obtienen N y C a partir de la atmósfera de la cueva, y que hay una alta actividad por parte de organismos quimiolitótrofos que utilizan el amonio como fuente de energía. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más análisis en torno a los ciclos biogeoquímicos de los elementos mencionados e incluir el azufre para un mejor entendimiento. Nuestros resultados sugieren que la formación de los estromatolitos terrestres del sistema de tubo de lava de Chimalacatepec está entonces, altamente influenciada por la actividad de las comunidades procariontes.

11. Bibliografía

- Alfreider, A., Baumer, A., Bogensperger, T., Posch, T., Salcher, M. M., & Summerer, M. (2017). CO₂ assimilation strategies in stratified lakes: Diversity and distribution patterns of chemolithoautotrophs. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13786>
- Alfreider, A., Vogt, C., Hoffmann, D., & Babel, W. (2003). Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from groundwater and aquifer microorganisms. *Microbial Ecology*, *45*(4), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2004-9>
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Amann, R. I., & Ludwig, W. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation, *59*(1), 143–169.
- Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., & So, J. S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, *5*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>
- Ando, S., Goto, M., Hayashi, H., Yoneyama, T., Meunchang, S., Thongra-ar, P., & Fujiwara, T. (2005). Detection of *nifH* Sequences in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). *Soil Science and Plant Nutrition*, *51*(2), 303–308. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2005.tb00034.x>
- Aprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, *75*(2), 129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Alßhauer, K. P., & Meinicke, P. (2013). On the estimation of metabolic profiles in metagenomics. *OASIScs - OpenAccess Series in Informatics*, *34*, 13. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>
- Alßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, *31*(17), 2882–2884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>
- Aubrecht, R., Brewer-Carías, C., Šmída, B., Audy, M., & Kováčik, L. (2008). Anatomy of biologically mediated opal speleothems in the World's largest sandstone cave: Cueva Charles Brewer, Chimantá Plateau, Venezuela. *Sedimentary Geology*, *203*(3–4), 181–195. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2007.10.005>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, *55*(3), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Banks, E. D., Taylor, N. M., Gully, J., Lubbers, B. R., Giarrizzo, J. G., Bullen, H. A., ... Barton, H. A. (2010). Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: A function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal*, *27*(5), 444–454. <https://doi.org/10.1080/01490450903485136>
- Barton, H. A., Giarrizzo, J. G., Suarez, P., Robertson, C. E., Broering, M. J., Banks, E. D., ... Venkateswaran, K. (2014). Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the Chloroflexi (Class Ktedonobacterales) and Thaumarchaeota Group I.1c. *Frontiers in Microbiology*, *5*(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00615>
- Barton, H. A., Taylor, M. R., & Pace, N. R. (2004). Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in an oligotrophic cave environment. *Geomicrobiology Journal*, *21*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1080/01490450490253428>
- Barton, H., & Northup, D. E. (2007). Barton HA , Northup DE .. Geomicrobiology in cave

- environments : past , current and future perspectives . *J Cave Karst Stud* 69 : 163-178, (September 2016), 163–178.
- Berg, I. A. (2011). Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 1925–1936. <https://doi.org/10.1128/AEM.02473-10>
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., ... Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 447–460. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2365>
- Bourne, D. G., McDonald, I. R., & Murrell, J. C. (2001). Comparison of pmoA PCR Primer Sets as Tools for Investigating Methanotroph Diversity in Three Danish Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3802–3809. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.3802>
- Broda, J., & Good Eshelman. (2004). Historia y vida ceremonial en las comunidades mesoamericanas : los ritos agrícolas. *Colección Etnografía de Los Pueblos Indígenas de México Serie Estudios Monográficos*, 2004, 498 p.
- Bustillo, M. A., Aparicio, A., & Carvalho, M. R. (2010). Estromatolitos Silíceos en Espeleotemas de la Cueva de Branca Opala (Isla de Terceira , Azores. *Macla*, 13, 51–52.
- Cadena-Zamudio, J. D., Martínez-Peña, M. D., Guzmán-Rodríguez, L. F., & Arteaga-Garibay, R. I. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*, 9(2), 70–83. Retrieved from ISSN-0188-7394
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cañaveras, J. C., Sanchez-Moral, S., Soler, V., & Saiz-Jimenez, C. (2001). Microorganisms and microbially induced fabrics in caves walls. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 223–240. <https://doi.org/10.1080/01490450152467769>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., & Connell, N. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005.A>
- Cheeptham, N. (2013). Advances and Challenges in Studying Cave Microbial Diversity. In N. Cheeptham (Ed.), *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery* (p. 69). SpringerBriefs in Microbiology. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17997-6>
- Chelius, M. K., & Moore, J. C. (2004). Molecular phylogenetic analysis of archaea and bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21(2), 123–134. <https://doi.org/10.1080/01490450490266389>
- Chen, Y., Wu, L., Boden, R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., ... Murrell, J. C. (2009). Life without light: Microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME Journal*, 3(9), 1093–1104. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.57>
- Cockell, C. S., Kelly, L. C., & Marteinsson, V. (2013). Actinobacteria-An Ancient Phylum Active in Volcanic Rock Weathering. *Geomicrobiology Journal*, 30(8), 706–720.

- <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.758196>
- Constantino Rodríguez, L. D. (2011). *Método de tomografía eléctrica para determinar estructuras volcánicas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Costello, A., & Lidstrom, M. E. (1999). Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5066–5074. <https://doi.org/10.1021/ci500406k>
- Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Pašić, L., Jurado, V., Hernandez-Marine, M., ... Saiz-Jimenez, C. (2012). The biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain. *FEMS Microbiology Ecology*, 81(1), 281–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01391.x>
- Daza Brunet, R., & Bustillo Revuelta, M. Á. (2014). Exceptional silica speleothems in a volcanic cave: A unique example of silicification and sub-aquatic opaline stromatolite formation (Terceira, Azores). *Sedimentology*, 61(7), 2113–2135. <https://doi.org/10.1111/sed.12130>
- de los Ríos, A., Bustillo, M. A., Ascaso, C., & Carvalho, M. R. (2011). Bioconstructions in ochreous speleothems from lava tubes on Terceira Island (Azores). *Sedimentary Geology*, 236(1–2), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2010.12.012>
- De Mandal, S., Zothansanga, Panda, A. K., Bisht, S. S., & Senthil Kumar, N. (2016). MiSeq HV4 16S rRNA gene analysis of bacterial community composition among the cave sediments of Indo-Burma biodiversity hotspot. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 12216–12226. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6423-9>
- del Pozzo, A. L. M. (1982). Monogenetic vulcanism in sierra Chichinautzin, Mexico. *Bulletin Volcanologique*, 45(1), 9–24. <https://doi.org/10.1007/BF02600386>
- Detay, M. (2011). Túneles de lava, 62–67.
- Engel, A. S., Meisinger, D. B., Porter, M. L., Payn, R. A., Schmid, M., Stern, L. A., ... Lee, N. M. (2010). Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *ISME Journal*, 4(1), 98–110. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.91>
- Espinasa-Pereña, R. (1999). *Origen y evolución de tubos de lava en la Sierra Chichinautzin: El caso del volcán Suchiooc*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Espinasa-Pereña, R. (2006). Sistema Chimalacatepec Tlacotenco, Mpo. Tepoztán Morelos. *Bulletin of the Association for Mexican Cave Studies*, 17(80).
- Espíndola, J. M., & Macías Vázquez, J. L. (1996). El vulcanismo. *Revista Ciencias*, (41).
- Fein, J. B. (2000). Quantifying the effects of bacteria on adsorption reactions in water-rock systems. *Chemical Geology*, 169(3–4), 265–280. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(00\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(00)00207-2)
- Forti, P. (2005). Genetic processes of cave minerals in volcanic environments: An overview. *Journal of Cave and Karst Studies*, 67(1), 3–13.
- Francis, C., Gregory, O., & Ward, B. (2003). Diversity of ammonia monooxygenase (amoA) genes across environmental gradients in Chesapeake Bay sediments. *Geobiology*, 1, 129–140.
- Gilbert, J. A., & Dupont, C. L. (2011). Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 347–371. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>
- Gómez-tuena, A., Orozco-esquivel, M. T., & Ferrari, L. (2007). Igneous petrogenesis of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Geological Society of America, Número esp(303)*, 129–181. [https://doi.org/10.1130/2007.2422\(05\)](https://doi.org/10.1130/2007.2422(05))
- Gonzalez-Pimentel, J. L., Miller, A. Z., Jurado, V., Laiz, L., Pereira, M. F. C., & Saiz-Jimenez, C. (2018). Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active Actinobacteria_Supplementary. *Scientific Reports*, 8(1).

- <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20393-2>
- Gorbushina, A. A. (2007). Minireview Life on the rocks, 9, 1613–1631. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x>
- Groster, A., & Alvarez-Cohen, L. (2013). RubisCO-based CO₂ fixation and C1 metabolism in the actinobacterium *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190. *Environmental Microbiology*, 15(11), 3040–3053. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12144>
- Hales, B. A., Edwards, C., Ritchie, D. A., Hall, G., Pickup, R. W., & Saunders, J. R. (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 668–675.
- Hathaway, J. J. M., Garcia, M. G., Moya Balasch, M., Spilde, M. N., Stone, F. D., Dapkevicius, M. de L. N. E., ... Northup, D. E. (2014a). Comparison of Bacterial Diversity in Azorean and Hawai'ian Lava Cave Microbial Mats. *Geomicrobiology Journal*, 15(4), 942–953. <https://doi.org/10.1111/ajt.13087>.TIM-1
- Hathaway, J. J. M., Sinsabaugh, R. L., Dapkevicius, M. D. L. N. E., & Northup, D. E. (2014b). Diversity of Ammonia Oxidation (*amoA*) and Nitrogen Fixation (*nifH*) Genes in Lava Caves of Terceira, Azores, Portugal. *Geomicrobiology Journal*, 31(3), 221–235. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.752424>
- Hill, C., & Forti, P. (1995). The classification of cave minerals and speleothems. *International Journal of Speleology*, 24(1/4), 77–82. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.24.1.5>
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., & Murrell, J. C. (1995). Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionary related. *FEMS Microbiol.Lett.*, 132Gamma-p, 203–208.
- Horz, H.-P., Rich, V., Avrahami, S., & Bohannon, B. J. M. (2005). Methane-Oxidizing Bacteria in a California Upland Grassland Soil : Diversity and Response to Simulated Global Change Methane-Oxidizing Bacteria in a California Upland Grassland Soil : Diversity and Response to Simulated Global Change. *Appl Environ Microbiol*, 71(5), 2642–2652. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2642>
- Ibañez, A., & Sandoval, F. (1993). La Wollastonita : propiedades , síntesis y aplicaciones cerámicas. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 32(6), 349–361. Retrieved from <http://boletines.secv.es/upload/199332349.pdf>
- Justin Kuczynski¹, Jesse Stombaugh², William Anton Walters¹, Antonio González³, J., & Gregory Caporaso⁴, and R. K. (2012). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. Current protocols in bioinformatics / editorial.. *Curr Protoc Bioinformatics*, (June), 1–28. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>.Using
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes .pdf, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 199–205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1076>
- Karwautz, C., Kus, G., Stöckl, M., Neu, T. R., & Lueders, T. (2018). Microbial megacities fueled by methane oxidation in a mineral spring cave. *ISME Journal*, 12(1), 87–100. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.146>
- Klingenberg, H., Aßhauer, K. P., Lingner, T., & Meinicke, P. (2013). Protein signature-based estimation of metagenomic abundances including all domains of life and viruses. *Bioinformatics*, 29(8), 973–980. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt077>
- Konhauser, K. (2007). *Introduction to Geomicrobiology* (1st ed.). Blackwell Publishing.
- Konhauser, K. (2016). Geomicrobial Interactions with Silicon. In H. L. Ehrlich, D. K. Newman,

- & A. Kappler (Eds.), *Ehrlich's Geomicrobiology* (6th ed., p. 643). USA: CRC Press.
- Konhauser, K. O., Phoenix, V. R., Bottrell, S. H., Adams, D. G., & Head, I. M. (2001). Microbial-silica interactions in Icelandic hot spring sinter: Possible analogues for some Precambrian siliceous stromatolites. *Sedimentology*, *48*(2), 415–433. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3091.2001.00372.x>
- Kumar, V., Maitra, S. S., & Shukla, R. N. (2015). Environmental Metagenomics: The Data Assembly and Data Analysis Perspectives. *Journal of The Institution of Engineers (India): Series A*, *96*(1), 71–83. <https://doi.org/10.1007/s40030-014-0102-y>
- Kumaresan, D., Wischer, D., Stephenson, J., Hillebrand-Voiculescu, A., & Murrell, J. C. (2014). Microbiology of Movile Cave-A Chemolithoautotrophic Ecosystem. *Geomicrobiology Journal*, *31*(3), 186–193. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.839764>
- Lavoie, K. H., Winter, A. S., Read, K. J. H., Hughes, E. M., Spilde, M. N., & Northup, D. E. (2017). Comparison of bacterial communities from lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA. *PLoS ONE*, *12*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169339>
- Llambías, E. J. (2001). Procesos y rocas volcánicas. In *Geología de los cuerpos ígneos* (Serie Corr, pp. 173–205). San Miguel Tucumán, Argentina: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Universidad Nacional de Tucumán Instituto Superior de Correlación Geológica.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z. M., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., ... Pallen, M. J. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: An embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(9), 599–606. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2850>
- López-Martínez, R., Barragán, R., Beraldi-Campesi, H., Lánzos, T., Vidal-Romaní, J. R., Aubrecht, R., ... Espinasa-Pereña, R. (2016). Morphological and mineralogical characterization of speleothems from the Chimalacatepec lava tube system, Central Mexico. *International Journal of Speleology*, *45*(2), 111–122. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.45.2.1927>
- Lynch, R. C., Darcy, J. L., Kane, N. C., Nemergut, D. R., & Schmidt, S. K. (2014). Metagenomic evidence for metabolism of trace atmospheric gases by high-elevation desert actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, *5*(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00698>
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring Biodiversity*. Malden, Massachusetts: Blackwell. <https://doi.org/10.2989/16085910409503825>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, *11*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Metzker, M. L. M. L. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res.*, *15*(12), 1767–1776. <https://doi.org/10.1101/gr.3770505.with>
- Northup, D. E., Melim, L. A., Spilde, M. N., Hathaway, J. J. M., Garcia, M. G., Moya, M., ... Riquelme, C. (2011). Lava Cave Microbial Communities Within Mats and Secondary Mineral Deposits: Implications for Life Detection on Other Planets. *Astrobiology*, *11*(7), 601–618. <https://doi.org/10.1089/ast.2010.0562>
- Offre, P., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2011). Community profiling and quantification of putative autotrophic thaumarchaeal communities in environmental samples. *Environmental Microbiology Reports*, *3*(2), 245–253. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00217.x>
- Olsen, G. J. (1986). Microbial Ecology and evolution : a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.*, *40*, 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.002005>
- Ortiz, M., Legatzki, A., Neilson, J. W., Fryslie, B., Nelson, W. M., Wing, R. A., ... Maier, R. M. (2014). Making a living while starving in the dark: Metagenomic insights into the energy

- dynamics of a carbonate cave. *ISME Journal*, 8(2), 478–491. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.159>
- Ortiz, M., Neilson, J. W., Nelson, W. M., Legatzki, A., Byrne, A., Yu, Y., ... Maier, R. M. (2013). Profiling Bacterial Diversity and Taxonomic Composition on Speleothem Surfaces in Kartchner Caverns, AZ. *Microbial Ecology*, 65(2), 371–383. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0143-6>
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology* (pp. 1–55). New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1
- Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: An emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.007>
- Porca, E., Jurado, V., Žgur-Bertok, D., Saiz-Jimenez, C., & Pašić, L. (2012). Comparative analysis of yellow microbial communities growing on the walls of geographically distinct caves indicates a common core of microorganisms involved in their formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 81(1), 255–266. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01383.x>
- Quintana, E. T., Badillo, R. F., & Maldonado, L. A. (2013). Characterisation of the first actinobacterial group isolated from a Mexican extremophile environment. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 104(1), 63–70. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9926-0>
- Riquelme, C., Hathaway, J. J. M., Dapkevicius, M. de L. N. E., Miller, A. Z., Kooser, A., Northup, D. E., ... Cheeptham, N. (2015a). Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01342>
- Riquelme, C., Rigal, F., Hathaway, J. J. M., Northup, D. E., Spilde, M. N., Borges, P. A. V., ... Dapkevicius, M. de L. N. E. (2015b). Cave microbial community composition in oceanic islands: Disentangling the effect of different colored mats in diversity patterns of Azorean lava caves. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(12), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/iv141>
- Riquelme, G. C., & Northup, D. E. (2013). Microbial ecology: Caves as an Extreme habitat. In *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery* (Vol. 1, pp. 85–108). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5206-5>
- Rodicio, M., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación de l ARNr 16S: fundamento , metodología y aplicaciones e n microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*, 22(4), 238–245. [https://doi.org/2004;22\(4\):238-45](https://doi.org/2004;22(4):238-45)
- Rogers, N. (2015). *The Composition and Origin of Magmas. The Encyclopedia of Volcanoes* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385938-9.00004-3>
- Rooney, D. C., Hutchens, E., Clipson, N., Baldini, J., & McDermott, F. (2010). Microbial Community Diversity of Moonmilk Deposits at Ballynamindra Cave, Co. Waterford, Ireland. *Microbial Ecology*, 60(4), 753–761. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9693-7>
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., & Liesack, W. (1997). The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704–4712. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168793/pdf/634704.pdf>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 955–962. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0945-5>
- Seckbach, J. (2006). *Life as we know it*. (J. Seckbach, Ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Seong-Joo, L., Browne, K. M., & Golubic, S. (2000). On Stromatolite Lamination. In R. E. Riding & S. M. Awramik (Eds.), *Microbial Sediments* (pp. 16–24). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000.
- Severin, I., & Stal, L. . (2010). Diazotrophic microbial mats. In J. Seckbach & A. Oren (Eds.), *Microbial Mats* (pp. 321–339). The Netherlands: Springer.
- Spear, J. R., Barton, H. A., Robertson, C. E., Francis, C. A., & Pace, N. R. (2007). Microbial community biofabrics in a geothermal mine adit. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6172–6180. <https://doi.org/10.1128/AEM.00393-07>
- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., & Pace, N. R. (1985). Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1379–1384.
- Stephenson, J. (2014). *Methanotrophy in Movile Cave*. University of Warwick, Coventry, UK.
- Sun, D. L., Jiang, X., Wu, Q. L., & Zhou, N. Y. (2013). Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 5962–5969. <https://doi.org/10.1128/AEM.01282-13>
- Tabita, F. R., Hanson, T. E., Satagopan, S., Witte, B. H., & Kreel, N. E. (2008). Phylogenetic and evolutionary relationships of RubisCO and the RubisCO-like proteins and the functional lessons provided by diverse molecular forms. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0023>
- Tarback, E. J., & Lutgnes, F. K. (2005). *Ciencias de la Tierra. Una introducción a la geología física*. Pearson Prentice Hall. [https://doi.org/10.1016/0196-0709\(91\)90073-O](https://doi.org/10.1016/0196-0709(91)90073-O)
- Tebo, B. M., Davis, R. E., Anitori, R. P., Connell, L. B., Schiffman, P., & Staudigel, H. (2015). Microbial communities in dark oligotrophic volcanic ice cave ecosystems of Mt. Erebus, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00179>
- Tringe, S. G., & Rubin, E. M. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 805–814. <https://doi.org/10.1038/nrg1709>
- Urzì, C., de Leo, F., Bruno, L., & Albertano, P. (2010). Microbial diversity in paleolithic caves: A study case on the phototrophic biofilms of the cave of bats (Zuheros, Spain). *Microbial Ecology*, 60(1), 116–129. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9710-x>
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., Vargas, F., Valenzuela, F., Casillas, R., ... Vargas, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Valerio, A., Tallarico, A., & Dragoni, M. (2008). Mechanisms of formation of lava tubes. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 113(8), 1–14. <https://doi.org/10.1029/2007JB005435>
- Valerio, A., Tallarico, A., & Dragoni, M. (2010). A model for the formation of lava tubes by the growth of the crust from the levees. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 115(9), 1–10. <https://doi.org/10.1029/2009JB006598>
- Vidal-Romaní, J. R., González-López, L., Vaqueiro, M., & Sanjurjo-Sánchez, J. (2015). Bioweathering related to groundwater circulation in cavities of magmatic rock massifs. *Environmental Earth Sciences*, 73(6), 2997–3010. <https://doi.org/10.1007/s12665-014-3743-2>
- Vidal Romaní, J. R., Sanjurjo Sánchez, J., Vaqueiro, M., & Fernández Mosquera, D. (2010).

- Speleothems of Granite caves. *Comunicacoes Geologicas*, 97(1), 71–80.
- Ward, B. B. (2012). The Global Nitrogen Cycle. In A. H. Knoll, D. E. Canfield, & K. Konhauser (Eds.), *Fundamentals of Geobiology* (pp. 36–48). Willey-Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9781118280874>
- Watters, W. A. (1995). Petrography and genesis of a wollastonite body and its associated rocks at Holyoake Valley, Nelson, New Zealand. *New Zealand Journal of Geology and Geophysics*, 38(3), 315–323. <https://doi.org/10.1080/00288306.1995.9514659>
- Welch, S. A., Barker, W. W., & Banfield, J. F. (1999). Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(9), 1405–1419. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00031-9)
- Welch, S. A., & Ullman, W. J. (1993). The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(12), 2725–2736. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90386-B](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90386-B)
- Westall, F., Boni, L., & Guerzoni, E. (1995). The experimental silicification of microorganisms. *Palaeontology*. Retrieved from [http://palaeontology.palass-pubs.org/pdf/Vol 38/Pages 495-528.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/0738E2D9-0F29-4080-ACCA-D51162C0B464](http://palaeontology.palass-pubs.org/pdf/Vol%2038/Pages%20495-528.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/0738E2D9-0F29-4080-ACCA-D51162C0B464)
- White, W. B. (2010). Secondary minerals in volcanic caves: Data from Hawai'i. *Journal of Cave and Karst Studies*, 72(2), 75–85. <https://doi.org/10.4311/jcks2009es0080>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Zamora Martínez, O., Montaña Hilario, J. M., Galindo Zavala, V. B., Siebe Grabach, C., & Prado Pano, B. L. (2016). Determinación Simultánea De Cationes Mayoritarios En Muestras De Agua Residual Por Medio De Cromatografía De Iones Con Detección Conductimétrica. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 32(3), 293–301. <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.04>
- Zepeda Mendoza, M. L., Lundberg, J., Ivarsson, M., Campos, P., Nylander, J. A. A., Sallstedt, T., & Dalen, L. (2016). Metagenomic analysis from the interior of a speleothem in Tjuv-Ante's cave, Northern Sweden. *PLoS ONE*, 11(3), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151577>

12. Anexos

Cuadro A1. Números de accesos de las secuencias utilizadas para comparación.

Estudio	Sitio de estudio / No. acceso	No. secuencias
Hathaway et al., 2014	Hawai'i, USA Kanoehina Cave, Kula Kai Caverns HM063010-HM063029	
	Big Island of Hawai'i, Bird Park Lava Tube, HM444833-HM445589	781
	Big Island of Hawai'i, Kaumana Lava Tube HM545239-HM545243	
Riquelme et al., 2015	Pico de Azores, Portugal	
	Gruta dos Montanheiros	197
	JF265809-JF265883; JF265884-JF265962; JF265755-JF265782; JF265784; JF265786-JF265787; JF265789-JF265795; JF265798- JF265800; JF265802-JF265803; JF265806-JF265808	
	Gruta das Torres	
	HM749653-HM749666 HM749668- HM749692 HM749694- HM749716; HM749718-HM749734; JF266342-JF266420; JF266421-JF266429; JF266431-JF266434; JF266436-JF266439; JF266441-JF266446; JF266448-JF266454; JF266456; JF266459- JF266462; JF266464; JF266466-JF266471; JF266473-JF266474; JF266476-JF266484; JF266487; JF266489-JF266492; JF266493- JF266497; JF266499-JF266509; JF266511-JF266536; JF266538- JF266558; JN698909- JN698922; JN698924-JN698947; JN696292-JN696313	343
Furna do Lemos		
HQ721102-HQ721176; JF265679-JF265711; JF265713- JF265720; JF265722-JF265726; JF265728-JF265748; JF265750; JF265752-JF265753; JN801072-JN801095; JN801097-JN801137	212	
Gruta da Ribeira do Fundo		
JF266186-JF266258; JF266259-JF266341; JF266104-JF266148 JF266150-JF266180; JF266182-JF266185; JN802345-JN802368	260	
Northup et al., no publicado	Terceira, Azores, Portugal	
	Algar do Caravao	
	JN672037-JN672104; JN672105-JN672128; JN672129 - JN672192	156
Gruta da Achada	163	

	JN850064-JN850124; JN850125-JN850128; JN607054-JN607073 JN607075-JN607081 Gruta dos Buracos	
	JN642995-JN643019; JN643020-JN643065; JN643066-JN643106 JN616008-JN616084 Gruta dos Balcoes	189
	JN672295-JN672297; JN672299-JN672303; JN672305-JN672337 JN850206-JN850293; JN850129-JN850171 Gruta da Branca Opala	190
	JN672193-JN672264; JN672338-JN672363; JN672365-JN672370; JN672554-JN672575; JN850172-JN850205 Gruta da Madre de Deus	161
	JN615875-JN615975; JN701036-JN701094; JN701095-JN701180 Gruta do Natal	245
	JN672371-JN672481; JN672482-JN672553; JN592623-JN592653; JN592655-JN592713 Gruta Terra Mole	374
	JN615811-JN615845; JN615847-JN615865; JN615867-JN615874; JN615790-JN615794; JN615796-JN615810; JN600568-JN600607 JN615738-JN615789	177
Lavoie, et al., 2017	Tulelake, California. Lava Caves in Lava Beds National Monument. USA	
	Catacombs Cave JX694094-JX702544	1551
	Silver Cave KP705489-KP706447	959

Cuadro A2. Composición elemental (wt %) de los estromatolitos terrestres en forma de galleta de acuerdo con el análisis EDS.

Elemento	Estromatolito a		Estromatolito b	
	Muestra molida	Muestra sin moler	Muestra molida	Muestra sin moler
C	ND	----	53.02	23.33
O	53.45	56.61	35.86	50.57
Mg	----	0.66	1.81	2.45
Si	45.67	9.32	9.32	22.64
Ca	0.89	0.56	----	0.96

Cuadro A3. Cuantificación de DNA extraído

Muestra	Id	DNA (ng/μL)
<i>Tapetes microbianos</i>		
Tapete1	T-1	16.8
Tapete2	T-2	18.7
Tapete3	T-3	16.6
<i>Estromatolitos terrestres</i>		
Estromatolito1	E-1	1.35
Estromatolito2	E-2	0.037
Estromatolito3	E-3	6.80
Estromatolito4	E-4	3.37