



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES PROCARIONTES DE TAPETES MICROBIANOS Y  
ESTRUCTURAS ÓRGANO-SEDIMENTARIAS ASOCIADAS A CUEVAS PSEUDOKÁRSTICAS  
EN LA SIERRA DEL CHICHINAUTZIN, MÉXICO.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**MAIRA NAYELI LUIS VARGAS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. MARIA SOLEDAD VÁSQUEZ MURRIETA  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2021**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES PROCARIONTES DE TAPETES MICROBIANOS Y  
ESTRUCTURAS ÓRGANO-SEDIMENTARIAS ASOCIADAS A CUEVAS PSEUDOKÁRSTICAS  
EN LA SIERRA DEL CHICHINAUTZIN, MÉXICO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MAIRA NAYELI LUIS VARGAS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. MARIA SOLEDAD VÁSQUEZ MURRIETA  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2021**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE GEOLOGÍA

OFICIO CPCB/989/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **09 de agosto de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **LUIS VARGAS MAIRA NAYELI** con número de cuenta **310172462** con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES PROCARIONTES DE TAPETES MICROBIANOS Y ESTRUCTURAS ÓRGANO-SEDIMENTARIAS ASOCIADAS A CUEVAS PSEUDOKÁRSTICAS EN LA SIERRA DEL CHICHINAUTZIN, MÉXICO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO  
Vocal: DRA. PATRICIA MARGARITA VALDESPINO CASTILLO  
Vocal: DR. RAFAEL ANTONIO LÓPEZ MARTÍNEZ  
Vocal: DRA. ERIA ALAIDE REBOLLAR CAUDILLO  
Secretario: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 18 de octubre de 2021

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los apoyos económicos recibidos que me permitieron llevar a cabo mis estudios de maestría (CVU 1002560). Esta investigación se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM-DGAPA-PAPIIT IN121420, otorgado a la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández.

A mi directora de tesis, la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández por su asesoría. A mi comité tutor: la Dra. María Soledad Vázquez Murrieta y a la Dra. Nathalie Roberte Chantal Cabirol, por su asesoramiento científico y técnico.

## Agradecimientos a título personal

Este proyecto se realizó en coordinación con los siguientes laboratorios: Laboratorio de Genómica y Biotecnología del Instituto de Geología, UNAM; Laboratorio de Cromatografía del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM); Sección de ICP del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM); Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería, UNAM; y Laboratorio de Carbonatos y Procesos Kársticos del Instituto de Geología, UNAM.

Agradezco a la Dra. Olivia Zamora Martínez por su apoyo técnico en la determinación de aniones y cationes mayoritarios. Al M. en C. Javier Tadeo León por su apoyo técnico en los análisis elementales. Al Dr. Ulises Durán Hinojosa, por su apoyo técnico en el análisis de carbono y nitrógeno. Al Dr. Rafael Antonio López Martínez y a la Dra. Raquel Daza Brunet, por su apoyo durante el muestreo. Al Dr. Bruno Chávez, por sus palabras de aliento, su disposición para ayudar y por su asesoramiento en algunos métodos estadísticos.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio de Genómica y Biotecnología (Karina Hernández, Jazmín Santillan y Alba Savín), por su sororidad, sus enseñanzas y su apoyo durante todo éste proceso.

A mis padres, por su paciencia, comprensión, amor y dedicación. Por educarme en la libertad de elección y por inculcarme la valía del conocimiento.

A mi psicoterapeuta, Laura Tapia, por su acompañamiento durante todo este proceso.

Por enseñarme a perder.

# Contenido

Agradecimientos institucionales

Agradecimientos a título personal

Lista de tablas

Lista de figuras

<b>1</b>	<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>5</b>
4.1	Características de las cuevas y tipos de cuevas . . . . .	5
4.2	Microbiología de las cuevas kársticas y pseudokársticas . . . . .	6
4.2.1	Composición, diversidad y potencial biogeoquímico . . . . .	7
4.2.2	La fijación de C y sus implicaciones en la precipitación de minerales . . .	8
4.3	Métodos para el estudio de sistemas de cueva . . . . .	10
4.3.1	Análisis para el estudio de las comunidades procariontes . . . . .	10
4.3.2	Métodos para el análisis ambiental . . . . .	14
<b>5</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>15</b>
5.1	Sierra del Chichinautzin y el volcán Suchiooc . . . . .	15
5.2	La Cueva de la Iglesia . . . . .	15

5.3	El Sistema Chimalacatepec . . . . .	17
<b>6</b>	<b>Justificación</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>Objetivos</b>	<b>21</b>
7.1	Objetivo general . . . . .	21
7.2	Objetivos particulares . . . . .	21
<b>8</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>9</b>	<b>Métodos</b>	<b>23</b>
9.1	Muestreo . . . . .	23
9.2	Análisis geoquímicos . . . . .	24
9.3	Análisis de <i>metabarcoding</i> . . . . .	24
9.3.1	Extracción, cuantificación y purificación de DNA . . . . .	24
9.3.2	Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA . . . . .	24
9.4	Amplificación de genes funcionales para fijación de C . . . . .	25
9.5	Análisis de datos . . . . .	26
9.5.1	Análisis de datos hidrogeoquímicos y atmosféricos . . . . .	26
9.5.2	Análisis de secuencias 16S rRNA . . . . .	26
9.5.3	Análisis estadísticos y visualización de datos . . . . .	27
<b>10</b>	<b>Resultados</b>	<b>28</b>
10.1	Parámetros ambientales de los tubos de lava de Chimalacatepec y la Cueva de la Iglesia . . . . .	28

10.1.1	Condiciones atmosféricas . . . . .	28
10.1.2	Química del agua de goteo . . . . .	28
10.2	Descripción de tapetes microbianos y estromatolitos terrestres encontrados en las cuevas . . . . .	31
10.3	Concentración de DNA, secuencias 16S rRNA y ASVs obtenidos . . . . .	31
10.4	Rarefacción . . . . .	32
10.5	Diferencias en la composición microbiana de las comunidades de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia. . . . .	33
10.6	Diversidad de las comunidades procariontes de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia. . . . .	35
10.6.1	Diversidad alfa . . . . .	35
10.6.2	Diversidad beta . . . . .	37
10.7	Diferencias en la distribución de los organismos a través de las muestras. . . . .	38
10.7.1	ASVs compartidos y <i>core</i> microbiano. . . . .	38
10.7.2	Especies indicadoras . . . . .	41
10.8	Interacción de las comunidades procariontes de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia . . . . .	43
10.8.1	Redes de co-ocurrencia del Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec . . . . .	44
10.8.2	Redes de co-ocurrencia de la Cueva de la Iglesia . . . . .	45
10.9	Perfil metabólico de las comunidades procariontes de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia . . . . .	47
10.10	Potencial de las comunidades procariontes para rutas de fijación de carbono . . . . .	48
10.10.1	Predicción funcional . . . . .	48
10.10.2	Análisis de marcadores moleculares, ensayos PCR <i>in vitro</i> . . . . .	49

<b>11</b>	<b>Discusión</b>	<b>51</b>
11.1	Características ambientales de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia . . .	51
11.2	Composición y diversidad de las comunidades procariontes. . . . .	52
11.3	Patrones de distribución e interacción de las comunidades procariontes . . . . .	54
11.4	Potencial funcional y biogeoquímico de las comunidades procariontes de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia . . . . .	56
11.5	Modelo propuesto del desarrollo de las comunidades procariontes en los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia . . . . .	57
<b>12</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>13</b>	<b>Alcances y perspectivas</b>	<b>62</b>
<b>14</b>	<b>Referencias</b>	<b>63</b>
	<b>Anexo</b>	<b>79</b>
A.1	Revisión bibliográfica de estudios microbiológicos en sistemas de cuevas . . . . .	79
A.2	Curvas de rarefacción por triplicado de cada muestra. . . . .	87
A.3	Datos completos de la química de agua de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia. . . . .	88
A.4	Concentraciones de DNA obtenido . . . . .	90
A.5	Resultados de las pruebas de normalidad y homocedasticidad para <i>t de student</i> . . . . .	91
A.6	Resultados de la prueba de <i>t de student</i> . . . . .	92
A.7	Resultados de los análisis estadísticos para la determinación de diversidad beta . . . . .	93

# Lista de tablas

1	Marcadores moleculares utilizados en estudios de fijación de carbono en sistemas subterráneos. . . . .	9
2	Número de muestras tomadas por tipo de muestra y por localidad. . . . .	23
3	Identificadores de las muestras por tipo y localidad. . . . .	23
4	Marcadores moleculares previamente reportados para la fijación de carbono. . .	25
5	Condiciones atmosféricas para los sitios de estudio. . . . .	28
6	Parámetros fisicoquímicos del agua de goteo de ambas cuevas. . . . .	29
7	Determinación de C y N en agua de goteo para ambos sistemas. Unidades en mg L <sup>-1</sup> . . . . .	30
8	Media y desviación estándar de la concentración de elementos principales de las muestras de agua de goteo para ambas cuevas. Unidades en mg L <sup>-1</sup> . . . . .	30
9	Promedio y desviación estándar del número de secuencias totales, filtradas, no quiméricas y porcentaje de eficiencia de cada muestra (n = 3 por muestra). . . .	32
10	Propiedades de las redes de co-ocurrencia. <i>l</i> : Grado Medio, <i>k</i> : Media de la Ruta más Corta, <i>D</i> : Diámetro, <i>C</i> : Coeficiente de Agrupamiento, <i>CI</i> : Centralidad de Intermediación Media, <i>m</i> : Índice de Modularidad. . . . .	43
11	Presencia de los genes involucrados en las enzimas clave para la fijación de carbono afótica. Presencia detectada (X), ausencia (-). . . . .	49
A1	Revisión bibliográfica de los análisis de microbiología en sistemas de cuevas pseudokársticas. . . . .	80
A2	Revisión bibliográfica de los análisis de microbiología en sistemas de cuevas kársticas. . . . .	81

A3	Datos completos de los fisicoquímicos del agua de goteo de ambas cuevas. Unidades en mg L <sup>-1</sup> . . . . .	88
A4	Datos completos de los iones mayoritarios del agua de goteo de ambas cuevas. . . . .	88
A5	Datos completos de la concentración de carbono y nitrógeno para la Cueva de la Iglesia y del Sistema de Chimalacatepec. Unidades en mg L <sup>-1</sup> . . . . .	89
A6	Datos completos de la concentración de elementos principales de las muestras de agua de goteo para ambas cuevas. Unidades en mg L <sup>-1</sup> . . . . .	89
A7	Media y desviación estándar de la concentración de DNA metagenómico extraído y de la concentración del amplicón obtenido. Unidades en ng $\mu$ L <sup>-1</sup> . . . . .	90

# Lista de figuras

1	Tipos de cuevas. Las cajas de color naranja muestran las cuevas que han sido estudiadas desde una perspectiva geomicrobiológica. Modificado de Cheeptham et al., (2013). . . . .	6
2	Proporción del número de estudios publicados (45 publicaciones) sobre microbiota de cuevas a partir del año 2010. A. Proporción por tipo de cueva (kárstica o pseudokárstica), y B. Proporción por tipo de muestra analizada (agua, roca, tapetes microbianos, espeleotemas, sedimento, u otros). . . . .	7
3	A. Ubicación del volcán Suchiooc. B. Representación del derrame de lava generado por la erupción del volcán Suchiooc. Los círculos amarillos resaltan los tubos formados por dicho derrame, en donde se puede localizar al Sistema de Chimalacatepec (E) y al Sistema Tlacotenco (G). Modificado de Espinasa-Pereña (1999). C. Representación del Sistema Tlacotenco, el círculo rojo resalta la ubicación de la Cueva de la Iglesia. Modificado de Espinasa-Pereña (2006). . . . .	16
4	Topografía y muestreo de La Cueva de la Iglesia. Los puntos naranjas indican los sitios donde se muestrearon los tapetes microbianos (IT), los puntos azules indica sitios donde se muestreó agua de goteo y el punto café indica el sitio donde se muestreo sedimento (ISD). E: entrada. . . . .	18
5	Topografía y muestreo del Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec. El punto naranja indica el sitio donde se muestrearon los tapetes microbianos (CT), el punto verde indica el sitio donde se muestrearon lo estromatolitos (CE) y los puntos azules indica sitios donde se muestreó el agua de goteo. . . . .	19
6	Diagrama de Piper con las muestras de agua de goteo para ambas cuevas en este estudio. . . . .	30

7	Curva de rarefacción del número de ASVs observados con diferentes esfuerzos de muestreo en este estudio. Cada muestra es resultado del promedio de tres submuestras. Por fines de espacio, no se muestran las desviaciones típicas para cada muestra. . . . .	33
8	Abundancias relativas de los phyla encontrados en tapetes, sedimentos y suelos de superficie de ambas cuevas. A. Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec. B. La Cueva de la Iglesia. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. El último número corresponde a la réplica analizada. . . . .	34
9	Diversidad alfa de cada muestra perteneciente a las cuevas de Chimalacatepec (A y B) y la Cueva de la Iglesia (C y D). Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. Resultados de la prueba de <i>t de student</i> mostró diferencias significativas entre los tapetes microbianos en función de la cueva ( $p = 0.005038$ ) . . . . .	36
10	Análisis multidimensional no métrico con el método UniFrac ponderado para todas las muestras de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia analizadas. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. El último número corresponde a la réplica analizada. . . . .	37

- 11 Análisis de *core* microbiano mostrando los ASVs compartidos entre tapetes, estromatolitos, sedimentos y suelos estudiados, y la abundancia relativa que éstos representan a nivel de género. A. ASVs compartidos para los componentes del sistema Chimalacatepec (T:tapetes, E: estromatolitos, S: suelo de horizonte A ubicado al exterior del tubo de lava). B. Abundancia relativa de los géneros compartidos entre estromatolitos y tapetes de Chimalacatepec. C. ASVs compartidos para los componentes de la Cueva de la Iglesia (T: tapetes, SD: sedimento ubicado dentro de la cueva. S: suelo de horizonte A ubicado al exterior del tubo de lava) D. Abundancia relativa de los géneros compartidos entre los tapetes de Iglesia. E. ASVs compartidos entre los tapetes de Iglesia (IT) y los tapetes de Chimalacatepec (CT). . . . . 40
- 12 Géneros indicadores basados en un análisis IndVal. A. Muestras del Sistema de Tubo de Lava Chimalacatepec, (círculo: estromatolito; triángulo: tapete microbiano). B. Muestras de la Cueva de la Iglesia (cuadrado: IT1, círculo IT2, triángulo: IT4, rombo: IT5). Los colores refieren al phylum al que pertenece la especie indicadora encontrada. . . . . 42
- 13 Redes de co-ocurrencia de las muestras del tubo de lava de Chimalacatepec. A. Tapetes microbianos. B. Estromatolitos. Cada color en la red indica un módulo generado por el método de Louvain y cada nodo corresponde a un género. Líneas de color gris (cruzamiento negativo) indican que no hay interacción entre los módulos generados, líneas de color negro (cruzamiento positivo) indican que hay interacción entre los módulos generados. . . . . 44
- 14 Redes de co-ocurrencia de la Cueva de la Iglesia. A. Tapete microbiano 1 (IT1). B. Tapete microbiano 2 (IT2). C. Tapete microbiano 3 (IT3). D. Tapete microbiano 4 (IT4). E. Tapete microbiano 5 (IT5). Cada color en la red indica un módulo generado por el método de Louvain. Líneas de color gris (cruzamiento negativo) indican que no hay interacción entre los módulos generados. . . . . 46

15	Perfil metabólico predicho a partir de la huella 16S rRNA de las muestras de La Cueva de la Iglesia y del Sistema de Chimalacatepec. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. . . . .	47
16	Índice de redundancia funcional de las enzimas clave para tres rutas de fijación de carbono predichas para los sistemas de: A. Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec. B. Cueva de la Iglesia. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. Las barras representan la desviación estándar de abundancia predicha en las muestras. . . . .	48
17	Amplicones obtenidos de los genes involucrados en la fijación de carbono afótica. M: Marcador de tamaño molecular donde resaltan las bandas de 100, 500 y 1,000 pb. Tamaño de los amplicones esperados <i>cbbLR</i> (~818 pb), <i>cbbL-IC</i> (~552 pb), <i>hcd</i> (~839 pb), <i>4HBD</i> (~1,048 pb) y <i>aclA</i> (~564 pb). . . . .	50
18	Modelo propuesto del desarrollo de las comunidades procariontes en sistemas de cuevas. A. Proceso de adhesión. B. Fase de crecimiento. C. Fijación de carbono mediante los ciclos de CBB, rTCA y 3HP/4HB. . . . .	60
A1	Índice de diversidad de Shannon de los tapetes microbianos del tubo de lava de Chimalacatepec y de La Cueva de la Iglesia. . . . .	92

# 1 Resumen

Los tubos de lava están clasificados como cuevas pseudokársticas, y son considerados ambientes extremos para la vida. Debido a que son sitios afóticos y generalmente, presentan poca disponibilidad de nutrientes. Los microorganismos desempeñan un papel importante en el mantenimiento de los ecosistemas subterráneos, no sólo a través de la productividad primaria o su participación en los ciclos biogeoquímicos sino también por la formación de depósitos sedimentarios secundarios. La Cueva de la Iglesia y el Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec en el Campo Volcánico Chichinautzin (Morelos, México), son cuevas con diferentes características geomorfológicas cuyo microbioma no ha sido explorado. Por lo que su estudio representa una oportunidad para conocer la forma en la que la vida se diversifica en este tipo de sistemas. Para este estudio, se muestrearon tapetes microbianos, depósitos sedimentarios secundarios, suelo y sedimento de ambas cuevas. Se estudiaron las comunidades procariontes de ambas cuevas a través del análisis de la región hipervariable V4 de la subunidad 16S rRNA. Asimismo, con estos datos se realizó el análisis potencial de las comunidades procariontes para la fijación de carbono en oscuro mediante tres rutas: la ruta de las pentosas fosfato, la ruta del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato y el ciclo reductivo del ácido cítrico. Los resultados obtenidos no muestran diferencias en la composición taxonómica de las comunidades procariontes entre cuevas, pero si existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad alfa y beta determinadas. Además, se observan diferentes patrones de co-ocurrencia y distribución de los organismos en función del tipo de muestra. Estos resultados sugieren que se encuentran los mismos grupo taxonómicos en ambos sistemas (*i.e.* el Sistema de Chimalacatepec y La Cueva de la Iglesia), sin embargo, la abundancia y la interacción de los grupos cambia, tanto en función de la cueva como en función de la matriz abiótica (*i.e.* tapetes microbianos o depósitos sedimentarios secundarios), esto puede indicar que los mismos organismos tienen diferentes papeles en cada ambiente y microambiente. Además, existe el potencial para la fijación carbono en ausencia de luz, sin mencionar que, se detectaron géneros clave capaces de degradar compuestos orgánicos complejos, lo que muestra la importancia de estos organismos para el mantenimiento de las comunidades en estos sistemas. Finalmente, los resultados sugieren que las comunidades procariontes de los tapetes microbianos se encuentran en diferentes etapas de maduración, siendo los estromatolitos las muestras que presentan mayor consolidación en sus comunidades procariontes.

## 2 Abstract

Lava tubes are classified as pseudokarstic caves and are considered as extreme environments for life because they are aphotic sites, with nutrient limitations often found. Microorganisms play an important role in the maintenance of underground ecosystems, not only through primary productivity or their participation in biogeochemical cycles but also through the formation of secondary sedimentary structures. La Cueva de la Iglesia and the Chimalacatepec Lava Tube System in the Chichinautzin Volcanic Field (Morelos, Mexico) are caves with different geomorphological characteristics whose microbiome has not been explored. Therefore, their study represents an opportunity to learn about how life is diversified in these types of systems. For this study, microbial mats, secondary sedimentary structures, soil and sediment were sampled from both caves. The prokaryotic communities of both caves were studied through the analysis of the variable region V4 of the 16S rRNA subunit. We also employed this data to analyze the potential of prokaryotic communities for carbon fixation in the dark by three pathways: the pentose phosphate cycle, the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle and the reductive citric acid cycle. The results obtained do not show significant differences in taxonomic composition of the prokaryotic communities between caves, but there is significant differences in alpha and beta diversity. Also, different patterns of interaction and distribution are observed. These results suggest that the same taxonomic groups are found in both systems (*i.e.* Chimalacatepec System and La Cueva de la Iglesia), however, the abundance and interaction of the groups change in function of the cave and of the abiotic matrix (*i.e.* microbial mats or secondary sedimentary deposits), this suggests that the same organisms have different roles in each environment and microenvironment. Furthermore, there is the potential for carbon fixation in the absence of light, not to mention that key genera capable of degrading complex organic compounds have been detected, suggesting the relevance of these organisms for maintaining communities in these systems. Finally, the results suggest that the prokaryotic communities of the microbial mats are in different stages of maturation, being the stromatolites the samples that show greater consolidation in their prokaryotic communities.

### 3 Introducción

La actividad de los procariontes tiene una alta influencia en la meteorización de las rocas, el transporte de los minerales y la formación de nuevos depósitos sedimentarios (Gorbushina, 2007). Un claro ejemplo de esto, es la formación de estromatolitos, es decir, estructuras órgano-sedimentarias con un componente biótico de génesis. Estas estructuras son típicas de sistemas fóticos (Dupraz et al., 2009); no obstante, en los últimos años se ha reportado la presencia de estromatolitos en sistemas afóticos, específicamente en tubos de lava (López-Martínez et al., 2016). Existen diversos estudios que se han enfocado en la descripción de la composición y estructura de las comunidades procariontes en tapetes microbianos en sitios afóticos (Gonzalez-Pimentel et al., 2018; Northup et al., 2011; Zhu et al., 2019), y recientemente en estromatolitos silíceos (Luis-Vargas et al., 2019). Sin embargo, pocas investigaciones han dirigido sus esfuerzos en conocer el potencial biogeoquímico en estos tapetes y la interacción metabólica entre los organismos de las comunidades, procesos que pueden estar involucrados en la litificación de estructuras órgano-sedimentarias terrestres.

Los tubos de lava son sitios oligotróficos y afóticos, por lo cual constituyen lugares ideales para estudiar: i) la forma en la que se diversifica la vida en ausencia de luz, ii) las estrategias energéticas que utilizan los organismos para sobrevivir y iii) la fuente de bioelementos para la generación de biomasa (Ortiz et al., 2013). Dada la química de los basaltos, los espeleotemas formados en tubos de lava son principalmente de ópalo-A (mineral característico por su alto contenido de  $\text{SiO}_2$ ), y en algunos casos, éste se intercala con láminas de carbonatos y materia orgánica para dar lugar a formaciones estromatolíticas (Konhauser, 2016). En México, el mayor sistema de cuevas volcánicas conocido es el Sistema Tlacotenco, el cual derivó de una erupción del volcán Suchiooc, que a su vez pertenece a la Sierra del Chichinautzin (Espinasa-Pereña, 1999). Las cuevas de este sistema se han descrito principalmente desde una perspectiva geomorfológica y geoquímica, a excepción del Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec, en donde también se han descrito sus espeleotemas (López-Martínez et al., 2016) y la composición de las comunidades microbianas (Luis-Vargas et al., 2019).

Entre los nutrientes más importantes para la dinámica energética, de cualquier sistema natural, se encuentra el carbono (C). En los sistemas de superficie, los organismos fotosintéticos proporcionan el carbono necesario para la manutención del ecosistema. Sin embargo, en sistemas afóticos, es probable que la fijación de C esté dirigida por organismos procariontes

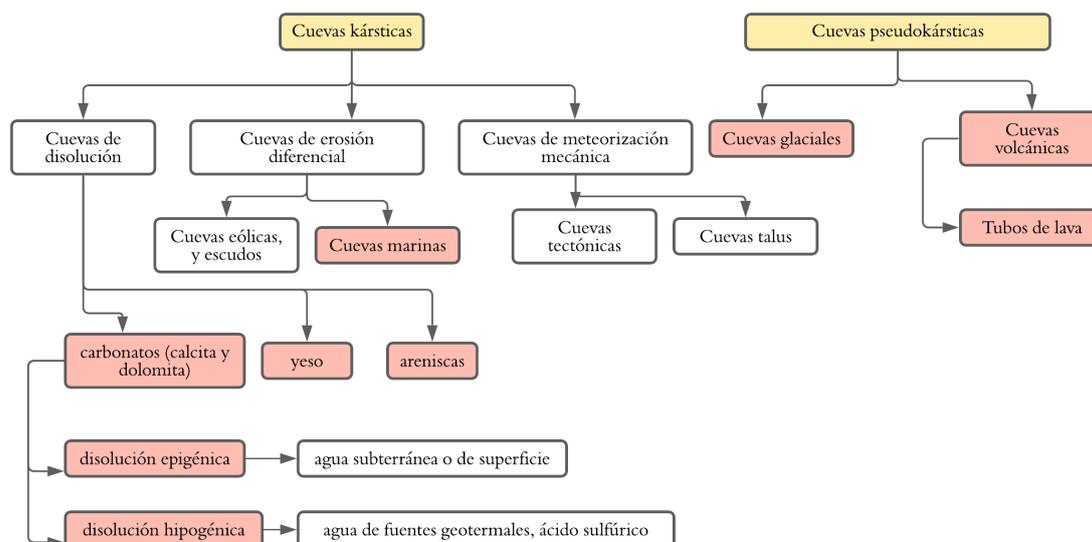
que utilizan rutas metabólicas diferentes a la fotosíntesis oxigénica para fijar carbono (Gong et al., 2018). La fijación de C en sistemas afóticos se ha estudiado en profundidades oceánicas (Reinthaler et al., 2010), en sistemas lacustres (Alfreider et al., 2017) y en sistemas de cuevas (Y. Chen et al., 2009). En la actualidad se conocen siete rutas de fijación de C en oscuro, llevadas a cabo tanto por organismos de Archaea (Offre et al., 2011) como de Bacteria (Berg, 2011). Por otro lado, investigaciones realizadas en cuevas han encontrado la actividad potencial de varias formas de la enzima RuBisCO del ciclo de las pentosas fosfato (De Mandal et al., 2017; Tebo et al., 2015). Sin embargo, a la fecha se desconoce el potencial para fijar carbono de las comunidades de tapetes en cuevas pseudokársticas.

## 4 Marco teórico

### 4.1 Características de las cuevas y tipos de cuevas

En términos geomicrobiológicos, las cuevas se caracterizan por ser hábitats con baja disponibilidad de nutrientes, ya que contienen poco carbono orgánico (Corg) ( $< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y nitrógeno disponible (Ghosh et al., 2017). La mayoría de la materia orgánica que se encuentra en las cuevas es alóctona, proviene de la superficie y se traslada por percolación a través del suelo hasta la cueva (H. A. Barton y Jurado, 2007). La cantidad de carbono orgánico que entre al sistema va a depender de la profundidad de la cueva y su relación con el suelo que hay sobre la misma (Hazel A. Barton, 2015). Además, las cuevas cuentan con una amplia variedad de interfaces redox que existen entre los microorganismos y las rocas de las cuevas. Cabe destacar que, la mayoría de las cuevas que se han estudiado presentan una humedad relativa entre 90-100% y la temperatura suele ser estable con leves fluctuaciones a través de las estaciones del año (Cheeptham, 2013).

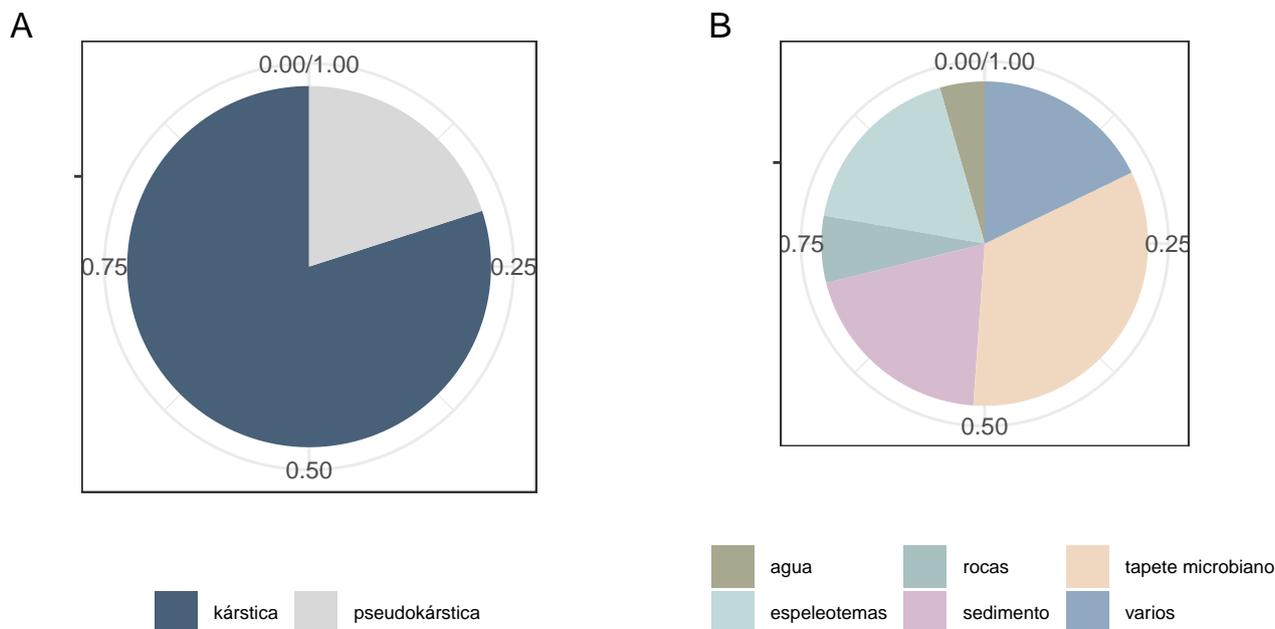
Existen diferentes tipos de cuevas que se diferencian principalmente por su composición física y química. Los sistemas de cuevas pueden estar clasificados con base en: i) la mineralogía de las rocas que las componen, ii) la proximidad que tenga con la superficie, y iii) la morfología y organización de los pasajes (Cheeptham, 2013). Sin embargo, las cuevas también pueden clasificarse en dos tipos: las cuevas kársticas y las cuevas pseudokársticas (**Figura 1**). Las cuevas kársticas se encuentran ampliamente distribuidas por todo el planeta, sus rocas se componen principalmente por carbonatos (calcita y dolomita), y la mayoría están formadas por la disolución de sus rocas (W. K. Jones y White, 2012). Por otro lado, las cuevas pseudokársticas incluyen a las cuevas generadas por erupciones volcánicas y las cuevas glaciares (Holler, 2019). Las cuevas volcánicas o tubos de lava se formaron a partir del flujo de lava de tipo pahoehoe (Valerio et al., 2008) y se caracterizan por estar compuestas de rocas basálticas, ricas en ópalo-A ( $\text{SiO}_2$ ) (Daza Brunet y Bustillo Revuelta, 2014). Es importante mencionar que, en la actualidad, las cuevas más estudiadas desde una perspectiva geomicrobiológica son las cuevas kársticas.



**Figura 1:** Tipos de cuevas. Las cajas de color naranja muestran las cuevas que han sido estudiadas desde una perspectiva geomicrobiológica. Modificado de Cheeptham et al., (2013).

## 4.2 Microbiología de las cuevas kársticas y pseudokársticas

Se sabe que los microorganismos juegan un papel importante en las formaciones de las estructuras de las cuevas, como en los depósitos sedimentarios secundarios (Engel, 2015). Sin embargo, también es importante conocer la composición, la diversidad e interacción de las comunidades microbianas, pues ésto permite comprender cómo se han adaptado a estos sistemas y qué estrategias metabólicas son las que han utilizado para sobrevivir. La vida microbiana en sistemas de cuevas se ha estudiado desde la década de 1940. Sin embargo, los avances en los métodos de biología molecular han permitido un avance significativo a partir de la década pasada (**Anexo sección A.1**). A partir del año 2010, los estudios de la composición y estructura de las comunidades procariontes en cuevas se han llevado a cabo principalmente en sistemas kársticos (~80%), dejando a los pseudokársticos en un vacío del conocimiento (**Figura 2.A**). Adicionalmente, los componentes muestreados en estos estudios corresponden a tapetes microbianos, rocas, espeleotemas, sedimentos encontrados dentro de la cueva y agua. En donde el análisis de la composición de las comunidades procariontes de los tapetes microbianos es dominante para ambos tipos de cuevas (**Figura 2.B**). Es importante mencionar que, la mayor proporción de estos estudios se han llevado a cabo a través de métodos de secuenciación, entre los métodos más comunes se encuentran los análisis de *metabarcoding* a partir de un fragmento del gen 16S rRNA (**Anexo sección A.1, Tabla A1 y Tabla A2**).



**Figura 2:** Proporción del número de estudios publicados (45 publicaciones) sobre microbiota de cuevas a partir del año 2010. A. Proporción por tipo de cueva (kárstica o pseudokárstica), y B. Proporción por tipo de muestra analizada (agua, roca, tapetes microbianos, espeleotemas, sedimento, u otros).

#### 4.2.1 Composición, diversidad y potencial biogeoquímico

Gran parte de los estudios de microbiología en sistemas de cuevas se centran en reportar los fila encontrados en las muestras y son pocos los que consideran hacer un análisis desde una perspectiva ecológica. Los fila encontrados con mayor frecuencia son: Actinobacteria (Actinobacteriota), Proteobacteria, Acidobacteria (Acidobacteriota), Verrucomicrobia (Verrucomicrobiota), Gemmatimonadates, Chloroflexi, Nitrospira (Nitrospirota) y Bacteroidetes (Bacteroidota) (De Mandal et al., 2017; Northup et al., 2011; Sauro et al., 2018; Talà et al., 2021). Los estudios que reportan diversidad alfa, utilizan los índices de Shannon y Simpson, siendo el índice de Shannon el más común. Tanto en cuevas kársticas como en pseudokársticas la diversidad alfa de los microorganismos es alta, pues el índice de Shannon es  $> 3$  en diversas muestras (He et al., 2019; Ircus et al., 2018; Park et al., 2020; Pfendler et al., 2018; Riquelme et al., 2015). Cabe destacar, que en los últimos años se han hecho esfuerzos por determinar los patrones de distribución de las comunidades microbianas en diferentes tipos de muestras, en donde se llevan a cabo análisis de diversidad beta y redes de co-ocurrencia (Dong et al., 2020; Park et al., 2020; Zhu et al., 2019).

Tanto en sistemas de cuevas kársticas como pseudokársticas, también se han realizado estudios para conocer el potencial funcional de las comunidades para la fijación de nitrógeno

(*nifH*), oxidación de amonio (*amoA*), fijación de carbono (*cbbL*, *cbbM*) y oxidación de azufre a través del uso de marcadores moleculares específicos (Hathaway et al., 2014; D. S. Jones et al., 2014; Marques et al., 2019; Tebo et al., 2015; Tetu et al., 2013). Además, algunos investigadores han utilizado herramientas bioinformáticas para predecir el perfil funcional de las comunidades a partir del 16S rRNA (Dong et al., 2020; Talà et al., 2021; Turrini et al., 2020), en los que se ha confirmado el potencial de las comunidades microbianas para fijar nitrógeno, oxidar amonio, reducir nitratos y fijar carbono a través de diferentes rutas (Dong et al., 2020).

#### 4.2.2 La fijación de C y sus implicaciones en la precipitación de minerales

La adquisición de carbono es fundamental para la manutención de la vida en cualquier sistema natural. Mientras que, en los sistemas de superficie, la obtención de C se lleva a cabo a través del proceso fotosintético, en los sistemas afóticos -como las cuevas- los organismos deben recurrir a otras estrategias. En términos metabólicos se piensa que en los sistemas subterráneos los procesos heterotróficos son dominantes y que los compuestos orgánicos provienen en gran medida de la superficie (Hazel A. Barton, 2015). Sin embargo, estudios recientes sugieren que la fijación de carbono en oscuro juega un papel también importante (Ortiz et al., 2014; Luis-Vargas et al., 2019).

Los sistemas subterráneos se encuentran entre los sistemas más inexplorados en términos de diversidad microbiana y de dinámica metabólica (Govil et al., 2019). Sin embargo, en los últimos años se han realizado diversos esfuerzos para conocer la actividad autótrofa de la vida microbiana en diferentes sistemas subterráneos (Alfreider et al., 2017; Hügler et al., 2010; Yakimov et al., 2011), incluyendo cuevas kársticas (Ortiz et al., 2014) y pseudokársticas (Tebo et al., 2015). Los estudios citados con anterioridad se han centrado en el análisis de tres rutas de fijación de carbono: el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, el ciclo reductivo del ácido cítrico y el ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato. Éstos estudios se han llevado a cabo con el uso de marcadores moleculares que permiten conocer la presencia potencial del gen que va a codificar la enzima clave para cada una de las rutas mencionadas (**Tabla 1**).

La precipitación de carbonatos es un proceso esencial para la formación de estructuras órgano-sedimentarias, la cual depende de la concentración de los iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y calcio en su forma libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Se sabe que en una solución con un pH mayor a 8, la precipitación de carbonatos se lleva a cabo de forma espontánea. Sin

**Tabla 1:** Marcadores moleculares utilizados en estudios de fijación de carbono en sistemas subterráneos.

Marcador	Enzima codificada	Grupos representativos	Referencia
<b>Ruta de las pentosas fosfato (CBB)</b>			
cbb	Ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa	Cianobacteria Betaproteobacteria Gammaproteobacteria Actinobacteria	Alfreider et al., 2009 Slesi et al., 2005
<b>Ciclo reductivo del ácido cítrico (rTCA)</b>			
acl	ATP-citrato liasa	Epsilonproteobacteria Nitrospira	Alfreider et al., 2017
<b>Ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato (3HP/4HB)</b>			
hcd	4-hidroxiacetil-CoA deshidratasa	Thaumarchaeota	Offre et al 2011, Yakimov et al., 2011

embargo, existen diversos factores que pueden cambiar la alcalinidad de la solución; entre estos se encuentran la presencia de organismos microbianos capaces de fijar carbono inorgánico. La fijación de carbono, elimina el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) de la atmósfera próxima, lo que genera un cambio de presión parcial del  $\text{CO}_2$  y un aumento en el pH de la solución. Esto genera una disminución en la solubilidad del  $\text{CaCO}_3$  y provoca su precipitación (Misra, 2012).

El cambio en el metabolismo de los organismos de los tapetes microbianos, hace que la dinámica de los carbonatos se modifique favoreciendo la bioprecipitación. Además de la fijación de  $\text{CO}_2$ , se ha demostrado que la sulfato reducción también induce la precipitación de minerales carbonatados, al aumentar el pH de la solución. Por el contrario, metabolismos como la fermentación, la respiración aerobia y la sulfuro oxidación generan un pH ácido en el medio, lo que aumenta la solubilidad de los carbonatos (Dupraz et al., 2009). Otro factor que influye en el balance de carbonatos, es la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés). Las EPS son generadas tanto por organismos autótrofos como heterótrofos y su función principal es propiciar el microambiente adecuado para el crecimiento microbiano y cohesionar al ensamble microbiano (Nazir et al., 2019). Sin embargo, también pueden inhibir la precipitación de carbonatos. Esto se debe a que las moléculas orgánicas cargadas negativamente (como los aminoácidos ácidos o los polisacáridos carboxilados), pueden unir una gran cantidad de cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Tourney y Ngwenya, 2009). En sistemas órgano-sedimentarios fóticos, la fijación por el ciclo de las pentosas fosfato, es el principal aportador de C, debido a la acción de cianobacterias y microalgas. En cambio, en sistemas afóticos sólo se conoce el caso de tapetes en cuevas kársticas (Ortiz et al., 2013), dejando un hueco de conocimiento para cuevas pseudokársticas.

## 4.3 Métodos para el estudio de sistemas de cueva

### 4.3.1 Análisis para el estudio de las comunidades procariontes

**4.3.1.1 Análisis de *metabarcoding*.** Con los avances en las tecnologías de secuenciación y análisis bioinformáticos, actualmente existe la posibilidad de evaluar la composición taxonómica de los organismos que forman parte de un ecosistema gracias al *metabarcoding*. El término *metabarcoding* hace referencia a la identificación de alto rendimiento de especies múltiples, utilizando el DNA total que puede estar degradado o activo, y que además es extraído de una muestra ambiental (Taberlet et al., 2012).

La mayoría de los estudios modernos de microbiología ambiental se basan en el análisis de secuencias del 16S RNA ribosomal (16S rRNA), para la identificación de procariontes. El gen 16S rRNA contiene ~1,500 pb e incluye nueve regiones hipervariables, en donde las regiones más conservadas se utilizan para hacer asignaciones taxonómicas (Tringe y Rubin, 2005). Sin embargo, también se han hecho análisis con *metabarcoding* utilizando genes funcionales con el fin de estudiar el potencial metabólico de las comunidades microbianas en un sistema en específico. Es importante mencionar que, este método es especialmente ventajoso por su capacidad de incrementar el número de lecturas de interés, de manera que es más sencillo realizar análisis cuantitativos a partir de ellos, sin mencionar que provee datos sobre organismos que no se han podido estudiar a través de medios de cultivo (Bukin et al., 2019). Los estudios que han utilizado este método tienen diversos enfoques como el análisis del impacto antrópico en la diversidad del suelo (Chariton et al., 2010), el estudio de la interacción de los organismos con su ambiente a través de redes de co-ocurrencia (Williams et al., 2014), e incluso el análisis de diversidad y potencial metabólico de los organismos en las cuevas para determinar nuevos metabolitos que funcionen como antibióticos (Ghosh et al., 2017).

**4.3.1.2 Aproximaciones para el estudio de la ecología microbiana.** Derivado de las técnicas de *metabarcoding*, existen diversas plataformas bioinformáticas que permiten realizar el análisis de las secuencias obtenidas. Entre éstas se encuentran QIIME2 (Bolyen et al., 2019), Bioconductor, UPARSE y mothur (Marizzoni et al., 2020). El proceso analítico que se lleva a cabo con estas plataformas consiste básicamente en: i) controlar la calidad de las secuencias, ii) agrupar las secuencias en función de su similitud y, iii) hacer una asignación taxonómica de los grupos de secuencias obtenidas. El avance tanto en las tecnologías de secuenciación, como en

las herramientas bioinformáticas, han permitido esclarecer el conocimiento de las comunidades microbianas desde una perspectiva ecológica y evolutiva.

Es necesario recalcar que los datos obtenidos a partir de los métodos de secuenciación masiva son de tipo composicional (Gloor et al., 2017). La composición de los organismos es representada como abundancias relativas, es decir, la proporción que tienen las secuencias de un taxón determinado en la comunidad. A partir de la abundancia relativa de los taxa, es como se puede llevar a cabo el resto de los análisis en ecología microbiana tales como: la determinación de índices de diversidad alfa y beta, análisis de especies indicadoras que hay en una muestra, las interacciones que pueden haber entre los organismos, entre otros (Lin y Peddada, 2020).

**4.3.1.2.1 Análisis de *core* microbiano** El concepto de *core* microbiano se estableció gracias al Proyecto del Microbioma Humano, y fue definido como el grupo de taxa o genes que son compartidos entre la mayoría de los seres humanos (Turnbaugh et al., 2007). Posteriormente éste concepto fue utilizado en el estudio del microbioma de otros organismos hospederos (Hernandez-Agreda et al., 2017; Wolz et al., 2017), y también en el estudio de otros sistemas ambientales como el suelo (Persina et al., 2018). La motivación para conocer a los organismos compartidos entre ciertos ambientes u hospederos, consiste en que se puede identificar procariontes que puedan tener una función importante en el sistema de estudio. Además en complemento con otros métodos, es posible inferir la organización de las comunidades procariontes y obtener una mejor comprensión de los procesos ecológicos y evolutivos involucrados en la interacción de los procariontes con su entorno (Risely, 2020).

**4.3.1.2.2 Análisis de diversidad.** Existen dos mediciones de diversidad que son comunes de encontrar en los estudios de ecología: la diversidad alfa y la diversidad beta. El término de **diversidad alfa** hace referencia a la variabilidad de organismos que hay en un complejo ecológico y se define a partir de la riqueza y la abundancia relativa de las especies en un espacio y tiempo determinado (Kim et al., 2017). Los índices de diversidad alfa más comunes en estudios de ecología de comunidades microbianas son el índice de Shannon-Weaver y el índice de Simpson. El índice de Shannon-Weaver (**1**), deriva de la teoría matemática de la información basada en la *entropía* (Shannon, 1948), es una medida de la elección asociada con una distribución de frecuencia (Legendre y Legendre, 2012). El valor aumenta a medida que aumenta el número de especies y a medida en que la distribución de individuos entre las

especies se vuelve uniforme. Por su parte, el índice de Simpson (**2**), mide la dominancia que tienen las especies en la comunidad a partir de la probabilidad de que al tomar dos individuos al azar éstos pertenezcan a la misma especie (Simpson, 1949).

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i \quad (1)$$

$$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2} \quad (2)$$

En donde,  $s$ : es número de especies y  $p_i$ : es abundancia relativa.

Por otra parte, la **diversidad beta** se define como la variación de la composición de los organismos a través de sitios o muestras con un área geográfica en común (Legendre y Legendre, 2012). Uno de los métodos más utilizados para la medición de la diversidad beta es la determinación de la disimilitud entre las comunidades a través de matrices de distancia, las cuales se puede utilizar en conjunto con técnicas de estadística multivariada (C. A. Lozupone y Knight, 2008). Las mediciones de disimilitud o similitud de las comunidades pueden estar en función de la presencia o ausencia de algunos taxa como los métodos de Jaccard y UniFrac no ponderado (C. A. Lozupone et al., 2007) o en función de la presencia o ausencia de los taxa y la abundancia relativa de los mismos, como los métodos de UniFrac ponderado (C. A. Lozupone et al., 2007) y Bray-Curtis (Chao et al., 2006). Los métodos de UniFrac se han utilizado constantemente en los estudios de ecología microbiana, pues permiten considerar la fracción de la longitud de la rama de un árbol filogenético de cada organismo de cada comunidad, para posteriormente comparar entre comunidades (C. A. Lozupone et al., 2007).

**4.3.1.2.3 Especies indicadoras** Las especies indicadoras son especies que funcionan como indicadores ecológicos de una comunidad en función del tipo de hábitat, las condiciones ambientales o los cambios en el entorno. En general, los análisis de especies indicadoras permiten clasificar sitios o muestras a partir de la comparación de los patrones de distribución de las especies (De Cáceres et al., 2010). Existen dos tipos de análisis computados que se pueden llevar a cabo para determinar las especies indicadoras de un sistema: *TWINSPAN* e *IndVal* (Legendre, 2013), siendo *IndVal* el método más utilizado en los últimos años. El método *IndVal*

considera un grupo de sitios y el conteo de organismos a un taxa determinado, en donde se compara las ocurrencias de los organismos entre los sitios correspondientes a un grupo. Sin mencionar que, el valor de significancia de cada valor indicador se calcula aleatoriamente con un número determinado de permutaciones. Cabe destacar que el valor del indicador es máximo cuando es igual a 1, ésto implica que los individuos de una especie determinada están en todos los sitios de un grupo y por tanto ese organismo es un buen indicador (Legendre, 2013).

**4.3.1.2.4 Análisis de interacción: redes de co-ocurrencia.** El estudio de los patrones de co-ocurrencia a partir de la abundancia de los organismos ha sido un método ampliamente utilizado en ecología. Se ha visto que los organismos no co-ocurren de manera aleatoria, por lo que los patrones de co-ocurrencia pueden ser utilizados para inferir la estructura de las comunidades y las interacciones que hay entre las especies (Berry y Widder, 2014). Las asociaciones entre microorganismos han sido inferidas en diferentes sistemas como en muestras de suelo (Barberán et al., 2012), de agua oceánica (Lima-Mendez et al., 2015) y microbioma humano (Faust et al., 2012). Los métodos más comunes para inferir co-ocurrencias a partir de datos de abundancia son: correlaciones de Pearson, Spearman y determinación de la distribución hipergeométrica (Faust y Raes, 2012). Las maneras en que los organismos co-ocurren o no es fácil de analizar a partir de la teoría de redes, pues las propiedades o topología que describen a una red permiten determinar las especies clave y los agrupamientos de organismos que pueden dar estructura a la comunidad microbiana (Layeghifard et al., 2017). Entre las propiedades de las redes que se pueden utilizar para dar una interpretación ecológica se encuentran: el grado medio ( $k$ ), la distribución del grado, el promedio de la ruta más corta ( $l$ ), el promedio del coeficiente de agrupamiento ( $C$ ), la centralidad de intermediación ( $BC$ ) y la centralidad de cercanía ( $CC$ ) (Berry y Widder, 2014).

**4.3.1.2.5 Predicción del potencial funcional de las comunidades a partir del 16S rRNA.** La versatilidad metabólica de los organismos procariontes ha sido de amplio interés en los estudios de ecología microbiana, pues las rutas metabólicas que puedan llevar a cabo regulan los ciclos biogeoquímicos de un sistema y el mantenimiento de la comunidad (Louca et al., 2018). Actualmente se pueden llevar a cabo predicciones del potencial funcional de una comunidad a partir del 16S rRNA. Los algoritmos más utilizados para realizar este proceso son: PICRUSt (Langille et al., 2013) y Tax4Fun2 (Wemheuer et al., 2018). A pesar de que ambos se basan en la predicción de genes a partir del 16S rRNA, PICRUSt utiliza la base de

datos de Greengenes (DeSantis et al., 2006) y genera las abundancias esperadas de familias de genes. Mientras que, **Tax4Fun2** utiliza la base de datos de SILVA (Quast et al., 2013) y genera un índice de redundancia funcional (FRI). El índice de redundancia funcional incorpora información sobre la distribución filogenética de los miembros de la comunidad con el potencial de llevar a cabo una función en específico y la proporción que tienen en la comunidad total (Wemheuer et al., 2018), lo que permite que la predicción sea más precisa.

#### 4.3.2 Métodos para el análisis ambiental

Las mediciones tomadas a través de métodos geoquímicos permiten contextualizar el entorno en el que habitan los organismos. La caracterización geoquímica de un sitio incluye el análisis de agua, roca, suelo y sedimentos, pues cada uno de estos componentes arroja información diferente del ambiente, además modifican la respuesta de los organismos de forma distinta (Altfelder et al., 2007). Los análisis elementales de muestras ambientales, nos facilita inferir tanto los procesos que pueden estar ocurriendo en el sistema como la posible composición química del material que se está analizando o de los componentes circundantes. Entre las pruebas multielementales se encuentran aquellas que utilizan Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP), ya sea acoplado a Espectrofotometría de Emisión Óptica (OES) o con Espectrometría de Masas (MS). Las pruebas multielementales resultan particularmente útiles para analizar muestras ambientales, pues son relativamente accesibles y tienen un amplio rango de detección, hasta en el orden de partes por billón (Bolann et al., 2007).

Dentro de las pruebas más comunes para conocer las propiedades de las muestras ambientales de agua, se encuentra la determinación de cationes y aniones mayoritarios por medio de cromatografía de iones (IC) con detección conductimétrica. La determinación de iones es esencial para los análisis geomicrobiológicos pues muchos de éstos son vitales para el desarrollo de los microorganismos. Por ejemplo los cationes monovalentes están implicados en el transporte e intercambio iónico. El método de IC se encuentra dentro de la clasificación de las técnicas de HPLC, con la diferencia de que el detector utilizado es de conductividad el cual se basa en la propiedad que tienen los electrolitos de conducir corriente eléctrica. Además no emplea la propiedad de hidrofobicidad como principal forma de separación, como en las técnicas HPLC *sensu stricto*. El detector de IC es de alta sensibilidad y responde de forma predecible a los cambios de concentración (Zamora Martínez et al., 2016).

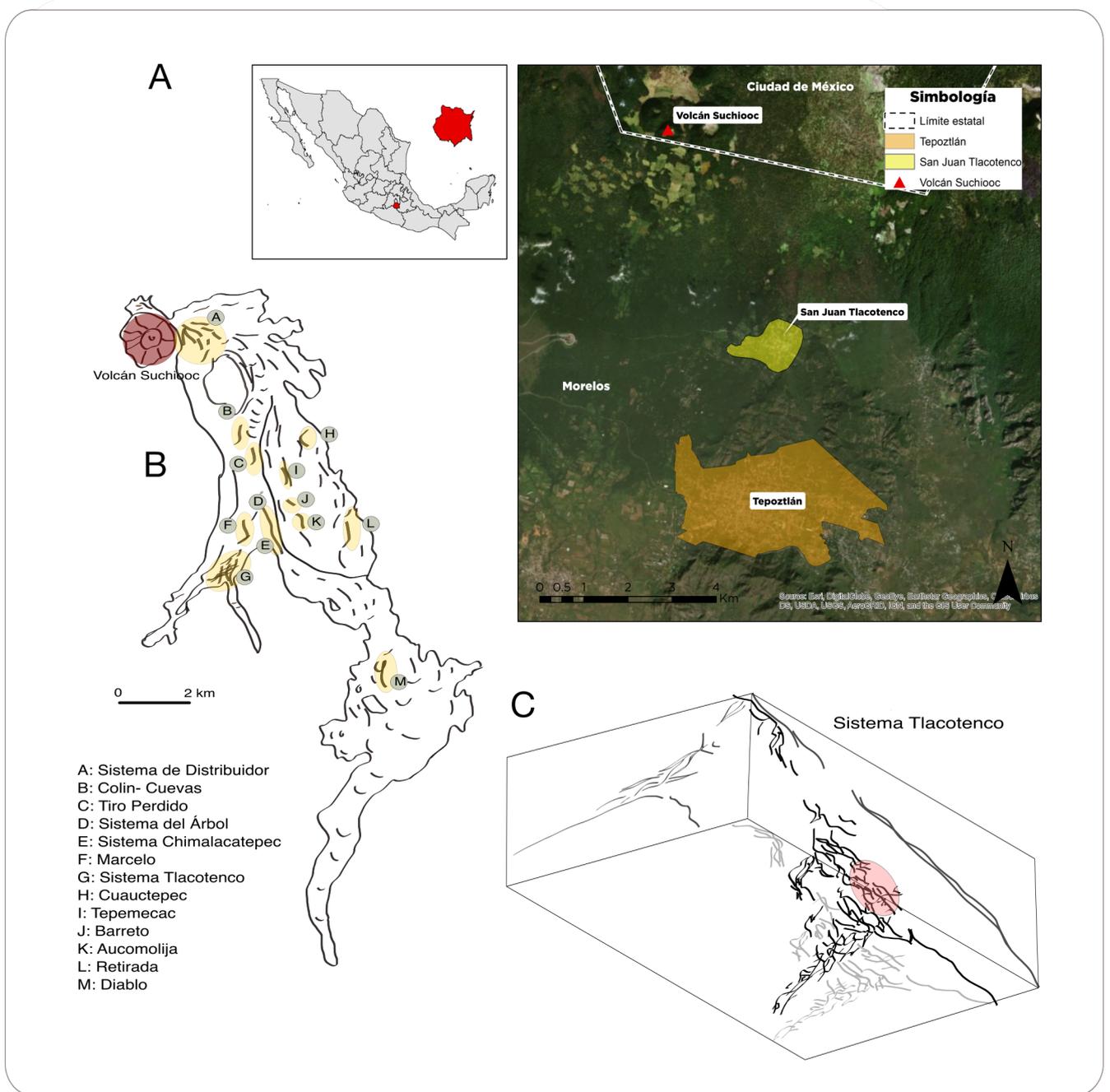
## 5 Antecedentes

### 5.1 Sierra del Chichinautzin y el volcán Suchiooc

La Sierra del Chichinautzin está situada a ~280 km de la fosa Mesoamericana y pertenece al Eje Neovolcánico Transversal Mexicano. Tiene un área aproximada de ~5945 km<sup>2</sup> y está constituida por 220 centros volcánicos monogenéticos cuaternarios separados por grandes volcanes poligenéticos como el Popocatépetl. El volcán Suchiooc se encuentra ubicado en la porción central de la Sierra del Chichinautzin, a 8 km de Tepoztlán, Morelos (**Figura 3.A**), y es un volcán monogenético ubicado en la zona central del Eje Neovolcánico Transversal (Espinasa-Pereña, 2006). El volcán Suchiooc, es la estructura más joven de un conjunto de volcanes, denominados los Otates. Tiene 200 m de alto y varios tubos de lava asociados que fueron generados a partir de la erupción de lavas tipo pahoehoe ( $\text{SiO}_2 > 52\%$ ) (Espinasa-Pereña, 1999), en donde el derrame superó los 18 km (**Figura 3.B**). Entre los sistemas de tubos de lava formados se encuentran el Sistema de Chimalacatepec y el Sistema Tlacotenco, este último contiene a la Cueva de la Iglesia (**Figura 3.B-C**). Cabe destacar que la geoquímica realizada por Espinasa-Pereña (1999) indica que las rocas de los tubos de lava generados por el volcán Suchiooc pertenecen a la serie calco-alcalinas.

### 5.2 La Cueva de la Iglesia

El Sistema Tlacotenco tiene 16,032 m de longitud y una extensión vertical de 301 m y está formado por 12 cuevas diferentes (**Figura 3.B-C**), entre ellas se encuentra la Cueva de la Iglesia. La Cueva de la Iglesia (**Figura 4**) tiene una longitud de 5,278 m y una extensión vertical máxima de 60 m, siendo la segunda cueva de origen volcánico más larga de América continental. Se conocen seis entradas, tres de las cuales fueron bloqueadas por los dueños de los terrenos en donde se encuentran. La cueva tiene un pasaje principal (Galería Principal) cuyas dimensiones son de 10 m, tanto de alto como de ancho y una longitud de 400 m. De la Galería Principal se desprende, a niveles superiores, y en varios sistemas de galerías anastomosadas, muchas de las cuales siguen sin ser exploradas (Espinasa-Pereña, 1999, 2006).

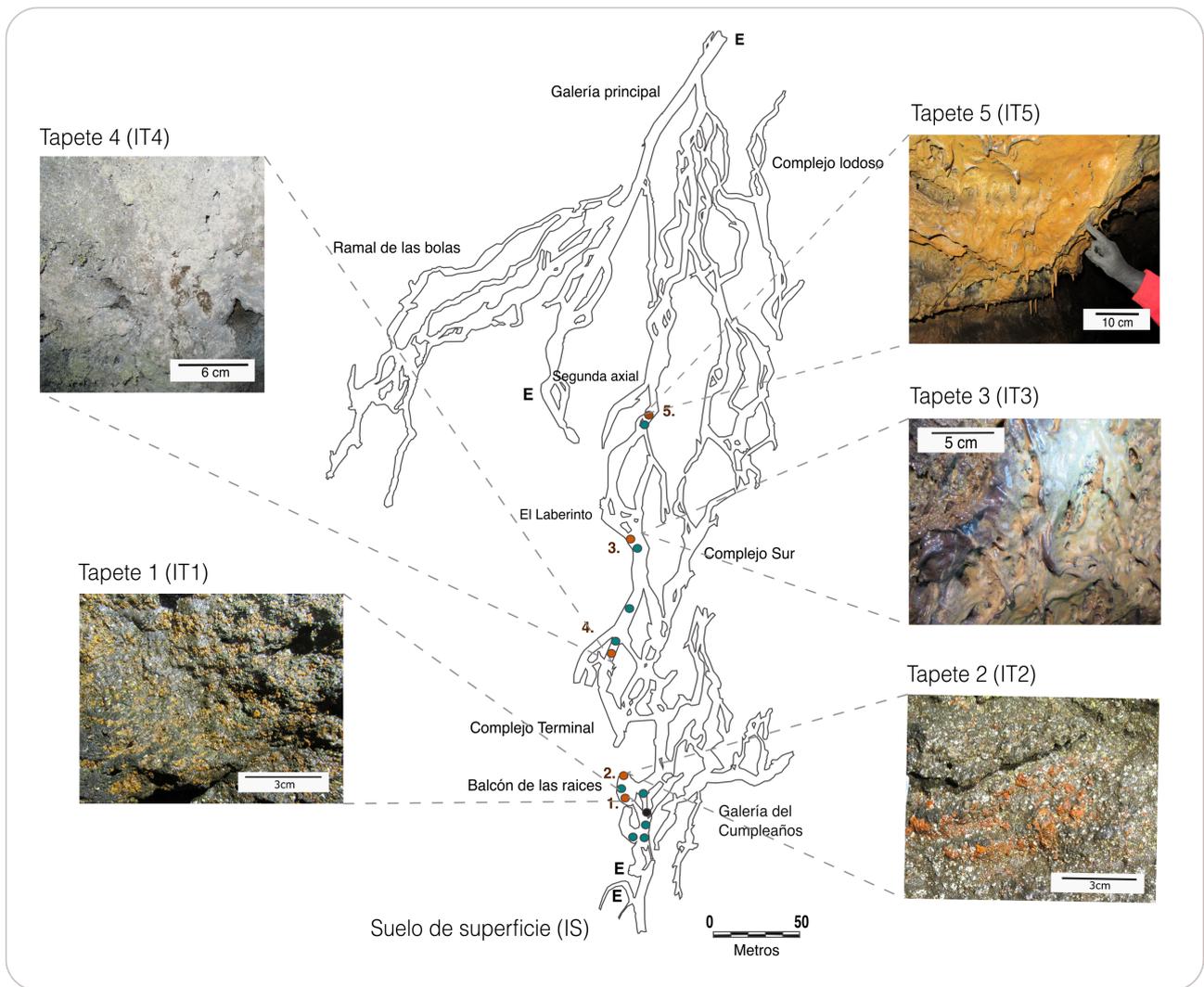


**Figura 3:** A. Ubicación del volcán Suchioco. B. Representación del derrame de lava generado por la erupción del volcán Suchioco. Los círculos amarillos resaltan los tubos formados por dicho derrame, en donde se puede localizar al Sistema de Chimalcatepec (E) y al Sistema Tlacotenco (G). Modificado de Espinasa-Pereña (1999). C. Representación del Sistema Tlacotenco, el círculo rojo resalta la ubicación de la Cueva de la Iglesia. Modificado de Espinasa-Pereña (2006).

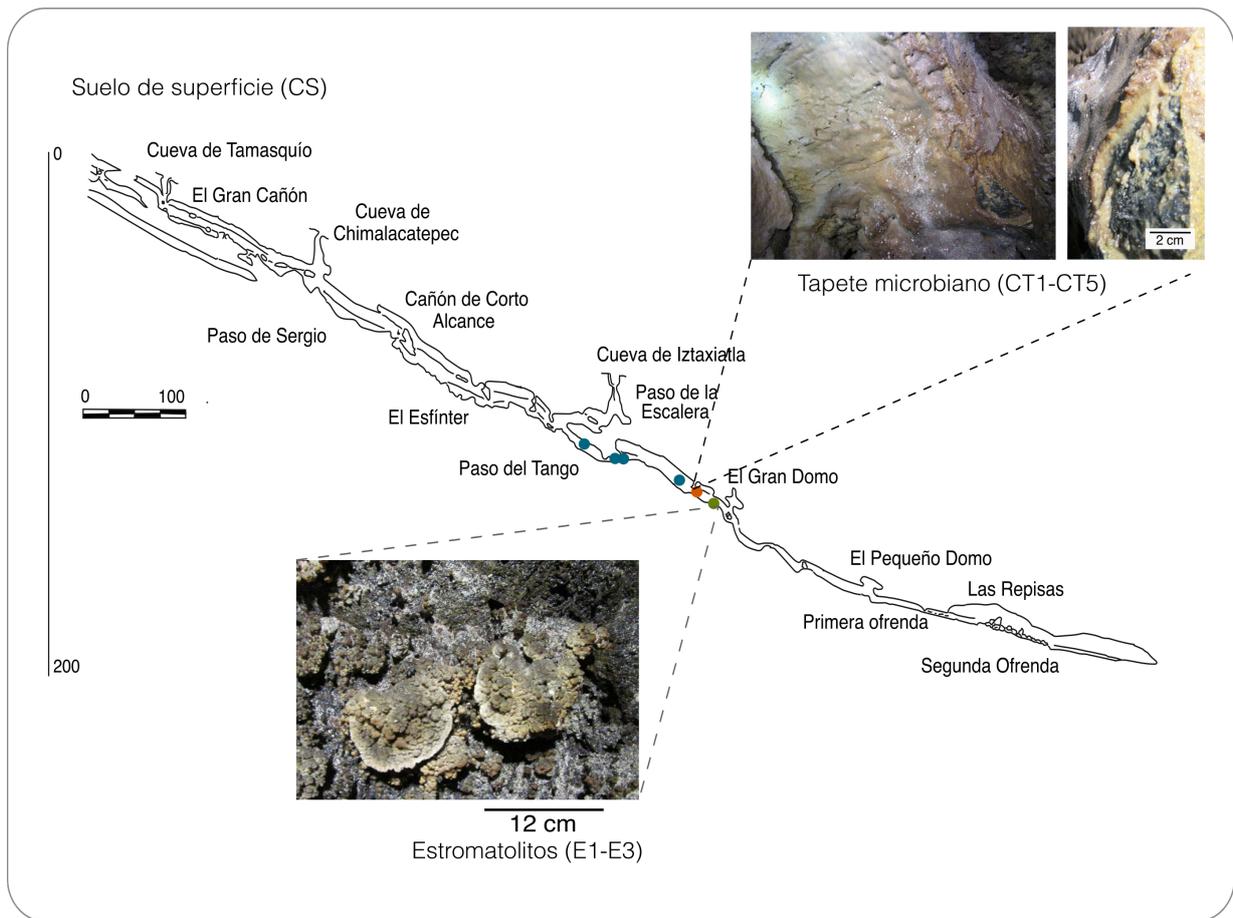
### 5.3 El Sistema Chimalacatepec

El Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec (**Figura 5**) es un pasaje largo y se caracteriza por tener varias porciones con derrumbes. Espinasa-Pereña (1999), divide el Sistema Chimalacatepec en tres secciones: i) la sección Norte, que se compone por la Cueva del Tamasquío, El Gran Domo y el Esfínter; ii) la sección Central, conformada por la última parte de El Esfínter, el Paso del Tango, la Cueva de Iztaxiatla y el Gran Domo; y iii) la sección Sur, constituida por El Pequeño Domo, Las Repisas y la Galería Final, sin mencionar a las tres ofrendas. Cabe resaltar que a partir de la sección de el Gran Domo, la galería disminuye en altura y aumenta a lo ancho.

El único estudio que existe en sistemas pseudokársticos en México a la fecha, se llevó a cabo en el tubo de lava de Chimalacatepec. En este estudio se describió la comunidad procarionte de tapetes microbianos y estromatolitos encontrados en la cueva. En el tubo de lava de Chimalacatepec los grupos Actinobacteria (Actinobacteriota), Proteobacteria, Chloroflexi y Acidobacteria (Acidobacteriota) fueron dominantes (Luis-Vargas et al., 2019). Además, se concluyó que ambos componentes (*i.e.* estromatolitos terrestres y tapetes microbianos) tienen una composición similar y una diversidad alfa alta, lo que sugiere que los organismos se encuentran relacionados con la formación de los estromatolitos del sistema.



**Figura 4:** Topografía y muestreo de La Cueva de la Iglesia. Los puntos naranjas indican los sitios donde se muestrearon los tapetes microbianos (IT), los puntos azules indica sitios donde se muestreó agua de goteo y el punto café indica el sitio donde se muestreo sedimento (ISD). E: entrada.



**Figura 5:** Topografía y muestreo del Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec. El punto naranja indica el sitio donde se muestrearon los tapetes microbianos (CT), el punto verde indica el sitio donde se muestrearon los estromatolitos (CE) y los puntos azules indican sitios donde se muestreó el agua de goteo.

## 6 Justificación

En México los estudios en cuevas tienen principalmente una perspectiva geológica y geomorfológica, siendo pocos los que han caracterizado a sus microorganismos y/o su potencial biogeoquímico a través de herramientas de secuenciación masiva. Los sistemas de cueva son de sumo interés biológico debido a que sus condiciones ambientales permiten el establecimiento y desarrollo de microorganismos con una diversidad taxonómica y metabólica poco conocida, en especial, en lo que concierne a sus estrategias para la producción primaria. Además conocer esta microbiota permite comprender los procesos de interacción mineral-microorganismo que han existido desde los periodos más antiguos de la Tierra. Entre los sistemas de cuevas, destacan los sistemas pseudokársticos en el centro de México, debido a que la actividad volcánica ha propiciado la formación de tubos de lava, que son cuevas con paredes basálticas con una química diferente de aquellas carbonatadas. La Sierra del Chichinautzin es uno de los campos volcánicos más grandes en México, donde se encuentran los tubos de lava de Chimalacatepec y La Cueva de la Iglesia. Estos tubos de lava son un excelente modelo para estudiar diversidad metabólica de procariontes, sus patrones de distribución y la interacción de las comunidades a través de diferentes componentes de las cuevas pseudokársticas (*i.e.*, tapetes microbianos, estromatolitos terrestres y sedimentos), así como los procesos de producción primaria a través de la fijación de carbono en la biosfera oscura. Por ello en este proyecto se propone el estudio de las comunidades procariontes de los tubos de lava del sistema de Chimalacatepec y de la Cueva de la Iglesia, lo cual permitirá tener un mejor entendimiento de la bioformación de las estructuras órgano-sedimentarias afóticas que se encuentran en las cuevas de origen volcánico.

## 7 Objetivos

### 7.1 Objetivo general

Determinar la composición, estructura, patrones de distribución e interacción y potencial funcional de las comunidades procariontes de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia, México.

### 7.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar la composición y de la diversidad de las comunidades procariontes de diferentes componentes (*i.e.*, estromatolitos, tapetes microbianos, sedimento y suelo de superficie) del tubo de lava de Chimalacatepec y de la Cueva de la Iglesia, a través del marcador genético V4 del 16S rRNA.
2. Determinar los patrones ecológicos de distribución e interacción de los organismos pertenecientes a las comunidades procariontes de los componentes colectados en ambas cuevas.
3. Determinar el potencial funcional de las comunidades procariontes de ambos sistemas de cueva, en especial aquellos procesos involucrados en la producción primaria tales como las rutas de fijación de carbono en oscuro.

## 8 Hipótesis

1. Debido a que las cuevas son similares en cuanto a composición mineralógica, formación y clima, es posible que las comunidades de ambos sistemas sean semejantes en cuanto a composición taxonómica, diversidad y perfil metabólico.
2. Otros estudios en sistemas de cuevas (kársticas) (Zhu et al., 2019) reportaron que a pesar de que la composición taxonómica es similar en todos sus sitios de estudio, al hacer un análisis de co-ocurrencia se encontró que los patrones de distribución de los organismos están determinados por el tipo de muestra. Por tanto, en este estudio se espera encontrar un patrón similar en función del tipo de matriz (*i.e.* suelo, estromatolitos y tapetes microbianos).
3. Ya que existe evidencia de la presencia de grupos procariontes que llevan a cabo la fijación de carbono en oscuro, tanto en cuevas como en otros sistemas subterráneos (Alfreider et al., 2017; Tebo et al., 2015), se espera encontrar el potencial genético para las rutas aerobias no fotosintéticas para la fijación de carbono, las cuales son: el ciclo de las pentosas fosfato, el ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato y el ciclo reductivo del ácido cítrico.

## 9 Métodos

### 9.1 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en noviembre de 2019. Para ambas cuevas se muestrearon tapetes microbianos, suelo superficial y agua de goteo. Para la Cueva de la Iglesia también se muestreó sedimento dentro de la cueva, mientras que para el Sistema Chimalacatepec se colectaron tres estromatolitos (ver **Tabla 2** y **Figuras 4** y **5**). Los identificadores de las muestras y su significado se pueden consultar en la **Tabla 3**. La toma de muestras se realizó con material estéril (tubos de microcentrífuga y espátula) y guantes para evitar contaminación. Las muestras se mantuvieron en obscuro y a 4°C durante su traslado al laboratorio, donde finalmente se almacenaron a -20°C. Cabe mencionar que las muestras de agua de goteo se tomaron cerca de los tapetes microbianos. Las muestras fueron filtradas con membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  para medir los parámetros fisicoquímicos: pH, temperatura, conductividad eléctrica y alcalinidad. Las primeras tres mediciones se obtuvieron con un medidor *Hach Pocket Pro and Pro+ Testers*, mientras que, la alcalinidad se obtuvo con un espectrofotómetro *Hach DR 1900*. Además, dentro de cada cueva se midió la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico, la temperatura y el porcentaje de humedad relativa para conocer las condiciones atmosféricas de las cuevas.

**Tabla 2:** Número de muestras tomadas por tipo de muestra y por localidad.

Tipo de muestra	Iglesia	Chimalacatepec
Tapete microbiano	5 (x3)	5 (x3)
Suelo	1 (x3)	1 (x3)
Sedimento	1 (x3)	0
Estromatolito terrestre	0	3 (x3)
Agua de goteo	9	4

**Tabla 3:** Identificadores de las muestras por tipo y localidad.

Tipo de muestra	Iglesia	Chimalacatepec
Tapete. Microbiano	IT	CT
Suelo	IS	CS
Sedimento	ISD	-
Estromatolito terrestre	-	CE
Agua de goteo	IA	CA

## 9.2 Análisis geoquímicos

De cada muestra de agua de goteo se determinaron en laboratorio: i) cationes mayoritarios ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y aniones mayoritarios ( $\text{F}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) por medio de cromatografía de iones con detección conductimétrica; iii) elementos, mediante espectrometría de emisión con fuente de ionización (ICP-OES), en donde el instrumento analítico que se utilizó fue un Perkin-Elmer Optima 8300 DV; y iv) carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (CI), carbono total (CT) y nitrógeno total (NT). Cabe destacar que los tres primeros análisis se efectuaron en el Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía del Instituto de Geología, UNAM y el último, en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería, UNAM.

## 9.3 Análisis de *metabarcoding*

### 9.3.1 Extracción, cuantificación y purificación de DNA

Se extrajo DNA de los tapetes microbianos, del suelo superficial y de los estromatolitos colectados. Para esto se pesaron aproximadamente 0.25 g de muestra (en peso húmedo) y se siguió el protocolo de extracción del kit DNeasy Power Soil (Qiagen). El DNA obtenido se eluyó en 40  $\mu\text{L}$  de la solución C6 del kit mencionado (10 mM Tris, sin EDTa). Posteriormente, el DNA se cuantificó a través de fluorometría con un Qubit 4 Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific) empleando el ensayo Qubit dsDNA High Sensivity (Thermo Fisher Scientific). El DNA obtenido se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

### 9.3.2 Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA

El protocolo de amplificación se llevó a cabo de acuerdo con el mencionado por el *Earth Microbiome Project* (Gilbert et al., 2014). El DNA extraído se utilizó como molde para la amplificación de la región V4 del 16S rRNA con los *primers* 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). El *primer reverse*, contenía una secuencia Golay para facilitar la identificación durante los análisis bioinformáticos. La reacción de PCR fue preparada a un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo: 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X Takara ExTaq PCR buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  de desoxirribonucleotidos

trifosfato (dNTPs) a 200  $\mu$ M, 0.75  $\mu$ L de cada primer (10 pmol), 1.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  a 25 mM, 2  $\mu$ L de DNA metagenómico (5-10 ng) y 0.125 U de Taq Polimerasa (Takara Taq TM). La 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 ciclo 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 de agua destilada, 0.30 g de agarosa (Axygen), 0.6 mL TAE 50X y 3  $\mu$ L de SYBR Safe (Invitrogen) y visto a través de luz UV. Los amplicones fueron purificados y secuenciados en la plataforma de Illumina MiSeq de la universidad de Yale (Yale Center for Genome Analysis), Estados Unidos de América.

## 9.4 Amplificación de genes funcionales para fijación de C

Con base en la literatura, se realizó una búsqueda de los genes más frecuentes en sistemas subterráneos. Para este estudio se seleccionaron ocho marcadores relacionados con alguna ruta de fijación de carbono. Dichos marcadores se encuentran enlistados en la **Tabla 4**. La presencia y el tamaño de cada gen fue verificada en un gel de agarosa al 1% y visto a través de luz UV.

**Tabla 4:** Marcadores moleculares previamente reportados para la fijación de carbono.

Primer	Secuencias 5'-3'	Amplicón (pb)	T <sub>M</sub> (°C)*	Referencia
<b>cbbL (RuBisCO-IA) (Ciclo CBB)</b>				
cbbL-IA-f	CGGCACSTGGACACSGTSTGGAC	620	54	Alfreider et al., 2003
cbbL-IA-r	GTARTCGTGCATGATGATSGG			
cbbLG1F	GGC AAC GTG TTC GGS TTC AA	1100	57	Selesi et al., 2005
cbbLG1R	TTG ATC TCT TTC CAC GTT TCC			
<b>cbbL (RuBisCO-IC) (Ciclo CBB)</b>				
cbbL-IC-f	GAACATCAAYTCKCAGCCCTT	552	55	Alfreider et al., 2009
cbbL-IC-r	GAACATCAAYTCKCAGCCCTT			
cbbLR1F	AAGGAYGAYGACGAGAACATC	818	57	Selesi et al., 2005
cbbLR1R	TCGGTCGGSGTGTAGTTGAA			
<b>hcd (4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa) (Ciclo 3HP/4HB)</b>				
hcd-465F	GGHGGTGCWATGACTGA	839	50.9	Ofre, 2010
hcd-1267R	CTCATTCTGTTTTCHACATC			
4HBD312F	TTCCAAAGATGTGTYGGWATGG	1048	55	Yakimov et al., 2011
4HBD1360R	CCATGCATTGATTCHGTAA			
<b>acl (ATP citrato liasa) (Ciclo rTCA)</b>				
aclA-f680	TNGGHGARRTNGGNGG	811	50	Alfreider et al., 2017
aclA-r1491	AYDCKRTGNCCDATNCC			
aclA-f87	TDMARTTYGGNCAYGCNGGNGC	564	55	Alfreider et al., 2017
aclA-r1371	GCNCCDCCRAANCKNGNCCDAT			

\* T<sub>M</sub>: Temperatura de alineamiento (PCR).

## 9.5 Análisis de datos

### 9.5.1 Análisis de datos hidrogeoquímicos y atmosféricos

Debido a las características geomorfológicas de cada cueva, no fue posible coleccionar el mismo número de muestras de agua de goteo en los sitios (**Tabla 2**). Con el fin de que los resultados fueran comparables entre ambos sitios, se realizaron muestras compuestas solo para la Cueva de la Iglesia y aleatoriamente se descartó una muestra del Sistema de Chimalacatepec, los datos completos se encuentran en la sección de Anexos (**A.3**). A partir de este nuevo conjunto de datos se obtuvo la media y la desviación estándar de los resultados de los parámetros fisicoquímicos, contenido de C y N y concentración de elementos químicos. Con respecto al análisis de iones mayoritarios, se realizó un diagrama de Piper (Piper, 1944) con la paquetería `hydrogeo` de `Rv4.0.3`, esto con el fin de conocer el tipo de agua dominante en cada sistema.

### 9.5.2 Análisis de secuencias 16S rRNA

El análisis de secuencias 16S rRNA fue llevado a cabo con la línea de comandos `QIIME2 v2020.8` (Bolyen et al., 2019), en donde se utilizó el algoritmo de `DADA2` para llevar a cabo el apareamiento, filtrado de calidad y agrupamiento de las secuencias en ASVs (secuencias variantes de amplicón) (Callahan et al., 2016). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con `mafft` (Kato et al., 2002) y el árbol filogenético fue computado con el algoritmo de `fasttree2` (Price et al., 2010). Por otro lado, los ASVs obtenidos fueron clasificados con la base de datos de `SILVA v138` para la región 515F/806R del 16S rRNA, en donde el amplicón resultante mide en promedio 292 pb (Ziesemer et al., 2015). Con estos resultados se llevó a cabo un análisis de rarefacción en función de la muestra con menor cantidad de secuencias. Adicionalmente, para conocer la diversidad alfa de las muestras se calcularon los índices de Shannon y Simpson inverso con el plugin `qiime diversity alpha`. Con el objetivo de determinar el número de ASVs que se comparten entre las muestras, se llevó a cabo un análisis de *core* microbiano con el plugin `qiime feature-table core-feature` a nivel de género. Finalmente, con el fin de comparar los resultados obtenidos de manera experimental e *in silico*, se realizó una predicción metabólica en la cual se utilizaron los ASVs obtenidos con el algoritmo de `Tax4Fun2` (Wemheuer et al., 2018).

### 9.5.3 Análisis estadísticos y visualización de datos

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con la plataforma de R v4.0.3 a través del uso de diferentes paqueterías. Para conocer la composición de las comunidades microbianas, se realizaron gráficos de barra para visualizar la abundancia relativa de todas las muestras de cada una de las cuevas. Para determinar si existen diferencias significativas entre la diversidad alfa de los tapetes microbianos de ambas cuevas, se llevó a cabo una prueba de medias para muestras independientes en dos grupos (*t de student*). Para esto previamente se comprobó la normalidad y la homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Wilks y Fisher, respectivamente. Por otra parte, para visualizar la diversidad beta de las comunidades procariontes de ambas cuevas, se realizó un NMDS con distancia UniFrac ponderada (C. Lozupone y Knight, 2005), a través de la paquetería de `phyloseq` (McMurdie y Holmes, 2013). Con el objetivo de fundamentar estadísticamente las agrupaciones observadas en el NMDS, se realizó un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA), con  $n = 999$  permutaciones aleatorias mediante la función `adonis()` de la paquetería `vegan`.

Con la finalidad de detectar el número de ASVs que se comparten entre las muestras de cada cueva y entre los tapetes microbianos de la cueva de Chimalacatepec e Iglesia, se utilizó la paquetería `limma` (Ritchie et al., 2015). Para la visualización de ASVs compartidos se crearon diagramas de Venn con el paquete `bioinfokit` en `python 3.8`. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de especies indicadoras (IndVal) en función del tipo de muestra para cada sistema. El análisis se realizó a nivel de género a través de la función `miltipatt()` de la paquetería `indicspecies` (De Cáceres et al., 2010), en donde el valor de  $p$  fue calculado mediante  $n = 999$  permutaciones aleatorias. Para la visualización de estos resultados se seleccionaron los géneros con un valor indicador  $> 0.5$  y con un valor de  $p$  significativo ( $< 0.05$ ).

Finalmente, se realizaron redes de co-ocurrencia a nivel de género y a través de los diferentes tipos de muestra. Las correlaciones de Spearman se llevaron a cabo mediante la paquetería `psych`, en donde el valor de  $p$  fue calculado con  $n = 999$  permutaciones aleatorias y corregido a través del método de Holm-Bonferroni (S. Y. Chen et al., 2017). Con el propósito de reducir la complejidad de la red, se seleccionaron aquellas correlaciones que fueran estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) y en donde el estadístico tuviera un valor  $> 0.7$ . Adicionalmente, se utilizó la paquetería de `igraph` (Csardi y Nepusz, 2006) para describir la topología de las redes y para identificar las comunidades dentro de la red a través del método de Louvain (Blondel et al., 2008). Finalmente, la visualización de las redes se realizó con la paquetería de `ggraph`.

## 10 Resultados

### 10.1 Parámetros ambientales de los tubos de lava de Chimalacatepec y la Cueva de la Iglesia

#### 10.1.1 Condiciones atmosféricas

Las condiciones atmosféricas de cada una de las cuevas fueron medidas cerca de los tapetes microbianos o estromatolitos encontrados (**Tabla 5**). Se tomó una medición en el exterior de cada una de las cuevas para tener un marco de referencia. En primera instancia, la concentración de dióxido de carbono incrementó dentro de la cueva con respecto al exterior. Además el promedio de la concentración de CO<sub>2</sub> en la Cueva de la Iglesia (637 ppm) es mayor que en el Sistema Chimalacatepec (570 ppm). Mientras que, la humedad relativa de ambos sistemas es similar y se mantiene mayor o cerca del 60%. Con respecto a la temperatura, ambos sistemas son templados con un rango entre 17°C y 19°C.

**Tabla 5:** Condiciones atmosféricas para los sitios de estudio.

Punto	CO <sub>2</sub> (ppm)	T (°C)	Humedad relativa (%)
<b>Cueva de la Iglesia</b>			
I1 (ext)*	231	19.1	63.8
I2	476	18.9	58.3
I3	819	17.8	64.4
I4	724	17.9	67.6
I5	768	19.2	69.4
I6	806	19.1	69.2
<b>Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec</b>			
C1 (ext)	489	23.5	60.6
C2	571	18.7	64.6
C3	504	17.6	66.4
C4	643	17.0	73.1
C5	563	17.5	73.1
C6	653	17.3	72.9

\* ext: sitio externo de la cueva.

#### 10.1.2 Química del agua de goteo

Los resultados obtenidos a partir de la medición de los parámetros fisicoquímicos del agua de goteo de ambas cuevas, se encuentran resumidos en la **Tabla 6** y los datos completos se

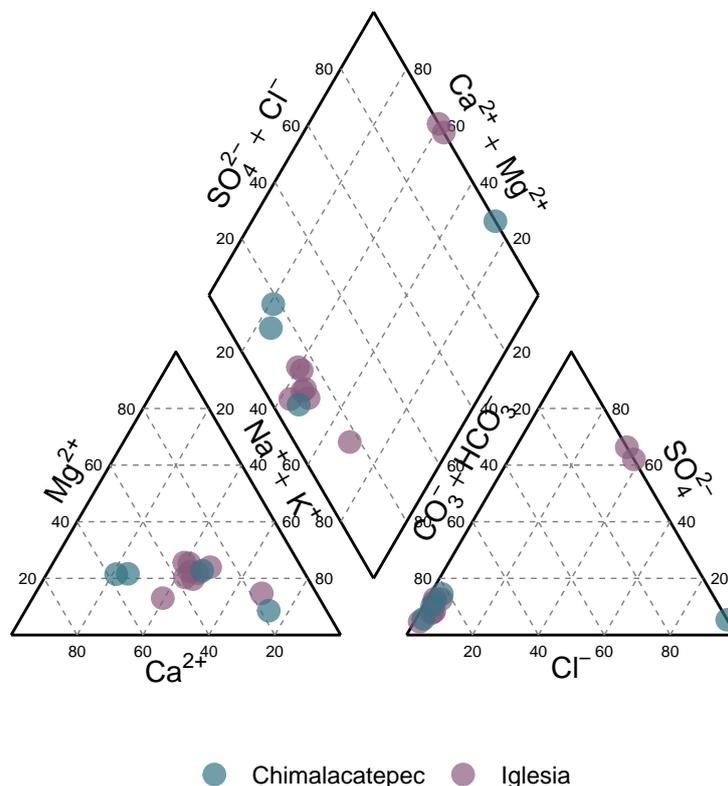
encuentran en la **Tabla A3**. Los parámetros fisicoquímicos de ambos sistemas indican que el agua de goteo tiene una naturaleza neutra y una condición oxidante. En el caso particular de la Cueva de la Iglesia, los datos sugieren que el potencial óxido reducción tiene mayor variabilidad que en el Sistema de Chimalacatepec. Las medias de la conductividad eléctrica indican que el agua de goteo del Sistema de Chimalacatepec presenta mayor cantidad de sales disueltas que la Cueva de la Iglesia. Sin embargo, la desviación estándar de ambos sitios indica que los datos presentan una amplia variabilidad entre los puntos, de 46.67-903  $\mu\text{S cm}^{-1}$  para la Cueva de la Iglesia y de 350–1,129  $\mu\text{S cm}^{-1}$  para el Sistema Chimalacatepec. Finalmente para el caso de la alcalinidad total, el Sistema de Chimalacatepec presenta mayor cantidad de carbonato de calcio disuelto y mayor variabilidad en los datos obtenidos para este parámetro.

**Tabla 6:** Parámetros fisicoquímicos del agua de goteo de ambas cuevas.

Cueva	pH	CE ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	CaCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	ORP ( $\mu\text{V}$ )
Iglesia	7.2 ± 0.42	353 ± 477	130. 5 ± 13	268 ± 32
Chimalacatepec	7.3 ± 0.29	837 ± 424	149 ± 93	298 ± 4.46

En general, la dominancia de iones mayoritarios para el agua de goteo de la Cueva de la Iglesia fue la siguiente: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> > Ca<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Mg<sup>2+</sup> para aniones y cationes respectivamente. Mientras que para el Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec fue: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Ca<sup>+</sup> > Mg<sup>2+</sup> para aniones y cationes, respectivamente (**Tabla A4**). Cabe destacar que los aniones nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) se encontraron por debajo del límite de detección (1.5 mg L<sup>-1</sup>). Para conocer el tipo de agua de las cuevas se realizó un diagrama de Piper (**Figura 6**). De acuerdo con las muestras ubicadas en el diamante, la mayoría de las muestras de ambas cuevas se componen principalmente por ácidos débiles. Por otro lado, la comparación de aniones indica que en general las muestras de agua son de tipo bicarbonadata mientras que, la comparación de cationes indica que no hay un tipo dominante.

Con respecto a los análisis elementales de carbono y nitrógeno, los resultados completos se encuentran en la **Tabla A5**. Sin embargo, en la **Tabla 7** se puede observar que en general, hay mayor cantidad de carbono total y carbono orgánico en la Cueva de la Iglesia que en el Sistema de Chimalacatepec. Sin embargo, para ambos parámetros los datos de la Cueva de la Iglesia presentan una amplia variabilidad, que va de 4.36 - 17.83 mg L<sup>-1</sup> para CT, y 1.46 - 14.89 mg L<sup>-1</sup> para Corg. Por el contrario, el carbono inorgánico es mayor en el Sistema de Chimalacatepec que en la Cueva de la Iglesia, sin mencionar que los datos no presentan una variabilidad significativa. Adicionalmente, el Sistema de Chimalacatepec presenta mayor



**Figura 6:** Diagrama de Piper con las muestras de agua de goteo para ambas cuevas en este estudio.

cantidad de N total en las muestras de agua, en donde los datos poseen un rango de variabilidad que abarca desde 0.97 hasta 6.9 mg L<sup>-1</sup>. Finalmente, los análisis elementales de las muestras de agua de goteo (datos completos en la **Tabla A6**), muestran que la Cueva de la Iglesia presenta una mayor concentración en todos los elementos detectados. Por otra parte, para ambos sitios los elementos dominantes fueron el sílice y el calcio (Si > Ca) (**Tabla 8**).

**Tabla 7:** Determinación de C y N en agua de goteo para ambos sistemas. Unidades en mg L<sup>-1</sup>.

Cueva	C Total	Cino	Corg	N Total
Iglesia	10.6 ± 6.8	2.7 ± 0.2	7.8 ± 6.7	0.43 ± 0.4
Chimalacatepec	6.26 ± 0.1	4.8 ± 0.3	1.5 ± 0.1	4 ± 3

**Tabla 8:** Media y desviación estándar de la concentración de elementos principales de las muestras de agua de goteo para ambas cuevas. Unidades en mg L<sup>-1</sup>.

Cueva	Ba	Ca	K	Mg	Na	Si	Sr
Iglesia	0.03 ± 0.02	7.6 ± 6.24	2.2 ± 1.1	2.5 ± 1.2	2.2 ± 0.66	13.4 ± 4.4	0.06 ± 0.04
Chimalacatepec	0.01 ± 0.01	2.8 ± 0.92	0.9 ± 0.86	1.1 ± 0.36	1.4 ± 0.45	12.3 ± 0.8	0.01 ± 0.01

## 10.2 Descripción de tapetes microbianos y estromatolitos terrestres encontrados en las cuevas

En la Cueva de la Iglesia se encontraron cinco tapetes microbianos diferentes, tanto en color como textura. Estos tapetes fueron hallados en paredes y techo de la cueva su ubicación exacta puede verse en la **Figura 4**. Los primeros dos tapetes colectados se encontraron en lados opuestos del Balcón de las Raíces, uno de ellos es color amarillo (IT1) y el otro naranja-rojizo (IT2). Estos dos tapetes se encontraban sobre sedimentos que percolaron desde el suelo de la superficie hasta la pared de la cueva. La inclinación en la que estaban era de aproximadamente 90° y la altura del piso de la cueva a los tapetes fue de ~90 cm. El IT3 se encontró en el techo, cerca de El Laberinto, adherido a depósitos sedimentarios primarios denominados *dientes de tiburón* a ~140 cm del piso de la cueva y con una inclinación de ~30°. Además presentaba un color amarillo opaco y su textura era pastosa. El IT4 se halló en la pared de la cueva a ~120 cm del piso de la cueva y a ~90° de inclinación. Su color era blanquecino y tenía una consistencia parecida a la de un gel, sin mencionar que conservaba bastante humedad. Finalmente, el IT5 se localizó cerca de la zona conocida como Segunda Axial a ~150 cm del piso de la cueva y a ~80° de inclinación. Este tapete se encontraba adherido directamente a la roca, era delgado, color naranja y de consistencia pastosa.

Por su parte, en el tubo de lava de Chimalacatepec los tapetes microbianos fueron encontrados en la zona de El Gran Domo (**Figura 5**). Esta pared cubierta de tapete que abarcaba desde el suelo de la cueva hasta el techo, su color es amarillento-blanquecino. La consistencia era parecida a la de un gel y tiene un grosor ~1.5 cm. En los sitios próximos a los tapetes se encontraron depósitos minerales secundarios denominados estromatolitos terrestres (López-Martínez et al., 2016), de igual manera se hallaron dispersados en toda la pared de la cueva.

## 10.3 Concentración de DNA, secuencias 16S rRNA y ASVs obtenidos

Por triplicado se extrajo DNA de cada muestra, el DNA recuperado se utilizó para amplificar la región V4 del 16S rRNA con el método que ya se describió con anterioridad (sección de **Métodos 9.3.1**). Una vez verificada la presencia del amplicón, el DNA se purificó y se

cuantificó para conocer la concentración de DNA para su posterior secuenciación (**Métodos 9.3.2**), los resultados de las concentraciones de DNA obtenidas por muestra se encuentran en la **Tabla A7**. En total se obtuvieron 6,927,626 secuencias de la región hipervariable V4 del gen 16S rRNA (~290 pb) de los dominios Bacteria y Archaea (**Tabla 9**). Después de los procesos de filtrado de calidad, apareamiento de secuencias y remoción de quimeras (**Métodos 9.5.2**), se recuperaron 4,120,293 secuencias (59% de eficiencia). El número de secuencias promedio por cueva fue de 123,726 y 37,127 para el tubo de lava de Chimalacatepec y la Cueva de la Iglesia, respectivamente. Estas secuencias obtenidas fueron agrupadas en 16,536 ASVs.

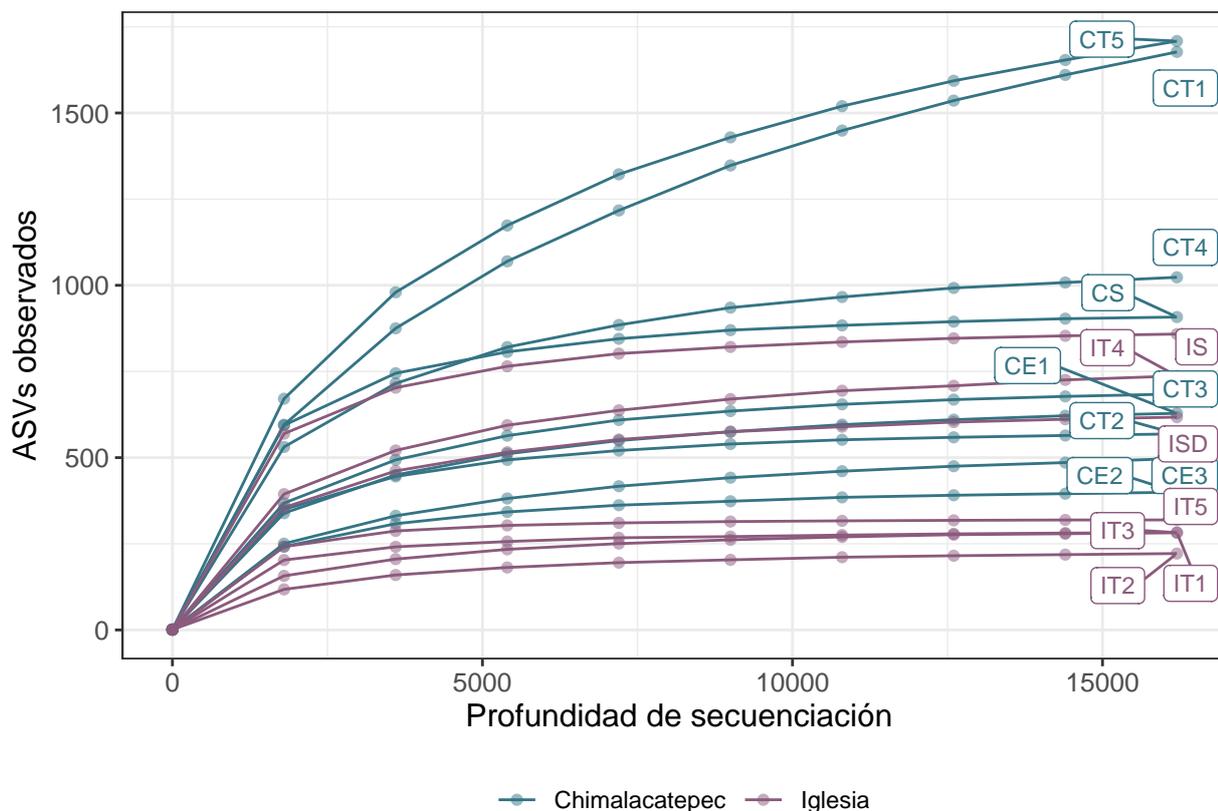
**Tabla 9:** Promedio y desviación estándar del número de secuencias totales, filtradas, no quiméricas y porcentaje de eficiencia de cada muestra (n = 3 por muestra).

Muestra	Total de secuencias	Secuencias filtradas	Secuencias no quiméricas	Eficiencia (%)
<b>Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec</b>				
CE1	51,544 ± 8,475	41,693 ± 6,186	28,653 ± 4,166	56 ± 1
CE2	619,968 ± 329,262	484,821 ± 261,387	419,128 ± 204,225	69 ± 5
CE3	46,052 ± 18,247	33,724 ± 19,014	26,547 ± 10,891	58 ± 10
CS	57,731 ± 11,912	44,199 ± 10,646	34,769 ± 5,519	61 ± 7
CT1	66,137 ± 2,126	52,676 ± 4,228	49,399 ± 5,215	75 ± 6
CT2	756,078 ± 1,058,598	584,946 ± 820,291	395,499 ± 534,281	57 ± 6
CT3	75,612 ± 15,177	65,936 ± 13,310	40,220 ± 7,882	53 ± 1
CT4	62,486 ± 15,071	54,023 ± 13,661	33,204 ± 7,715	53 ± 1
CT5	168,279 ± 155,966	136,835 ± 135,072	86,122 ± 74,811	53 ± 3
<b>Cueva de la Iglesia</b>				
IS	48,279 ± 3,211	39,245 ± 2,408	26,546 ± 542	55 ± 3
ISD	64,113 ± 14,850	52,877 ± 12,556	40,760 ± 9,759	63 ± 1
IT1	59,666 ± 40,562	48,804 ± 34,281	38,302 ± 25,703	64 ± 1
IT2	61,680 ± 7,866	54,955 ± 6,518	41,288 ± 3,380	67 ± 5
IT3	48,346 ± 12,335	36,999 ± 11,276	34,017 ± 7,048	71 ± 4
IT4	81,989 ± 34,789	63,919 ± 18,491	48,777 ± 16,852	61 ± 4
IT5	41,248 ± 5,691	31,567 ± 5,044	30,200 ± 5,244	73 ± 3

## 10.4 Rarefacción

Con el fin de normalizar los datos, se llevó a cabo un análisis de rarefacción en donde se submuestrearon aleatoriamente las secuencias de cada muestra, desde uno hasta la profundidad de lectura más baja (**Figura 7**). Para ello se empleó la media del triplicado de las secuencias obtenidas por muestra. Las curvas de rarefacción de cada triplicado se pueden observar en la sección de **Anexos A.2**. La mayoría de las muestras de ambas cuevas tuvieron un comportamiento asintótico, lo que sugiere que gran parte de la diversidad está representada con un corte a una profundidad de lecturas de 16,251 secuencias (número menor de secuencias encontrado). El CT5 del Sistema de Chimalacatepec, presentó el mayor número de ASVs con

un promedio de 1,709 ASVs; por otro lado, IT2, fue la muestra con menor cantidad de ASVs reportados con un promedio de 222 (Figura 7).



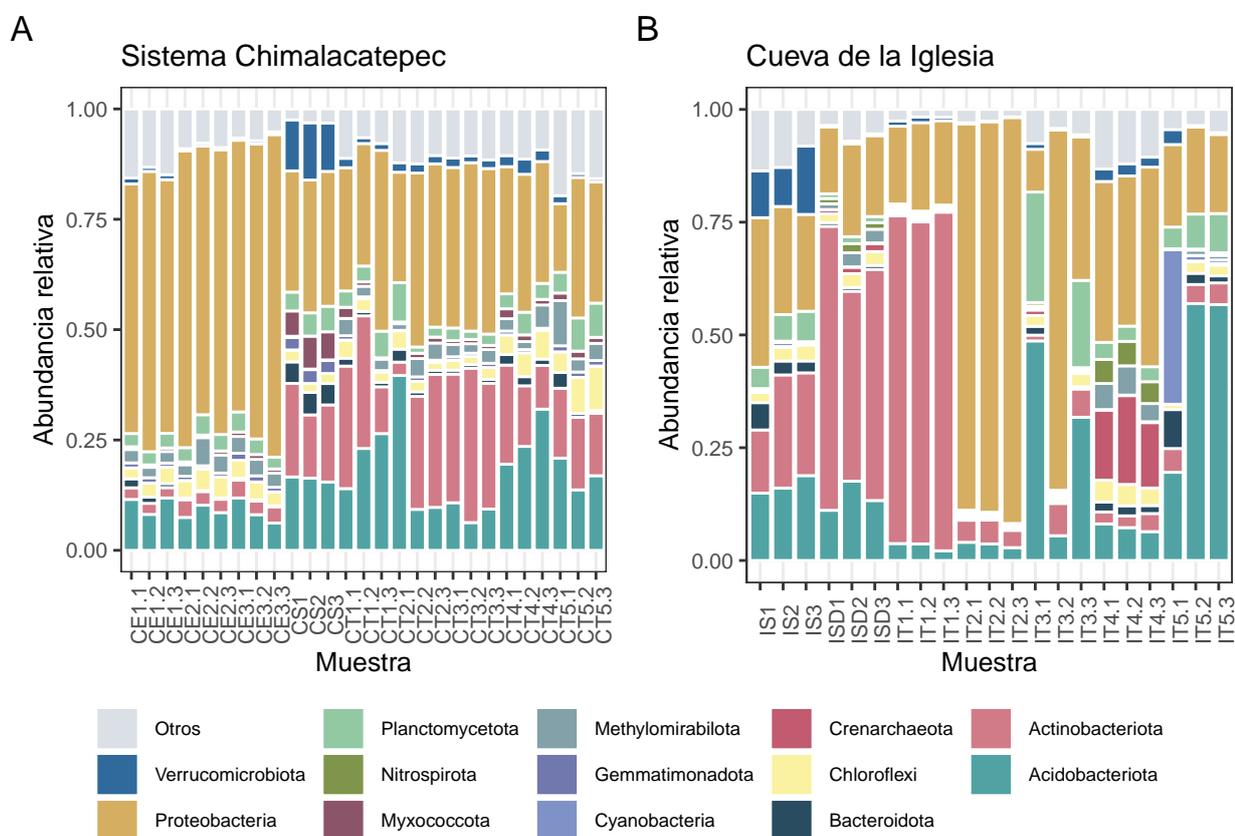
**Figura 7:** Curva de rarefacción del número de ASVs observados con diferentes esfuerzos de muestreo en este estudio. Cada muestra es resultado del promedio de tres submuestras. Por fines de espacio, no se muestran las desviaciones típicas para cada muestra.

## 10.5 Diferencias en la composición microbiana de las comunidades de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia.

De los ASVs obtenidos el 97.55% fue asignado al nivel taxonómico de phylum (Figura 8). Actinobacteriota, Acidobacteriota y Proteobacteria fueron grupos predominantes en todas las muestras de ambas cuevas. Sin embargo, también se identificó en menor proporción la presencia de grupos como Planctomycetota, Chloroflexi, Bacteroidota y Verrucomicrobiota. En el tubo de lava de Chimalacatepec los tapetes microbianos (CT1–CT5) presentan proporciones similares de los grupos Proteobacteria (~30%), Actinobacteria (~15-25%) y Acidobacteriota (~13-20%); mientras que, los estromatolitos (CE1-CE3) poseen una dominancia del grupo Proteobacteria (~60-75%). Adicionalmente en las muestras de suelo (CS), los grupos Myxococcota, Gemmatimonadota y Verrucomicrobiota están en mayor proporción que en el resto de las muestras, sin mencionar que, en este tipo de muestra no se detectó el phylum

Methylomirabilota (**Figura 8.A**).

Por otro lado, en la Cueva de la Iglesia se puede observar mayor variación entre las proporciones de los grupos dominantes, así como en los phyla presentes (**Figura 8.B**). El IT1 es similar al sedimento que se encuentra dentro de la cueva (ISD) en cuanto a composición taxonómica, pues en ambas muestras los grupos Proteobacteria y Actinobacteriota tienen mayor proporción. En el IT2, el grupo Proteobacteria presenta una abundancia mayor al 85%. En el IT4, se detectaron los grupos Nitrospirota (~5%) y Crenarchaeota (~16%), grupos no detectados en el resto de las muestras. Finalmente en IT3 e IT5, Acidobacteriota fue el grupo con mayor abundancia (~40%) y (~8%), respectivamente. Además en el IT5 se detectó la presencia del phylum Cyanobacteria, phylum no detectado en ninguna otra muestra.



**Figura 8:** Abundancias relativas de los phyla encontrados en tapetes, sedimentos y suelos de superficie de ambas cuevas. A. Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec. B. La Cueva de la Iglesia. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. El último número corresponde a la réplica analizada.

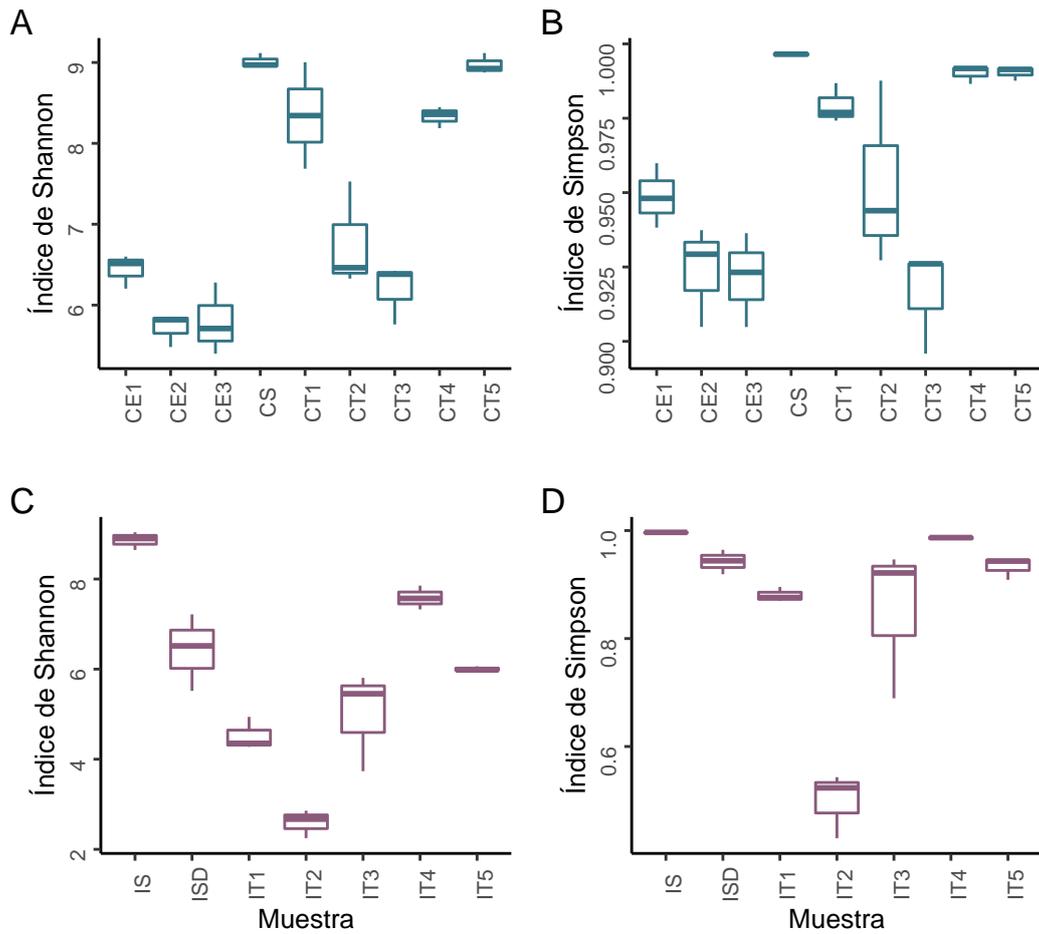
## 10.6 Diversidad de las comunidades procariontes de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia.

### 10.6.1 Diversidad alfa

La diversidad alfa fue determinada a través de los índices de Shannon y Simpson inverso para cada una de las muestras de ambas cuevas (**Figura 9**). En general, la diversidad de las comunidades procariontes de las muestras de Chimalacatepec e Iglesia es alta, ya que el índice de Shannon es mayor a 3. Las muestras de suelo de ambas cuevas tienen una diversidad similar ( $> 8$ ) (CS e IS). En cuanto a las muestras del Sistema de Chimalacatepec, los estromatolitos (CE) presentaron un rango del índice de Shannon de 5.4 - 6.6, mientras que, el de los tapetes microbianos (CT) fue de 6.2 - 9.1. Los tapetes microbianos de La Cueva de la Iglesia presentaron mayor variabilidad, pues el rango del índice de Shannon va de 2.2 - 7.8, en donde el IT2 es el que tienen menor diversidad (2.2 - 2.8).

Referente al índice de Simpson inverso, éste fue mayor a 0.9 en las muestras de estromatolitos (CE), tapetes microbianos (CT) del Sistema de Chimalacatepec, así como del suelo de ambas cuevas (CS e IS). Estos valores sugieren que los ASVs que componen la comunidad de cada muestra tienen abundancias similares. Para las muestras de tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia, el índice de Simpson presenta mayor variabilidad (rango de 0.54 - 0.94), siendo IT2 el de menor rango (0.43 - 0.54), lo que sugiere la dominancia de un taxon en particular.

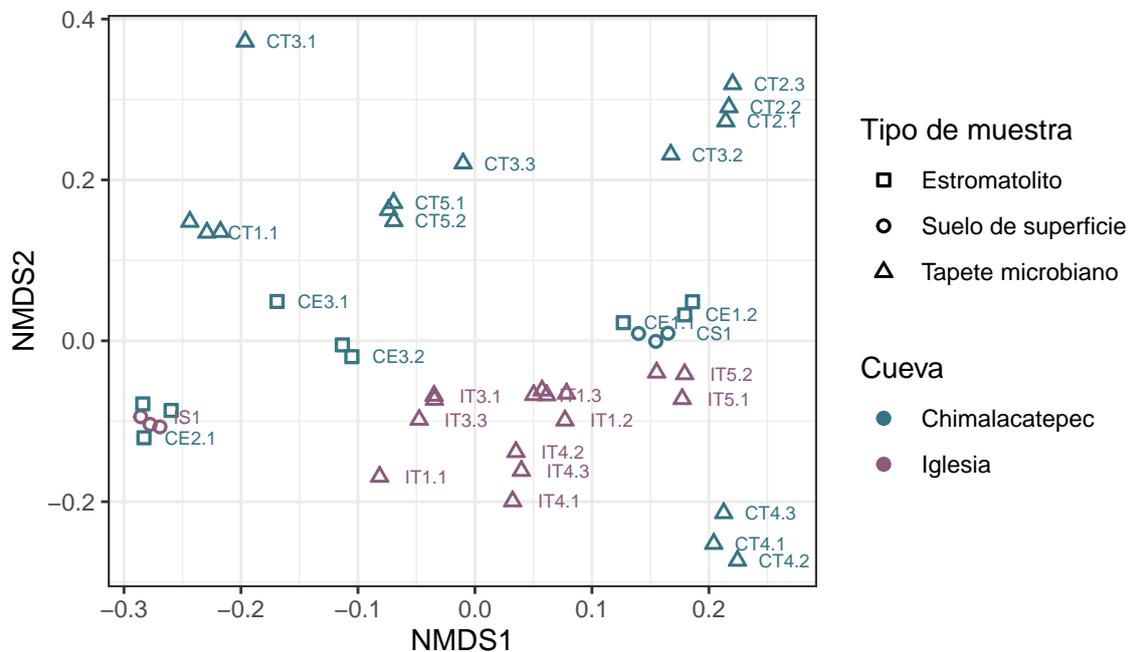
Se llevó a cabo una prueba de *t de student* para identificar si existen diferencias significativas entre las medias del índice de Shannon de los tapetes microbianos, las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Fisher) se encuentran en el **Anexo sección A.5**. Los tapetes microbianos del tubo de lava de Chimalacatepec (CT) presentaron una media de 7.72 (*error típico* = 1.46), mientras que, los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia presentaron una media de 5.13 (*error típico* = 3.70). La diferencia efecto fue de 2.59 a favor de los tapetes de Chimalacatepec (CT), siendo estadísticamente significativa ( $t = 2.946$   $p = 0.005038$ ) (**Anexo sección A.6**).



**Figura 9:** Diversidad alfa de cada muestra perteneciente a las cuevas de Chimalacatepec (A y B) y la Cueva de la Iglesia (C y D). Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento collectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. Resultados de la prueba de *t de student* mostró diferencias significativas entre los tapetes microbianos en función de la cueva ( $p = 0.005038$ )

### 10.6.2 Diversidad beta

Con el fin de observar los patrones de agrupamiento de las muestras para ambas cuevas, se realizó un NMDS con el método UniFrac ponderado ( $stress = 0.1481$ ), los resultados del NMDS pueden consultarse en el **Anexo sección A.7**. En la **Figura 10**, se puede observar una agrupación entre la mayoría de las muestras de la Cueva de la Iglesia, a diferencia del Sistema de Chimalacatepec, en donde cada muestra presenta mayor distancia entre si. Sin mencionar que, el análisis indica que los estromatolitos terrestres se encuentran más relacionados con las muestras de suelo que con las muestras de tapetes microbianos. Aunado a esto, el análisis de PERMANOVA (**Anexo sección A.7**) indica que existen diferencias significativas entre la estructura de las comunidades procariontes en función de la cueva ( $p = 0.001$ ).



**Figura 10:** Análisis multidimensional no métrico con el método UniFrac ponderado para todas las muestras de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia analizadas. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. El último número corresponde a la réplica analizada.

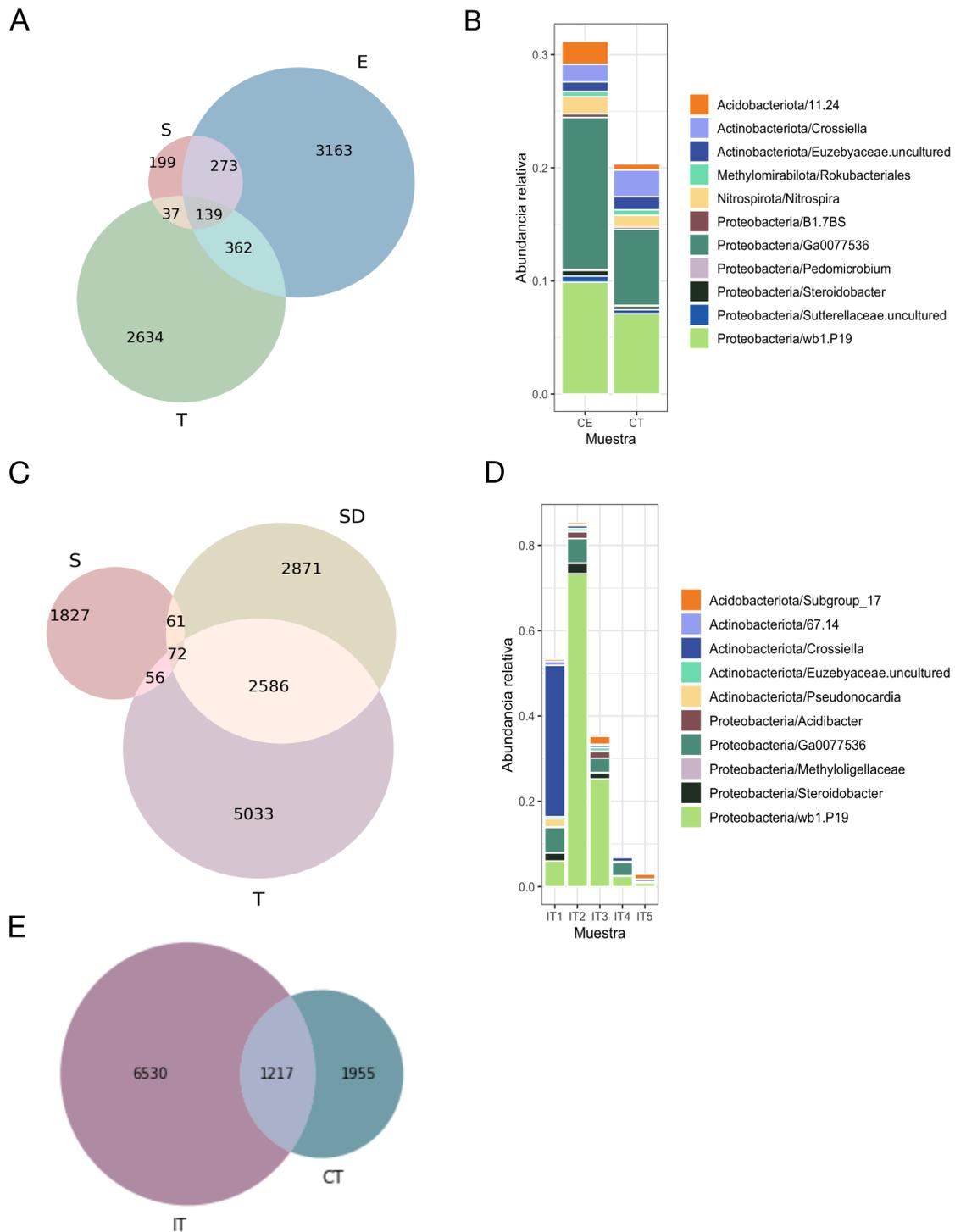
## 10.7 Diferencias en la distribución de los organismos a través de las muestras.

### 10.7.1 ASVs compartidos y *core* microbiano.

Se crearon diagramas de Venn para determinar el número de ASVs compartidos entre las muestras de cada sistema y entre los tapetes microbianos de Chimalacatepec e Iglesia. El diagrama de Venn para el Sistema de Chimalacatepec muestra que los tapetes y estromatolitos están compuestos mayormente por ASVs únicos a cada componente (**Figura 11.A**), donde las muestras con mayor cantidad de grupos únicos fueron los estromatolitos terrestres ( $n = 3,163$ ). Además se comparten 139 ASVs entre las muestras de tapetes microbianos, estromatolitos y suelo, donde se encuentran filotipos no cultivables del orden Rokubacterales (Methylomirabilota), *Pedomicrobium* (Alphaproteobacteria), y *Steroidobacter* (Gammaproteobacteria). Cuando se analizó la abundancia relativa de estos ASVs compartidos entre tapetes (T) y estromatolitos (E) ( $n = 501$ ) se encontraron como los más abundantes a grupos no clasificados correspondientes a Ga0077536 (Proteobacteria) (6-13% de abundancia relativa) y a *wb1.P19* (Proteobacteria) (7-9% de abundancia relativa) (**Figura 11.B**). Adicionalmente se identificaron ocho géneros compartidos entre las muestras de tapetes microbianos y estromatolitos terrestres, donde es de notar la presencia de *Crossiella* (Actinobacteriota), un género que será discutido más adelante.

Por su parte en la Cueva de la Iglesia se encontró que sólo se comparten 72 ASVs entre todas las muestras de suelo (IS), sedimento (ISD) y tapetes microbianos (IT) (**Figura 11.C**). Conforme al análisis del *core* microbiano, se identificó la presencia de dos géneros entre los tapetes los cuales fueron: *Crossiella* (Actinobacteriota) y *Steroidobacter* (Gammaproteobacteria) (**Figura 11.D**). En este sistema los tapetes microbianos contaron con 5,033 ASVs únicos, y comparten 2,586 ASVs exclusivamente con los sedimentos. Asimismo se determinó que todos los tapetes microbianos comparten a organismos de: Subgrupo 17 (Acidobacteriota), Ga0077536 (Gammaproteobacteria), *wb1.P19* (Gammaproteobacteria) y Euzebyaceae (Actinobacteriota). Aunado a esto todos los tapetes presentan a Methyloligellaceae (Alphaproteobacteria) excepto el IT5 (**Figura 11.D**). Además en el IT1 *Crossiella* fue grupo dominante, mientras que, el género *wb-P19* predomina en el IT2. Por último, cabe señalar que entre los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia (IT) y los del sistema de Chimalacatepec (CT) se comparten 1,955 ASVs (**Figura 11.E**), donde los géneros

compartidos son: *Crossiella*, Methyloligellaceae, Ga0077536 (Gammaproteobacteria), *wb1.P19* (Nitrosococcaceae) y *Steroidobacter*.

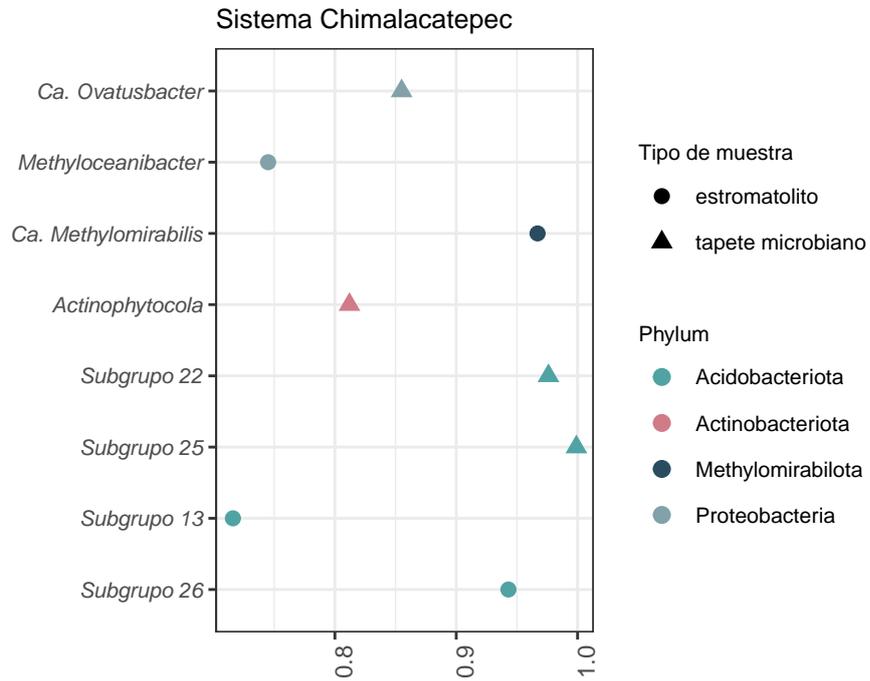


**Figura 11:** Análisis de *core* microbiano mostrando los ASVs compartidos entre tapetes, estromatolitos, sedimentos y suelos estudiados, y la abundancia relativa que éstos representan a nivel de género. A. ASVs compartidos para los componentes del sistema Chimalacatepec (T:tapetes, E: estromatolitos, S: suelo de horizonte A ubicado al exterior del tubo de lava). B. Abundancia relativa de los géneros compartidos entre estromatolitos y tapetes de Chimalacatepec. C. ASVs compartidos para los componentes de la Cueva de la Iglesia (T: tapetes, SD: sedimento ubicado dentro de la cueva. S: suelo de horizonte A ubicado al exterior del tubo de lava) D. Abundancia relativa de los géneros compartidos entre los tapetes de Iglesia. E. ASVs compartidos entre los tapetes de Iglesia (IT) y los tapetes de Chimalatepec (CT).

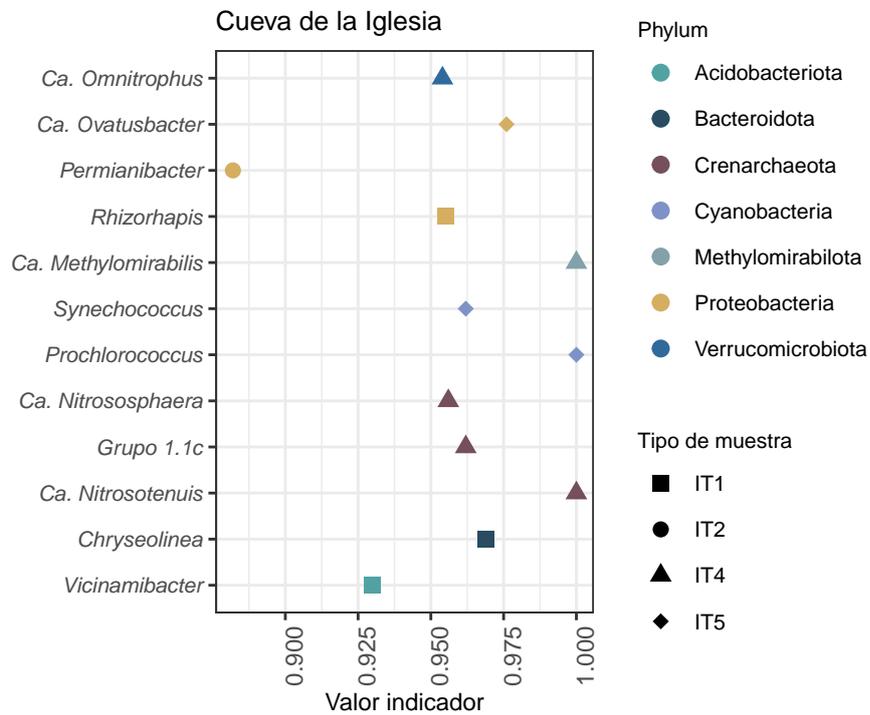
### 10.7.2 Especies indicadoras

Se realizó un análisis para determinar los géneros indicadores (IndVal) en las muestras de estromatolitos y tapetes microbianos del Sistema de Tubo de lava de Chimalacatepec y para cada uno de los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia. Para ambos sistemas se encontraron 183 especies a un nivel de confianza igual al 95% ( $\alpha = 0.05$ ) y un valor indicador  $> 0.5$ ; entre más cercano a 1 sea el valor indicador implica que un organismo se encuentra bien distribuido en un grupo de muestras del mismo tipo, por lo cual las representa adecuadamente (sección de **Marco teórico 4.3.1.2.3**). En el Sistema de Chimalacatepec se detectaron ocho géneros indicadores en las muestras cuatro en los estromatolitos y cuatro en los tapetes microbianos (**Figura 12.A**). Con respecto a los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia se reportaron doce géneros indicadores (**Figura 12.B**), en donde IT4 cuenta con siete de éstos (**Figura 12.B**). Cabe mencionar que el análisis no arrojó organismos indicadores para el IT3.

A



B



**Figura 12:** Géneros indicadores basados en un análisis IndVal. A. Muestras del Sistema de Tubo de Lava Chimalacatepec, (círculo: estromatolito; triángulo: tapete microbiano). B. Muestras de la Cueva de la Iglesia (cuadrado: IT1, círculo IT2, triángulo: IT4, rombo: IT5). Los colores refieren al phylum al que pertenece la especie indicadora encontrada.

## 10.8 Interacción de las comunidades procariontes de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia

Las redes de co-ocurrencia de las comunidades procariontes fueron generadas en estromatolitos y tapetes microbianos para el sistema Chimalacatepec y para cada uno de los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia. Las propiedades de cada red generada se encuentran descritas en la **Tabla 10**. En primera instancia se determinó el número de nodos (géneros) y enlaces de cada red, así como el promedio de enlaces de cada nodo (grado medio o  $l$ ), en donde IT1 e IT2 de la Cueva de la Iglesia resultaron ser las redes más pequeñas. La longitud media de la ruta ( $k$ ) y el diámetro ( $D$ ) calculados para cada red (1-4.6 y 1-12, respectivamente), arrojaron valores bajos en todas las muestras. Esto significa que la comunicación de los organismos dentro de cada red es eficiente ya que no es necesario un gran número de pasos para lograr transmitir algún metabolito de un organismo a otro.

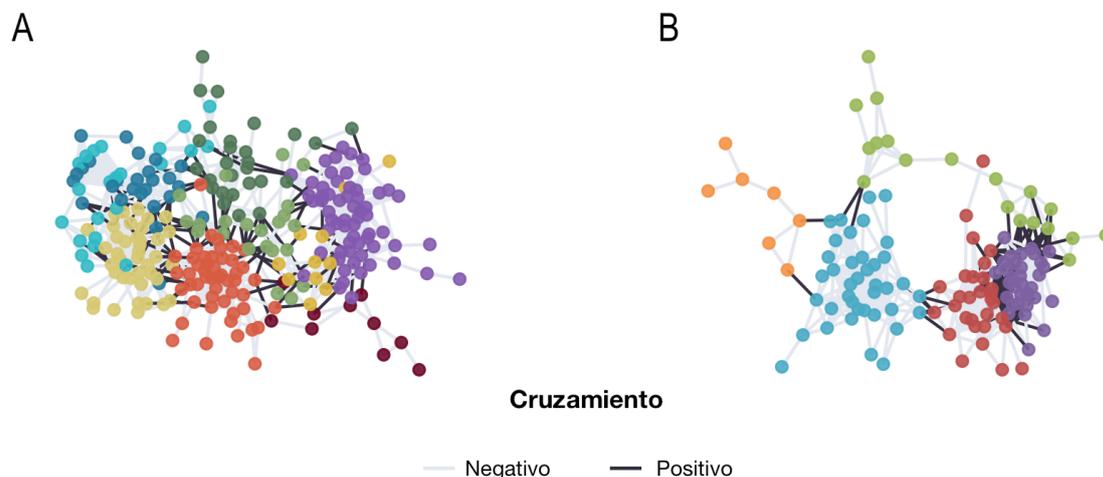
El índice de modularidad ( $m$ ) fue mayor a 0.5 en todas las muestras excepto en los estromatolitos del Sistema de Chimalacatepec. Las muestras con un índice de modularidad alto indican que los organismos tienen fuertes conexiones entre ellos dentro de cada módulo pero escasas conexiones entre los módulos que componen la red. Con respecto al coeficiente medio de agrupamiento ( $C$ ), es posible observar que en todas las muestras tienen un valor mayor a 0.5 (**Tabla 10**), lo que sugiere que las conexiones de cada nodo (género) tiene una conexión robusta con los nodos vecinos.

**Tabla 10:** Propiedades de las redes de co-ocurrencia.  $l$ : Grado Medio,  $k$ : Media de la Ruta más Corta,  $D$ : Diámetro,  $C$ : Coeficiente de Agrupamiento,  $CI$ : Centralidad de Intermediación Media,  $m$ : Índice de Modularidad.

Muestra	Nodos	Enlaces	$l$	$k$	$D$	$C$	$CI$	$m$
<b>Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec</b>								
CE	135	928	13.7	4.1	12	0.7	183.7	0.5
CT	294	1185	8.1	4.7	12	0.5	458.9	0.7
<b>Cueva de la Iglesia</b>								
IT1	64	380	11.9	1.0	1	1.0	0.0	0.7
IT2	46	195	8.5	1.0	1	1.0	0.0	0.6
IT3	139	1483	21.3	1.0	1	1.0	0.0	0.7
IT4	110	1171	21.3	1.0	1	1.0	0.0	0.7
IT5	164	2105	25.7	1.0	1	1.0	0.0	0.7

### 10.8.1 Redes de co-ocurrencia del Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec

El análisis de modularidad de Louvain arrojó once y siete módulos para las muestras de tapetes microbianos y estromatolitos terrestres respectivamente. Las redes de éste sistema presentaron cruzamiento positivo entre los módulos; esto significa que los organismos que pertenecen a un mismo módulo (mismo color en **Figura 13**) interactúan con los organismos de otro módulo. Con el fin de facilitar el análisis visual se descartaron aquellos módulos con menos de tres conexiones para ambas muestras (**Figura 13**). Así mismo se determinó el grado de cada nodo para conocer las posibles especies clave de las comunidades de cada tipo de muestra. Para esto, se eligieron los géneros con mayor grado ( $l \geq 20$ ). Entre los géneros con mayor grado de los **tapetes microbianos** están *Acinetobacter*, los Subgrupos 9 y 17 de Acidobacteriota y *Nitrospira*. Mientras que, el género con mayor centralidad de intermediación fue *Lacunisphaera*. Con respecto a los **estromatolitos**, entre los géneros con mayor grado se encuentran *Steroidobacter*, *Ca. Nitrosotenus* y organismos no cultivados del Subgrupo 22 y Subgrupo 10 de Acidobacteriota. Además, el género con la máxima centralidad de intermediación fue *Steroidobacter*.

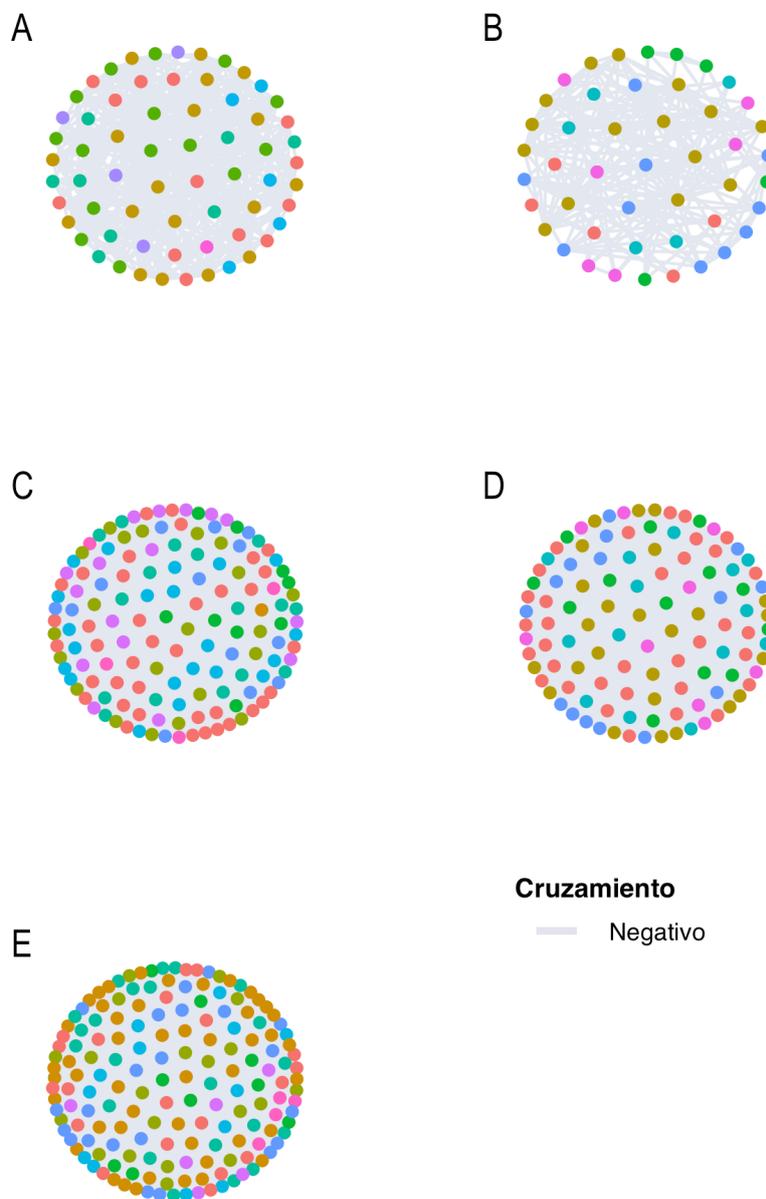


**Figura 13:** Redes de co-ocurrencia de las muestras del tubo de lava de Chimalacatepec. A. Tapetes microbianos. B. Estromatolitos. Cada color en la red indica un módulo generado por el método de Louvain y cada nodo corresponde a un género. Líneas de color gris (cruzamiento negativo) indican que no hay interacción entre los módulos generados, líneas de color negro (cruzamiento positivo) indican que hay interacción entre los módulos generados.

### 10.8.2 Redes de co-ocurrencia de la Cueva de la Iglesia

Se realizaron redes de co-ocurrencia para cada uno de los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia. Las muestras con menos nodos y enlaces fueron IT1 e IT2 (**Figura 14**). El método de Louvain arrojó más de cinco módulos para cada red, sin embargo, éstos no presentan cruzamientos entre sí. Además, dado que el promedio de la centralidad de intermediación de los tapetes de la Cueva de la Iglesia es igual a 0, implica que no hay organismos puente en las comunidades de procariontes de estas muestras (**Tabla 10**). Entre los géneros con mayor número de enlaces ( $l = 14$ ) para el **IT1** fueron organismos de los Subgrupos 11 y 17 de Acidobacteriota, un organismo no cultivado del orden Rokubacteriales, un organismo no cultivado del orden OM190, *Pedomicrobium* y un organismo no cultivado del orden Ga0077536. Para el **IT2** entre los organismos con mayor grado ( $l = 37$ ) fueron *Ca. Nitrosopumilus*, seguido por los Subgrupos 11 y 10 de Acidobacteriota, *Crosiella*, organismos no cultivados de los órdenes Ga0077536 (Gammaproteobacteria) y OM190, *Acidibacter*, *wb-P19* y *Steroidobacter*, todos los géneros anteriores con un grado igual a 20.

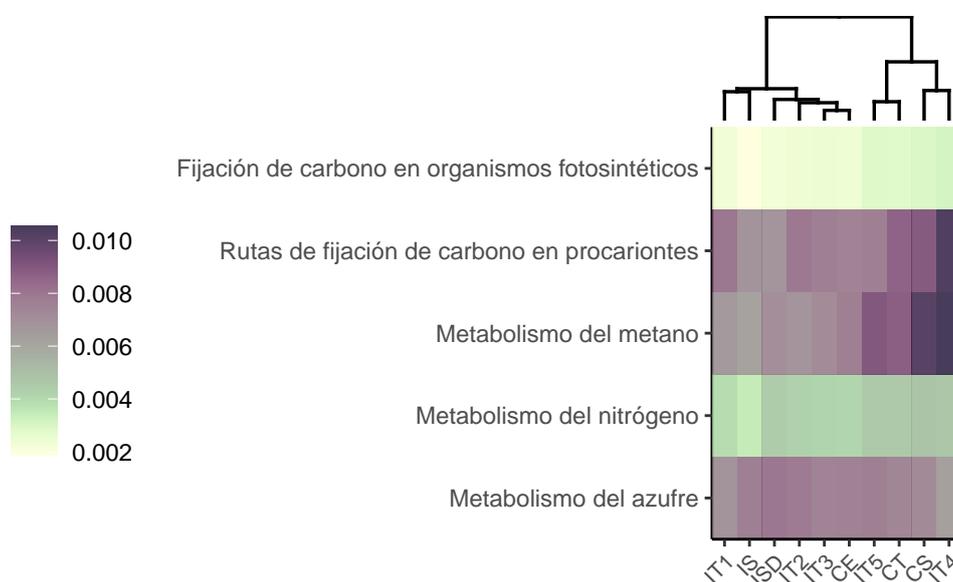
Con respecto al **IT3**, entre los géneros que presentaron mayor grado ( $L = 33$ ) se encuentran organismos no cultivados de los Subgrupos 2, 11 y 17 de Acidobacteriota, un organismo no cultivado de la familia B1-7BS y *Gaiella*. Con respecto al **IT4** el grado máximo fue igual a 47 y algunos de los posibles géneros clave son *Pedobacter* y un organismo no cultivado del orden OM190. El siguiente número máximo de enlaces fue igual a 21, en donde se encuentra el género *Steroidobacter*. Por último, organismos de los Subgrupos 2, 9, 12 y 17 de Acidobacteriota, organismos de las familias Nitrosopumilaceae y Nitrososphaeraceae, así como los géneros *Pseudonocardia*, *wb1.P19* (Nitrosococcaceae) y *Pedomicrobium* parecen tener gran peso para la conexión de las redes al tener un grado igual a 19. Finalmente, para el **IT5** entre los géneros con mayor número de grado ( $l = 17$ ) se encuentran organismos no cultivados de los Subgrupos 7 y 17 de Acidobacteriota y *Steroidobacter*. Seguidos por géneros con  $l = 14$ , como *Pedomicrobium*, *Hyphomicrobium*, *Pseudonocardia* y organismos no cultivados de los órdenes OM190 y Rokubacteriales.



**Figura 14:** Redes de co-ocurrencia de la Cueva de la Iglesia. A. Tapete microbiano 1 (IT1). B. Tapete microbiano 2 (IT2). C. Tapete microbiano 3 (IT3). D. Tapete microbiano 4 (IT4). E. Tapete microbiano 5 (IT5). Cada color en la red indica un módulo generado por el método de Louvain. Líneas de color gris (cruzamiento negativo) indican que no hay interacción entre los módulos generados.

## 10.9 Perfil metabólico de las comunidades procariontes de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia

La predicción metabólica a partir de las secuencias del 16S rRNA llevada a cabo con Tax4Fun2 se realizó para las muestras del tubo de lava de Chimalacatepec y de la Cueva de la Iglesia. Para conocer el potencial de metabolismos para la generación de energía de las comunidades se eligieron aquellos metabolismos que estuvieran relacionados con el ciclo del carbono (*i.e.* rutas de fijación de carbono), el ciclo del metano, el ciclo del nitrógeno y el ciclo del azufre. Los resultados indican que, en general, las comunidades de los tubos de lava presentan un índice de redundancia funcional mayor para los metabolismos relacionados con las rutas de fijación de carbono en procariontes, el metabolismo del metano y el metabolismo del azufre. Mientras que, los metabolismos relacionados con el nitrógeno y la fijación de carbono por organismos fotosintéticos mantienen un FRI menor a 0.004 (**Figura 15**). Además, el análisis predictivo sugiere que el potencial metabólico de los organismos arrojó tres agrupaciones: el primer grupo se conforma por las muestras de suelo y sedimentos; el segundo grupo lo constituyen los IT1-IT3 de La Cueva de la Iglesia; y el último grupo lo forman los tapetes microbianos de Chimalacatepec (CT), IT5, los estromatolitos (CE) y el IT4 (**Figura 15**).

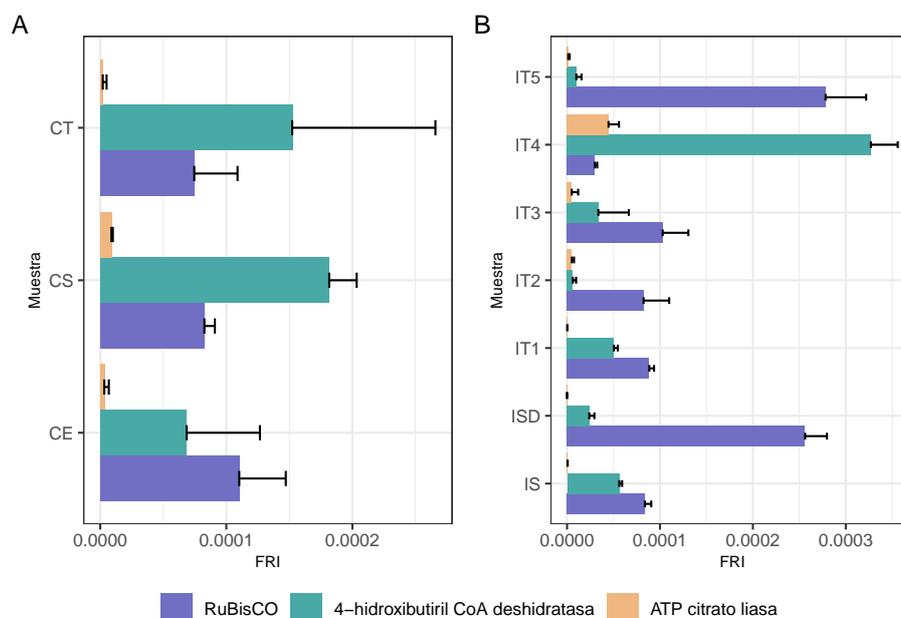


**Figura 15:** Perfil metabólico predicho a partir de la huella 16S rRNA de las muestras de La Cueva de la Iglesia y del Sistema de Chimalacatepec. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia.

## 10.10 Potencial de las comunidades procariontes para rutas de fijación de carbono

### 10.10.1 Predicción funcional

En los resultados de la predicción funcional arrojada por Tax4Fun2 se buscaron las enzimas clave para tres rutas de fijación de carbono de estudio de esta tesis. Los resultados sugieren que las comunidades procariontes del sistema Chimalacatepec presentan el potencial genético para codificar las enzimas clave para los ciclos de las pentosas fosfato y del 3-hidroxiacetil-CoA/4-hidroxiacetil-CoA principalmente, en donde los estromatolitos tienen mayor actividad de la 4-hidroxiacetil-CoA deshidratasa (**Figura 16.A**). Por su parte todas las muestras de la Cueva de la Iglesia, excepto el IT4, presentan mayor abundancia predicha de la enzima RuBisCO. Con respecto a la enzima ATP citrato liasa (rTCA), se detectó su abundancia potencial en los tapetes microbianos tanto del sistema Chimalacatepec como de la Cueva de la Iglesia (**Figura 16.B**), siendo mayor en el IT4 de la Cueva de la Iglesia. En general, estos resultados coinciden con los arrojados de manera experimental (**Figura 17**); aunque el índice de redundancia funcional muestra la actividad potencial de la ATP citrato liasa, también fue detectada en estromatolitos terrestres (Chimalacatepec) por el marcador genético *acl*.



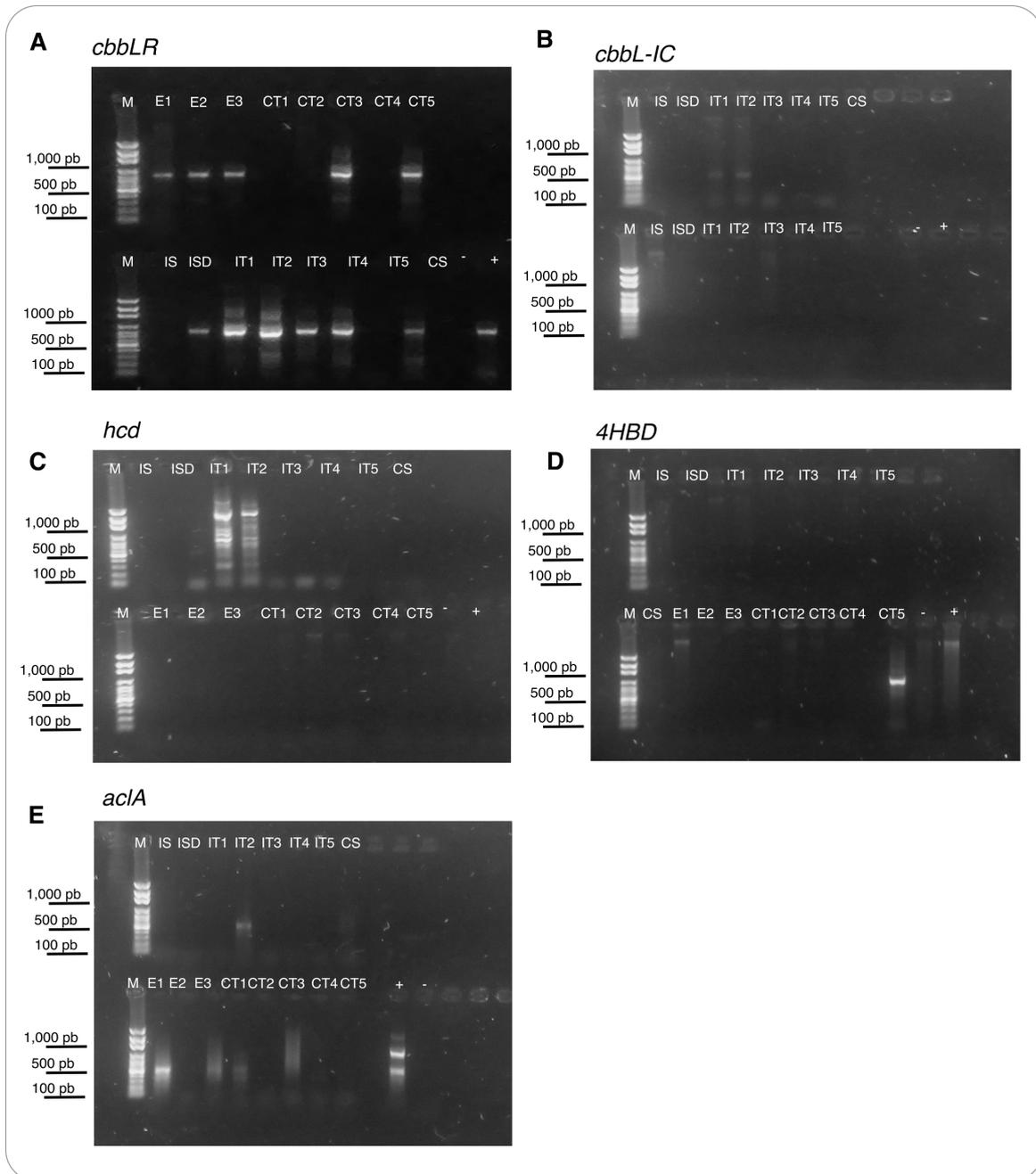
**Figura 16:** Índice de redundancia funcional de las enzimas clave para tres rutas de fijación de carbono predichas para los sistemas de: A. Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec. B. Cueva de la Iglesia. Códigos empleados, CS: suelo de Chimalacatepec, CT: tapete de Chimalacatepec, CE: estromatolito de Chimalacatepec, IS: suelo de Iglesia, ISD: sedimento colectado dentro de Iglesia, IT: tapete de Iglesia. Las barras representan la desviación estándar de abundancia predicha en las muestras.

### 10.10.2 Análisis de marcadores moleculares, ensayos PCR *in vitro*

Con el fin de comprobar las predicciones enzimáticas realizadas con Tax4Fun2 (**Figura 16**), se realizaron amplificaciones PCR de los genes que codifican las enzimas clave para el ciclo de las pentosas fosfato, la ruta del 3-hidroxiacetil-CoA/4-hidroxiacetil-CoA y del ciclo reductivo del ácido cítrico, a través de los marcadores moleculares que se encuentran enlistados en la **Tabla 4**. El resumen de los resultados obtenidos pueden visualizarse en la **Tabla 11**, en tanto que los geles de electroforesis que comprueban la presencia del amplicón en las muestras pueden visualizarse en la **Figura 17**. En general, el gen que codifica para la enzima RuBisCO forma IC, se encuentra en todas las muestras excepto en el suelo de la Cueva de la Iglesia. Mientras que, los genes *hcd* (que codifica para la enzima 4-hidroxiacetil-CoA deshidratasa) y *acl* (que codifica para la enzima ATP citrato liasa), se encontraron en las muestras de estromatolitos (Chimalacatepec) y de tapetes microbianos en ambos sistemas.

**Tabla 11:** Presencia de los genes involucrados en las enzimas clave para la fijación de carbono afótica. Presencia detectada (X), ausencia (-).

Marcador	Iglesia			Chimalacatepec		
	IS	ISD	IT	CS	CT	CE
<b>RuBisCO</b>						
cbbLR	-	X	X	X	X	X
cbbL-IC	-	-	X	-	-	-
<b>4-hidroxibutiril deshidratasa</b>						
HCD	-	-	X	-	-	X
4HBD	-	-	-	-	X	X
<b>ATP citrato liasa</b>						
aclA	-	-	X	-	X	X



**Figura 17:** Amplicones obtenidos de los genes involucrados en la fijación de carbono afótica. M: Marcador de tamaño molecular donde resaltan las bandas de 100, 500 y 1,000 pb. Tamaño de los amplicones esperados *cbbLR* (~818 pb), *cbbL-IC* (~552 pb), *hcd* (~839 pb), *4HBD* (~1,048 pb) y *aclA* (~564 pb).

## 11 Discusión

Generalmente las cuevas son consideradas como ambientes subterráneos con características extremas para la vida, debido a la poca disponibilidad de materia orgánica, ausencia de luz, altos niveles de humedad e incluso la variabilidad en composición mineral de las rocas (L. L. Barton y Northup, 2011). Las cuevas estudiadas en este trabajo son poco visitadas por turistas, el pueblo de San Juan Tlacotenco tiene un control estricto ante esa situación y sólo algunas personas del lugar las visitan; por tanto, son cuevas con poco impacto antropogénico. Estas cuevas pertenecen a una red de tubos de lava generada por una erupción del volcán Suchiooc, la cual ha sido descrita por Espinasa Pereña (1994). En este estudio se describe la composición, diversidad y patrones de distribución de las comunidades procariontes en dos cuevas (*i.e.*, el Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec y la Cueva de la Iglesia), sin mencionar que se sugieren las estrategias que tiene las comunidades procariontes de estos sistemas para la producción primaria y su papel en la formación de depósitos minerales secundarios.

### 11.1 Características ambientales de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia

El Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec se caracteriza por ser un túnel de grandes dimensiones y con una profundidad máxima de 200 m, sin mencionar que, tanto los estromatolitos terrestres como los tapetes microbianos se muestrearon a una profundidad aproximada de 100 m bajo nivel del suelo (**Figura 5**). Por otro lado, la Cueva de la Iglesia se caracteriza por ser una cueva anastomosada con una profundidad máxima de 60 m; además de que cada uno de los tapetes microbianos son diferentes entre sí y se encontraron en distintos puntos del sitio (**Figura 4**). En general los parámetros atmosféricos son similares entre las cuevas, ambas tienen una temperatura menor a 20°C y una humedad relativa mayor o cercana al 60%, estos resultados coinciden con los parámetros medidos en otras cuevas en el mundo (Cheeptham, 2013). Con respecto al agua de goteo, hay mayor concentración de carbono total y elementos principales en las muestras de la Cueva de la Iglesia en comparación con Chimalacatepec, ésto puede deberse a la profundidad de las cuevas, ya que Chimalacatepec posee una capa de suelo más gruesa; por lo que los nutrientes que contenga el agua quedarán adheridos a la superficie de las partículas de suelo o retenidos por los basaltos, filtrando el agua de goteo. Cabe mencionar que en las muestras de ambos tubos de lava el elemento con

mayor concentración fue el Si (**Tabla 8**), debido a que el mineral predominante en las rocas es el ópalo-A ( $\text{SiO}_2$ ) al igual que otros tubos de lava del mundo (Daza, 2012).

## 11.2 Composición y diversidad de las comunidades procariontes.

Los phyla más abundantes encontrados en los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia fueron: Acidobacteriota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi, Crenarchaeota, Plantomycetota, Proteobacteria y Verrucomicrobia (**Figura 8**). Estos phyla coinciden con los reportados en otros estudios de *metabarcoding* llevados a cabo en cuevas, en donde los grupos de los phyla Proteobacteria, Actinobacteriota y Acidobacteriota cuentan con mayor dominancia en estos sistemas (Dong et al., 2020; Gonzalez-Pimentel et al., 2018; Oliveira et al., 2017; Turrini et al., 2020; Zhu et al., 2019).

El grupo Proteobacteria contiene organismos capaces de sobrevivir a pesar de la variable disponibilidad de carbono (Ikner et al., 2007; Ivanova et al., 2013). El phylum Actinobacteriota está caracterizado por generar compuestos antibióticos, por lo que su participación en la formación de tapetes microbianos es relevante (Riquelme et al., 2017). Acidobacteriota y Bacteroidota pueden descomponer diversos compuestos orgánicos del ambiente (Naumoff y Dedysh, 2012), algunos de los organismos de Acidobacteriota particularmente sobreviven en ambientes oligotróficos (Smit et al., 2001). Los organismos del phylum Chloroflexi tienen la facultad de fijar carbono y es frecuentemente encontrado en otros sistemas subterráneos (Hügler et al., 2002; Spieck et al., 2020).

Adicionalmente el IT4 de la Cueva de la Iglesia muestra la presencia de Nitrospirota y Crenarchaeota. El primero de estos grupos es crucial para la manutención del ciclo del nitrógeno (Daims y Wagner, 2018), mientras que, el segundo phylum pertenece al dominio Archaea y se caracteriza por la capacidad que tienen algunos de sus organismos para oxidar amonio y fijar carbono mediante la ruta de 3-hidroxiopropionato/4-hidroxiбутирато (Berg et al., 2007; Srithep et al., 2018).

Por otra parte, la diversidad alfa de las muestras del tubo de lava de Chimalacatepec es mayor a 3 para el índice de Shannon y mayor a 0.9 para el índice Simpson Inverso (**Figura 9**). Estos resultados son similares a los encontrados en espeleotemas (Park et al., 2020) y tapetes microbianos (Pfundler et al., 2018; Riquelme et al., 2015) de sistemas de cuevas. Los resultados

de diversidad alfa de las muestras de Chimalacatepec sugiere que los organismos se distribuyen de manera homogénea en las muestras, en otras palabras, que el grado de equitatividad es similar. Por otro lado para la Cueva de la Iglesia hubo mayor variabilidad en los índices de diversidad (**Figura 9**) en donde el IT2 fue el que obtuvo la menor diversidad (Shannon = 2.5, SimpsInv = 0.49), debido a la dominancia del grupo *wb1.P19* (Nitrosococcaceae) (**Figura 11.D**).

Aunado a esto, la prueba de *t de Student* para los índices de Shannon mostró que existen diferencias significativas de la diversidad entre los tapetes microbianos del Sistema de Chimalacatepec y de la Cueva de la Iglesia, en donde los tapetes de Chimalacatepec tienen mayor diversidad alfa. Esto puede deberse a que los tapetes de Chimalacatepec se encuentran en un solo sitio del tubo de lava (**Figura 5**) por tanto, los organismos se han adaptado a condiciones ambientales similares. Por otro lado, los tapetes de la Cueva de la Iglesia se encuentran distribuidos en diferentes zonas de la cueva (**Figura 4**) y a diferentes condiciones ambientales, lo que puede generar las fluctuaciones de diversidad entre los tapetes sean más notorias. Una prueba de esto es que en La Cueva de la Iglesia el carbono orgánico y la concentración de elementos tienen mayor variación que en el Sistema de Chimalacatepec (**Tabla 7** y **Tabla 8**, respectivamente).

Con respecto a la diversidad beta, el análisis de NMDS y la prueba de PERMANOVA (sección de **Resultados 10.6.2**) mostraron que existen diferencias significativas en las comunidades procariontes en función de la cueva. Esto significa que, a pesar de que en ambas cuevas se encuentran los mismos taxa, estos cambian su proporción debido a características particulares de cada sistema, es decir, los mismos organismos se han adaptado de forma particular a cada cueva lo que genera que la estructura de cada comunidad sea distinta (C. A. Lozupone et al., 2007). Además los organismos encontrados en los estromatolitos terrestres están más relacionados con los organismos que se encuentran en las muestras de suelo, lo que sugiere que ambas matrices pueden presentar características fisicoquímicas similares; por lo que queda determinarlas en próximos estudios.

### 11.3 Patrones de distribución e interacción de las comunidades procariontes

De acuerdo al **análisis de ASVs compartidos y de *core* microbiano** llevado a cabo en las muestras del Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec y de La Cueva de la Iglesia, se sugiere que existen diferencias en la distribución de los organismos a través de los distintos componentes de los sistemas (**Figura 11**). En el Sistema de Chimalacatepec todas las muestras comparten tres géneros, un organismo no cultivado del orden Rokubacteriales, así como *Pedomicrobium* y *Steroidobacter*. Mientras que, en La Cueva de la Iglesia, todas las muestras comparten a los géneros *Crosiella* y *Steroidobacter*. Los organismos del género *Steroidobacter* se caracterizan por tener la capacidad de degradar esteroides utilizándolos como fuente principal de carbono, además de aceptar nitrato, nitrito o dióxígeno como aceptores de electrones (Fahrbach et al., 2008).

El orden Rokubacteriales ha sido encontrado en las muestras de sistemas kársticos en el sudeste de China y en el Reino Unido (Newsome et al., 2021; Zhu et al., 2019). Este grupo se caracteriza por codificar proteínas que permiten el transporte de carbono a través de la membrana citoplasmática, incluidas las especializadas en el transporte de lípidos, péptidos y azúcares. Así mismo, el análisis de su genoma mostró que posee genes para la codificación de nitrito reductasas, característica que la emparenta filogenéticamente con organismos del grupo Nitrospirota. Además los organismos de Rokubacteriales pueden utilizar diversos donadores y aceptores de electrones bajo condiciones tanto anaerobias como aerobias (Becraft et al., 2017). Por su parte el género *Pedomicrobium* es un grupo aerobio, heterótrofo y predominante en biopelículas (Braun et al., 2009) gracias a su capacidad de generar estructuras similares a hifas, los organismos de este grupo pueden adherirse a cualquier superficie y comenzar la formación de biopelículas (Sly y Arunpairojana, 1987). *Pedomicrobium* contiene solo cuatro especies cultivables a la fecha y todas precipitan y oxidan compuestos de hierro y manganeso (Cox y Sly, 1997). Finalmente, los organismos del grupo *Crosiella* son aerobios obligados y generan un tipo de hifa aérea que les permite adherirse a diversos sustratos, pueden reducir nitratos, producir fosfatasas y dopsisamina como antibiótico (Labeda, 2001). Cabe mencionar que en los últimos años, se ha asociado a *Crosiella* con la precipitación de carbonatos de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (J. Y. Li y Li, 2018; Rodríguez-Berbel et al., 2020).

El análisis de *core* microbiano realizado en los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia

y del Sistema de Chimalacatepec, mostró que éstos comparten cinco taxa, (*i.e.* *Crosiella*, un organismo no cultivado de la familia Methyloligellaceae, *Ga0077536* (Gammaproteobacteria), *wb1.P19* (Nitrosococcaceae) y *Steroidobacter*), los cuales pueden ser fundamentales para la formación y/o manutención de tapetes microbianos en sistemas de cueva. El género *wb-P19* fue el nombre de un filotipo encontrado en una cueva australiana (Holmes et al., 2006). Este filotipo fue asociado a bacterias autótrofas sulfo y nitrito oxidadoras. Al igual que *Steroidobacter*, *wb1.P19* se encontró en la misma cueva del sudeste de China (Zhu et al., 2019) y también en una cueva kárstica en España (Schabereiter-Gurtner et al., 2002). Adicionalmente, este género se encuentra asociado a la formación de biopelículas en otros sistemas (Tsuchiya et al., 2011). Finalmente, los organismos de la familia Methyloligellaceae, son organismos metilótrofos que han sido encontrados en diversos sistemas subterráneos como chimeneas hidrotermales y minas (Sjöberg et al., 2020; Suzuki et al., 2004).

A pesar de que existe un grupo de organismos *core* en los componentes de las cuevas, el **análisis de especies indicadoras** (IndVal) sugiere que también existen organismos que se encuentran estrechamente relacionados con el tipo de muestra; debido a que la matriz abiótica de los componentes puede ofrecer algunas ventajas para la supervivencia de éstos (De Cáceres et al., 2010). En el caso de **las muestras de Chimalacatepec**, la prueba de IndVal sugiere que organismos de los Subgrupos 22 y 25 son indicadores de los tapetes microbianos, mientras que, los Subgrupos 13 y 26 son géneros indicadores los estromatolitos (**Figura 12**). Los 26 Subgrupos existentes en el Phylum de Acidobacteriota han sido ampliamente estudiados y encontrados en muestras de suelo (Kuramae y De Assis Costa, 2019; Navarrete et al., 2015). La abundancia de los subgrupos de Acidobacteriota se encuentran relacionados con la disponibilidad de nutrientes y el pH, en donde el Subgrupo 13 se ha encontrado en muestras con baja disponibilidad de C y N, en tanto que, el Subgrupo 25 se halla en suelos con alta disponibilidad de nutrientes (Chaves et al., 2019). Los tapetes microbianos se distinguen por tener un alto contenido de materia orgánica, gracias a los fijadores de C (Cuadrado, 2019), sin embargo, en las estructuras órgano-sedimentarias hay una mayor presencia de carbono inorgánico (Cuadrado, 2019). Por ello, los organismos con capacidad de degradar compuestos complejos sobreviven en sustratos menos ricos en nutrientes como los estromatolitos del Sistema de Chimalacatepec.

Con respecto a las muestras de la Cueva de la Iglesia, los géneros indicadores de los IT1 e IT2, son organismos que comúnmente se encuentran en el suelo (*i.e.* *Chryseolinea*, *Rhizorharpis* y *Permianibacter*) (S. A. Lee et al., 2019; Wang et al., 2014). Esto puede deberse a que estos

tapetes se hallaron sobre una capa de sedimentos en el Balcón de las Raíces (**Figura 4**). Por otro lado, el IT4 presenta tres taxa de la clase Nitrososphaeria (*i.e.* *Ca. Nitrososphaera*, *Ca. Nitrosotenuis* y organismos del Grupo 1.1c). *Ca. Nitrososphaera* y *Ca. Nitrosotenuis* son arqueas con la capacidad de oxidar amoníaco para la obtención de energía y fijar carbono a través de la ruta del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato y del ciclo reductivo del ácido cítrico (Y. Li et al., 2016; Zhalnina et al., 2014). Por otra parte, los organismos del Grupo 1.1c, son procariontes que pueden mineralizar nitrógeno orgánico en amonio y dentro de los compuestos con mayor afinidad se encuentra el ácido glutámico (Weber et al., 2015), aminoácido sintetizado por la enzima glutamato sintetasa. Sin mencionar que la anotación de genes del genoma de *Ca. Nitrososphaera* arrojó presencia del gen para codificar la enzima mencionada (Zhalnina et al., 2014), lo que sugiere que los organismos indicadores del IT4 se retroalimentan en cuanto a los metabolitos generados. Además de acuerdo con algunas investigaciones, estos organismos crecen en lugares con altos porcentajes de humedad relativa y con un nivel de pH circumneutral (Y. Li et al., 2016; Zhalnina et al., 2014).

En cuanto a los patrones de interacción, los índices de modularidad indican que la muestra con más interacciones entre sus módulos son los estromatolitos de Chimalacatepec, sin mencionar que, en comparación con los tapetes microbianos del mismo tubo de lava, tienen menos módulos (**Figura 13**). Al parecer la comunidad de procariontes de los estromatolitos se encuentra más consolidada en contraste con la de los tapetes microbianos, pues la interacción entre módulos sugiere mayor cooperación entre la comunidad al no funcionar como entes individuales. Por otro lado, en todas las redes los organismos clave están relacionados con la degradación de compuestos químicos complejos (Subgrupos de Acidobacteriota) o con procesos de quimiolitotrofia (como *Nitrospira* y organismos de Crenarchaeota). Con ello, igualmente se sugiere que la hipótesis 2 planteada (**Sección 8**) se favorece ya que existieron diferentes patrones de modularidad entre tapetes y estromatolitos.

## **11.4 Potencial funcional y biogeoquímico de las comunidades procariontes de los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia**

Los resultados obtenidos en el análisis predictivo sugieren que las comunidades realizan procesos relacionados con la fijación de C, el metabolismo del metano y el metabolismo del azufre. Con respecto a los organismos relacionados con el ciclo del metano y del azufre, es posible que

éstos estuvieran activos durante el enfriamiento de la cuevas y por ello son detectados a través del marcador 16S rRNA. Sin mencionar que organismos del grupo B1-7BS también ha sido encontrado en tubos de lava de las Islas Canarias (Gonzalez-Pimentel, 2019). Adicionalmente, los análisis *in silico* e *in vitro* arrojaron resultados similares en cuanto a la determinación del potencial de las comunidades para la fijación de carbono mediante los ciclos CBB, 3HP/4HB y rTCA (**Figura 16** y **Tabla 11**), viendo que la hipótesis número 3 (**Sección 8**) se cumplió ya que se encontraron las tres rutas aerobias para la fijación de C propuestas para este estudio.

De acuerdo con los resultados de las pruebas *in vitro* la ruta CBB se lleva a cabo por la RuBisCO forma IC. Estos resultados coinciden con algunos de los géneros principales detectados a partir de los análisis de *core* microbiano (**Figura 11**), de especies indicadores (**Figura 12**) y de especies clave en las redes de interacción (**Figuras 13 y 14**), tales como: *Ca. Methyloirabilis* y *Pseudonocardia*. Las cuatro especies de *Ca. Methyloirabilis* conservan todos los genes para llevar a cabo la ruta de las pentosas fosfato (Versantvoort et al., 2018), lo que sugiere que es una ruta metabólica activa (Rasigraf et al., 2014). Finalmente, el género *Pseudonocardia* es un género ubicuo en suelos y presenta un crecimiento autotrófico, gracias a que puede llevar a cabo la ruta de las pentosas fosfato (Grostern y Alvarez-Cohen, 2013).

Como ya se ha mencionado, las arqueas *Ca. Nitrososphaera* y *Ca. Nitrosotenuis* tienen el potencial genético para fijar carbono a través de las rutas del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato o el ciclo reductivo del ácido cítrico (Y. Li et al., 2016; Zhalnina et al., 2014), lo cual también es comprobado de forma experimental. En la ruta del 3HP/4HB los organismos son capaces de transformar el carbono inorgánico ya sea en forma de  $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$ . El agua de goteo de ambas cuevas mostró tener un alto contenido de  $\text{HCO}_3^-$  (**Figura 6**) por lo que puede ser una fuente de carbono inorgánico para que se lleve a cabo el proceso mencionado.

## **11.5 Modelo propuesto del desarrollo de las comunidades procariontes en los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia**

Los tapetes microbianos son reconocidos como estructuras complejas que permiten a los organismos procariontes sobrevivir ante condiciones ambientales hostiles. Los organismos que habitan un tapete microbiano se encuentran protegidos gracias a la matriz extracelular generada, lo que facilita el desarrollo de interacciones entre las células y permite el intercambio de metabolitos y nutrientes (Sivadon et al., 2019). Se han llevado a cabo diversos estudios que

analizan la formación y el ciclo de vida de los tapetes microbianos en diferentes sistemas (A. A. Jones y Bennett, 2017; Yin et al., 2019). El ciclo de un tapete microbiano comienza con la adhesión de los organismos a un sustrato, el crecimiento inicial, la formación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), la maduración de la estructura y a veces la dispersión de los organismos a sustratos cercanos (Krsmanovic et al., 2021).

En cada uno de los pasos para la formación de un tapete, se deben llevar a cabo procesos importantes que permiten el mantenimiento y la supervivencia de los organismos. Para el primer paso, la adhesión de los organismos a un sustrato es necesario que haya movimiento de fluidos, ya que es el mecanismo por el que la biomasa bacteriana se transporta. Para que exista una adhesión irreversible pueden influir algunos factores como fuerzas de Van der Waals, la hidrofobicidad de la superficie e incluso la formación de algunas estructuras adhesivas (Campoccia et al., 2013). En los sistemas de cuevas, como los tubos de lava de Chimalacatepec e Iglesia, el movimiento de agua se da principalmente por agua de goteo que percola desde la superficie de la cueva hasta las paredes y el suelo de la misma. El agua de goteo, a su vez arrastra suelo y otros minerales resultado de la meteorización de la roca (**Tabla 8**), por lo que la convierte en un medio con componentes que pueden ser aprovechados por los procariontes (Sivadon et al., 2019). Dado que el análisis de *core* microbiano detectó en las muestras de tapetes microbianos a los géneros *Crosiella*, *Pedomicrobium* y *wb1.P19* (Nitrosococcaceae) es probable que sean esenciales para llevar a cabo la adhesión a la roca y comenzar así la formación de los tapetes (**Figura 18.A**).

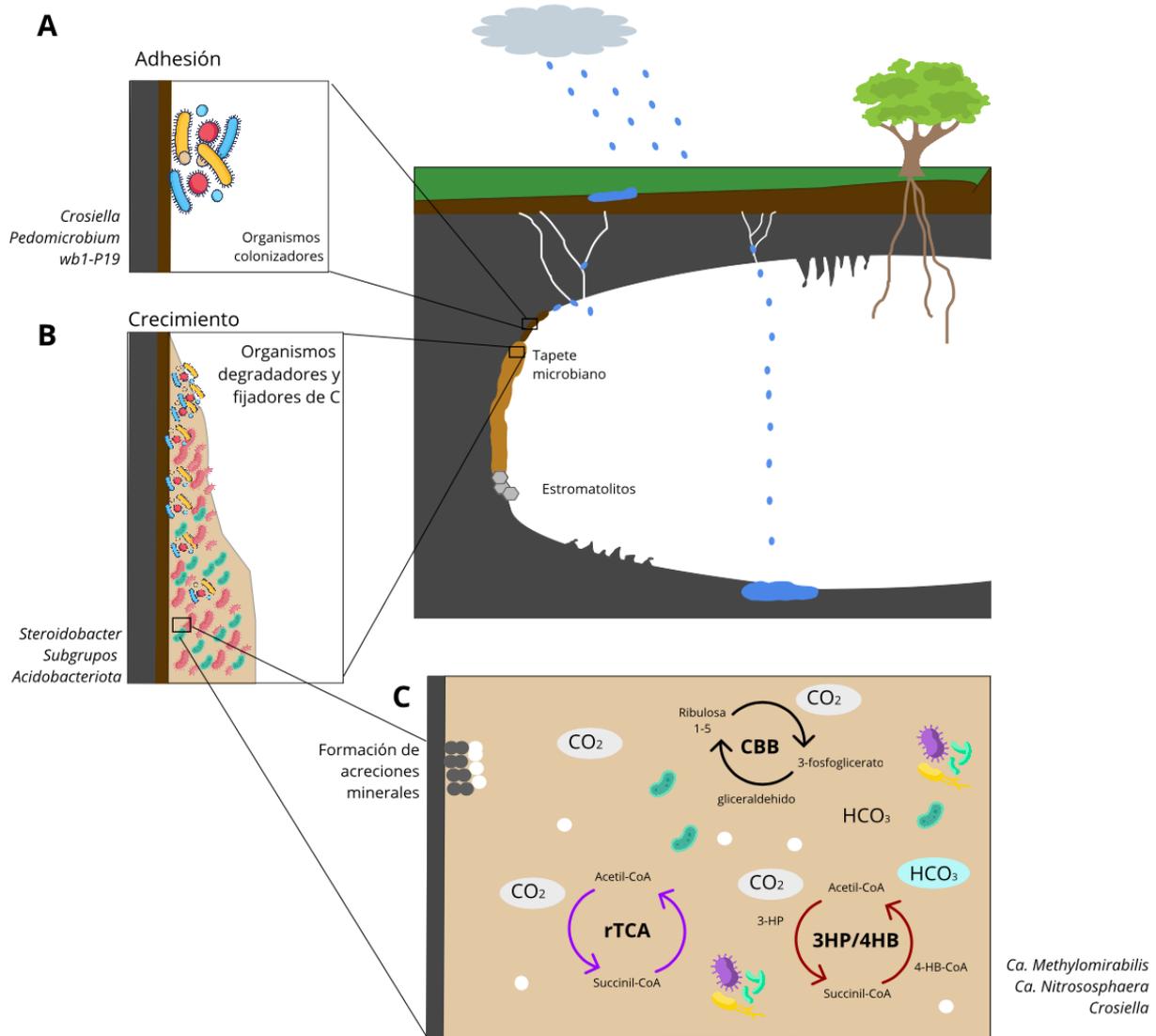
Durante la fase de crecimiento impera la necesidad de obtener carbono orgánico para asimilarlo a biomasa y permitir el crecimiento celular. Se ha sugerido que gran parte de los compuestos orgánicos no se solubilizan en el agua y pueden quedar adheridos en las superficies de los sustratos en formas de pequeñas gotas (Sivadon et al., 2019). De esta manera, organismos con la capacidad de degradar compuestos orgánicos complejos pueden asimilar el carbono de esas moléculas y estimular el catabolismo. El análisis de los microbiomas de Chimalacatepec e Iglesia, sugieren que existen diversos organismos clave que tienen el potencial de realizar la degradación de compuestos orgánicos complejos. Entre estos se encuentra los géneros *Steroidobacter* y varios organismos no cultivados de los Subgrupos de Acidobacteriota (*i.e.* Subgrupos 2, 7, 9, 10, 12, 13, 16, 22, 25, 26) (**Figura 18.B**). Aunado a esto, existen investigaciones en sistemas subterráneos que hacen hincapié en la obtención de C orgánico a partir de moléculas inorgánicas como el CO<sub>2</sub> y el HCO<sub>3</sub> (Alfreider et al., 2017). En los tubos de

lava de esta investigación, también se encontró el potencial para la fijación de carbono, a partir de experimentos computados y de laboratorio (**Figuras 16 y 17**). Dicho potencial se analizó con: i) el ciclo de las pentosas fosfato, ii) el ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato y el ciclo reductivo del ácido cítrico. Por tanto, es probable que la fuente de carbono orgánico de las comunidades microbianas de estos tubos de lava provenga tanto de la degradación de compuestos orgánicos complejos derivados de procesos de quimiolitotrofia (**Figura 18.C**).

Durante el crecimiento (**Figura 18.B**) se forman las sustancias extracelulares poliméricas, entre el 50% - 90% del carbono orgánico de los tapetes microbianos se encuentra en los EPS y se encuentra formado principalmente por polisacáridos y proteínas. Estos realizan muchas funciones para las comunidades como protección, humedad y transporte de metabolitos (K. S. Lee et al., 2020; Suarez et al., 2019). Sin embargo, también brinda información sobre la maduración que tienen los tapetes microbianos el grosor de los tapetes microbianos depende de la generación de EPS, de la concentración de nutrientes y de la edad que tenga. El grosor influye en la estructura del tapete como en su densidad, porosidad, en los gradientes redox y en general, en los microambientes locales que forme el tapete microbiano (Donlan, 2002; Suarez et al., 2019). Los tapetes microbianos en La Cueva de la Iglesia son delgados, por lo que se infiere que la acumulación de nutrientes y la generación de EPS es menor en comparación con los tapetes del Sistema de Chimalacatepec; por lo que es probable que los tapetes de la Cueva de la Iglesia sean más jóvenes. De hecho, dado que el IT1 e IT2 de la Cueva de la Iglesia aún no forman una película (**Figura 4**) es posible que estos tapetes se encuentren en la fase de adhesión.

Con respecto al Sistema de Chimalacatepec, Luis-Vargas et al., (2019) sugieren que los tapetes microbianos interfieren en la precipitación de carbonatos para la formación de estromatolitos terrestres. Los resultados obtenidos en la detección de módulos de las redes de co-ocurrencia, mostró que los estromatolitos terrestres generaron menos módulos y mayor interacción entre éstos (**Figura 13**). Por lo que puede haber una mayor consolidación en el intercambio de metabolitos en los estromatolitos, esto puede sugerir que los procesos metabólicos de las comunidades en los estromatolitos se encuentren mejor acoplados que en los tapetes. Esto permite la supervivencia de la comunidad procarionte y la generación de depósitos minerales secundarios (Bolhuis et al., 2014). Además el organismo que puede estar involucrado en la precipitación de carbonatos es *Crosiella*, sin mencionar que *Ca. Methylomirabilis* y arqueas como *Ca. Nitrososphaera* pueden jugar un papel importante

durante la degasificación de  $\text{CO}_2$  de la solución (**Figura 18.C**).



**Figura 18:** Modelo propuesto del desarrollo de las comunidades procariontes en sistemas de cuevas. A. Proceso de adhesión. B. Fase de crecimiento. C. Fijación de carbono mediante los ciclos de CBB, rTCA y 3HP/4HB.

## 12 Conclusiones

Del presente estudio se concluye que, no existen diferencias en cuanto a la composición taxonómica de las comunidades procariontes entre el Sistema de Tubo de Lava de Chimalacatepec y la Cueva de la Iglesia. Sin embargo, si se detectaron diferencias en la estructura de las comunidades en función de la cueva, estos resultados indican que los organismos de los mismos taxa se adaptan de diferente forma en función de los factores particulares de cada cueva.

En cuanto a los patrones de distribución (*i.e.* análisis de especies indicadoras, *core* microbiano y redes de co-ocurrencia), existen organismos que podrían desempeñar funciones importantes de colonización (*wb-P19*, *Pedomicrobium* y *Crosiella*), obtención de compuestos orgánicos (*Steroidobacter* y Subgrupos de Acidobacteriota) y quimiolitautotrofia (*Ca. Nitrososphaera*, *Ca. Nitrosotenuis*, *Ca. Methylospirillum* y *Pseudonocardia*). Asimismo, las redes de co-ocurrencia mostraron diferentes patrones de distribución entre los tapetes microbianos y los estromatolitos del tubo de lava de Chimalacatepec. En los tapetes microbianos de la Cueva de la Iglesia no hubo evidencia de interacción entre los módulos, no obstante, cada módulo se compone por organismos diferentes. Esto sugiere que a pesar de que existen los mismos taxones en las comunidades procariontes, los organismos cooperan y se adaptan de manera distinta en cada tapete de la cueva.

El análisis para determinar el potencial funcional de las comunidades sugiere que los organismos obtienen C a partir del CO<sub>2</sub> atmosférico y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> del agua de goteo. Sin embargo, también se reporta la presencia de varios procariontes con la capacidad de degradar compuestos complejos de C. Se sugiere que, su participación en conjunto con los organismos quimiolitautótrofos, es importante para la manutención y el crecimiento de las comunidades procariontes en estos sistemas.

## 13 Alcances y perspectivas

El presente estudio brinda un acercamiento para conocer la composición, estructura, distribución, patrones de interacción y potencial funcional de comunidades procariontes en sistemas de tubos de lava en el centro de México. En donde se hipotetiza que los mismos taxones de organismos colaboran y se adaptan a diferentes matrices abióticas. Con el fin de tener un panorama más amplio sobre la dinámica y la estructura de las comunidades de bacterias y arqueas en sistemas subterráneos, se pueden contemplar futuros estudios donde se tomen en cuenta más factores ambientales como diferentes estaciones del año, propiedades químicas del suelo de superficie y/o la composición mineralógica. Además con el fin de comprobar el ciclaje de nutrientes, se pueden llevar a cabo experimentos que incluyan el uso de marcadores isotópicos para carbono.

Adicionalmente pueden considerarse estudios metagenómicos y/o transcriptómicos para conocer con mayor profundidad el potencial funcional de las comunidades. Así mismo, la obtención de genomas de organismos de interés, podría brindar información sobre poblaciones y consorcios bacterianos con gran importancia para este tipo de sistemas.

## 14 Referencias

- Alfreider, A., Baumer, A., Bogensperger, T., Posch, T., Salcher, M. M., y Summerer, M. (2017). CO<sub>2</sub> assimilation strategies in stratified lakes: Diversity and distribution patterns of chemolithoautotrophs. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13786>
- Altfelder, S., Birke, M., Dohrmann, R., Hilse, H., Jenn, F., Kaufhold, S., Knödel, K., Nitsche, C., Schmidt, K., Thiem, A., y Voigt, H.-J. (2007). Methods for Characterizing the Geochemical and Microbiological Conditions. In *Environmental geology: Geological, hydrogeological investigations* (Vol. 3, pp. 749–940). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74671-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74671-3_17)
- Barberán, A., Bates, S. T., Casamayor, E. O., y Fierer, N. (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME Journal*, 6(2), 343–351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.119>
- Barton, Hazel A. (2015). Starving Artists: Bacterial Oligotrophic Heterotrophy in Caves. In C. Bakermans (Ed.), *Life in extreme environments: Microbial life of cave systems*. Walter de Gruyter GmbH.
- Barton, H. A., y Jurado, V. (2007). What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*, 2(3), 132–138. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34547171491%7B/&%7DpartnerID=40%7B/&%7Dmd5=c0f6b943fe84ea15b7f8e3362f075b47>
- Barton, L. L., y Northup, D. E. (2011). Microbe-microbe interactions. *Microbial Ecology*, 159–182. <https://doi.org/10.1002/9781118015841.ch6>
- Becraft, E. D., Woyke, T., Jarett, J., Ivanova, N., Godoy-Vitorino, F., Poulton, N., Brown, J. M., Brown, J., Lau, M. C. Y., Onstott, T., Eisen, J. A., Moser, D., y Stepanauskas, R. (2017). Rokubacteria: Genomic giants among the uncultured bacterial phyla. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02264>
- Berg, I. A. (2011). Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 1925–1936. <https://doi.org/10.1128/AEM.02473-10>
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W., y Fuchs, G. (2007). A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science*, 318(5857), 1782–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1149976>

- Berry, D., y Widder, S. (2014). Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00219>
- Blondel, V. D., Guillaume, J. L., Lambiotte, R., y Lefebvre, E. (2008). Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2008(10). <https://doi.org/10.1088/1742-5468/2008/10/P10008>
- Bolann, B. J., Rahil-Khazen, R., Henriksen, H., Isrenn, R., y Ulvik, R. J. (2007). Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 67(4), 353–366. <https://doi.org/10.1080/00365510601095281>
- Bolhuis, H., Cretoiu, M. S., y Stal, L. J. (2014). Molecular ecology of microbial mats. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(2), 335–350. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12408>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Braun, B., Richert, I., y Szewzyk, U. (2009). Detection of iron-depositing Pedomicrobium species in native biofilms from the Odertal National Park by a new, specific FISH probe. *Journal of Microbiological Methods*, 79(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.014>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., y Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y 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>
- Campoccia, D., Montanaro, L., y Arciola, C. R. (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 34(34), 8533–8554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., y Shen, T. J. (2006). Abundance-based similarity indices

- and their estimation when there are unseen species in samples. *Biometrics*, 62(2), 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2005.00489.x>
- Chariton, A. A., Court, L. N., Hartley, D. M., Colloff, M. J., y Hardy, C. M. (2010). Ecological assessment of estuarine sediments by pyrosequencing eukaryotic ribosomal DNA. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(5), 233–238. <https://doi.org/10.1890/090115>
- Chaves, M. G., Silva, G. G., Rossetto, R., Edwards, R. A., Tsai, S. M., y Navarrete, A. A. (2019). Acidobacteria subgroups and their metabolic potential for carbon degradation in sugarcane soil amended with vinasse and nitrogen fertilizers. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01680>
- 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>
- Chen, S. Y., Feng, Z., y Yi, X. (2017). A general introduction to adjustment for multiple comparisons. *Journal of Thoracic Disease*, 9(6), 1725–1729. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.05.34>
- Chen, Y., Wu, L., Boden, R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., Baciu, M., Lu, Y., y 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>
- Cox, T. L., y Sly, L. I. (1997). Phylogenetic relationships and uncertain taxonomy of Pedomicrobium species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 377–380. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-377>
- Csardi, G., y Nepusz, T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems, Complex Sy*(1695), 1695. <http://igraph.sf.net>
- Cuadrado, D. G. (2019). *Microbial mats: Impact on geology* (4th ed., Vol. 2, pp. 146–156). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13076-6>
- Daims, H., y Wagner, M. (2018). Nitrospira. *Trends in Microbiology*, 26(5), 462–463. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.001>
- Daza Brunet, R., y 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>

- Daza, R. (2012). *Branca Opala ( Terceira , Islas Azores ) Geochemical characterization of the silica deposits in the Branca Opala Cave*. 860–863.
- De Cáceres, M., Legendre, P., y Moretti, M. (2010). Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos*, *119*(10), 1674–1684. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18334.x>
- De Mandal, S., Chatterjee, R., y Kumar, N. S. (2017). Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1002-x>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., y Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Dong, Y., Gao, J., Wu, Q., Ai, Y., Huang, Y., Wei, W., Sun, S., y Weng, Q. (2020). Co-occurrence pattern and function prediction of bacterial community in Karst cave. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01806-7>
- Donlan, R. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, *8*(9), 1891–1890.
- Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S., y Visscher, P. T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, *96*(3), 141–162. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2008.10.005>
- Engel, A. S. (2015). 1. Bringing Microbes into Focus for Speleology: An Introduction. *Microbial Life of Cave Systems, II*, 1–22. <https://doi.org/10.1515/9783110339888-003>
- Espinasa Pereña, R. (1994). *Origen y distribución de las cavernas de México* (Vol. 36, pp. 45–49).
- Espinasa-Pereña, R. (1999). *Origen y evolución de tubos de lava en la Sierra Chichinautzin: El caso del volcán Suchiooc*. (p. 96) [Tesis Maestr{\'}{i}a]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Espinasa-Pereña, R. (2006). Lava Tubes of the Suchiooc Volcano, Mexico. *Association for Mexican in Cave Studies Bulletin*, *17*, 80.
- Fahrbach, M., Kuever, J., Remesch, M., Huber, B. E., Kämpfer, P., Dott, W., y Hollender, J. (2008). *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,

58(9), 2215–2223. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65342-0>

- Faust, K., y Raes, J. (2012). Microbial interactions: From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 538–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Faust, K., Sathirapongsasuti, J. F., Izard, J., Segata, N., Gevers, D., Raes, J., y Huttenhower, C. (2012). Microbial co-occurrence relationships in the Human Microbiome. *PLoS Computational Biology*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002606>
- Ghosh, S., Kuisiene, N., y Cheeptham, N. (2017). The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochemical Pharmacology*, 134, 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., y Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: Successes and aspirations. *BMC Biology*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., y Egozcue, J. J. (2017). Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>
- Gong, F., Zhu, H., Zhang, Y., y Li, Y. (2018). Biological carbon fixation: From natural to synthetic. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 28(September), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.09.014>
- Gonzalez-Pimentel, J. L. (2019). *Microorganismos de las cuevas volcánicas de La Palma (Islas Canarias)*. *Diversidad y uso biotecnológico*. (p. 368) [Doctor en Biotecnología]. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Gonzalez-Pimentel, J. L., Miller, A. Z., Jurado, V., Laiz, L., Pereira, M. F. C., y Saiz-Jimenez, C. (2018). Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active Actinobacteria. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <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>
- Govil, T., Rathinam, N. K., Salem, D. R., y Sani, R. K. (2019). *Taxonomical Diversity of Extremophiles in the Deep Biosphere* (pp. 631–656). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814849-5.00035-6>
- Grosterm, A., y Alvarez-Cohen, L. (2013). RubisCO-based CO<sub>2</sub> fixation and C1 metabolism in the

- actinobacterium *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190. *Environmental Microbiology*, 15(11), 3040–3053. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12144>
- Hathaway, J. J. M., Sinsabaugh, R. L., Dapkevicius, M. D. L. N. E., y Northup, D. E. (2014). 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>
- He, H., Fu, L., Liu, Q., Fu, L., Bi, N., Yang, Z., y Zhen, Y. (2019). Community Structure, Abundance and Potential Functions of Bacteria and Archaea in the Sansha Yongle Blue Hole, Xisha, South China Sea. *Frontiers in Microbiology*, 10(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02404>
- Hernandez-Agreda, A., Gates, R. D., y Ainsworth, T. D. (2017). Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends in Microbiology*, 25(2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.003>
- Holler, C. (2019). Pseudokarst. In W. B. White, D. C. Culver, y T. Pipan (Eds.), *Encyclopedia of caves* (3rd ed., pp. 836–849). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814124-3.00101-1>
- Holmes, A. J., Tujula, N. A., Holley, M., Contos, A., James, J. M., Rogers, P., y Gillings, M. R. (2006). *Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves , Australia*. 3(2001), 256–264.
- Hügler, M., Gärtner, A., y Imhoff, J. F. (2010). Functional genes as markers for sulfur cycling and CO<sub>2</sub> fixation in microbial communities of hydrothermal vents of the Logatchev field. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(3), no–no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00919.x>
- Hügler, M., Menendez, C., Schägger, H., y Fuchs, G. (2002). Malonyl-coenzyme a reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *Journal of Bacteriology*, 184(9), 2404–2410. <https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2404-2410.2002>
- Ikner, L. A., Toomey, R. S., Nolan, G., Neilson, J. W., Pryor, B. M., y Maier, R. M. (2007). Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microbial Ecology*, 53(1), 30–42. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9135-8>
- Ircus, C., Pascu, M. D., Lavin, P., Perşoiu, A., Iancu, L., y Purcarea, C. (2018). Bacterial and archaeal community structures in perennial cave ice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28111-1>

- Ivanova, V., Tomova, I., Kamburov, A., Tomova, A., Vasileva-Tonkova, E., y Kambourova, M. (2013). High phylogenetic diversity of bacteria in the area of prehistoric paintings in Magura cave, Bulgari. *Journal of Cave and Karst Studies*, 75(3), 218–228. <https://doi.org/10.4311/2012MB0279>
- Jones, A. A., y Bennett, P. C. (2017). Mineral ecology: Surface specific colonization and geochemical drivers of biofilm accumulation, composition, and phylogeny. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00491>
- Jones, D. S., Schaperdoth, I., y Macalady, J. L. (2014). Metagenomic Evidence for Sulfide Oxidation in Extremely Acidic Cave Biofilms. *Geomicrobiology Journal*, 31(3), 194–204. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.834008>
- Jones, W. K., y White, W. B. (2012). Karst. *Encyclopedia of Caves*, 430–438. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383832-2.00061-X>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., y Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., y Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Konhauser, K. (2016). *Ehrlich's Geomicrobiology* (H. L. Ehrlich, D. K. Newman, y A. Kappler, Eds.; 6th ed., p. 643). CRC Press.
- Krsmanovic, M., Biswas, D., Ali, H., Kumar, A., Ghosh, R., y Dickerson, A. K. (2021). Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102336>
- Kuramae, E. E., y De Assis Costa, O. Y. (2019). Acidobacteria. *Encyclopedia of Microbiology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20780-2>
- Labeda, D. P. (2001). *Crossiella* gen. nov., a new genus related to *Streptoalloteichus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1575–1579. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1575>

- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., y Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, *31*(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Layeghifard, M., Hwang, D. M., y Guttman, D. S. (2017). Disentangling Interactions in the Microbiome: A Network Perspective. *Trends in Microbiology*, *25*(3), 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.008>
- Lee, K. S., Kwon, T.-H., Park, T., y Jeong, M. S. (2020). *Microbiology and Microbial Products for Enhanced Oil Recovery* (pp. 27–65). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819983-1.00002-8>
- Lee, S. A., Kim, Y., Sang, M. K., Song, J., Kwon, S. W., y Weon, H. Y. (2019). *Chryseolinea soli* sp. nov., isolated from soil. *Journal of Microbiology*, *57*(2), 122–126. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8562-4>
- Legendre, P. (2013). Indicator Species: Computation. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, *4*, 264–268. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00430-5>
- Legendre, P., y Legendre, L. (2012). *Multidimensional qualitative data*. 219–264. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53868-0.50006-x>
- Li, J. Y., y Li, T. Y. (2018). Seasonal and annual changes in soil/cave air pCO<sub>2</sub> and the  $\delta^{13}\text{C}$ -DIC of cave drip water in response to changes in temperature and rainfall. *Applied Geochemistry*, *93*(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.04.002>
- Li, Y., Ding, K., Wen, X., Zhang, B., Shen, B., y Yang, Y. (2016). A novel ammonia-oxidizing archaeon from wastewater treatment plant: Its enrichment, physiological and genomic characteristics. *Scientific Reports*, *6*(October 2015), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23747>
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., Chaffron, S., Ignacio-Espinosa, J. C., Roux, S., Vincent, F., Bittner, L., Darzi, Y., Wang, J., Audic, S., Berline, L., Bontempi, G., Cabello, A. M., Coppola, L., Cornejo-Castillo, F. M., ... Velayoudon, D. (2015). Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, *348*(6237). <https://doi.org/10.1126/science.1262073>
- Lin, H., y Peddada, S. D. (2020). Analysis of microbial compositions: a review of normalization and differential abundance analysis. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00160-w>

- Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B. N., Huber, J. A., O'Connor, M. I., Ackermann, M., Hahn, A. S., Srivastava, D. S., Crowe, S. A., Doebeli, M., y Parfrey, L. W. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology and Evolution*, *2*(6), 936–943. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., y Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(5), 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Lozupone, C. A., y Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(4), 557–578. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x>
- Lozupone, C., y Knight, R. (2005). UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- López-Martínez, R., Barragán, R., Beraldi-Campesi, H., Lánzos, T., Vidal-Romaní, J. R., Aubrecht, R., Bernal Uruchurtu, J. P., Pi Puig, T., y 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>
- Luis-Vargas, M. N., López-Martínez, R. A., Vilchis-Nestor, A. R., Daza, R., y Alcántara-Hernández, R. J. (2019). Bacterial Insights into the Formation of Opaline Stromatolites from the Chimalacatepec Lava Tube System, Mexico. *Geomicrobiology Journal*, *36*(8). <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1607952>
- Marizzoni, M., Gurry, T., Provasi, S., Greub, G., Lopizzo, N., Ribaldi, F., Festari, C., Mazzelli, M., Mombelli, E., Salvatore, M., Mirabelli, P., Franzese, M., Soricelli, A., Frisoni, G. B., y Cattaneo, A. (2020). Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Frontiers in Microbiology*, *11*(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01262>
- Marques, E., Dias, J., Gross, E., Silva, A., Moura, S. de, y Rezende, R. (2019). Purple Sulfur Bacteria Dominate Microbial Community in Brazilian Limestone Cave. *Microorganisms*, *7*(2), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020029>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis

- and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Misra, K. (2012). *Introduction to Geochemistry* (1st ed., p. 431). Wiley-Blackwell.
- Naumoff, D. G., y Dedysh, S. N. (2012). Lateral gene transfer between the Bacteroidetes and Acidobacteria: The case of  $\alpha$ -l-rhamnosidases. *FEBS Letters*, 586(21), 3843–3851. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.005>
- Navarrete, A. A., Venturini, A. M., Meyer, K. M., Klein, A. M., Tiedje, J. M., Brendan, B. J., Nüsslein, K., Tsai, S. M., y Rodrigues, J. L. M. (2015). Differential response of Acidobacteria subgroups to forest-to-pasture conversion and their biogeographic patterns in the western Brazilian Amazon. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01443>
- Nazir, R., Zaffar, M. R., y Amin, I. (2019). *Bacterial biofilms: The remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes* (pp. 307–340). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00008-6>
- Newsome, L., Bacon, C. G. D., Song, H., Luo, Y., Sherman, D. M., y Lloyd, J. R. (2021). Natural attenuation of lead by microbial manganese oxides in a karst aquifer. *Science of the Total Environment*, 754, 142312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142312>
- Northup, D. E., Melim, L. A., Spilde, M. N., Hathaway, J. J. M., Garcia, M. G., Moya, M., Stone, F. D., Boston, P. J., Dapkevicius, M. L. N. E., y 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., y 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>
- Oliveira, C., Gunderman, L., Coles, C. A., Lochmann, J., Parks, M., Ballard, E., Glazki, G., Rahmatallah, Y., Tackett, A. J., y Thomas, D. J. (2017). 16S rRNA Gene-based metagenomic analysis of Ozark Cave Bacteria. *Diversity (Basel)*, 59(8), 855–870. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1527.A>
- Ortiz, M., Legatzki, A., Neilson, J. W., Fryslie, B., Nelson, W. M., Wing, R. A., Soderlund, C. A., Pryor, B. M., y 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.2013.152>

[//doi.org/10.1038/ismej.2013.159](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.159)

- Ortiz, M., Neilson, J. W., Nelson, W. M., Legatzki, A., Byrne, A., Yu, Y., Wing, R. A., Soderlund, C. A., Pryor, B. M., Pierson, L. S., 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>
- Park, S., Cho, Y. J., Jung, D. Y., Jo, K. N., Lee, E. J., y Lee, J. S. (2020). Microbial Diversity in Moonmilk of Baeg-nyong Cave, Korean CZO. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00613>
- Pershina, E. V., Ivanova, E. A., Korvigo, I. O., Chirak, E. L., Sergaliev, N. H., Abakumov, E. V., Provorov, N. A., y Andronov, E. E. (2018). Investigation of the core microbiome in main soil types from the East European plain. *Science of the Total Environment*, 631-632, 1421–1430. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.136>
- Pfendler, S., Karimi, B., Maron, P. A., Ciadamidaro, L., Valot, B., Bousta, F., Alaoui-Sosse, L., Alaoui-Sosse, B., y Aleya, L. (2018). Biofilm biodiversity in French and Swiss show caves using the metabarcoding approach: First data. *Science of the Total Environment*, 615, 1207–1217. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.054>
- Piper, A. (1944). A graphic procedure in the geochemical interpretation of water-analyses. *Transactions, American Geophysical Union*, 25(6), 914–928.
- Price, M. N., Dehal, P. S., y Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., y Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rasigraf, O., Kool, D. M., Jetten, M. S. M., Sinninghe Damsté, J. S., y Ettwig, K. F. (2014). Autotrophic carbon dioxide fixation via the Calvin-Benson-Bassham cycle by the denitrifying methanotroph "Candidatus Methyloirabilis oxyfera". *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2451–2460. <https://doi.org/10.1128/AEM.04199-13>
- Reinthal, T., Aken, H. M. van, y Herndl, G. J. (2010). Major contribution of autotrophy to microbial carbon cycling in the deep North Atlantic's interior. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(16), 1572–1580. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.02.023>

- Riquelme, C., Enes Dapkevicius, M. de L., Miller, A. Z., Charlop-Powers, Z., Brady, S., Mason, C., y Cheeptham, N. (2017). Biotechnological potential of Actinobacteria from Canadian and Azorean volcanic caves. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(2), 843–857. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7932-7>
- Riquelme, C., Rigal, F., Hathaway, J. J. M., Northup, D. E., Spilde, M. N., Borges, P. A. V., Gabriel, R., Amorim, I. R., y Dapkevicius, M. de L. N. E. (2015). 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>
- Risely, A. (2020). Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *Journal of Animal Ecology*, *89*(7), 1549–1558. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13229>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., y Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, *43*(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rodríguez-Berbel, N., Ortega, R., Lucas-Borja, M. E., Solé-Benet, A., y Miralles, I. (2020). Long-term effects of two organic amendments on bacterial communities of calcareous mediterranean soils degraded by mining. *Journal of Environmental Management*, *271*(February). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110920>
- Sauro, F., Cappelletti, M., Ghezzi, D., Columbu, A., Hong, P. Y., Zowawi, H. M., Carbone, C., Piccini, L., Vergara, F., Zannoni, D., y De Waele, J. (2018). Microbial diversity and biosignatures of amorphous silica deposits in orthoquartzite caves. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35532-y>
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., y Rölleke, S. (2002). Phylogenetic 16s rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environmental Microbiology*, *4*(7), 392–400. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00303.x>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, *27*(4), 623–656. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb00917.x>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, *163*(1943), 1949.
- Sivadon, P., Barnier, C., Urios, L., y Grimaud, R. (2019). Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates. *Environmental Microbiology Reports*, *11*(6), 749–764. <https://doi.org/10.1002/emr2.1111>

[//doi.org/10.1111/1758-2229.12785](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12785)

- Sjöberg, S., Stairs, C. W., Allard, B., Homa, F., Martin, T., Sjöberg, V., Ettema, T. J. G., y Dupraz, C. (2020). Microbiomes in a manganese oxide producing ecosystem in the Ytterby mine, Sweden: Impact on metal mobility. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(11), 1–17. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa169>
- Sly, L. I., y Arunpairojana, V. (1987). Isolation of manganese-oxidizing Pedomicrobium cultures from water by micromanipulation. *Journal of Microbiological Methods*, *6*(3), 177–182. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90013-3](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90013-3)
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., Van Den Broek, J., Van Mil, S., y Wernars, K. (2001). Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(5), 2284–2291. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2284-2291.2001>
- Spieck, E., Spohn, M., Wendt, K., Bock, E., Shively, J., Frank, J., Indenbirken, D., Alawi, M., Lücker, S., y Hüpeden, J. (2020). Extremophilic nitrite-oxidizing Chloroflexi from Yellowstone hot springs. *ISME Journal*, *14*(2), 364–379. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0530-9>
- Srithep, P., Pornkulwat, P., y Limpiyakorn, T. (2018). Contribution of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria to ammonia oxidation in two nitrifying reactors. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(9), 8676–8687. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1155-z>
- Suarez, C., Piculell, M., Modin, O., Langenheder, S., Persson, F., y Hermansson, M. (2019). Thickness determines microbial community structure and function in nitrifying biofilms via deterministic assembly. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41542-1>
- Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K. H., y Horikoshi, K. (2004). Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems. *Microbial Ecology*, *47*(2), 186–196. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1014-y>
- Taberlet, P., Coissac, E., y Pompanon, F. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding - TABERLET - 2012 - Molecular Ecology - Wiley Online Library. *Molecular ...*, *33*, 2045–2050. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x/full%7B/%7D5Cnpapers2://publication/uuid/30F6E470-48F9-4C24-A3C1-6964EE26B34F>
- Talà, A., Buccolieri, A., Calcagnile, M., Ciccacese, G., Onorato, M., Onorato, R., Serra, A., Spedicato, F., Tredici, S. M., Alifano, P., y Belmonte, G. (2021). Chemotrophic profiling of prokaryotic

- communities thriving on organic and mineral nutrients in a submerged coastal cave. *Science of the Total Environment*, 755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142514>
- Tebo, B. M., Davis, R. E., Anitori, R. P., Connell, L. B., Schiffman, P., y 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>
- Tetu, S. G., Breakwell, K., Elbourne, L. D. H., Holmes, A. J., Gillings, M. R., y Paulsen, I. T. (2013). Life in the dark: Metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. *ISME Journal*, 7(6), 1227–1236. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.14>
- Tourney, J., y Ngwenya, B. T. (2009). Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO<sub>3</sub> morphology and polymorphism. *Chemical Geology*, 262(3-4), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2009.01.006>
- Tringe, S. G., y Rubin, E. M. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 805–814. <https://doi.org/10.1038/nrg1709>
- Tsuchiya, Y., Hiraki, A., Kiriya, C., Arakawa, T., Kusakabe, R., y Morisaki, H. (2011). Seasonal change of bacterial community structure in a biofilm formed on the surface of the aquatic macrophyte phragmites australis. *Microbes and Environments*, 26(2), 113–119. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10183>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., y Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Turrini, P., Tescari, M., Visaggio, D., Pirolo, M., Lugli, G. A., Ventura, M., Frangipani, E., y Visca, P. (2020). The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. *Microbiological Research*, 241(May), 126584. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126584>
- Valerio, A., Tallarico, A., y 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>
- Versantvoort, W., Guerrero-Cruz, S., Speth, D. R., Frank, J., Gambelli, L., Cremers, G., Alen, T. van, Jetten, M. S. M., Kartal, B., Op den Camp, H. J. M., y Reimann, J. (2018). Comparative genomics of *Candidatus* Methyloirabilis species and description of *Ca.* Methyloirabilis lanthanidiphila. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01672>

- Wang, H., Zheng, T., Hill, R. T., y Hu, X. (2014). *Permianibacter aggregans* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family Pseudomonadaceae capable of aggregating potential biofuel-producing microalgae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 3503–3507. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.065003-0>
- Weber, E. B., Lehtovirta-Morley, L. E., Prosser, J. I., y Gubry-Rangin, C. (2015). Ammonia oxidation is not required for growth of group 1.1c soil Thaumarchaeota. *FEMS Microbiology Ecology*, *91*(3), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv001>
- Wemheuer, F., Taylor, J., Daniel, R., Johnston, E., Meinicke, P., Thomas, T., y Wemheuer, B. (2018). Tax4Fun2: a R-based tool for the rapid prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene marker gene sequences. *bioRxiv*, *7*, 490037. <https://doi.org/10.1101/490037>
- Williams, R. J., Howe, A., y Hofmockel, K. S. (2014). Demonstrating microbial co-occurrence pattern analyses within and between ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, *5*(JULY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00358>
- Wolz, C., Yarwood, S. A., Campbell Grant, E. H., Fleischer, R. C., y Lips, K. R. (2017). Effects of host species and environment on the skin microbiome of Plethodontid salamanders. *Journal of Animal Ecology*, *87*(2), 341–353. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Yakimov, M. M., Cono, V. L., Smedile, F., DeLuca, T. H., Juárez, S., Ciordia, S., Fernández, M., Albar, J. P., Ferrer, M., Golyshin, P. N., y Giuliano, L. (2011). Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (Central Mediterranean Sea). *ISME Journal*, *5*(6), 945–961. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.197>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., y He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Zamora Martínez, O., Montaña Hilario, J. M., Galindo Zavala, V. B., Siebe Grabach, C., y 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>
- Zhalnina, K. V., Dias, R., Leonard, M. T., De Quadros, P. D., Camargo, F. A. O., Drew, J. C., Farmerie, W. G., Daroub, S. H., y Triplett, E. W. (2014). Genome sequence of *Candidatus nitrososphaera evergladensis* from group I.1b enriched from everglades soil reveals novel genomic

features of the ammonia-oxidizing archaea. *PLoS ONE*, 9(7), 21–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101648>

Zhu, H. Z., Zhang, Z. F., Zhou, N., Jiang, C. Y., Wang, B. J., Cai, L., y Liu, S. J. (2019). Diversity, distribution and co-occurrence patterns of bacterial communities in a karst cave system. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01726>

Zieseimer, K. A., Mann, A. E., Sankaranarayanan, K., Schroeder, H., Ozga, A. T., Brandt, B. W., Zaura, E., Waters-Rist, A., Hoogland, M., Salazar-García, D. C., Aldenderfer, M., Speller, C., Hendy, J., Weston, D. A., MacDonald, S. J., Thomas, G. H., Collins, M. J., Lewis, C. M., Hofman, C., y Warinner, C. (2015). Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification. *Scientific Reports*, 5, 1–19. <https://doi.org/10.1038/srep16498>

## Anexo

### A.1 Revisión bibliográfica de estudios microbiológicos en sistemas de cuevas

Se llevó a cabo una revisión de artículos científicos de estudios de microbiología en sistemas de cuevas (kársticas y pseudokársticas). Y se eligieron aquellos cuya fecha de publicación fuera a partir del 2010.

**Tabla A1:** Revisión bibliográfica de los análisis de microbiología en sistemas de cuevas pseudokársticas.

Cueva (País)	Muestra	Método de análisis	Potencial funcional	Referencia
Buracos (PRT)	Espeleotemas	Identificación del 16S rRNA, DGGE	No	de los Río et al., 2011
La Palma (ESP)	Tapete microbiano	Metabarcoding de V4 16S rRNA y metagenoma, Illumina Miseq	No	González-Pimentel et al., 2018
Azores (PRT)	Tapete microbiano	Identificación genes, DGGE	Fijación de N y oxidación de amonio	Hathaway et al., 2014
LABE (USA)	Tapete microbiano	Metabarcoding de V1 y V3 del 16S rRNA, 454 Roche	No	Lavoie et al., 2017
Chimalacatepec (MEX)	Espeleotemas y tapetes microbianos	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Luis-Vargas et al., 2019
Azores (PRT) y Hawaii (USA)	Tapete microbiano	Secuenciación de 16S rRNA, ABI PRISM	No	Northup et al., 2011
Gruta Triangulo (BRA)	Tapete microbiano	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Parker et al., 2018
Azores (PRT)	Tapete microbiano	Secuenciación del 16S rRNA	No	Riquelme et al., 2015
Mt. Erebus (ATA)	Sedimentos	Secuenciación del 16S rRNA	Potencial para fijación de C	Tebo et al., 2015

**Tabla A2:** Revisión bibliográfica de los análisis de microbiología en sistemas de cuevas kársticas.

Cueva (País)	Muestra	Método de análisis	Potencial funcional	Referencia
Roraima Sur (VEN)	Sedimentos	Secuenciación del 16S rRNA, Sanger	No	Barton et al., 2014
Molnár János, Gállert Hill (HUN)	Tapete microbiano	Secuenciación de V4 16S rRNA, ABI PRISM 310	No	Borsodi et al., 2012
Schmiedefeld (DEU)	Rocas	Secuenciación del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Burow et al., 2019
Villa Luz (MEX)	Espeleotemas y sedimentos	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, 454 Roche	No	D'Auria et al., 2018
Monte Conca (ITA)	Agua	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Davis et al., 2020
Murapuk, Lamsialpuk, Farpuk (IND)	Sedimentos	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	De Mandal et al., 2016
Bukpuk, Lamsialpuk, Reiekpuk (IND)	Sedimentos	Metabarcoding de V3 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	De Mandal et al., 2017
Lake, Moondyne y Mammoth (AUS)	Espeleotemas	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Dhami et al., 2018
Zhinjin (CHN)	Rocas, sedimentos y espeleotemas	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	Predicción funcional con PICRUST	Dong et al., 2020
Lowe Kane (USA)	Tapete microbianos	Detección de RFLPs	No	Engel et al., 2010
Kaklik (TUR)	Sedimentos y tapetes microbianos	Metabarcoding de V4 y V5 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Gulecal-Pektas y Temel, 2017
Frasassi y Rio Garrafo (ITA)	Tapete microbiano	Metagenoma, Illumina HiSeq 2000	Potencial para ciclos de C, N y S	Hamilton et al., 2014
Xueyu (CHN)	Agua	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	He et al., 2019
Scaisoara (ROU)	Rocas	Secuenciación del 16S rRNA, 454 Roche	No	Itecs et al., 2018
Frasassi (ITA)	Tapete microbiano	Secuenciación del 16S rRNA, ABI Hitachi	Potencial para oxidación de S	Jones et al., 2014
Krubera-Voronja (RUS)	Sedimentos, espeleotemas y agua	Metabarcoding de V4 16S rRNA, 454 Roche	No	Kieraitė-Aleksandrova et al., 2015
Sopradeira (BRA)	Sedimentos	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	Fijación de N y oxidación de amonio	Marques et al., 2019
Ozark (USA)	Sedimentos	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Oliveira et al., 2017
Karchener (USA)	Espeleotemas	Metabarcoding de V4 16S rRNA, 454 Roche	No	Ortiz et al., 2013
Karchener (USA)	Espeleotemas	Metagenoma, 454 Roche	Potencial para fijación de C y N	Ortiz et al., 2014
Baeg-nyong (KOR)	Espeleotemas	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Park et al., 2020
Scarisoara (ROU)	Rocas	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Paun et al., 2019
Altamira (ESP)	Tapete microbiano	Secuenciación del 16S rRNA, Sanger	No	Porca et al., 2012
Ballynamindra (IRL)	Espeleotemas	Secuenciación de IGS, Beckman Coulter	No	Rooney et al., 2010
Imawari Yeuta (VEN)	Espeleotemas	Metabarcoding de V4 y V5 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Sauro et al., 2018
Zinzulusa (ITA)	Sedimentos y rocas	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	Predicción funcional con PICRUST	Tala et al., 2021
Weebubbe (AUS)	Tapete microbiano	Metabarcoding del 16S rRNA, 454 Roche	Potencial para ciclos de C y N	Tetu et al., 2013
Yumigi (PNG)	Tapete microbiano	Metabarcoding de V4 16S rRNA y metagenoma, Illumina Miseq	Predicción funcional con COGS	Turrini et al., 2020
Cueva de los Murciélagos (ESP)	Tapete microbiano	Secuenciación de IGS	No	Urzí et al., 2010
Pajsarjeva jama (SVN)	Tapete microbiano	Secuenciación del 16S rRNA, Sanger	No	Velikonja et al., 2014
Mano-Pee (THA)	Sedimentos	Secuenciación de metagenoma, Ion Torrent	Ortologías con KEGG	Wiseschart et al., 2019
Jinjia (CHN)	Espeleotemas y sedimentos	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, 454 Roche	No	Wu et al., 2015
Koat Magbari (PAK)	Sedimentos	Metabarcoding de V4 16S rRNA, 454 Roche	No	Yasir et al., 2018
Heshang, (CHN)	Sedimentos	Metabarcoding de V3 y V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Yun et al., 2016
Tjuv-Ante's (SWE)	Espeleotemas	Metagenoma, Illumina HiSeq 2000	Ortologías con KEGG	Zepeda Mendoza et al., 2016
Sudoeste de China	Rocas, sedimentos y agua	Metabarcoding de V4 del 16S rRNA, Illumina Miseq	No	Zhu et al., 2019

## Referencias de la revisión bibliográfica

- Barton, H. A., Giarrizzo, J. G., Suarez, P., Robertson, C. E., Broering, M. J., Banks, E. D., Vaishampayan, P. A., y 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>
- Borsodi, A. K., Knáb, M., Krett, G., Makk, J., Márialigeti, K., Eross, A., y Mádl-Szonyi, J. (2012). Biofilm Bacterial Communities Inhabiting the Cave Walls of the Buda Thermal Karst System, Hungary. *Geomicrobiology Journal*, 29(7), 611–627. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.602801>
- D'Auria, G., Artacho, A., Rojas, R. A., Bautista, J. S., Méndez, R., Gamboa, M. T., Gamboa, J. R., y Gómez-Cruz, R. (2018). Metagenomics of bacterial diversity in villa Luz caves with sulfur water springs. *Genes*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/genes9010055>
- Davis, M. C., Messina, M. A., Nicolosi, G., Petralia, S., Baker, M. D., Mayne, C. K. S., Dinon, C. M., Moss, C. J., Onac, B. P., y Garey, J. R. (2020). Surface runoff alters cave microbial community structure and function. *PLoS ONE*, 15(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232742>
- de los Ríos, A., Bustillo, M. A., Ascaso, C., y 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., y 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>
- De Mandal, S., Chatterjee, R., y Kumar, N. S. (2017). Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1002-x>
- Dhami, N. K., Mukherjee, A., y Watkin, E. L. J. (2018). Microbial diversity and mineralogical-mechanical properties of calcitic cave speleothems in natural and in vitro biomineralization conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00040>
- Dong, Y., Gao, J., Wu, Q., Ai, Y., Huang, Y., Wei, W., Sun, S., y Weng, Q. (2020). Co-occurrence pattern and function prediction of bacterial community in Karst cave. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01806-7>
- Engel, A. S., Meisinger, D. B., Porter, M. L., Payn, R. A., Schmid, M., Stern, L. A., Schleifer, K. H., y 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>
- Gonzalez-Pimentel, J. L., Miller, A. Z., Jurado, V., Laiz, L., Pereira, M. F. C., y Saiz-Jimenez, C. (2018). Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active Actinobacteria. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20393-2>
- Gulecal-Pektas, Y., y Temel, M. (2017). A Window to the Subsurface: Microbial Diversity in Hot Springs of a Sulfidic Cave (Kaklik, Turkey). *Geomicrobiology Journal*, 34(4), 374–384. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1204374>

Hamilton, T. L., Jones, D. S., Schaperdoth, I., y Macalady, J. L. (2014). Metagenomic insights into S(0) precipitation in a terrestrial subsurface lithoautotrophic ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00756>

Hathaway, J. J. M., Garcia, M. G., Moya Balasch, M., Spilde, M. N., Stone, F. D., Dapkevicius, M. de L. N. E., Amorim, I. R., Gabriel, R., Borges, P. A. V., y Northup, D. E. (2014). 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

He, H., Fu, L., Liu, Q., Fu, L., Bi, N., Yang, Z., y Zhen, Y. (2019). Community Structure, Abundance and Potential Functions of Bacteria and Archaea in the Sansha Yongle Blue Hole, Xisha, South China Sea. *Frontiers in Microbiology*, 10(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02404>

Ircus, C., Pascu, M. D., Lavin, P., Perşoiu, A., Iancu, L., y Purcarea, C. (2018). Bacterial and archaeal community structures in perennial cave ice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34106-2>

Jones, D. S., Schaperdoth, I., y Macalady, J. L. (2014). Metagenomic Evidence for Sulfide Oxidation in Extremely Acidic Cave Biofilms. *Geomicrobiology Journal*, 31(3), 194–204. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.834008>

Kieraitė-Aleksandrova, I., Aleksandrovas, V., y Kuisiėne, N. (2015). Down into the Earth: Microbial diversity of the deepest cave of the world. *Biologia*, 70(8), 989–1002. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0127>

Lavoie, K. H., Winter, A. S., Read, K. J. H., Hughes, E. M., Spilde, M. N., y 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>

Luis-Vargas, M. N., López-Martínez, R. A., Vilchis-Nestor, A. R., Daza, R., y Alcántara-Hernández, R. J. (2019). Bacterial Insights into the Formation of Opaline Stromatolites from the Chimalacatepec Lava Tube System, Mexico. *Geomicrobiology Journal*, 36(8). <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1607952>

Marques, E., Dias, J., Gross, E., Silva, A., de Moura, S., y Rezende, R. (2019). Purple Sulfur Bacteria Dominate Microbial Community in Brazilian Limestone Cave. *Microorganisms*, 7(2), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020029>

Northup, D. E., Melim, L. A., Spilde, M. N., Hathaway, J. J. M., Garcia, M. G., Moya, M., Stone, F. D., Boston, P. J., Dapkevicius, M. L. N. E., y 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>

Oliveira, C., Gunderman, L., Coles, C. A., Lochmann, J., Parks, M., Ballard, E., Glazki, G., Rahmatallah, Y., Tackett, A. J., y Thomas, D. J. (2017). 16S rRNA Gene-based metagenomic analysis of Ozark Cave Bacteria. *Diversity (Basel)*, 59(8), 855–870. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1527.A>

Ortiz, M., Neilson, J. W., Nelson, W. M., Legatzki, A., Byrne, A., Yu, Y., Wing, R. A., Soderlund, C. A., Pryor, B. M., Pierson, L. S., 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>

Ortiz, M., Legatzki, A., Neilson, J. W., Fryslie, B., Nelson, W. M., Wing, R. A., Soderlund, C. A., Pryor, B. M., y 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>

Park, S., Cho, Y. J., Jung, D. Y., Jo, K. N., Lee, E. J., y Lee, J. S. (2020). Microbial Diversity in Moonmilk of Baeg-nyong Cave, Korean CZO. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00613>

Parker, C. W., Auler, A. S., Barton, M. D., Sasowsky, I. D., Senko, J. M., y Barton, H. A. (2018). Fe(III) Reducing Microorganisms from Iron Ore Caves Demonstrate Fermentative Fe(III) Reduction and Promote Cave Formation. *Geomicrobiology Journal*, 35(4), 311–322. <https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1368741>

Paun, V. I., Icaza, G., Lavin, P., Marin, C., Tudorache, A., Persoiu, A., Dorador, C., y Purcarea, C. (2019). Total and potentially active bacterial communities entrapped in a late glacial through holocene ice core from scarisoara ice Cave, Romania. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01193>

Porca, E., Jurado, V., Žgur-Bertok, D., Saiz-Jimenez, C., y 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>

Riquelme, C., Hathaway, J. J. M., Dapkevicius, M. de L. N. E., Miller, A. Z., Kooser, A., Northup, D. E., Jurado, V., Fernandez, O., Saiz-Jimenez, C., y Cheeptham, N. (2015). Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01342>

Rooney, D. C., Hutchens, E., Clipson, N., Baldini, J., y 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>

Sauro, F., Cappelletti, M., Ghezzi, D., Columbu, A., Hong, P. Y., Zowawi, H. M., Carbone, C., Piccini, L., Vergara, F., Zannoni, D., y De Waele, J. (2018). Microbial diversity and biosignatures of amorphous silica deposits in orthoquartzite caves. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35532-y>

Talà, A., Buccolieri, A., Calcagnile, M., Ciccacese, G., Onorato, M., Onorato, R., Serra, A., Spedicato, F., Tredici, S. M., Alifano, P., y Belmonte, G. (2021). Chemotrophic profiling of prokaryotic communities thriving on organic and mineral nutrients in a submerged coastal cave. *Science of the Total Environment*, 755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142514>

Tebo, B. M., Davis, R. E., Anitori, R. P., Connell, L. B., Schiffman, P., y 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/>

Tetu, S. G., Breakwell, K., Elbourne, L. D. H., Holmes, A. J., Gillings, M. R., y Paulsen, I. T. (2013). Life in the dark: Metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. *ISME Journal*, 7(6), 1227–1236. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.14>

Turrini, P., Tescari, M., Visaggio, D., Pirolo, M., Lugli, G. A., Ventura, M., Frangipani, E., y Visca, P. (2020). The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. *Microbiological Research*, 241(May), 126584. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126584>

Turrini, P., Tescari, M., Visaggio, D., Pirolo, M., Lugli, G. A., Ventura, M., Frangipani, E., y Visca,

P. (2020). The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. *Microbiological Research*, 241(May), 126584. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126584>

Velikonja, B. H., Tkavc, R., y Pašić, L. (2014). Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of macroscopic microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia. *International Journal of Speleology*, 43(1), 45–56. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.43.1.5>

Wiseschart, A., Mhuantong, W., Tangphatsornruang, S., Chantasingh, D., y Pootanakit, K. (2019). Shotgun metagenomic sequencing from Manaop-pee cave, Thailand, reveals insight into the microbial community structure and its metabolic potential. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1521-8>

Wu, Y., Tan, L., Liu, W., Wang, B., Wang, J., Cai, Y., y Lin, X. (2015). Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00244>

Yasir, M. (2018). Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.005>

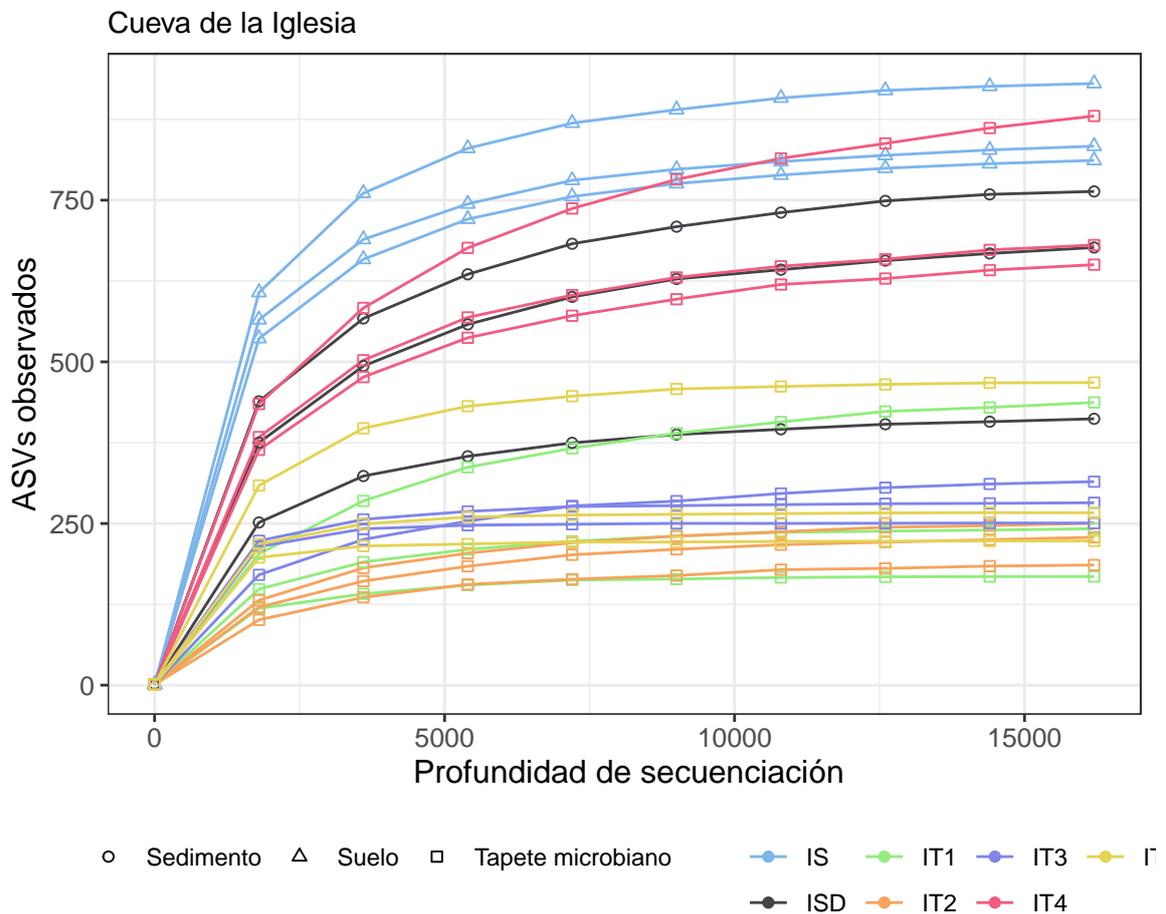
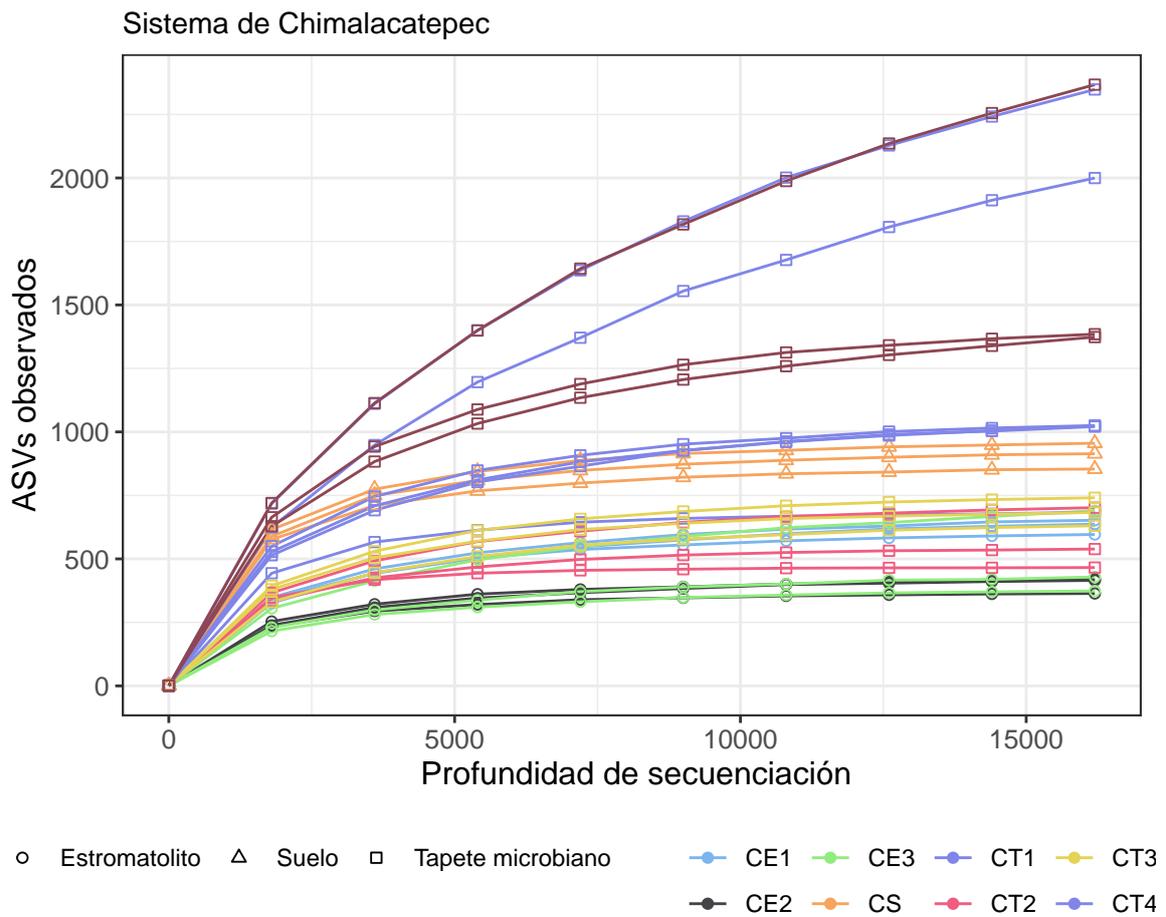
Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y., y Engel, A. S. (2016). The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC), 23–32. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01955>

Zepeda Mendoza, M. L., Lundberg, J., Ivarsson, M., Campos, P., Nylander, J. A. A., Sallstedt, T., y 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>

Zhu, H. Z., Zhang, Z. F., Zhou, N., Jiang, C. Y., Wang, B. J., Cai, L., y Liu, S. J. (2019). Diversity, distribution and co-occurrence patterns of bacterial communities in a karst cave system. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01726>



## A.2 Curvas de rarefacción por triplicado de cada muestra.



### A.3 Datos completos de la química de agua de las cuevas de Chimalacatepec e Iglesia.

**Tabla A3:** Datos completos de los fisicoquímicos del agua de goteo de ambas cuevas. Unidades en  $\text{mg L}^{-1}$ .

Muestra	pH	CE ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	$\text{CaCO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	ORP ( $\mu\text{V}$ )
<b>Cueva de la Iglesia</b>				
IA1	7.80	42.5	114.1	176.5
IA2	7.59	46.3	134.1	240.7
IA3	7.53	51.2	132.6	280.0
IA4	7.56	39.1	150.9	283.0
IA5	7.27	36.9	133.3	294.0
IA6	7.18	256.0	150.3	309.7
IA7	7.30	205.0	119.4	307.4
IA8	6.79	1447.0	111.8	296.5
IA9	6.33	1057.0	128.5	226.5
<b>Sistema de Chimalacatepec</b>				
CA1	7.26	3130.0	110.9	246.8
CA2	7.55	350.0	61.3	301.6
CA3	7.40	1129.0	246.8	293.5
CA4	7.32	1032.0	141.3	300.8

**Tabla A4:** Datos completos de los iones mayoritarios del agua de goteo de ambas cuevas.

Muestra	$\text{Ca}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Cl}^-$	$\text{SO}_2^{2-}$	$\text{HCO}_3^-$
<b>Cueva de la Iglesia</b>							
I1	2.9	1.3	3.0	1.4	0.8	4.8	17.9
I2	2.6	1.2	2.9	1.4	0.6	4.8	16.3
I3	1.9	1.0	3.0	1.4	1.1	3.1	17.0
I4	2.2	0.9	2.8	1.3	1.1	3.0	15.8
I5	1.3	0.7	4.0	3.7	1.3	5.4	18.0
I6	2.8	1.1	3.3	1.2	0.5	1.9	19.3
I7	3.5	1.2	3.5	2.9	1.1	3.1	18.1
I8	7.2	1.2	4.0	4.9	1.9	4.2	0.0
I9	2.4	0.8	2.7	0.8	0.9	2.4	0.0
<b>Sistema de Chimalacatepec</b>							
C1	4.0	1.8	5.4	2.7	1.1	3.8	31.1
C2	13.1	3.2	4.6	3.9	1.1	5.8	24.8
C3	11.1	3.3	4.1	84.2	67.7	5.2	0.0
C4	16.7	3.8	4.3	4.7	1.1	6.3	18.1

**Tabla A5:** Datos completos de la concentración de carbono y nitrógeno para la Cueva de la Iglesia y del Sistema de Chimalacatepec. Unidades en mg L<sup>-1</sup>.

Muestra	C orgánico	C total	C inorgánico	N total
<b>Cueva de la Iglesia</b>				
IA1	16.900	19.580	2.600	0.2100
IA2	25.300	28.000	2.690	0.2400
IA3	2.460	5.900	3.520	0.0000
IA4	13.900	16.700	2.800	0.1000
IA5	6.030	8.300	2.320	0.0600
IA6	1.678	4.158	2.480	0.5381
IA7	1.671	5.012	2.341	0.3111
IA8	1.057	3.778	2.721	2.2780
IA9	1.638	4.303	2.665	0.1328
<b>Sistema de Chimalacatepec</b>				
CA1	1.636	6.189	4.554	0.9706
CA2	1.358	6.422	5.064	4.0730
CA3	33.390	36.820	3.425	4.9280
CA4	1.511	6.176	4.665	6.9680

**Tabla A6:** Datos completos de la concentración de elementos principales de las muestras de agua de goteo para ambas cuevas. Unidades en mg L<sup>-1</sup>.

Muestra	Ba	Ca	K	Mg	Na	Si	Sr
<b>Cueva de la Iglesia</b>							
I1	0.011	2.566	1.206	1.712	1.641	8.718	0.027
I2	0.010	2.353	0.845	1.362	1.524	9.166	0.025
I3	0.008	2.535	1.109	1.260	1.441	8.728	0.025
I4	0.007	2.279	1.008	1.118	1.418	8.304	0.023
I5	0.011	1.232	3.120	0.839	2.461	12.428	0.016
I6	0.052	14.232	2.959	4.234	3.163	20.179	0.120
I7	0.046	13.041	2.723	3.771	2.877	18.273	0.105
I8	0.041	12.057	2.454	3.488	2.632	16.622	0.095
I9	0.051	18.651	4.584	4.493	3.006	17.933	0.125
<b>Sistema de Chimalacatepec</b>							
C1	0.003	2.523	0.633	1.223	1.349	12.055	0.019
C2	0.019	3.812	1.972	1.534	1.857	13.242	0.036
C3	0.020	6.822	3.081	2.525	2.155	11.527	0.068
C4	0.016	2.035	0.365	0.811	0.955	11.531	0.023

## A.4 Concentraciones de DNA obtenido

**Tabla A7:** Media y desviación estándar de la concentración de DNA metagenómico extraído y de la concentración del amplicón obtenido. Unidades en  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

Muestra	DNA metagenómico	DNA con amplicón
<b>Cueva de la Iglesia</b>		
CS	$11.4 \pm 0.4$	$17.2 \pm 4.0$
CT1	$1.7 \pm 2.2$	$1.7 \pm 1.2$
CT2	$32.8 \pm 8.3$	$4.3 \pm 3.1$
CT3	$2.9 \pm 4.0$	$20.3 \pm 13.9$
CT4	$0.1 \pm 0.1$	$6.3 \pm 1.4$
CT5	$0.1 \pm 0.1$	$3.8 \pm 3.4$
CE1	$31.4 \pm 15.8$	$29.4 \pm 4.2$
CE2	$10.5 \pm 5.5$	$21.8 \pm 4.3$
CE3	$5.9 \pm 6.6$	$20.1 \pm 10.3$
<b>Sistema de Chimalacatepec</b>		
IS	$48.5 \pm 7.8$	$11.5 \pm 4.2$
ISD	$2.1 \pm 2.3$	$17.2 \pm 5.2$
IT1	$13.4 \pm 10.5$	$17.2 \pm 9.3$
IT2	$20.9 \pm 1.5$	$33 \pm 6.6$
IT3	$0.4 \pm 0.2$	$8.3 \pm 6.9$
IT4	$10.5 \pm 3.2$	$17 \pm 3.0$
IT5	$0.5 \pm 0.4$	$7.6 \pm 2.3$

## A.5 Resultados de las pruebas de normalidad y homocedasticidad para *t de student*

### Prueba de normalidad (Shapiro-Wilks)

$$\begin{cases} H_0 : X \sim N(\mu, \sigma) \\ H_1 : X \not\sim N(\mu, \sigma) \end{cases}$$

```
##  
## Shapiro-Wilk normality test  
##  
## data:  tTest$shannon  
## W = 0.94064, p-value = 0.09465
```

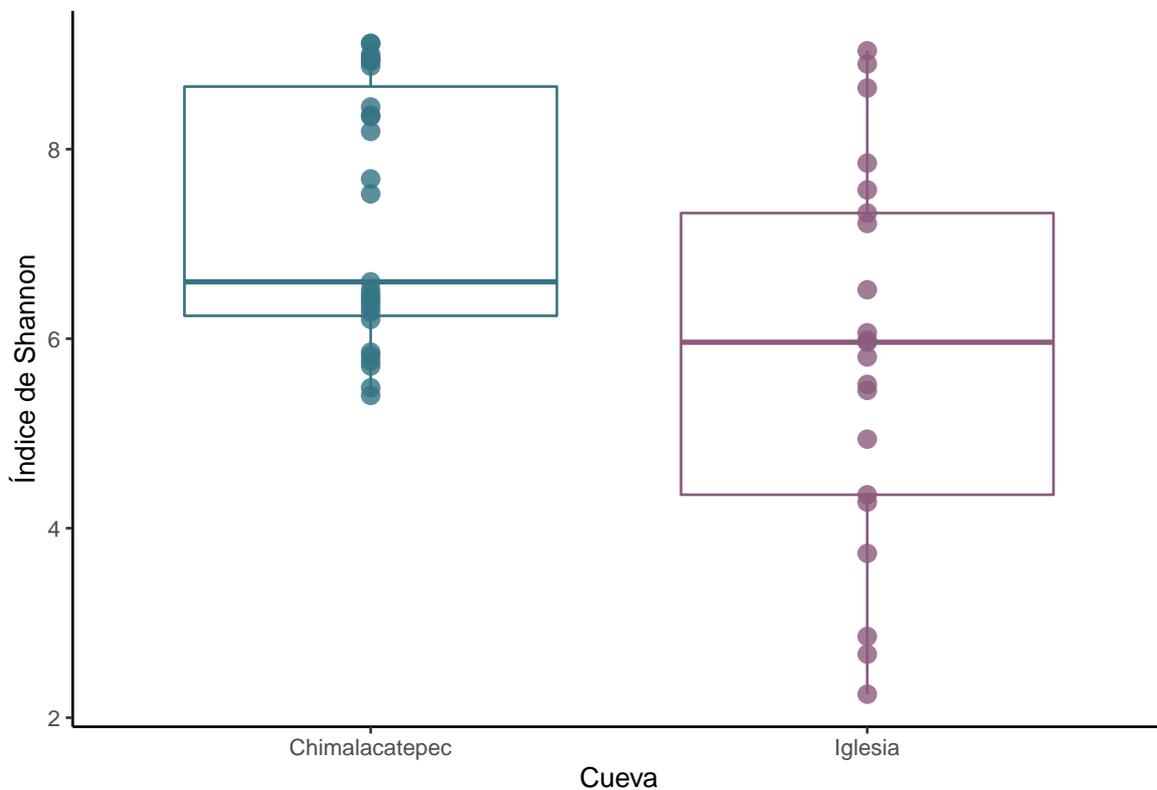
### Prueba de homocedasticidad (Fisher)

$$\begin{cases} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \end{cases}$$

```
##  
## F test to compare two variances  
##  
## data:  shannonIg and shannonCh  
## F = 2.3359, num df = 14, denom df = 14, p-value = 0.1243  
## alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1  
## 95 percent confidence interval:  
##  0.7842151 6.9575437  
## sample estimates:  
## ratio of variances  
##           2.335853
```

## A.6 Resultados de la prueba de *t* de student

```
##  
## Two Sample t-test  
##  
## data: test$shannon by test$cueva  
## t = 2.946, df = 46, p-value = 0.005038  
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0  
## 95 percent confidence interval:  
## 0.4536604 2.4109865  
## sample estimates:  
## mean in group Chimalacatepec          mean in group Iglesia  
##                7.286110                5.853787
```



**Figura A1:** Índice de diversidad de Shannon de los tapetes microbianos del tubo de lava de Chimalacatepec y de La Cueva de la Iglesia.

## A.7 Resultados de los análisis estadísticos para la determinación de diversidad beta

### Resultados del análisis de NMDS

```
##  
## Call:  
## metaMDS(comm = ps.dist)  
##  
## global Multidimensional Scaling using monoMDS  
##  
## Data:      ps.dist  
## Distance: user supplied  
##  
## Dimensions: 2  
## Stress:    0.1481222  
## Stress type 1, weak ties  
## Two convergent solutions found after 20 tries  
## Scaling: centring, PC rotation  
## Species: scores missing
```

## Resultados de la prueba de PERMANOVA

```
##
## Call:
## adonis(formula = wunifrac.dist ~ sample_data(phy_data1)$site)
##
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##              Df SumsOfSqs MeanSqs F.Model      R2 Pr(>F)
## sample_data(phy_data1)$site  1    0.5206 0.52058  3.9327 0.08379  0.001 ***
## Residuals                    43    5.6920 0.13237          0.91621
## Total                        44    6.2126          1.00000
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```