

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
Y BIOINGENIERÍA**

**“Estructura de las comunidades microbianas en los sedimentos
salinos-alcálinos de la Hoya del Rincón de Parangueo,
Guanajuato”.**

Tesis que presenta:

M. en C. Claudia Leonor Ibarra Sánchez

PARA OBTENER EL GRADO :

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de tesis:

Dr. Luc Dendooven.

Ciudad de México

Diciembre, 2019.

La sustentante con número de CVU 253683 agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar sus estudios de Doctorado, en el período de Enero 2016 a Diciembre del 2019.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología de Suelos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Zacatenco), bajo la dirección del Dr. Luc Dendooven.

Agradecimientos

A mi director Luc Dendooven por darme la oportunidad de realizar mi proyecto. A mis asesores por todo el tiempo dedicado a revisar el presente trabajo.

A Blanquita y Marco por todo el apoyo, cariño e invaluable amistad.

A mis compañeros del laboratorio, por la compañía y consejos durante mi estancia, por las platicas que nos mantuvieron “cuerdos” todo este tiempo.

A mis padres, por apoyarme en cada decisión de mi vida, por llenar de amor cada día de mi vida. A mis hermanos por siempre estar a mi lado gracias a ustedes jamás he estado sola.

A mis amigos por ser parte de mi vida, su cariño ha sido mi fuerza en los momentos difíciles.

A Don Gato por dormir mientras yo trabajaba, por llenar mi pancita de comida... por todo tu amor, por siempre creer en mi e impulsarme a alcanzar mis metas.

A todas los chicos que han colaborado conmigo, su apoyo ha sido invaluable, su entusiasmo y alegría siempre fue inspiradora.

“Es bueno amar tanto como se pueda,
porque ahí radica la verdadera fuerza, y el
que mucho ama realiza grandes cosas y
se siente capaz, y lo que se hace por
amor está bien hecho.”

-Vincent Van Gogh-

“¿Qué sería de la vida si no
tuviéramos el valor de intentar algo
nuevo ?”

-Vincent Van Gogh-

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE FÍGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
	Pag.
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Localización de La Hoya del Rincón de Parangueo.	1
1.2 Origen y características de La Hoya del Rincón de Parangueo.	2
1.3 Ambientes sedimentarios: sedimentos como hábitat de comunidades microbianas.	5
1.4 Comunidades microbianas asociadas a sedimentos.	6
2. JUSTIFICACIÓN.	9
3. OBJETIVOS.	10
3.1 Objetivo general.	10
3.2 Objetivos específicos.	10
4. METODOLOGÍA.	11
4.1 Sitio de estudio.	12
4.2 Colecta de sedimentos.	12
4.3 Caracterización fisicoquímica de los sedimentos.	13
4.4 Extracción de DNA metagenómico.	13
4.5 Amplificación del gen 16S rRNA de arqueas.	15
4.6 Amplificación de gen 16S rRNA de bacterias.	16
4.7 Construcción de librería para secuenciación.	17

4.8	Secuenciación con el protocolo de Illumina.	17
4.9	Análisis de las secuencias.	17
4.10	Predicción de capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas en los sedimentos de la HRP.	18
4.11	Análisis estadístico.	19
5.	RESULTADOS.	20
5.1	Características fisicoquímicas de los sedimentos.	20
5.2	Análisis de la comunidad de bacterias presentes en los sedimentos de la Hoya del Rincón de Parangueo (HRP).	25
5.2.1	Agrupamiento de las OTUs y análisis de diversidad de bacterias.	25
5.2.2	Asignación taxonómica de bacterias en los sedimentos de HRP.	27
5.2.3	Correlación entre poblaciones de bacterias.	29
5.2.4	Efecto de las características fisicoquímicas de los sedimentos sobre las poblaciones bacterianas.	29
5.3	Análisis la comunidad de arqueas en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo (HRP).	33
5.3.1	Agrupación de las OTUs y análisis de diversidad alfa de arqueas en HRP.	33
5.3.2	Asignación taxonómica de las arqueas presentes en los sedimentos de la HRP.	36
5.3.3	Correlación entre poblaciones de arqueas.	38
5.3.4	Efecto de las características fisicoquímicas de los sedimentos sobre las poblaciones de arqueas.	39
5.4	Capacidades metabólicas de las comunidades microbianas de los sedimentos de la HRP.	42
6.	DISCUSIÓN.	43
6.1	Caracterización fisicoquímica de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo (HRP).	43

6.2	Estructura de la población de bacterias en los sedimentos de la HRP.	44
6.3	Estructura de la población de arqueas en los sedimentos de la HRP.	47
6.4	Capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas en los sedimentos de la HRP.	49
7.	CONCLUSIONES.	51
8.	REFERENCIAS	52
ANEXOS		
	Anexo I. Soluciones para extracción de DNA metagenómico	60
	Anexo II. Permiso de colecta	63
	Anexo III Portada de artículo	64

INDICE DE FIGURAS

	Pie de figura	Pag.
Fig. 1	Localización de La Hoya del Rincón de Parangueo.	2
Fig. 2	Desecación del lago en la Hoya del Rincón de Parangueo.	3
Fig. 3	Sedimentos de la Hoya del Rincón de Parangueo.	4
Fig. 4	Esquema de la distribución estratificada de grupos microbianos y vías metabólicas en ambientes microbianos litificantes.	7
Fig. 5	Estrategia experimental del presente trabajo.	11
Fig. 6	Localización del sitio de muestreo en La Hoya del Rincón de Parangueo.	12
Fig. 7	Correlaciones pareadas de las características fisicoquímicas de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.	24
Fig. 8	Curva de rarefacción de las poblaciones de bacterias en la HRP.	25
Fig. 9	Correlaciones entre las características fisicoquímicas de los sedimentos y los índices de diversidad alfa de bacterias.	27
Fig. 10	Heatmap de abundancia relativa de diferentes taxa de bacteria en la HRP.	28
Fig. 11	Correlaciones pareadas entre diferentes filo y clases de bacterias presentes en los sedimentos de HRP.	29
Fig. 12	Análisis canónico de coordenadas principales (CAP) de las poblaciones de bacteria en HRP.	31
Fig. 13	Correlaciones entre los parámetros abióticos y diferentes grupos de bacteria en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.	32
Fig. 14	Curva de rarefacción de las poblaciones de arqueas en la HRP.	34
Fig. 15	Heatmap de la correlación entre las características fisicoquímicas de los sedimentos y los índices de diversidad alfa para la población de arqueas.	36
Fig. 16	Heatmap de abundancia relativa de diferentes taxa de	37

	arqueas en la HRP.	
Fig. 17	Correlaciones pareadas de las diferentes clases de arqueas presentes en los sedimentos de HRP.	38
Fig. 18	Análisis canónico de coordenadas principales (CAP) de las poblaciones de arqueas en HRP.	40
Fig. 19	Correlaciones entre los parámetros abióticos y diferentes grupos de arqueas en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.	41
Fig. 20	Predicción de capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.	42

ÍNDICE DE TABLAS

	Título	Pag.
Tabla 1	Condiciones de PCR para amplificar el gen 16S rRNA de arqueas.	16
Tabla 2	Características fisicoquímicas de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.	21
Tabla 3	Contenido de metales en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.	22
Tabla 4	Diversidad alfa de bacterias en La Hoya del Rincón de Parangueo.	26
Tabla 5	Cambio de las poblaciones microbianas y capacidades metabólicas explicadas por las características abióticas medidas.	33
Tabla 6	Diversidad alfa de arqueas en La Hoya del Rincón de Parangueo.	35

RESUMEN

La “ Hoya del Rincón de Parangueo “ (HRP) es un maar cuaternario que hasta 1980 tuvo un lago alcalino perenne y debido a la sobre explotación del agua del subsuelo el lago se secó, dejando expuestos los sedimentos blanquecinos característicos de la HRP. Actualmente los sedimentos tienen pH alcalino y alto contenido de sales. El objetivo del presente trabajo fue determinar como las comunidades de bacterias y arqueas son afectadas por los factores fisicoquímicos de los sedimentos.

Se colectaron sedimentos superficiales (0 – 20 cm) a lo largo de un transecto en el fondo del cráter. Posteriormente se realizó la caracterización fisicoquímica de los sedimentos y extracción de DNA metagenómico. Se analizó la diversidad de arqueas y bacterias mediante la secuenciación del gen 16 S rRNA usando la plataforma Illumina.

Las muestras de sedimento tienen pH 10, alta conductividad electrolítica (CE) y variable contenido de diferentes metales. Se encontraron 3 filos de arqueas y 37 filos de bacterias. Euryarchaeota fue el filo de arquea mas abundante. Proteobacteria y Actinobacteria fueron los filos abundantes de bacterias. Se encontraron mas de 32 géneros de arqueas, el género dominante fue *Candidatus Nitrososphaera*, en el caso de bacterias fueron *Euzebya*, *Halomonas*, *KSA1* y *Planctomyces*. Se encontró que los organismos del filo Thaumarchaeota fueron abundantes en las muestras con alto contenido de Pb y Euryarchaeota fue abundante en muestras con alto contenido de Mg; mientras que Crenarchaeota y *Candidatus Nitrososphaera* fueron abundantes en sedimentos con alto contenido de arena, N total y C orgánico. El filo Proteobacteria fue abundante en muestras con alto contenido de C orgánico, N total, Si y arena. Los Bacteroidetes y Planctomycetes tuvieron alta abundancia en muestras de sedimento con alto contenido de Mg y arcilla. Los organismos *KSA1* y *Euzebya* fueron enriquecidos en muestras con baja CE, C orgánico y N total. Los principales grupos funcionales definidos fueron los involucrados en la oxidación de amonio y reducción de nitrito para bacteria y arquea. A pesar de que varios grupos de bacteria y arquea tuvieron correlación significativa con algunas características de los sedimentos, de acuerdo al algoritmo random Forest los parámetros abióticos medidos explican poco de la variabilidad de las poblaciones microbianas presentes en los sedimentos, en el caso de la población de bacterias los factores abióticos explican menos del 50 % de la variabilidad de *TM6* y *Desulfonatrosospira*, con respecto a la población de arqueas ningún factor abiótico explica la variación en la población de arqueas presentes en los sedimentos de la HRP. En conclusión a pesar de que las diferentes muestras de sedimento fueron dominadas por similares grupos de arqueas y bacterias, la medición de las características de los sedimentos explica poco de la variación entre los diferentes puntos de muestreo. La alta diversidad de bacterias y arqueas indican que la HRP puede ser fuente de organismos no clasificados con capacidades metabólicas involucradas en los ciclos del nitrógeno y azufre.

ABSTRACT

The “Hoya del Rincón de Parangueo (HRP) is a maar that contained a perennial alkaline lake that drained in that 1980s so that a sediment with high pH and extreme salinity remained. The aim of this work was to determine how the bacterial and archaeal community were controlled by these extreme conditions.

Sediment samples were collected from the 0-20 cm layer along a crater-wide transect. Physicochemical characteristics and the archaeal and bacterial community were determined by analysis of the 16S rRNA through Illumina sequencing.

The sediment samples had a pH 10 and an electrolytic conductivity (EC) that ranged from 29.8 to 74.4 dS m⁻¹. Three archaeal and 37 bacterial phyla were detected with Euryarchaeota dominating the Archaea and Proteobacteria and Actinobacteria the Bacteria. The most 32 abundant archaea genus was *Candidatus Nitrososphaera* while *Euzebya*, *Halomonas*, *KSA1* and *Planctomyces* dominated the bacterial gene. Thaumarchaeota were enriched in sediment samples with a higher Pb content and Euryarchaeota in sediment with a higher Mg content, while Crenarchaeota and *Candidatus Nitrososphaera* were enriched in sediment with higher sand, total N and organic C content. Proteobacteria were enriched in sediment with a higher organic C, total N, Si and sand content. while Bacteroidetes and Planctomycetes in sediment with higher WHC, clay and Mg content. Members of *KSA1* and *Euzebya* were enriched in sediment with a lower EC, organic C and total N content.

Although a large number of bacterial and archaeal groups were correlated significantly with a range of sediment characteristics, the sediment characteristics explained the variations of only two bacterial groups >50 % (TM6 and Desulfonatronospira) using the machine learning tool random Forest and none of the archaeal groups. Archaeal and bacterial functional guilds were dominated by ammonium oxidation and nitrite reduction.

In conclusions, although the different sediment samples were dominated often by similar bacterial and archaeal groups, the measured sediment characteristics explained little of the variation found between the sampling points. The high bacterial and archaeal diversity indicated that the site might be a source of unclassified species and phylotypes with specific metabolic capacities involves in the N and S cycles.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Localización de la Hoya del Rincón de Parangueo.

La Hoya del Rincón de Parangueo (HRP) forma parte del campo volcánico del Valle de Santiago; el cual se encuentra en la zona central de la Faja Volcánica Transmexicana. La Faja Volcánica Transmexicana es un área volcánica ampliamente estudiada debido a que presenta una gran diversidad de estructuras volcánicas, La Faja Volcánica Transmexicana atraviesa la República mexicana desde el Golfo de México hasta el Océano Pacífico (Pasquaré et al. 1988; Ferrari et al. 1999).

El Valle de Santiago se localiza en el extremo nororiental del campo volcánico de Michoacán-Guanajuato (Fig.1a); en el Valle de Santiago hay 7 cráteres tipo maar conocidos comúnmente conocidos como "las 7 luminarias". La distribución de los 7 maares en el Valle de Santiago es de norte a sur (Fig 1b): La Hoya del Rincón de Parangueo, Hoya San Nicolás de Parangueo, Hoya de Estrada, Hoya La Alberca, Hoya Blanca, Hoya Cintora y Hoya de Álvarez (Escoledo y Alcocer 2004).

El cráter de La HRP se encuentra en la parte norte del Valle de Santiago, el borde del cráter tiene una forma semi-elíptica, el centro del cráter se localiza en las coordenadas 20° 25' N a una altura de 1 700 m.s.n.m, las coordenadas externas del cráter son 20°25'21'', 20°27'57''N, 101°12'32'', 101°16'30'' W. El clima en la HRP es semicálido la temperatura media de 18 a 22 °C, tiene una precipitación media anual de 600 mm (Escolero y Alcocer 2004).

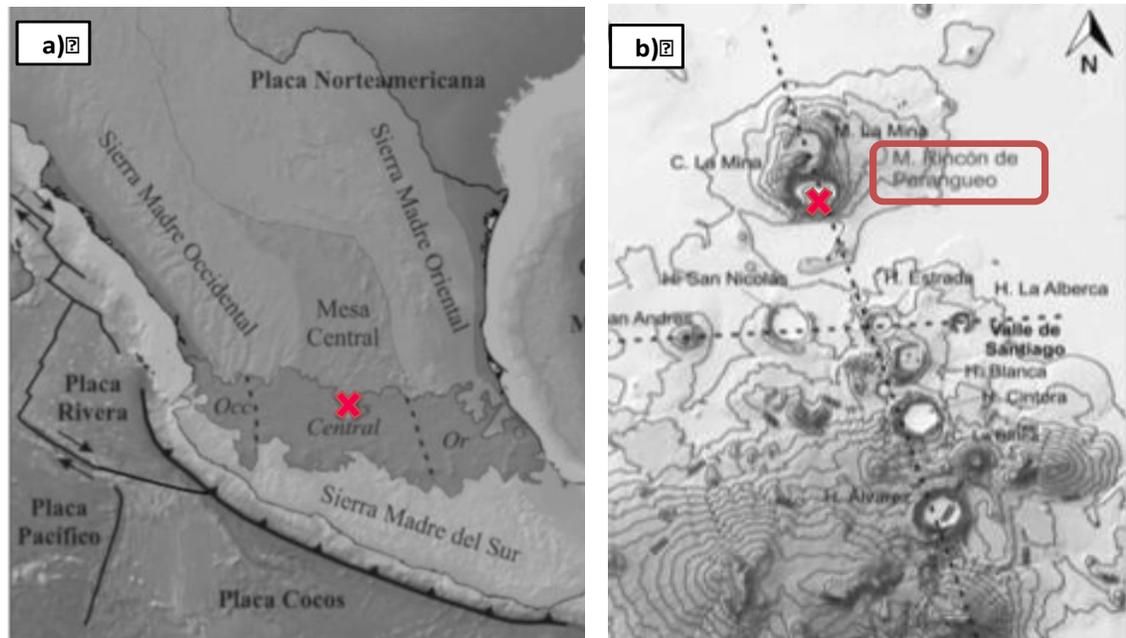


Fig. 1. Localización de La Hoya del Rincón de Parangueo.
 a) Ubicación del Valle de Santiago en la Faja Volcánica Transmexicana.
 b) Ubicación de la Hoya del Rincón de Parangueo en el Valle de Santiago. La línea punteada marca la zona de debilidad cortical (Modificado de Aranda-Gómez et al. 2013).

1.2 Origen y características de La Hoya del Rincón de Parangueo.

La HRP es un maar, es un cráter que se formó por la explosión generada a causa del contacto entre el magma y agua del subsuelo, debido a lo anterior es considerado una estructura de origen hidrovolcánico (Lorenz 1973). En el Valle de Santiago se formaron 7 cráteres tipo maar, la gran abundancia de maares en el Valle de Santiago indica que durante el periodo en el que se originaron existió un gran lago en esta área (Aranda-Gomez et al. 2013). Los 7 maares del Valle de Santiago son considerados monogenéticos, se originaron a causa de una debilidad cortical que permitió el ascenso del magma, por lo que se encuentran alineados en dirección NNW-SSE siguiendo la zona de debilidad de las placas tectónicas (Fig. 1b) (Murphy 1986). La HRP se originó en el periodo cuaternario, se determinó una edad aproximada de 0.137 Ma (Aranda-Gomez et al. 2009).

La HRP fue uno de los cuatro lago-cráter del Valle de Santiago y de acuerdo a los reportes éste fue el único lago-cráter que contuvo agua con alto contenido de sales en el Valle de Santiago (Kienel et al. 2009). La HRP contuvo un lago perene hasta la década de 1980 (Fig. 2) cuando comenzó a secarse gradualmente a causa de la sobre-explotación del acuífero de Salamanca-Valle de Santiago. La desecación del acuífero fue debido a la extracción del agua del subsuelo a través de pozos que bombearon el agua para uso agrícola (Escoledo-Alcocer 2004).

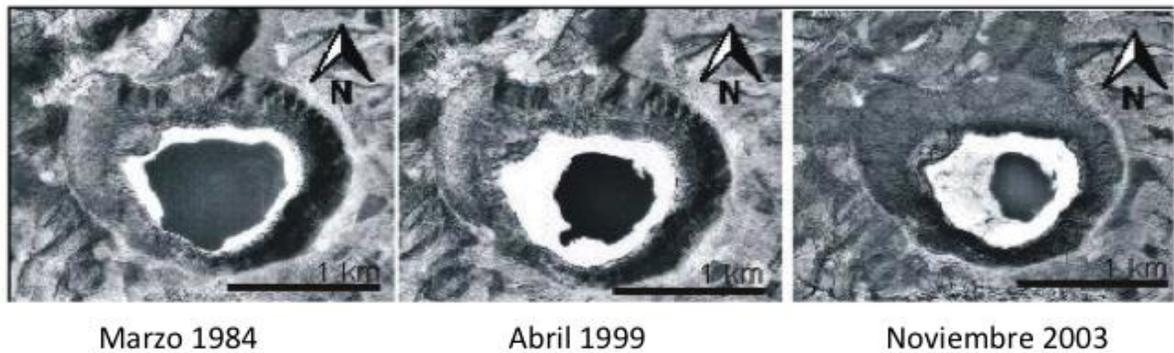


Fig. 2. Desecación del lago en la Hoya del Rincón de Parangueo. Se observa la disminución del volumen de agua a través del tiempo (Tomada de Aranda-Gómez et al. 2013).

La desecación del lago de la HRP ocasionó que aumentara la concentración de las sales y también provocó que sedimentaran y compactaran las partículas antes suspendidas en el agua. Actualmente la mayor parte del fondo del cráter de la HRP se encuentra cubierto por los sedimentos blanquecinos y solo en el centro se encuentra una laguna somera con agua hipersalina (Armienta et al. 2008).

En el fondo de la HRP se observan diferentes inclinaciones o pendientes, estas diferentes áreas son causa los diferentes patrones de hundimiento de los sedimentos en el cráter (Fig. 3). El proceso de hundimiento en HRP tiene varias causas: el efecto gravitacional sobre las partículas del sedimento además de la disolución y remoción de evaporitas aunado a la ausencia de agua del subsuelo y la diferencia de distribución de las partículas que sedimentaron en el fondo del cráter (Aranda-Gómez et al. 2013).

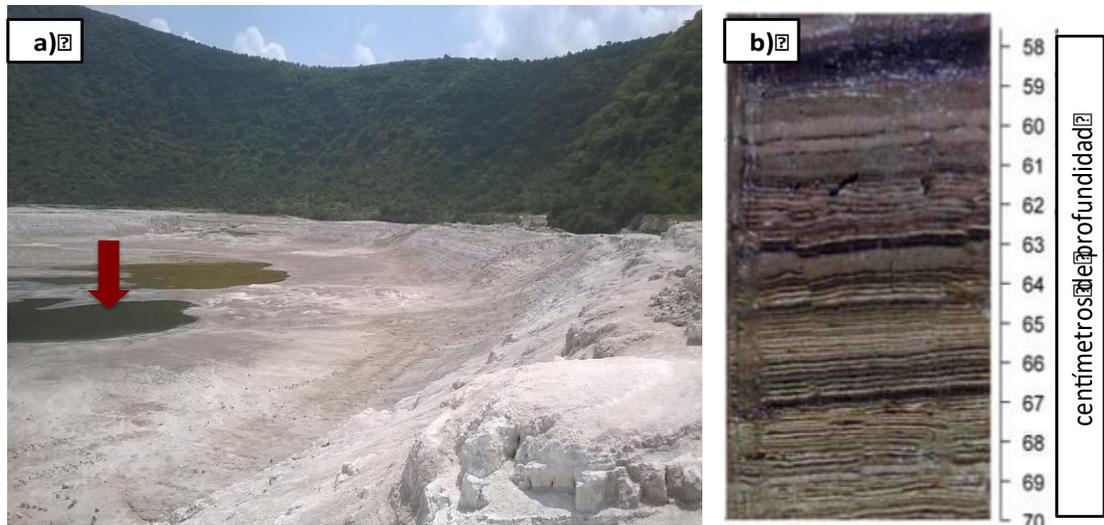


Fig. 3. Sedimentos de la Hoya del Rincón de Parangueo.
 a) Fondo del cráter de la HRP. Se muestran los diferentes patrones de hundimiento y se señala la localización de la laguna en la parte central.
 b) Estratos formados en el fondo del cráter. Se observa la secuencia sedimentaria estratificada (Modificada de Kienel et al. 2009).

La diferencia de sedimentación y distribución de las partículas permitió que se formaran diferentes estratos en el fondo de la HRP. Los diferentes estratos de los sedimentos tienen distinta composición química, en la parte superficial se encuentran partículas calcáreas de grano fino de color blanquecino, debajo de la capa blanquecina se pueden observar capas intercaladas de color café, beige y negro (Fig. 3b). De acuerdo con el reporte de Kienel et al. 2009, las capas color beige están formadas por carbonatos de calcio y estroncio; las capas café son aglomerados de arcilla, limo y materia orgánica (restos celulares) y las capas negras están formadas por arena y restos de algas. También, se pueden encontrar cristales dispersos de color verde-amarillo y café-rojo que corresponden a cristales de sulfatos de potasio, aluminio, titanio, silicio.

La distribución de las partículas en el fondo del cráter es heterogénea, ya que el fenómeno de sedimentación depende de diferentes factores ambientales como temperatura, precipitación, contenido de sales, etc. (Vuillemin et al. 2019); la

distribución irregular de los minerales y microorganismos hace de los sedimentos un hábitat complejo.

1.3 Ambientes sedimentarios: sedimentos como hábitat de comunidades microbianas.

Los ambientes sedimentarios son aquellas zonas donde se acumulan los sedimentos y formación de rocas sedimentarias. Los ambientes sedimentarios pueden ser marinos, de transición y continentales, en el caso de los sedimentos de La HRP estos son considerados como ambiente sedimentario continental de origen volcánico.

Se entiende por sedimento al conjunto de partículas que se depositan en el fondo de un cuerpo de agua. Los sólidos que forman el sedimento en los cuerpos de agua pueden tener diferente origen, las partículas pueden ser acarreadas por la corriente de agua y viento depositarse en el cuerpo de agua y finalmente sedimentar al fondo (Kallmeyer et al. 2012).

Las características fisicoquímicas de los sedimentos son altamente variables ya que dependen de la precipitación de minerales, materia orgánica y disponibilidad de nutrientes (Nelson et al. 2007; Mees et al. 2011). La precipitación de las partículas en los cuerpos de agua es afectada por factores abióticos como precipitación pluvial, velocidad de evaporación del agua, salinidad, temperatura, formación de corrientes superficiales a causa del viento, entre otros. Debido a que la precipitación de las partículas es determinada por condiciones ambientales, se considera que los sedimentos preservan información sobre los cambios ambientales asociados a ese hábitat a través del tiempo (Vuillemin et al. 2018).

Después de que las partículas se depositan en el fondo pueden compactarse y cementarse (proceso de litificación) formando lo que se conoce como roca sedimentaria. La litificación ocurre cuando la precipitación de los minerales supera la disolución, es decir cuando disminuye el volumen de agua; después de formarse las rocas sedimentarias la movilización de nutrientes ocurre a causa de metabolismo microbiano (Dupraz y Visscher, 2005).

La litificación biológica forma estructuras órgano-sedimentarias, las cuales son capas intercaladas de microorganismos y partículas minerales, estas estructuras son variables dependiendo de factores ambientales (Centeno et al. 2012), en los diferentes estratos formados por la litificación biológica se pueden encontrar restos celulares y minerales como silicatos, carbonatos y sulfatos (Dupraz y Vischer 2005).

Los ambientes sedimentarios representan un importante reservorio de nutrientes en el planeta, además en ellos puede encontrarse una amplia diversidad de organismos no caracterizados (Hug et al. 2013). La gran variación en las características abióticas de los sedimentos permite realizar estudios con diferentes enfoques como geológico, químico, biológico y entender el efecto de las características abióticas sobre las poblaciones microbianas (Vuillemin et al. 2013; Bryanskaya et al. 2016).

1.4 Comunidades microbianas asociadas a sedimentos.

Las comunidades microbianas sedimentarias, son un conjunto de microorganismos asociados a rocas sedimentarias. Los microorganismos en los sedimentos establecen asociaciones ecológicas complejas, en los sedimentos se forman a pequeña escala ecosistemas constituidos por organismos filogenéticamente diversos (Durbin y Teske 2012). Se estima que hay hasta 10^9 células procariotas/cm³ de sedimento (Danovaro et al. 2016).

Actualmente las técnicas de secuenciación masiva han permitido explorar diferentes ambientes sedimentarios, se ha encontrado una gran diversidad de organismos antes desconocidos y predecir las posibles funciones metabólicas en las cuales puedan estar implicados (Hug et al. 2013). En diferentes tipos de sedimentos se ha reportado una gran diversidad de poblaciones de arqueas y bacterias, la amplia distribución de estos organismos es debida a la variedad de sus capacidades metabólicas que les ha permitido adaptarse a diferentes condiciones (Schubotz et al. 2013, Sunagawa et al. 2015).

Los organismos presentes en los sedimentos participan en los diferentes ciclos

biogeoquímicos permitiendo el flujo de nutrientes a través del hábitat. Los microorganismos sedimentarios tienen funciones diversas como; degradación de materia orgánica, oxidación de azufre, fijación biológica de nitrógeno entre otras (Fig. 4) (Dupraz y Visscher 2005).

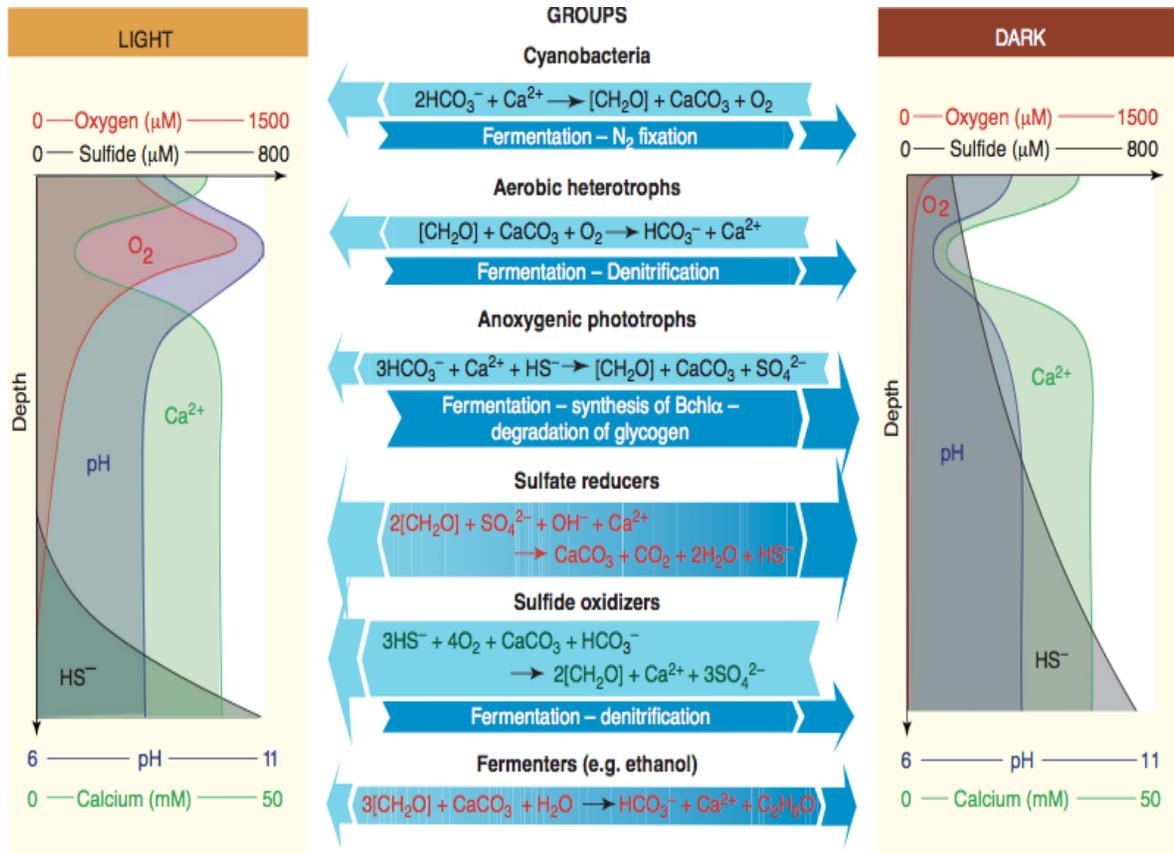


Fig. 4. Esquema de la distribución estratificada de grupos microbianos y vías metabólicas en ambientes microbianos litificantes (Tomado de Dupraz y Visscher 2005)

Diferentes estudios demuestran que los factores abióticos y las capacidades metabólicas de los microorganismos determinan la distribución de las poblaciones microbianas en los sedimentos (Vuillemin et al. 2014, Fernández et al. 2016, Wang et al. 2018). Las condiciones ambientales pueden fluctuar a través del tiempo y espacio provocando alteraciones en la estructura de las poblaciones microbianas en los sedimentos (Galand et al. 2016). Factores como intensidad luminosa, temperatura, calcificación, tensión de oxígeno y contenido de materia orgánica son importantes para determinar la distribución estratificada de los microorganismos en los sedimentos (Fig.

4) (Hug et al. 2013; Fernández et al. 2016; Li et al. 2019).

El trabajo de Vuillemin et al. (2013) realizado en la Laguna Potrok Aike (Argentina) demuestra el efecto de las condiciones ambientales en la distribución de las comunidades microbianas a través de la columna de agua y sedimentos. Se evidenció que la disponibilidad de manganeso, hierro, nitrato, dióxido de carbono y oxígeno determinan la distribución y actividad de comunidades desnitrificantes y metanógenas.

El estudio realizado por Fernández et al. (2016) en un salar de Tebenquiche (chile), evaluó las poblaciones de arqueas y bacterias presentes en este hábitat hipersalino. Se encontró alta diversidad de organismos halófilos, arqueas anaerobias y metanógenas en sedimentos donde existe la presencia de tapetes microbianos. Dedujo que la distribución de los microorganismos depende no solo de los factores ambientales sino también a las capacidades metabólicas de cada organismo, los procesos como fotosíntesis son llevados a cabo en la zona litoral dependiendo de intensidad luminosa, tensión de oxígeno y dióxido de carbono. La metanogénesis es llevada a cabo por organismos Euryarchaeota principalmente en ecosistemas bénticos. La reducción del sulfato es realizada por Proteobacterias que pudieran participar movilizand o nutrientes minerales a través del hábitat (Fernández et al. 2016).

2. JUSTIFICACIÓN.

Se considera que los sedimentos tienen características fisicoquímicas altamente variables haciendo que ambientes sedimentarios sean un hábitat altamente heterogéneo, por lo que permiten realizar estudios de tipo geológico y microbiológico.

Los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo, por su naturaleza son un ambiente heterogéneo extremo (salino-alkalino), el estudio de los sedimentos de este cráter permitirá conocer las poblaciones microbianas presentes en este hábitat y evaluar el efecto de las características fisicoquímicas sobre la diversidad y distribución de las poblaciones microbianas.

El carácter único de los sedimentos de la HRP justifica sobradamente una protección rigurosa de la que actualmente carece. En este contexto, el principal factor de tensión al que se encuentra sometido este hábitat es el efecto de la deshidratación que produce singularmente un ambiente extremo.

3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de los factores abióticos de los sedimentos de la Hoya del Rincón de Parangueo sobre las comunidades microbianas presentes en ellos y conocer la correlación entre los diferentes grupos taxonómicos.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Conocer la correlación que existe entre los diferentes parámetros fisicoquímicos evaluados en los sedimentos.
- Describir los taxa presentes en los sedimentos colectados.
- Determinar la diversidad de las comunidades microbianas en los sedimentos.
- Evaluar el efecto de las características fisicoquímicas sobre la estructura de las poblaciones microbianas.

4. METODOLOGÍA.

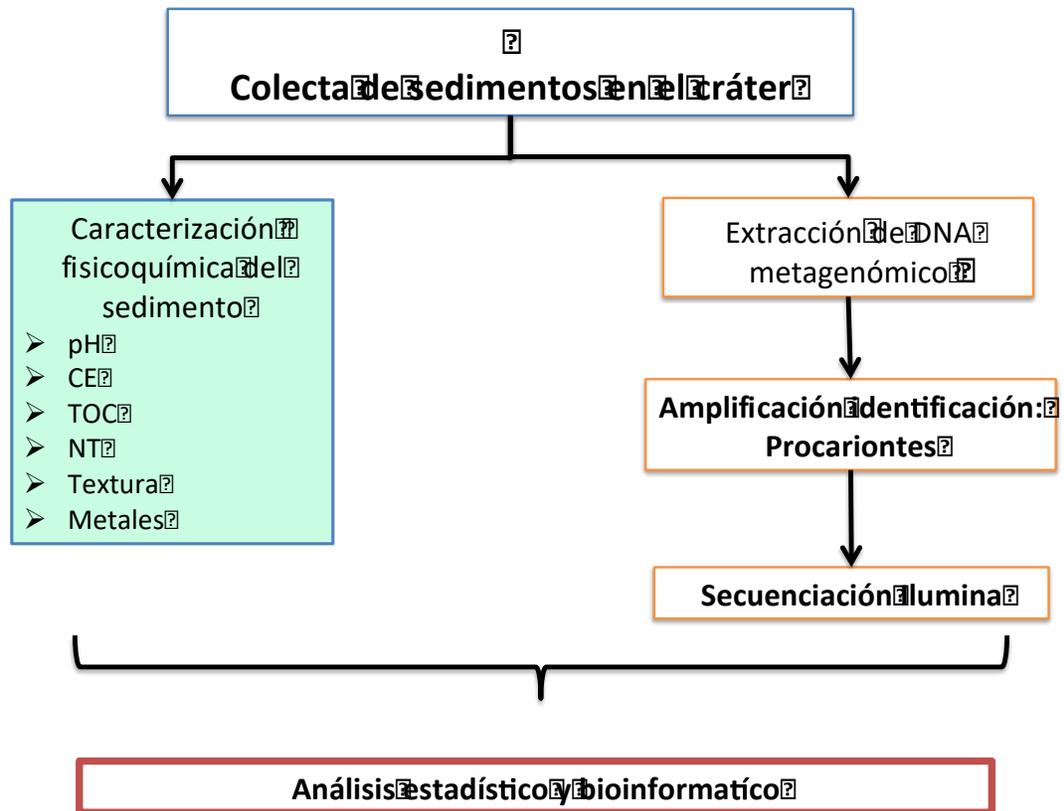


Fig. 5 Estrategia experimental del presente trabajo.

4.1 Sitio de estudio.

La Hoya del Rincón de Parangueo (HRP) se localiza en la región volcánica del Valle de Santiago en el Estado de Guanajuato, México. Las coordenadas del borde del cráter son N: 20° 25' 21", 20° 27' 57" Longitud W: 101° 12' 32', 101° 16' 30'. El área tiene un clima semicálido a templado subhúmedo, temperatura media de 18-22 °C y una precipitación anual de 500 – 2 500mm. La HRP actualmente es considerado como área natural protegida.

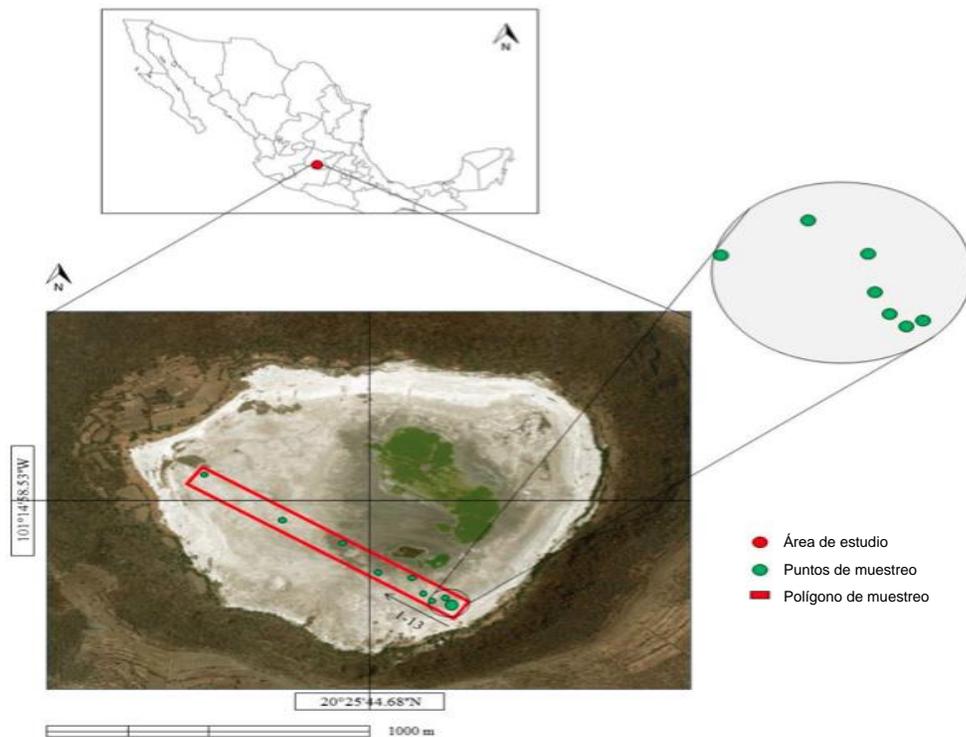


Fig. 6 Localización del sitio de muestreo en La Hoya del Rincón de Parangueo. Nota: El recuadro rojo delimita el transecto de muestreo, los puntos señalados en verde corresponden a cada punto de colecta.

4.2 Colecta de sedimentos.

La colecta se realizó el día 27 de Julio 2015 en el periodo de sequía. Se delimitó un transecto en el fondo del cráter (Fig. 6) y se colectaron sedimentos en 13 puntos a diferente distancia a lo largo del transecto. Se colectaron muestras en diferentes puntos en el fondo del cráter con la finalidad de encontrar la mayor variación en características fisicoquímicas y poblaciones microbianas.

Las muestras de sedimento fueron tomadas con pala, se tomaron los 20 cm superficiales y se limpió la pala entre cada punto de colecta. Las muestras de sedimento fueron colocadas en bolsas negras de polipropileno estériles y fueron transportadas en hielo hasta el laboratorio.

En el laboratorio se subdividió cada muestra, una fracción se destinó a la caracterización fisicoquímica y otra se mantuvo a -20 °C para extracción de DNA metagenómico.

4.3 Caracterización fisicoquímica de los sedimentos.

Cada una de las submuestras de sedimento destinadas a caracterización fisicoquímica fueron secadas al aire después molidas y mezcladas para posteriormente realizar la caracterización fisicoquímica.

La caracterización fisicoquímica de los sedimentos fue realizada por Sánchez Cerda Karla incluyendo, capacidad de retención de agua (CRA) por el método gravimétrico (Cassel et al. 1986), conductividad eléctrica (CE) con el método de pasta saturada (Rhoades et al.1989), nitrógeno total con el método de Kjeldahl (Bremner et al. 1996), carbono orgánico total (TOC) (Chung et al. 2004), tamaño de partícula del sedimento (Gee et al. 1986), pH (Thomas et al. 1996).

El contenido de metales totales se realizó por Aguirre-Noyola José L. mediante la técnica de digestión ácida con HNO₃: HCl ULTREX® II siguiendo el protocolo del método 3050b EPA, posteriormente se realizó un análisis por ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) usando agua desionizada como blanco de reactivos y High-Purity Multi-Element Standards (CWW-TM-D; CWW- TM-H and CWW-TM-A) para calibrar el equipo.

4.4 Extracción de DNA metagenómico.

Las submuestras mantenidas a -20 °C fueron maceradas en mortero en condiciones de esterilidad para generar muestras homogéneas de cada punto de muestreo. Debido al alto contenido de sales en los sedimentos colectados se realizaron diferentes protocolos de extracción de DNA metagenómico.

El primer protocolo fue usando el Kit de Mo Bio Laboratories, USA siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante. El siguiente protocolo fue propuesto por Griffiths et al. 2000 el cual usa una mezcla de fenol:cloroformo; sin embargo con estos protocolos no se logró obtener DNA metagenómico en todas las muestras analizadas.

Se estandarizaron las condiciones de extracción de DNA metagenómico como se describe a continuación.

Cada técnica de extracción se realizó 4 veces a partir de 250 mg de sedimento para obtener finalmente DNA metagenómico de 1 g de sedimento por protocolo de extracción y finalmente mezclar el DNA metagenómico de 3 g de sedimento.

Previo a la extracción se eliminó materia orgánica y exceso de sales como se describe a continuación: Se pesaron 250 mg de sedimento en tubos cónicos Falcon™ de 15 mL se adicionaron 10 mL de pirofosfato de sodio 0.15 M se homogenizó con vortex y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó a 6 000 rpm durante 10 minutos posteriormente se decantó el sobrenadante. Se repitió el lavado 3 veces; después se eliminó el exceso de pirofosfato realizando 2 lavados con 10 mL de regulador de fosfatos 0.15 M pH 8 se homogenizó con vortex y se centrifugó 6 000 rpm y se decantó el sobrenadante (Ceja-Navarro et al. 2010). Las muestras de sedimento tratadas con pirofosfato y regulador de fosfatos fueron procesadas para extracción inmediatamente.

El primer protocolo de extracción fue el descrito por Valenzuela-Encinas et al. (2008), el cual consiste en lisis química y choque térmico (Incubación a -70 °C toda la noche y después 70 °C 20 minutos), el segundo protocolo fue reportado por Sambrook y Rusel (2001) se basa en el uso de lisozima para realizar lisis enzimática adicionalmente se

realizó un choque térmico para aumentar la eficiencia de la extracción; finalmente el tercer protocolo de extracción fue explicado por Hoffman y Winston (1987) el cual consiste en lisis química usando soluciones de detergentes. En los tres protocolos de extracción se realizó lisis mecánica usando FastPrep-24™5G, se realizaron 3 ciclos de agitación a una velocidad e 5.5 m s^{-1} durante 40 segundos y reposo de 4 minutos entre cada ciclo de agitación.

Se evaluó la calidad del DNA metagenómico obtenido con cada protocolo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en regulador TAE 1X (Apéndice I); se corrió por 30 minutos a 70V. La mezcla de DNA metagenómico se guardo a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y se hicieron alícuotas de trabajo para los posteriores análisis.

4.5 Amplificación del gen 16 S rRNA de arqueas.

Para la identificación molecular de arqueas presentes en las muestras de sedimento se amplificó la región V1-V3 del gen 16 S rRNA usando los iniciadores 25F (5'-CYG GTT GAT CCT GCC RG-3') (Dojka et al. 1998) y A571R (5'-GCT ACG GNY SCT TTA RGC-3') (Baker et al. 2003). Los iniciadores contenían los identificadores moleculares de 8 pb propuestos por Illumina.

En la Tabla 1 se muestran las condiciones de reacción establecidas para amplificar el gen 16 S rRNA de arqueas. por triplicado para cada muestra.

El tamaño del amplicón se verificó en electroforesis en agarosa al 1% usando Sybr Gold y marcador de talla molecular 100 pb de Thermo Scientific.

Los productos de tres reacciones por muestra se mezclaron para la construcción de librerías para secuenciación.

Tabla 1. Condiciones de PCR para el gen 16S rRNA de arqueas

Reactivo	Concentración inicial	μL para una reacción
MgCl ₂	25 mM	1.5
Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	10 X	1.25
dNTP	10 mM	0.25
BSA	10 mg mL ⁻¹	1
DMSO		0.5
Iniciador 25F	10 pM	0.25
Iniciador A571R	10 pM	0.25
<i>Taq</i> polimerasa	1 UI μL ⁻¹	0.0625
DNA	ND	1.5 – 3
H ₂ O	Completar a 12.5 μL	-

Desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos 95 °C por 45 segundos, 53 °C 45 segundos 72 °C 1 minuto, y una extensión final de 72 °C por 5 minutos.
dNTP : Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (ATP, CTP, TTP, GTP).
BSA: Albúmina sérica bovina
DMSO : Dimetilsulfóxido

4.6 Amplificación de gen 16S rRNA de bacterias.

Se amplificó por triplicado para cada muestra la región V3-V5 del gen 16S rRNA utilizando los iniciadores 341-F (5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3') y 785-R (5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC -3') (Klindworth et al. 2013) los iniciadores tenían identificadores moleculares de 8 pb.

Las condiciones de PCR para amplificar el gen 16S rRNA de bacterias fueron similares a las establecidas para amplificar arqueas, únicamente se modificó el volumen de DNA (0.75 μL) y la temperatura de alineamiento (56 °C). El tamaño del amplicón fue corroborado en geles de agarosa 1% y usando Sybr Gold. Los triplicados obtenidos por muestra se mezclaron para posteriormente realizar la construcción de librerías para secuenciación.

4.7 Construcción de librería para secuenciación.

Los amplicones obtenidos el gen 16S rRNA de arqueas y bacterias respectivamente, se purificaron para eliminar los residuos de la reacción usando el kit FastGene™ PCR extraction (Genetics), se siguieron las especificaciones del fabricante usando un volumen final de elución de 30 µL de agua.

Se comprobó la eficiencia de la purificación corriendo las muestras en gel de agarosa al 1.5%; posteriormente se cuantificó por triplicado cada muestra usando PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, USA), se realizó una dilución 1:50 del amplicón purificado en TE 1X (Tris-EDTA pH8) y se mezcló en volúmenes iguales de PicoGreen 1X, la mezcla se dejó reposar por 5 min en oscuridad y en hielo finalmente se midió la concentración en NanoDrop™ 3300 Fluorespectrometer (Thermo Scientific Nanodrop) las lecturas se hicieron usando 2 µL de la muestra previamente descrita. Con base en las concentraciones obtenidas se mezclaron las diferentes muestras para obtener concentraciones equivalentes.

Siguiendo las especificaciones del protocolo de Illumina se colocó el index a cada muestra para mandar a secuenciar. Los amplicones con index se mezclan y se cuantifican como se describió previamente.

4.8 Secuenciación con el protocolo de Illumina.

La mezcla se envió a secuenciar en MacroGen Inc. DNA Sequencing Service, Seoul, Korea utilizando la plataforma de Illumina Miseq.

4.9 Análisis de las secuencias.

Se verificó la calidad de las secuencias usando el software FastQC High Throughput Sequence QC report versión 0.11.5 (Andrew et al. 2011). Para los siguientes análisis

se usaron las secuencias Trimmed, el análisis de las secuencias se realizó usando QIIME versión 1.9.1 (<http://www.qiime.org>) (Caporaso et al. 2010b), se eliminaron las secuencias de baja calidad (menores a Phred 19). Se seleccionaron las unidades taxonómicas operacionales (OTU) con nivel de similitud de 97% usando el algoritmo de UCLUST (Edgar 2010) y la base de datos de Greengenes v13_5. El alineamiento de las secuencias se realizó usando el algoritmo PyNAST, con un umbral de identidad mínima de 75% comparando con la base de datos de Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) (Caporaso et al. 2010b). Se determinó una secuencia representativa de cada OTU y la asignación taxonómica se hizo mediante el clasificador del Ribosomal Data Project (RDP) usando la clasificación Naïve Bayesian con identidad mínima de 80% (<http://edp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jps>) (Wang et al. 2007). Las matrices de observaciones biológicas (BIOM) se hicieron usando los datos de la asignación taxonómica y los metadatos de cada muestra de sedimento. Las matrices BIOM se rarificaron a 6 282 secuencias para bacteria y 4 281 secuencias para arquea con la finalidad de evitar el sesgo debido a las diferencias en la secuenciación. Se realizó el análisis para estimar diversidad y riqueza de especies usando las matrices BIOM rarificadas (Gilbert et al. 2009).

4.10 Predicción de capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas en los sedimentos de la HRP.

Se realizó la predicción de las capacidades metabólicas en la plataforma de METAGENassist (<http://www.metagenassist.ca>) (Arndt et al. 2012). Se usaron las matrices BIOM rarificadas de arqueas y bacterias, respectivamente y los datos de las características fisicoquímicas de los sedimentos. Los datos no fueron normalizados y se realizó la predicción de capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas para cada punto de muestreo.

4.11 Análisis estadístico.

Los análisis que a continuación se describen fueron realizados el software R (R Core Team 2013), se uso el paquete Vegan (Oksanen et al. 2017) y Hmisc (Harrell Jr y Dupont 2016) para los análisis de correlación. Los gráficos se realizaron con el paquete Corrplot (Dupont 2016; Taiyun y Simki 2016).

Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) para evaluar la interacción entre las características fisicoquímicas de los sedimentos; con el ρ de los factores abióticos se construyó un heatmap de la correlación entre las características fisicoquímicas.

Se determinó ρ para definir la correlación entre los factores abióticos y los índices de diversidad alfa de las poblaciones microbianas. La correlación entre las características fisicoquímicas y los diferentes grupos taxonómicos se determinó mediante el análisis canónico de coordenadas principales (CAP) y el índice ρ (Anderson y Willis 2003).

El posible efecto de los diferentes factores abióticos en las abundancias relativas de los grupos de arqueas y bacterias fue explorado con el algoritmo de Random Forest (Breiman y Cutler 2015).

5. RESULTADOS.

5.1 Características fisicoquímicas de los sedimentos.

En la Tabla 2 y 3 se muestran las características fisicoquímicas de los sedimentos de la Hoya del Rincón de Parangueo (HRP) evaluadas en las muestras de sedimento, en la Tabla 2 se puede ver que las diferentes muestras de sedimento de la HRP tienen pH alcalino (10.2 -10.3), conductividad electrolítica variable de 24 - 74 dS m⁻¹, el contenido de carbono orgánico es variable en un rango de 10.8 - 12.8 g kg⁻¹ de sedimento seco y el limo representa la mayor proporción de las partículas minerales en las muestras de sedimento.

En la Tabla 3 se muestra el contenido de diferentes metales determinados en los puntos de muestreo. En cada punto de muestreo se observa diferente proporción de metales. Los metales en mayor concentración son Mg (71 300 a 88 042 mg kg⁻¹ de sedimento), Ca (31 113 a 79 138 mg kg⁻¹ de sedimento) y Na (15 711 a 48 096 mg kg⁻¹ de sedimento). El resto de los metales se encuentran en menor concentración por mencionar algunos Pb (0.7 a 6.7 mg kg⁻¹ de sedimento) y As (68 a 141 mg kg⁻¹ de sedimento).

Se determinó también el contenido de fosfato soluble y nitrógeno inorgánico en el sedimento, encontrando las muestras analizadas tienen menos de 1.5 ppm fosforo soluble 10 ppm de amonio 2 ppm de nitrato y 0.4 ppm de nitritos (Dato no mostrado).

La correlación entre las características fisicoquímicas de los sedimentos se muestra en la Fig. 7; en esta se puede observar que conductividad eléctrica y pH tienen correlación positiva significativa con el contenido de K y Na; el contenido de limo tiene correlación negativa significativa con los metales determinados, la mayoría de los metales tiene correlación positiva entre ellos.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Paranguero.

Punto de muestreo	Distancia (m)	pH	CE (dS m ⁻¹)	N total	C orgánico	CRA	Arcilla	Arena	Limo	USDA Clasificación textura
HRP01	0.0	10.2	35.3	2.0	12.1	843	190	300	510	Franco limoso
HRP02	0.3	10.3	55.5	2.1	12.8	793	140	390	470	Franco
HRP03	0.6	10.2	35.6	1.8	10.8	1011	300	250	450	Franco arcilloso
HRP04	1.0	10.3	52.0	2.9	13.3	821	180	480	340	Franco
HRP05	2.0	10.2	31.2	2.4	11.0	852	220	360	420	Franco
HRP06	4.0	10.2	39.2	2.2	11.3	810	260	270	460	Franco
HRP07	8.0	10.3	54.9	2.1	12.2	770	140	270	600	Franco limoso
HRP08	16.0	10.3	43.4	1.5	11.0	949	300	240	460	Franco arcilloso
HRP09	32.0	10.3	54.9	2.0	12.0	867	290	410	300	Franco arcilloso
HRP10	64.0	10.3	74.4	2.2	11.5	739	320	420	250	Franco arcilloso
HRP11	128.0	10.3	67.9	2.0	12.4	950	270	430	290	Franco
HRP12	256.0	10.3	63.6	2.6	12.5	772	150	410	450	Franco
HRP13	512.0	10.2	29.8	2.2	11.5	842	230	360	410	Franco

CE : Conductividad eléctrica, CRA : Capacidad de retención de agua.

Tabla 3. Contenido de metales en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Paranguero.

Punto de muestreo	Ag	As	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K
	(mg kg ⁻¹ sedimento)									
HRP01	0.42	80.2	101.9	52496	0.83	1.55	2.50	1.08	3884	5186
HRP02	0.33	94.8	112.6	51434	0.9	2.05	2.71	1.33	4021	6956
HRP03	0.29	68.1	107.7	53621	0.67	2.80	3.84	2.46	4950	4590
HRP04	0.54	100.6	140.9	79138	1.17	2.80	4.21	3.17	6771	9025
HRP05	0.37	92.7	122.3	54380	1.05	3.80	4.42	2.90	6178	5522
HRP06	0.08	104.7	125.4	66171	1.21	3.25	6.25	3.63	8366	8416
HRP07	0.00	72.2	68.6	31113	1.00	4.42	4.21	3.13	5432	7911
HRP08	0.37	113.9	131.2	59742	1.38	3.13	4.88	3.59	5115	7718
HRP09	0.83	120.6	149.9	66530	1.50	3.09	3.63	3.29	5322	9373
HRP10	0.33	141.4	152.5	66254	1.67	3.90	4.88	4.29	6489	10770
HRP11	0.04	140.4	150.7	40488	1.67	4.21	5.75	4.17	7445	11122
HRP12	0.21	103.3	121.7	61609	1.34	4.75	5.25	4.84	7245	9683
HRP13	0.29	123.5	135.4	69775	1.59	4.09	5.13	4.09	7012	7051

Tabla 3 Continuación

Punto de muestreo	Mg	Mn	Ni	Pb	V	Si	Sr	Zn	Na	Al
	(mg kg ⁻¹ sedimento)									
HRP01	71300	115.2	2.54	4.30	0.0	797.8	624.09	11.250	15711	5693.3
HRP02	76079	153.3	2.80	2.09	0.0	1154.4	610.59	18.627	25758	6605.0
HRP03	79438	154.3	2.75	3.08	0.0	652.0	596.75	19.833	18625	7526.7
HRP04	73525	191.1	3.55	6.71	0.9	26599.2	858.08	18.753	23700	11039.6
HRP05	72521	173.0	3.38	5.17	0.0	932.5	747.04	19.253	16388	9061.3
HRP06	77088	229.7	4.38	5.55	9.5	1567.5	700.00	22.460	23454	12059.2
HRP07	74992	136.6	3.21	5.05	0.0	943.3	327.25	20.210	20392	7857.5
HRP08	87963	175.5	3.34	3.20	1.3	643.4	714.71	18.460	26954	8403.8
HRP09	85763	200.8	2.50	1.80	0.2	562.5	815.04	18.167	34950	8740.4
HRP10	88042	233.8	3.30	2.67	3.8	1091.3	806.13	33.627	45488	10621.3
HRP11	84571	318.7	3.88	0.71	11.4	794.4	748.75	19.793	48096	11543.3
HRP12	80588	213.6	4.00	6.38	7.2	457.2	650.75	20.753	34196	10390.8
HRP13	78088	216.6	3.25	5.17	6.9	412.0	813.67	15.630	17029	10437.5

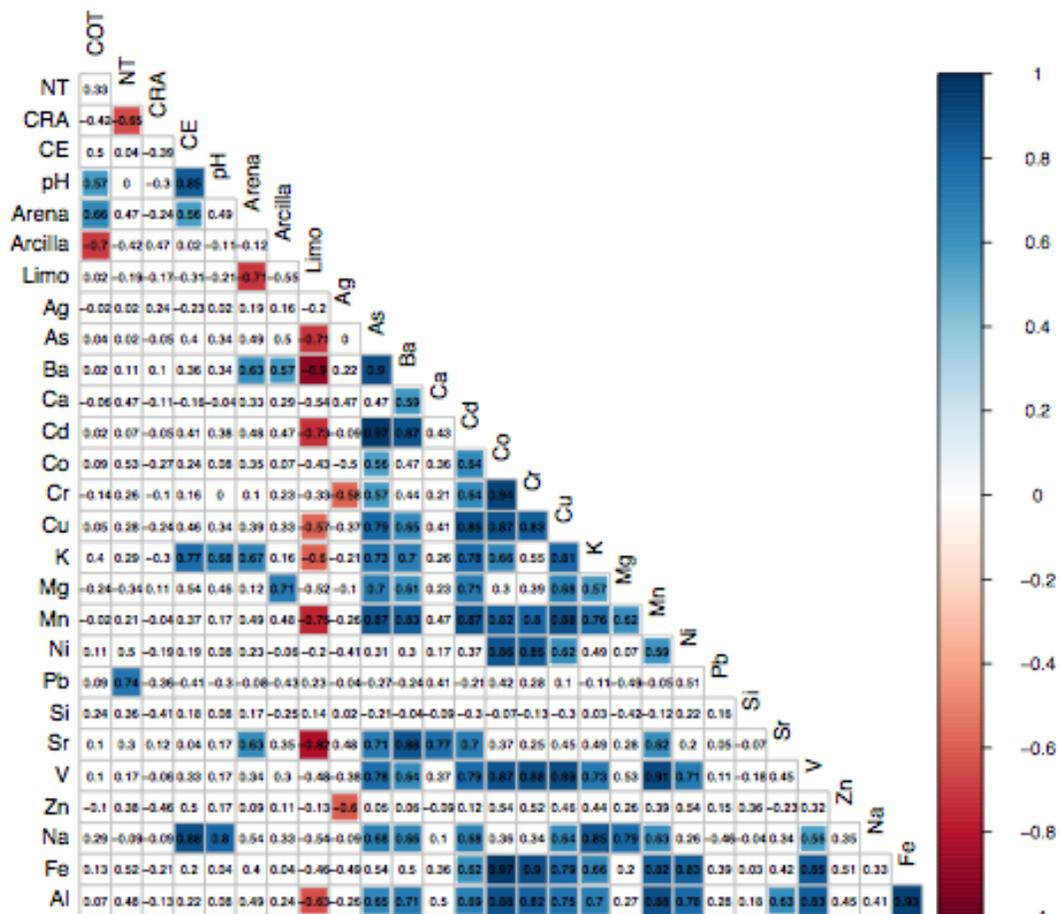


Fig. 7. Correlaciones pareadas de las características fisicoquímicas de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Paranguero.

Nota: La magnitud del coeficiente de correlación de Spearman es solo mostrada gráficamente con escala de color si es significativa ($p < 0.05$). En azul se muestran las correlaciones positivas y en rojo negativa.

5.2 Análisis de la comunidad de bacterias presentes en los sedimentos de la Hoya del Rincón de Parangueo (HRP).

5.2.1 Agrupamiento de las OTUs y análisis de diversidad de bacterias.

En la Fig. 8 se muestra la curva de rarefacción obtenida para cada punto de muestreo, se observa que al analizar un mayor número de secuencias se obtiene un número limitado de OTUs.

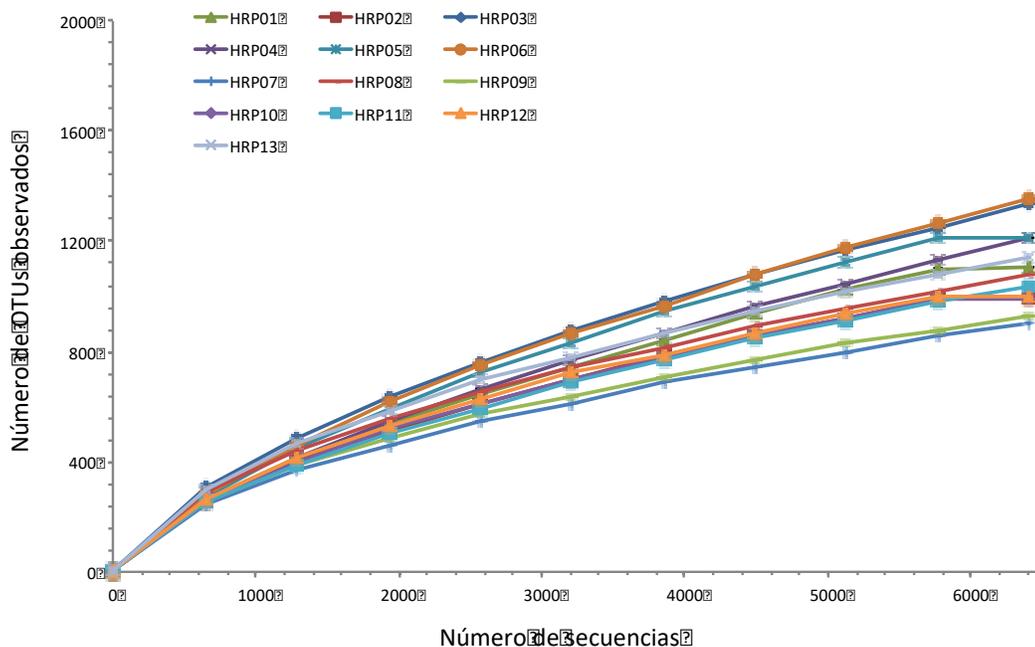


Fig. 8. Curva de rarefacción de las poblaciones de bacterias en la HRP.

En la Tabla 4 se muestra el resumen de diversidad alfa de la comunidad de bacterias, se puede ver el que la cobertura es de 88 - 92 %, es decir que la mayoría de las OTUs fueron detectados en la secuenciación.

El número de OTUs observado es variable en cada punto de muestreo; el número mínimo de OTUs fue 894 (HRP07) y el máximo fue 1 341 (HRP06), el estimador de riqueza de especies (Chao 1) tiene un valor mínimo de 1 970 (HRP08) y máximo de 3 312 (HRP01); el índice de Simpson tiene un rango de 0.97 (HRP02) a 0.99 (HRP03, HRP08, HRP 13) y el índice de Shannon 7.33 (HRP04) a 8.52 (HRP13). La variación

en los parámetros de diversidad alfa pueden ser indicativos de la complejidad de las comunidades microbianas en los sedimentos de la HRP.

Tabla 4. Diversidad alfa de bacterias en La Hoya del Rincón de Parangueo.

Muestra	OTU ₉₇	Riqueza de		Índices de diversidad		
		especies (Chao1)	Cobertura (%)	Diversidad filogenética	Simpson	Shannon
HRP01	1165	3312	88	70.37	0.98	7.94
HRP02	1037	2173	91	67.25	0.97	7.61
HRP03	1318	2763	88	69.21	0.99	8.51
HRP04	1189	2758	88	71.54	0.95	7.33
HRP05	1285	3067	87	77.53	0.98	7.95
HRP06	1341	2925	86	76.10	0.98	8.08
HRP07	894	2003	92	57.22	0.98	7.70
HRP08	1068	1970	91	58.33	0.99	8.26
HRP09	917	1980	92	60.12	0.98	7.87
HRP10	1034	2016	91	64.03	0.98	7.85
HRP11	1027	2194	90	62.08	0.98	7.86
HRP12	1049	2277	90	64.19	0.98	7.88
HRP13	1132	2088	90	66.02	0.99	8.52

NOTA : Los análisis se realizaron con las secuencias rarificadas a 6 282 secuencias por muestra

Se evaluó la correlación de las características fisicoquímicas sobre los índices de diversidad de bacterias, en la Fig. 9 se puede observar que pocas características fisicoquímicas afectan los índices de diversidad.

El pH muestra correlación negativa con la mayoría de los índices evaluados. El estimador de Chao 1 fue negativamente correlacionado con capacidad de retención de agua y el contenido de Si, mientras que el índice de Shannon tiene correlación positiva con pH.

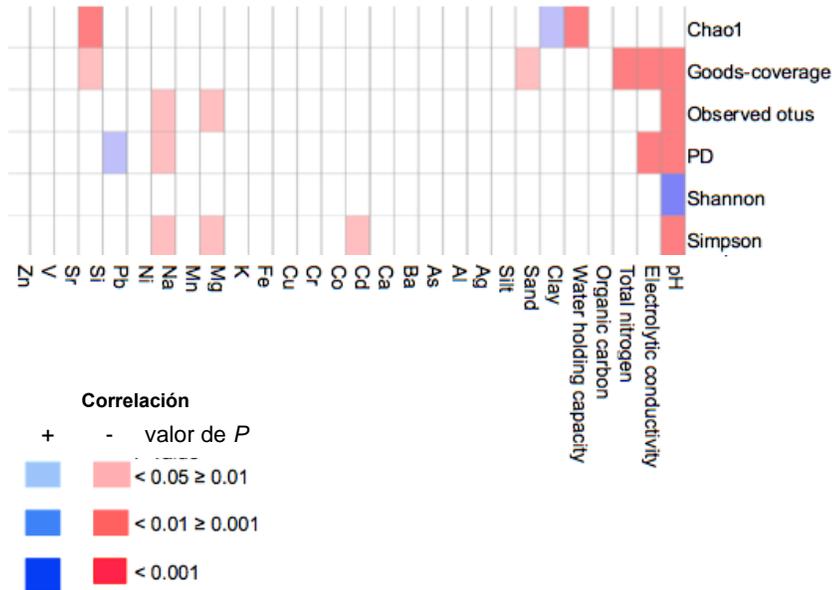


Fig. 9. Correlaciones entre las características fisicoquímicas de los sedimentos y los índices de diversidad alfa de bacterias.

Nota: Solo se muestran en color los índices de correlación significativos. En azul se muestra correlación positiva y en rojo negativas.

5.2.2 Asignación taxonómica de bacterias en los sedimentos de HRP.

Se analizaron un total de 81 666 secuencias de las cuales aproximadamente 5.5 % no fueron identificadas, se identificaron 37 phyla, 108 clases, 203 órdenes, 314 familias y 400 géneros. Los phyla más abundante son Proteobacteria (17 - 51 %), Actinobacteria (14 – 35 %), Planctomycetes (2 – 26 %) y Gemmatimonadetes (3 – 15 %) (Fig. 10). Las clases dominantes son Gammaproteobacteria (10 - 40 %) y Nitrospirae (7 – 18 %). Los géneros abundantes son *Candidatus Nitrospirae* (6 -13 %), *Euzeybya* (1 - 4%), *Planctomyces* (1 – 4%) y *Halomonas* (1%).

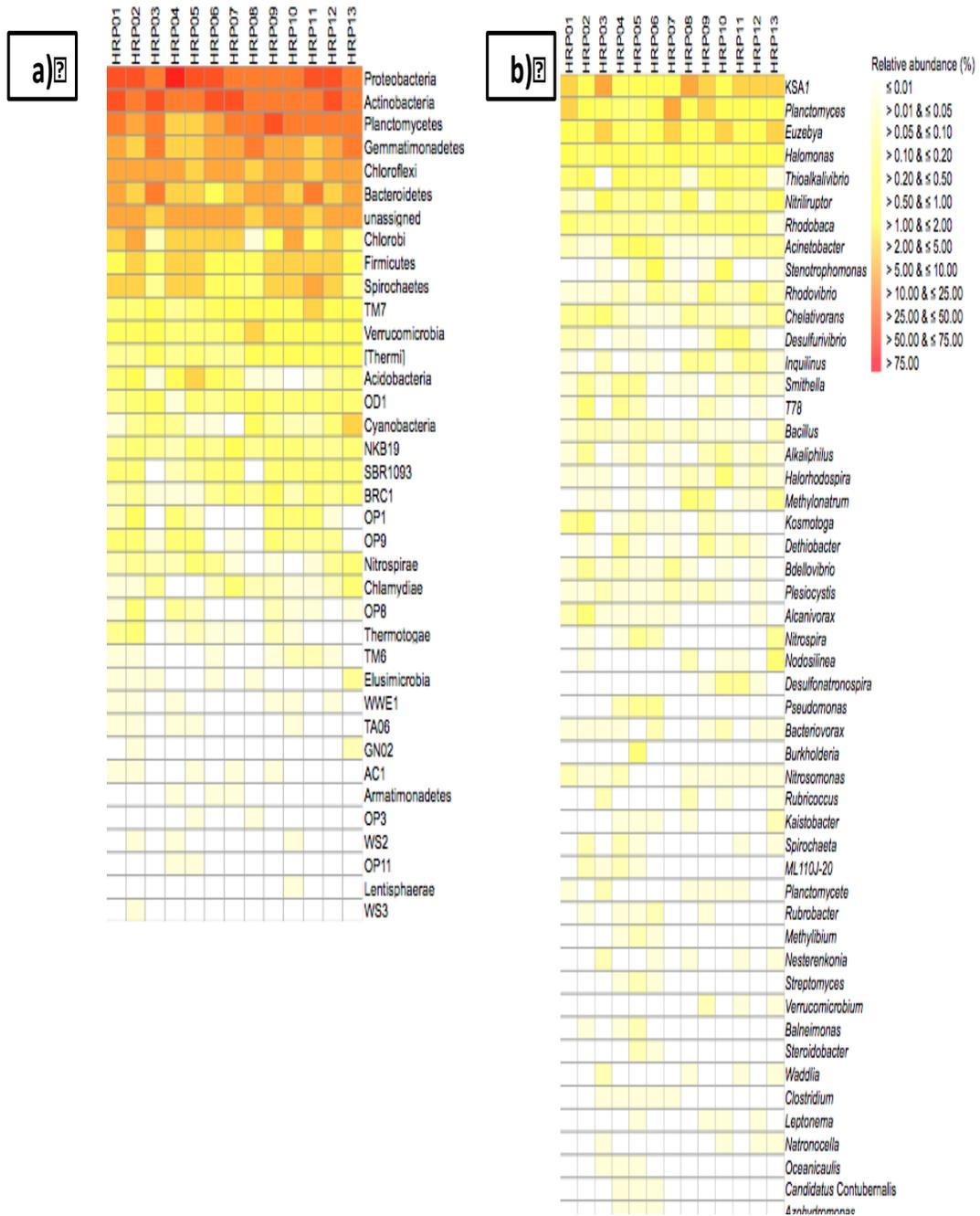


Fig. 10. Heatmap de abundancia relativa de diferentes taxa de bacteria en la HRP.
a) Abundancia relativa a nivel de filo. b) Abundancia relativa de los géneros de bacterias.
Nota: Abundancia relativa expresada en porcentaje; los datos no fueron normalizados.

5.2.3 Correlación entre poblaciones de bacterias.

Las asociaciones entre las poblaciones de bacterias fueron analizadas mediante el coeficiente de correlación de Spearman. En la Fig. 11 se pueden observar la posible asociación positiva entre Bacteroidetes, Verrucomicrobia y Planctomycetes y otro grupo de microorganismos puede ser entre Acidobacteria y las diferentes clases de Proteobacteria.

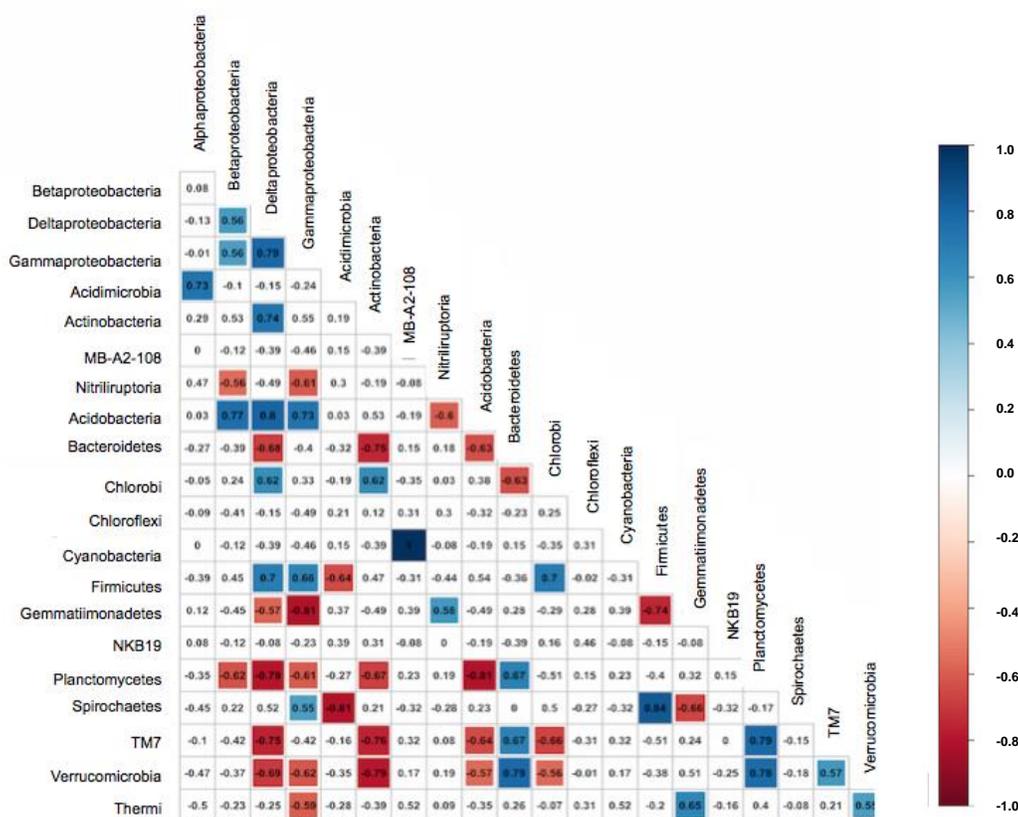


Fig. 11. Correlaciones pareadas entre diferentes filo y clases de bacterias presentes en los sedimentos de HRP.

NOTA: Únicamente se resaltan en color los grupos microbianos con correlación significativa. En azul se muestra correlación positiva y en rojo negativas.

5.2.4 Efecto de las características fisicoquímicas de los sedimentos sobre las poblaciones bacterianas,

En la Fig. 12 muestra el análisis de CAP de los diferentes grupos de bacterias. En la Fig. 12a se puede observar que la abundancia relativa de Proteobacteria es mayor en las muestras de sedimento con alto contenido de C, N total, Si y arena (p. ej. HRP 04),

Bacteroidetes y Planctomycetes fueron enriquecidos en muestras con alto contenido de Mg y arcilla (p. ej. HRP08).

En la Fig. 12b se puede observar que los filotipos pertenecientes a *Planctomyces* fueron abundantes en muestras de sedimento con alto contenido de Cd y Na (p. ej. HRP07 y HRP09), los organismos pertenecientes a los géneros *Euzebya*, *KSA1* y *Nitriliruptor* fueron abundantes en muestras con alto contenido de arcilla y Mg (p.ej. HRP03, HRP08 y HRP13). La abundancia relativa de *Acinetobacter* fue mayor en muestras de sedimento con alto contenido de C orgánico, N total, arena, K, Pb y Si.

El grado de correlación entre los factores fisicoquímicos y los diferentes taxa de bacteria se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. En la Fig. 13a se puede observar que el contenido de Mg y arena tienen correlación significativa ($p < 0.001$) con la mayoría de las poblaciones microbianas. El contenido de limo, Ca, y Zn no tiene correlación significativa con ninguna de las poblaciones de bacterias. El contenido de Mg tiene correlación negativa con la abundancia relativa de *Thermi* y positiva con *Verrucomicrobia* ($p < 0.001$). El contenido de arena tiene correlación positiva con la presencia de *Spirochaetes* ($p < 0.001$). Pocos grupos de géneros de bacteria fueron relacionados significativamente con algún parámetro abiótico (Fig.13b). *Desulfonatronospira* tiene correlación positiva con el contenido de arena y *Alcanivorax* tiene correlación negativa con el contenido de Mg ($p < 0.001$).

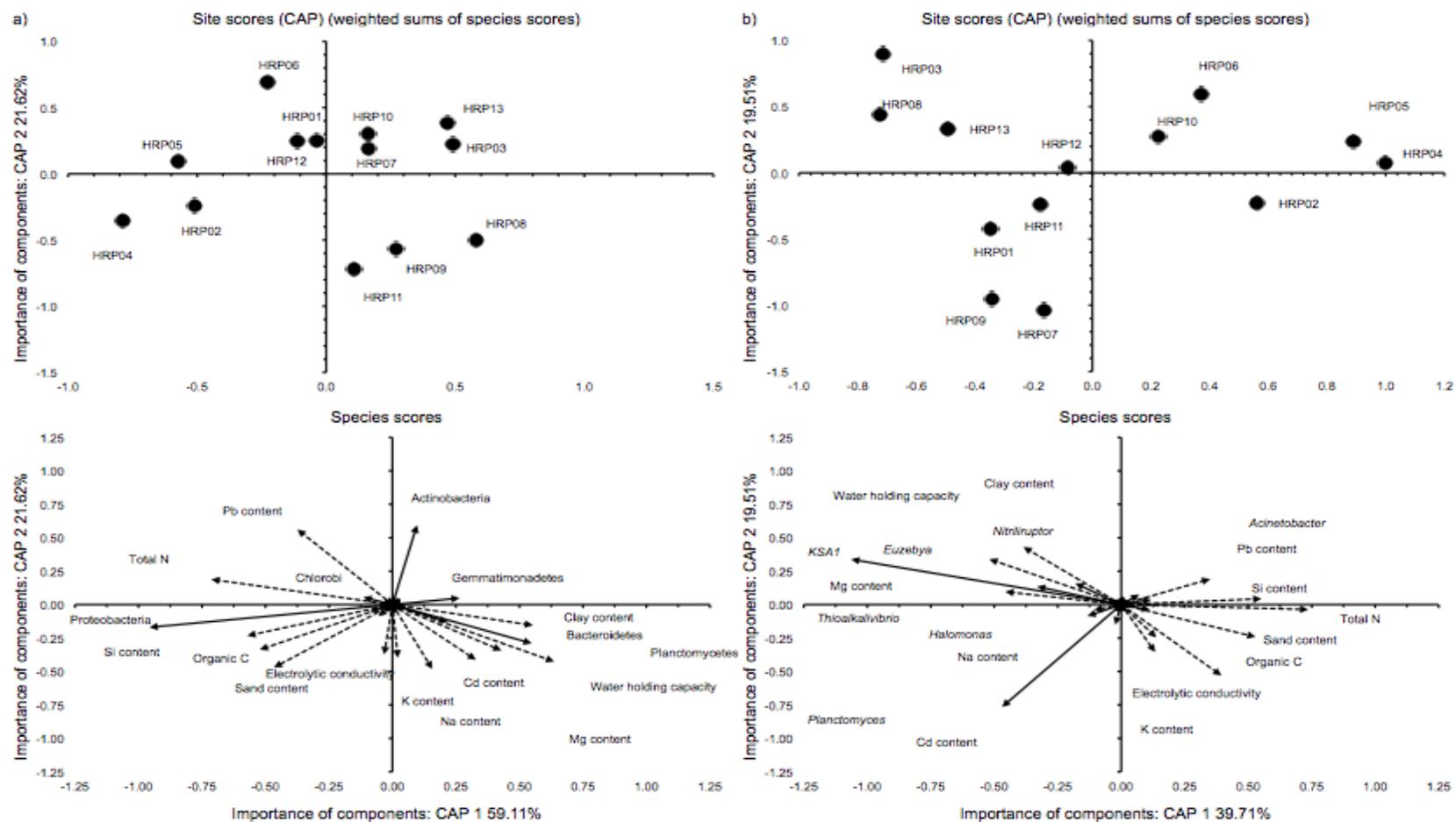


Fig. 12. Análisis canónico de coordenadas principales (CAP) de las poblaciones de bacteria en HRP.

a) Análisis a nivel de filo b) Análisis a nivel de género.

Nota: Se utilizó la distancia de Bray Curtis.

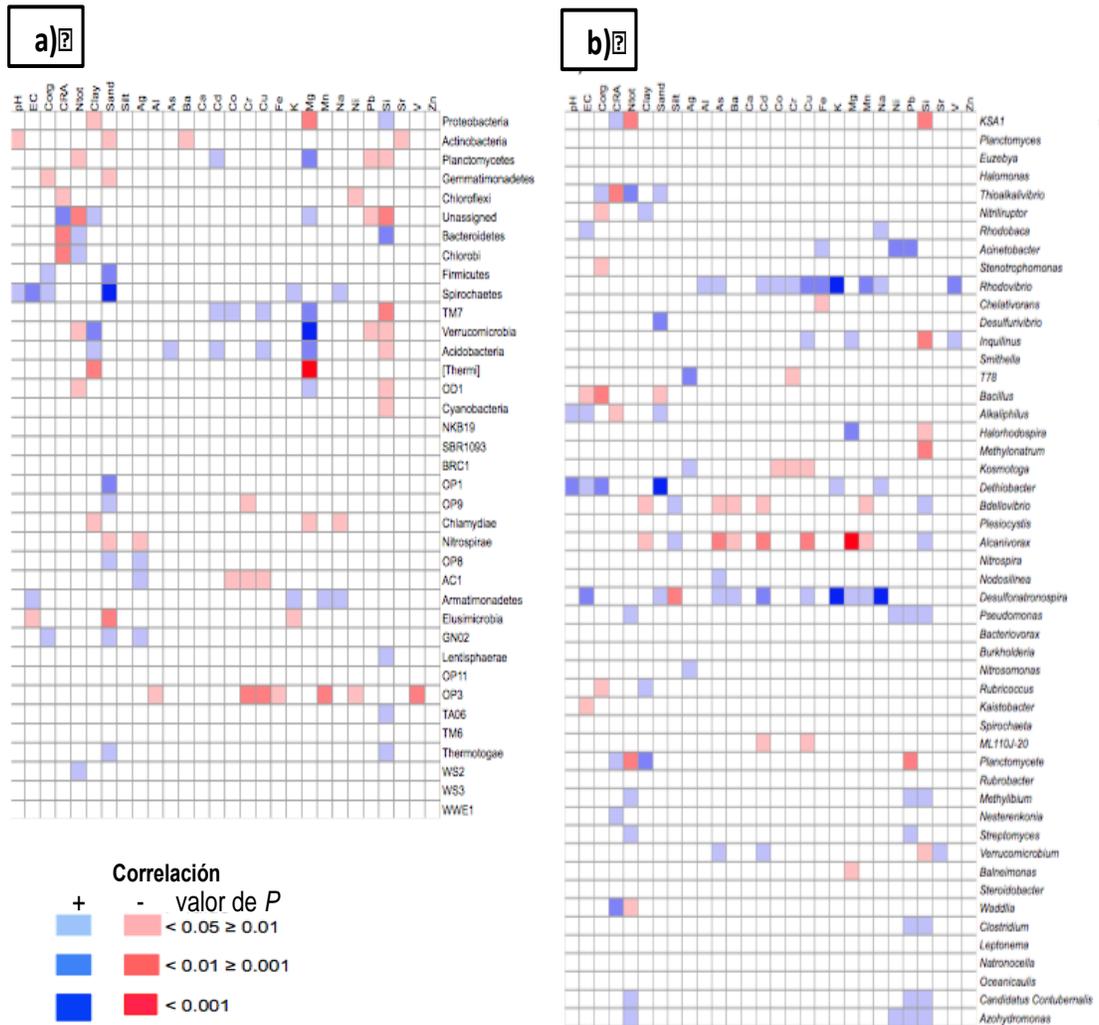


Fig. 13. Correlaciones entre los parámetros abióticos y diferentes grupos de bacteria en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Paranguero.

a) Correlación de Spearman entre factores abióticos y los fillos de bacterias. b) Correlación se Spearman parámetros abióticos y géneros.

El algoritmo de random Forest demuestra que los parámetros abióticos medidos no explican completamente ($> 25\%$) la variación en las poblaciones de bacterias en los sedimentos de la HRP (Tabla 5).

Los parámetros abióticos medidos explican solo la variación en la población de TM6 y *Desulfonatronospira* en aproximadamente $> 50\%$.

Tabla 5. Cambio de las poblaciones microbianas y capacidades metabólicas explicadas por las características abióticas medidas.

Grupos Taxonómicos	Variación explicada (%)	Importancia de los factores abióticos para explicar la variación
Bacteroidetes	45.25	CRA ^a > Total N > Arcilla
TM6	50.12	CE ^b > Mn > As
Verrucomicrobia	45.94	Arcilla > Mg > CRA
Thermi	27.78	Mg > Cd > Arcilla
<i>KSA1</i> (Bacteroidetes)	31.29	N total > Arena > CRA
<i>Desulfovibrio</i>	23.12	Limo > K > Pb
<i>Desulfonatronospira</i>	53.65	Limo > As > Na
Funcionalidad Bacteria		
Dehalogenación	38.55	CRA > N total > Arcilla
Funcionalidad de Arqueas		
Reducción de sulfato	39.01	Pb > Na > N total

^a CRA: Capacidad de retención de agua, ^b CE: Conductividad electrolítica por los factores abióticos usando el algoritmo de random Forest.

5.3 Análisis comunidad de arqueas en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Paranguo (HRP).

5.3.1 Agrupación de las OTUs y análisis de diversidad alfa de arqueas en HRP.

En la Fig.14 se observa la curva de rarefacción obtenida para las poblaciones de arqueas, se observa una gráfica asintótica indicando que el análisis de mas secuencias de DNA genera un número limitado de OTUs.

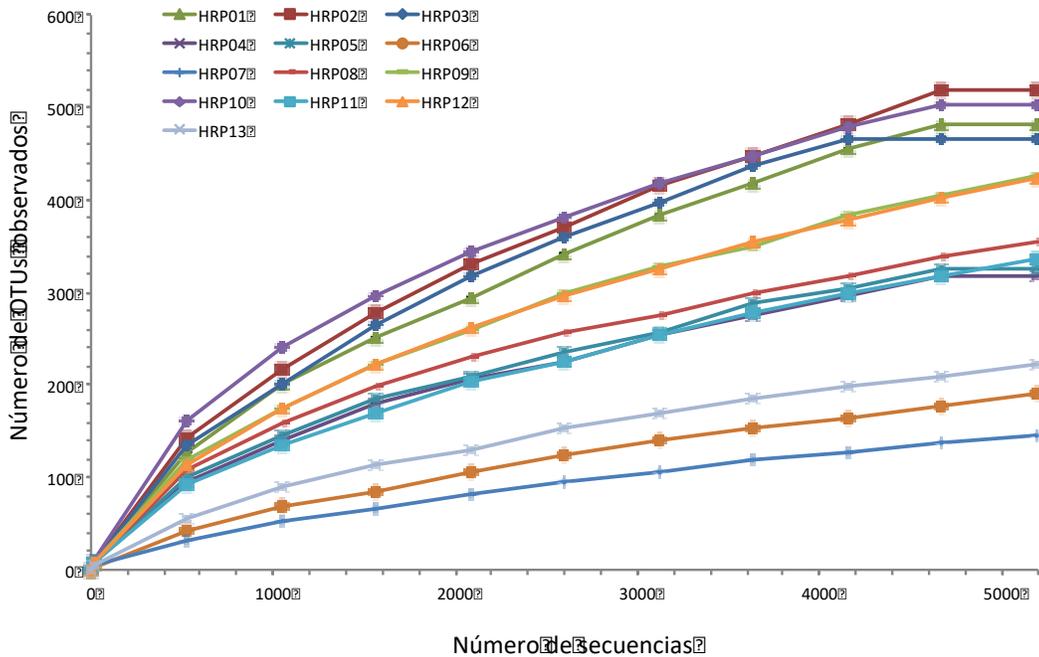


Fig. 14. Curva de rarefacción de las poblaciones de arqueas en la HRP.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos del análisis de diversidad alfa de arqueas, la cobertura del análisis fue de 93 – 98 % es decir que la mayoría de las OTUs correspondientes a arqueas fueron detectados. Se puede observar variaciones en los parámetros usados para medir diversidad de la comunidad de arqueas. Se encontraron diferente número de OTUs el valor mínimo fue 121 (HRP07) y el máximo fue 496 (HRP02); se encontró valores variables del estimador Chao1 el valor mínimo fue 249 (HRP07), el índice de Simpson tiene valor mínimo de 0.68 (HRP06) y máximo de 0.97 (HRP10), el índice de diversidad filogenética tiene valor mínimo de 6.5 (HRP07) y máximo de 17.7 (HRP02) y el índice de Shannon presenta un valor mínimo de 2.42 (HRP7) y máximo de 6.69 (HRP10).

Tabla 6. Diversidad alfa de arqueas en La Hoya del Rincón de Paranguero.

Muestra	Riqueza de			Índices de diversidad		
	OTU ₉₇	especies (Chao1)	Cobertura (%)	Diversidad filogenética	Simpson	Shannon
HRP01	461	929	93	16.1	0.93	5.62
HRP02	496	1010	93	17.7	0.95	6.06
HRP03	477	978	93	15.6	0.92	5.70
HRP04	305	679	96	12.0	0.94	5.18
HRP05	312	578	96	11.7	0.93	5.18
HRP06	166	409	97	8.3	0.68	2.64
HRP07	121	249	98	6.5	0.69	2.42
HRP08	330	582	96	9.9	0.92	5.22
HRP09	390	786	95	14.6	0.94	5.57
HRP10	491	839	94	15.7	0.97	6.69
HRP11	301	680	96	12.2	0.93	5.14
HRP12	388	645	95	12.9	0.91	5.36
HRP13	202	436	97	7.9	0.86	3.88

Nota: Los análisis se realizaron con 4 281 secuencias de arquea por muestra.

Se evaluó el efecto de las características de los sedimentos sobre los índices de diversidad alfa de arqueas mediante el coeficiente de correlación de Spearman (Fig 15). Se encontró que ninguno de los índices determinados tiene correlación significativa con ninguno de los parámetros abióticos ($p < 0.01$).

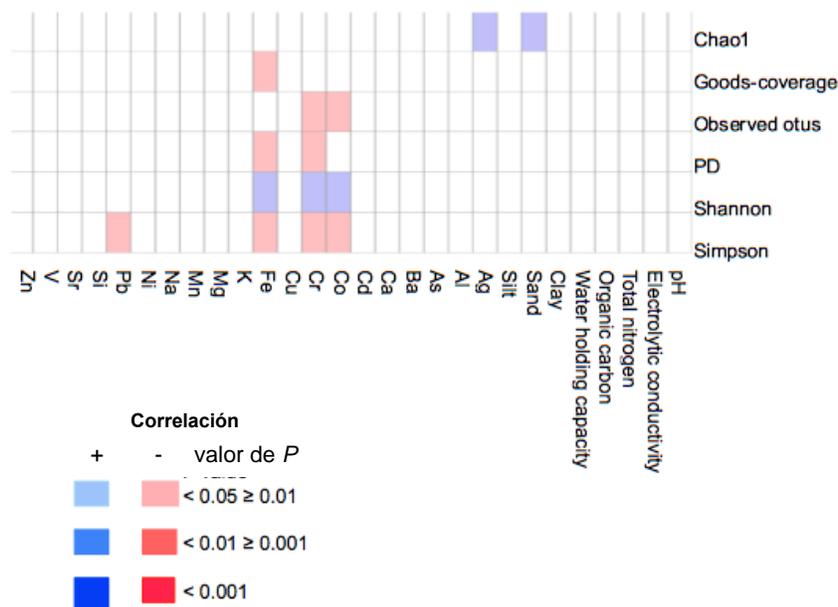


Fig. 15. Heatmap de la correlación entre las características fisicoquímicas de los sedimentos y los índices de diversidad alfa para la población de arqueas.

5.3.2 Asignación taxonómica de las arqueas presentes en los sedimentos de la HRP.

Después de eliminar las secuencias de mala calidad se rarificaron las librerías de arqueas en 4281 lecturas por muestra, haciendo un en total se analizaron 55 653 secuencias. Se encontraron 3 phyla, 7 clases, 21 ordenes, 36 familias y 51 géneros.

En la Fig. 16 se observa las abundancias relativas de arqueas en diferentes niveles taxonomicos; se puede ver que el phylum con mayor abundancia relativa es Euryarchaeota en la mayoría de las muestras a excepción de los puntos HRP04 y HRP05 donde Thaumarchaeota tiene mayor abundancia. Las clases abundantes son Halobacteria (3 - 53 %), Thermoplasmata (9 - 54 %), Cenarchaeales (13 - 43%), Nitrososphaerales (2 - 21 %). Los géneros abundantes son *Candidatus Thermoplasmata* (4 - 48 %), *Candidatus Nitrososphaera* (2 - 20 %) y *Natranococcus* (1 - 4 %).

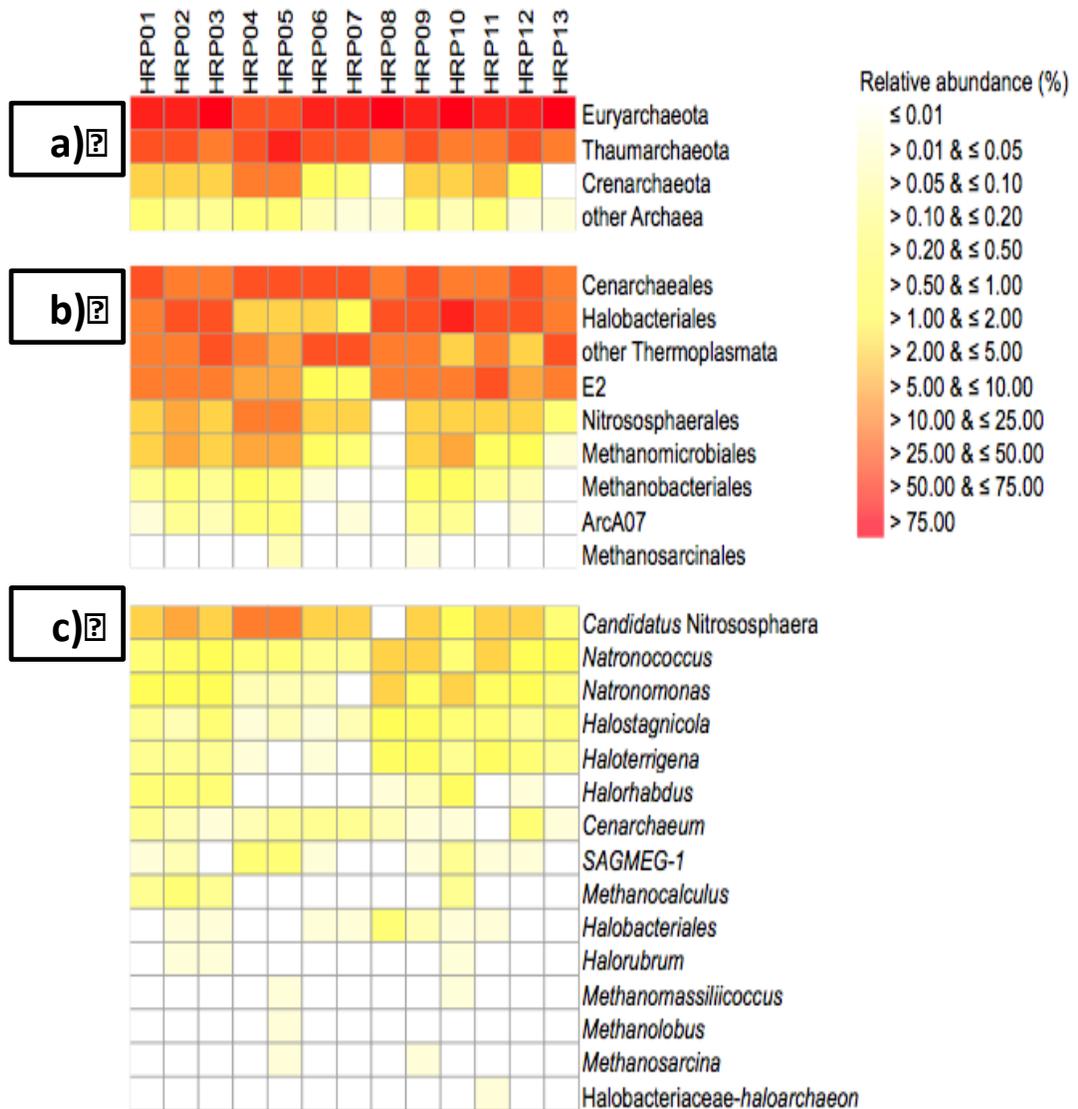


Fig. 16 . Heatmap de abundancia relativa de diferentes taxa de arqueas en la HRP.
a) Abundancia relativa a nivel de filo, b) Abundancia relativa a nivel de orden
c) Abundancia relativa a nivel de género.

5.3.3 Correlación entre poblaciones de arqueas.

La interacción entre diferentes grupos de arqueas se exploró mediante el coeficiente de correlación de Spearman. En la se observa que pocos grupos de arquea tienen correlación significativa. Crenarchaeales y Nitrososphaerales tienen correlación

positiva lo cual podría indicar alguna asociación , también los organismos Methanomicrobia y Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG) tienen correlación positiva. En el caso de Thermoplasmata y Methanomicrobia tienen correlación negativa lo cual podría indicar competencia entre esos grupos de arqueas.

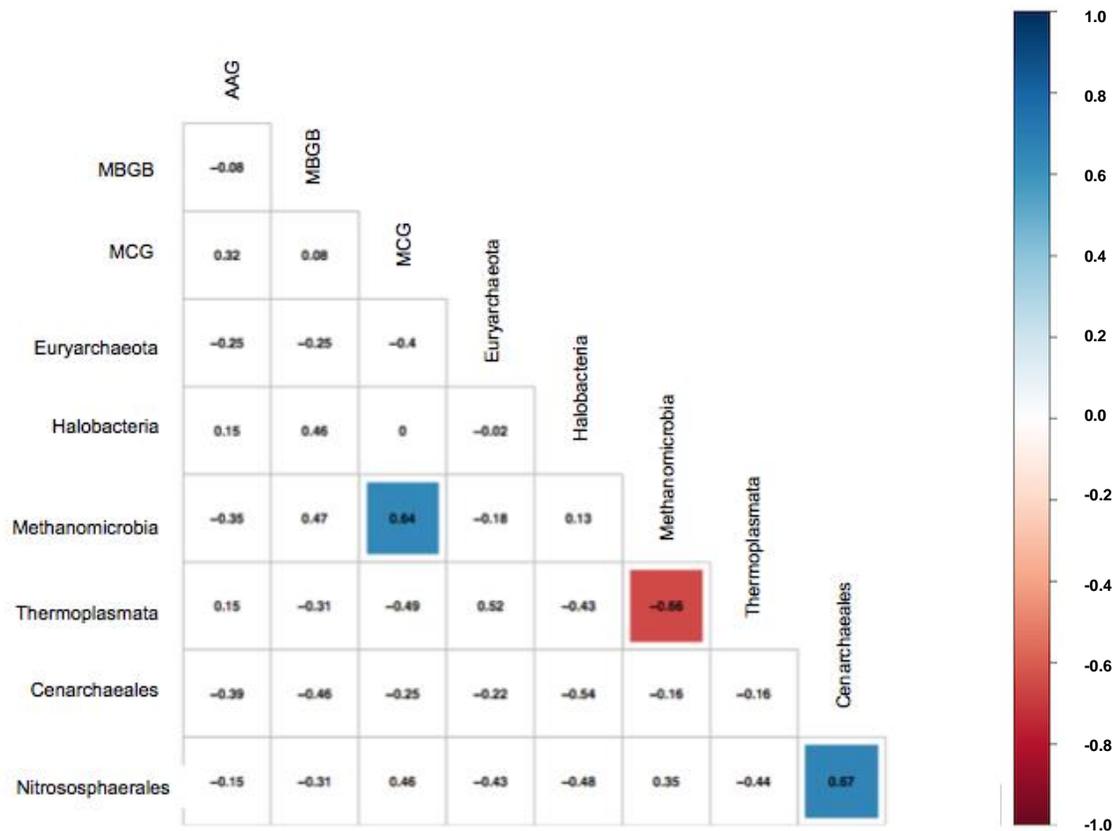


Fig.17. Correlaciones pareadas de las diferentes clases de arqueas presentes en los sedimentos de HRP.

NOTA: Únicamente se resaltan en color los grupos microbianos con correlación significativa ($p < 0.05$).

5.3.4 Efecto de las características fisicoquímicas de los sedimentos sobre las poblaciones de arqueas.

El análisis CAP indica que las muestras de sedimento con alto contenido de N y Pb favorecen la presencia de Thaumarchaeota (p. ej. HRP 06, HRP07 y HRP 12), mientras que los sedimentos con alto contenido de Si y arena (HRP 04 y HRP'5)

favorecen el crecimiento de Crenarchaeota (Fig. 18a). Euryarchaeota tiene abundancias relativas altas en muestras de sedimento con alto contenido de Mg, C orgánico y CRA (p. ej. HRP08 y HRP13).

Los filotipos pertenecientes a *Candidatus Nitrososphaera* fueron abundantes en las muestras con alto contenido de Si, Pb, arena y N total (p. ej. HRP04 y HRP05), *Natranococcus* estuvo presente en las muestras de sedimento con alto contenido de arcilla, CRA y Cd (p. ej. HRP08 y HRP13) y *Natranomonas* fue abundante en las muestras con alto contenido de Na y elevada CE (p. ej. HRP03, HRP11, HRP12 y HRP13) (Fig. 18c).

Los fila de arqueas tienen correlación con pocos factores abióticos (Fig .19) por mencionar algunos el contenido de N total, arena, arcilla Pb y Mg ($p < 0.05$). Crenarchaeals tiene correlación negativa con el contenido de arcilla, Halobacteriales tiene correlación positiva con el contenido de Mg y Na. Se encontró que los Nitrososphaerales tienen correlación negativa con arcilla.

El contenido de arcilla, N total, Mg y Pb fueron características que mostraron importante correlación con la mayoría de los géneros de arquea ($p < 0.01$).

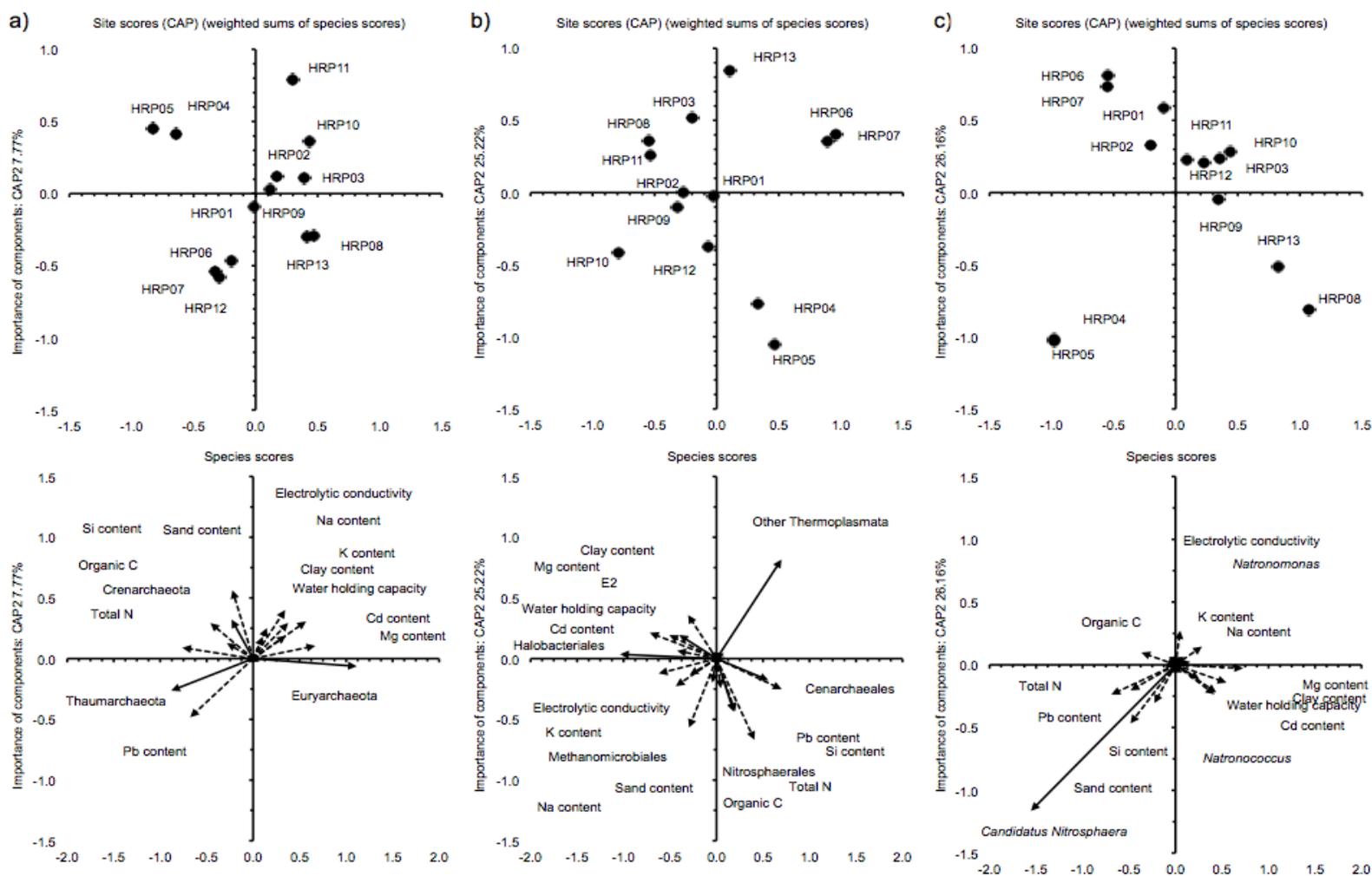


Fig. 18. Análisis canónico de coordenadas principales (CAP) de las poblaciones de arqueas en HRP.

a) Análisis a nivel de filo b) Análisis a nivel de orden c) Análisis a nivel de género.

Nota: Se utilizó la distancia de Bray Curtis

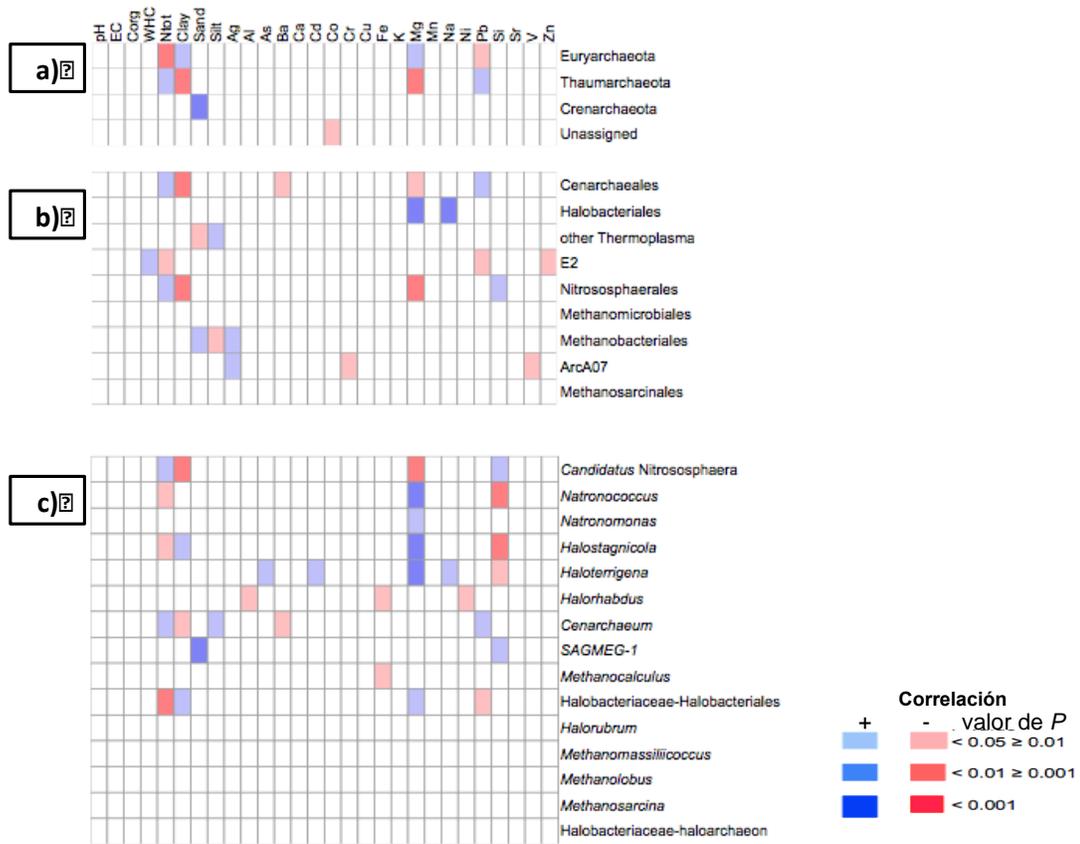


Fig. 19. Correlaciones entre los parámetros abióticos y diferentes grupos de arqueas en los sedimentos de La Hoya del Rincón de Paranguero.

- a) Correlación de Spearman entre factores abióticos y los filos de arqueas. b) Correlación se Spearman entre parámetros abióticos y ordenes de arqueas. c) Correlación entre parámetros abióticos y géneros de arqueas.

5.4 Capacidades metabólicas de las comunidades microbianas de los sedimentos de la HRP.

En la Fig. 20 se muestran las capacidades metabólicas encontradas en las poblaciones microbianas de los sedimentos de la HRP. Se observó una mayor diversidad de funciones metabólicas en la población de bacterias en contraste con las funciones metabólicas de la población de arqueas. La mayoría de las capacidades metabólicas encontradas son aquellas que participan en el ciclo del nitrógeno y del azufre, particularmente para ambos grupos microbianos la oxidación de amonio y reducción del nitrito fueron las más importantes. En el caso de la comunidad de bacterias se encontró además capacidades metabólicas como dehalogenación y degradación de quitina.

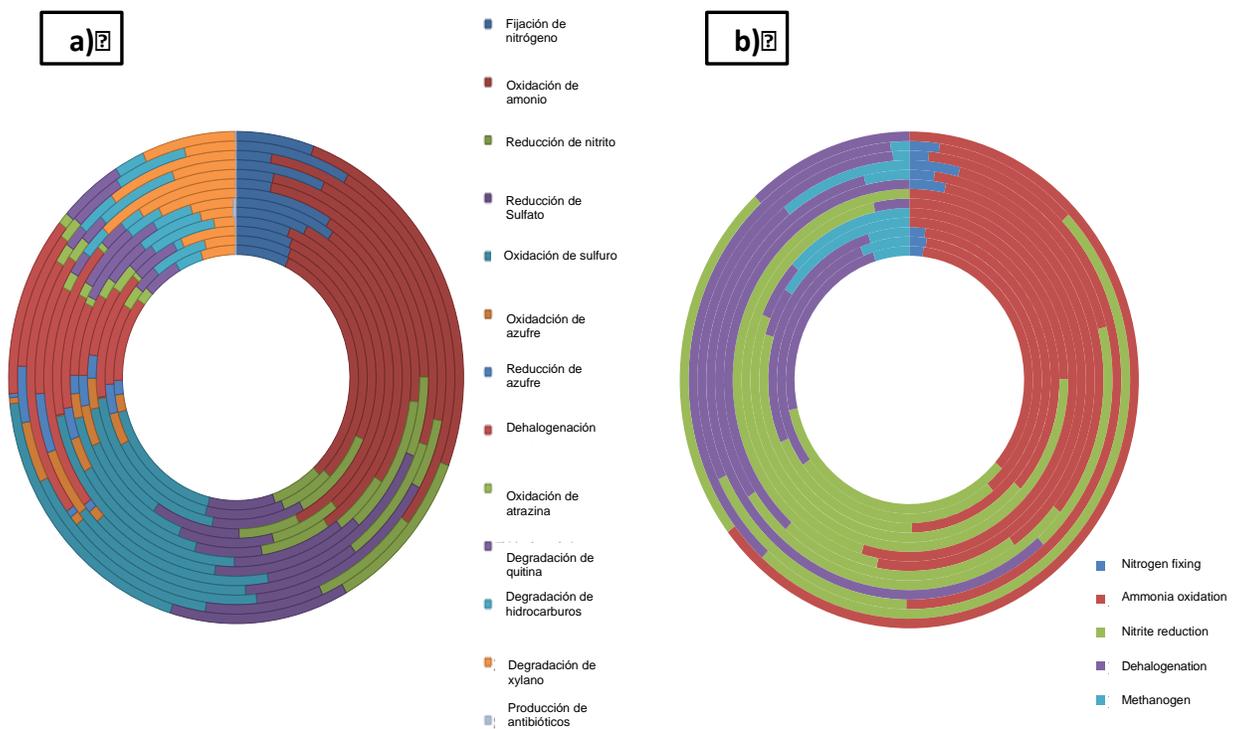


Fig. 20 . Predicción de capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.
a) Capacidades metabólicas de bacterias.
b) Capacidades metabólicas de arqueas.

6. DISCUSIÓN

6.1 Caracterización fisicoquímica de los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo.

Las características fisicoquímicas de los sedimentos de la Hoya del Rincón de Parangueo (HRP) son variables en cada punto de muestreo, esto coincide con estudios previos realizados en sedimentos (Hug et al. 2013, Vuillemin et al. 2013) ya que diferentes factores alteran la precipitación y distribución de las partículas en el fondo lacustre (Lehmann et al. 2002, Fan y Xing 2016). La evaporación del agua del lago contenido en la HRP provocó que se concentrarán las sales y posteriormente precipitaron en el fondo del cráter.

Todas las muestras colectadas tienen pH 10 y alta conductividad electrolítica (CE); estos resultados coinciden con los estudios previos hechos en sedimentos y agua del ex lago de la HRP (Escoledo y Alcocer 2004). El pH alcalino en los sedimentos colectados tiene correlación positiva con el contenido de Na y Mg lo cual coincide con reportes previos (Kienel et al. 2009, Aranda-Gómez et al. 2013). La elevada CE es debida a la evaporación del agua en el cráter, lo cual provocó que se precipitaran carbonatos de sodio y magnesio en el fondo del cráter (Armienta et al. 2008, Aranda-Gómez et al. 2013).

De acuerdo con el reporte de Kienel et al. (2009) en los sedimentos de la HRP hay alto contenido de Ca debido a el momento en que se originó el cráter es decir es un elemento autóctono en cambio el alto contenido de Pb es debido a procesos independientes a la formación del lago como la acumulación de cenizas de actividad volcánica en el este del Valle de Santiago. El contenido de materia orgánica en los sedimentos esta relacionada con la precipitación de detritus (Kienel et al. 2009) y también a la producción de exopolisacaridos por los microorganismos presentes en este hábitat (Valdespino-Castillo et al. 2018).

La correlación positiva entre los diferentes elementos determinados esta relacionada con el proceso de litificación (Kienel et al. 2008). Elementos como Mg, Ca, Al, Si, Fe, y Cd pueden formar carbonatos los cuales son depositados en los sedimentos (Centeno

et al. 2012, Coman et al. 2015). La correlación positiva entre materia orgánica y elementos como K, Na, Ca y Pb está relacionado con la formación de tapetes microbianos. El exopolisacárido en los tapetes microbianos puede unirse a los elementos y mantenerlos precipitados (Valdespino-Castillo et al. 2018) este proceso de litificación microbiana puede conducir a la formación de microbialitas en los sedimentos. El alto contenido de metales como Mg, Ca y Na en las muestras de sedimento es alta comparado con el contenido de elementos de transición como Co, Cu y Mn lo cual pudiera estar relacionado con la formación de microbialitas (Valdespino-Castillo et al. 2018).

6.2 Estructura de la población de bacterias en los sedimentos de la HRP.

Estudios de las poblaciones microbianas en diferentes tipos de sedimentos demuestran que la diversidad de la comunidad microbiana es afectada por factores bióticos y abióticos como pH y contenido de sales (Antranikian et al. 2017).

Los parámetros de diversidad alfa de la población de bacterias en la HRP son altos comparados con los reportes en otros tipos de sedimentos (Embarcadero et al. 2016, Fernández et al. 2016, Black et al. 2017) estas diferencias pudieran estar relacionadas con las condiciones en los sedimentos de la HRP como la composición de la materia orgánica.

En las muestras analizadas se encontró correlación negativa entre diversidad filogenética (PD) con los factores pH y CE, esto podría indicar que los sedimentos son un hábitat altamente selectivo y las bacterias presentes en los sedimentos son filogenéticamente cercanos (Crépeau et al. 2011; Prieto-Barajas et al. 2018). La baja diversidad en los puntos HRP07 y HRP09 esta relacionado con el alto contenido de Cd, As, Na, y Mg. La correlación negativa entre las OTUs observados y el contenido de Mg y Na puede deberse a efectos tóxicos de estos elementos; se ha demostrado que el Cd provoca estrés oxidativo (Giller et al. 1998) y el alto contenido de Na provoca estrés osmótico (Chaudhary et al. 2016) por lo que estos elementos pueden disminuir la diversidad microbiana.

Las bacterias de los phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria y Firmicutes son los grupos dominantes en los sedimentos de la HRP, estos organismos se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tipos de sedimentos (Baatar et al. 2016; Wang et al. 2016; Black et al. 2017), estos grupos de bacterias participan en los diferentes ciclos biogeoquímicos por lo que son importantes para el flujo de nutrientes en este hábitat (Comte et al. 2017; Hussein et al. 2017; Wu et al. 2017). Las Cyanobacterias, son principalmente organismos fototrofos oxigénicas además fijan nitrógeno molecular, por lo tanto este grupo puede apartar materia orgánica a los sedimentos (Fernández et al. 2016, Delmont et al. 2018, Valdespino-Castillo et al. 2018). Las bacterias de los phyla Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes ambientes (Fierer et al. 2007; Shvrlata and Satyanarayana 2015), estos son heterótrofos, participan en la degradación de materia orgánica (Sorokin et al. 2014; Fernández et al. 2016; Liu et al. 2015). Las bacterias de la clase Deltaproteobacterias y del phylum Firmicutes participan en el ciclo del azufre, estos organismos pueden reducir el azufre en condiciones de microaerofilia (Liu et al. 2003, Wu et al. 2008, Fichtel et al. 2012, Sorokin et al. 2014). Se ha reportado que las bacterias de los phyla Planctomycetes, Proteobacteria y Cyanobacteria pueden fijar nitrógeno en ambientes marinos (Alcántara-Hernández et al. 2017; Delmont et al. 2018); se ha reportado que Planctomycetes son abundantes en sedimentos de lagos y menos abundante en aguas marinas (Pizzetti et al. 2011; Wang et al. 2016) .

Se ha reportado previamente que bacterias de los phyla Proteobacteria y Actinobacteria se asocian para la formación de tapetes microbianos en sedimentos; las Proteobacteria excretan exopolisacárido y las Actinobacteria ayudan a estabilizar las colonias de bacterias (Schubotz et al. 2013; Fernández et al. 2016; Valdespino-Castillo et al. 2018), probablemente la correlación positiva de estos grupos microbianos en los sedimentos de la HRP pueda estar relacionado con la formación de tapetes microbianos. La correlación positiva entre Planctomycetes, Verrucomicrobia y Bacteroidetes se ha reportado previamente que forman asociaciones en agua dulce, marina y suelos, sin embargo se requieren más estudios para determinar la causa de estas asociaciones (van Niftrik y Devos 2017).

Las Actinobacterias tuvieron correlación negativa con el contenido de Mg, se ha reportado previamente que son sensibles a altas concentraciones de iones como Mg, Ca y Al (Navarrete et al. 2015). Los filotipos pertenecientes a Planctomycetes, Verrucomicrobia y TM7 fueron abundantes en las muestras de sedimento con alto contenido de Mg, esta correlación positiva puede ser porque estos organismos pueden usar el Mg como cofactor y acumular este elemento formando gránulos metacromáticos (Valdespino-Castillo et al. 2018). La relación positiva entre Firmicutes, OP1 y Spirochaetes con el contenido de arena, es debido a que la arena puede hacer que los sedimentos se compacten menos y permita el flujo de oxígeno y nutrientes (Fang et al. 2017).

Las bacterias de los géneros *Euzebya*, *Halomonas*, *KSA1* y *Planctomyces* fueron abundantes en las muestras analizadas, estos organismos han sido reportados en diferentes cuerpos de agua y ambientes salinos. *Planctomyces* es comúnmente reportado en agua dulce asociado a macroalgas (Bondoso et al. 2017), la elevada abundancia de *Planctomyces* en las muestras de la HRP contrasta con reportes previos que señalan que es sensible a alto contenido de sales (Zhong et al. 2016). El genero *KSA1* (familia Balneolaceae) se ha reportado en ambientes salino-alcalinos (Xie et al. 2018). *Halomonas* es descrito como un género de bacterias halófilas, esto coincide con los resultados obtenidos ya que es un género abundante en las muestras con alto contenido de Na (Kindzierski et al. 2017). Se ha reportado que algunas especies de *Euzebya* toleran alto contenido de sales (15 % NaCl) (Kurahashi et al. 2010).

A pesar de que la caracterización de los sedimentos de la HRP fue exhaustiva, el algoritmo de Random Forest explica muy poco la variabilidad de algunos grupos de bacterias con base en las características medidas; lo cual indica que probablemente la variación en la población de bacterias es determinada por otros factores como interacción entre los grupos microbianos o degradación de materia orgánica (Fernández et al 2016; Mahmoudi et al. 2017). La composición y distribución de la materia orgánica en los sedimentos es variable, esté parámetro no se determinó y pudiera ser un factor importante para determinar la distribución de la bacterias presentes en los sedimentos, además el drenaje del lago ha sido gradual lo que pudo

provocar que los sedimentos estuvieran expuestos a ciclos de hidratación y deshidratación.

6.3 Estructura de la población de arqueas en los sedimentos de la HRP.

Los parámetros de alpha diversidad de la comunidad de arqueas en nuestras muestras fueron similares a los reportados en otros ambientes que tuvieron CE con rangos de 9.0 a 157.2 dS cm⁻¹ (Navarro-Noya et al. 2015) y sedimentos con alto contenido de metales (Compte-Port et al. 2018).

Los puntos HRP07 y HRP13 tienen diversidad filogenética (PD) menor que el resto de los puntos de colecta, lo cual puede deberse al alto contenido de metales pesados en esos puntos de colecta (Wani et al. 2015). La PD tiene correlación negativa con el contenido de Co, Cr y Pb, particularmente se ha demostrado que la presencia de Pb y Cd disminuye drásticamente la abundancia de arqueas metanogénicas en sedimentos de lagos (Compte-Port et al. 2018).

En las muestras colectadas de la HRP los filas abundantes son Thaumarchaeota y Euryarchaeota, estos están ampliamente distribuidos en ambientes salinos ya que tienen tolerancia a alto contenido de sales (Oren 2014). El phylum Crenarchaeota se encuentra en baja abundancia en las muestras colectadas a pesar de que este phylum ha sido frecuentemente reportado en diferentes tipos de sedimentos como estuarios y marinos (Abreu et al. 2001; Durbin y Teske 2012); posiblemente la baja abundancia de este phylum se deba al contacto con el oxígeno en los sedimentos secos de la HRP ya que se ha determinado que se favorece su desarrollo en bajas tensiones de oxígeno (Kubo et al. 2012).

Los organismos pertenecientes a las clases Crenarchaeales y Halobacteriales han sido reportados en sedimentos marinos, lo que explica su alta abundancia relativa en el sedimento salino- alcalino del ex lago de la HRP (Fan and Xing, 2016). Se encontró alta abundancia de organismos de la clase de Thermoplasmata este es un resultado interesante, estos organismos han sido descritos como arqueas termoacidófilicas

(Kambura et al. 2016) y ha sido reportado en baja abundancia en ambientes salinos (dC Rubin et al. 2017), explicar la alta abundancia de este grupo requiere mas estudios para describir que cepas de Thermoplasmata se han adaptado a las condiciones de los sedimentos de la HRP.

Los géneros de arqueas abundantes fueron *Candidatus Nitrososphaera*, *Natronococcus* y *Natronomonas* estos parecen estar adaptados a las condiciones salinas de los sedimentos del ex lago de la HRP.

Las arqueas identificadas como *Candidatus Nitrososphaera* han sido descritas como arqueas que oxidan el amonio en sedimentos hipersalinos (Sirisena et al. 2018) y con alto contenido de metales pesados (Spang et al. 2012).

Las arqueas de los géneros *Natronomonas* y *Natronococcus* han sido reportados con alta abundancia en otros sedimentos de ex lagos en México (Navarro-Noya et al. 2015). *Natronococcus roseus* ha sido descrita como arquea haloalcalofílica, está fue aislada de un lago hipersalino (Corral et al. 2013); tiene un crecimiento óptimo a 24 % NaCl (w/v) (Kim et al. 2013).

Se encontró correlación positiva entere algunos grupos de arqueas, Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG) tiene correlación positiva con Methanomicrobia, está correlación positiva puede ser porque ambos son sensibles a oxígeno, por lo tanto se distribuirán en los microambientes con baja tensión de oxígeno, en el caso de la correlación positiva entre Cenarchaeales y Nitrososphaerales puede estar relacionada con la capacidad de ambas de oxidar el amonio (Valdespino-Castillo et al. 2018).

La correlación negativa entre Thermoplasmata y Methanomicrobia pusiera estar relacionada con competencia por nutrientes, sin embargo como se mencionó anteriormente es necesario realizar mas estudios para conocer mas sobre las poblaciones de arqueas en nuestras muestras.

A pesar de que algunos grupos de arqueas tuvieron correlación significativa con factores abióticos de los sedimentos, el algoritmo de random Forest explicó menos del 25 % de la variación en la población de arqueas de los sedimentos de la HRP.

Estos resultados indican que la población de arqueas en los sedimentos de la HRP son menos sensibles que las bacterias a los factores abióticos medidos en el presente trabajo.

6.4 Capacidades metabólicas de las poblaciones microbianas en los sedimentos de la HRP.

Los diferentes procesos geoquímicos permiten el flujo de nutrientes a través del hábitat (Dupraz y Visscher 2005). En las muestras colectadas de la HRP se encontró que la población de bacterias tiene mayor diversidad de capacidades metabólicas que la población de arqueas, esto puede deberse a la gran variedad de metabolismos descritos en bacterias (Sorokin et al. 2014), es importante mencionar que existen mas estudios de poblaciones de bacterias que de arqueas lo cual podría sesgar los resultados.

Se encontró que las principales capacidades metabólicas en nuestras muestras están relacionadas con el ciclo del nitrógeno y azufre, esto coincide con los reportes previos de ambientes volcánicos (Crépeau et al 2011, Fujimura et al. 2015) y ambientes haloalcalinos (Sorokin et al. 2011, 2014).

La oxidación de amonio es la ruta mas importante en nuestras muestras, esta ruta permite el balance del ciclo del nitrógeno, sin embargo de acuerdo con Watanabe et al. 2015 la oxidación de amonio mediado por bacterias es inhibido a pH alcalino debido a que el amonio no se encuentra disponible en ese pH; probablemente en nuestras muestras la comunidad microbiana tiene la capacidad de oxidar el amonio, puede ser que el proceso ocurra en los microecosistemas formados en los diferentes estrados de los sedimentos de la HRP (Alcántara-Hernández et al 2017; El-Sayed et al. 2018). La fijación de nitrógeno en nuestras muestras puede estar inhibida, debido a que las bacterias fijadoras de nitrógeno son sensibles a desecación (Alcántara-Hernández et al. 2017)

7. CONCLUSIONES

- Los sedimentos de La Hoya del Rincón de Parangueo tienen pH alcalino aproximadamente de 10, alta conductividad electrolítica y alto contenido de sodio.
- Los sedimentos de la HRP pudieran ser reservorio organismos no descritos de arqueas y bacterias, por ejemplo Thermoplasmata.
- Las características fisicoquímicas determinadas en los sedimentos de la HRP explican poco de la variación de las poblaciones microbianas.
- Las principales rutas metabólicas en los sedimentos de la HRP son aquellas involucradas en los ciclos del nitrógeno y azufre.

8. REFERENCIAS.

- Abreu C, Jurgens G, De Marco P, Saano A, Bordalo AA (2001) Crenarchaeota and euryarchaeota in temperate estuarine sediments. *J Appl Microbiol* 90:713-718
- Alcántara-Hernández RJ, Valdespino-Castillo PM, Centeno CM, Alcocer J, Merino-Ibarra M, Falcón LI (2017) Genetic diversity associated with N-cycle pathways in microbialites from Lake Alchichica, Mexico. *Aquat Microb Ecol* 78:121-133
- Anderson MJ, Willis TJ (2003) Canonical analysis of principal coordinates: A useful method of constrained ordination for ecology *Ecology*, 84: 511-525
- Andrew DR, Fitak RR, Munguia-Vega A, Racolta A, Martinson VG, Dontsova K(2012) Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran desert soils. DOI 10.1128/AEM.01459-12.
- Antranikian G, et al. (2017) Diversity of Bacteria and Archaea from two shallow marine hydrothermal vents from Vulcano Island. *Extremophiles* 21:733-742
- Aranda-Gómez JJ, Levresse G, Pacheco-Martínez, J, Ramos-Leal JA, Carraco-Nuñez G, Chacón-Baca E, González-Naranjo G, Chávez-Cabello G, Vega-González M, Origel G, Noyola-Medrano C. (2013) Active sinking at the bottom of the Rincón de Parangueo Maar (Guanajuato, México) and its probable relation with subsidence faults at Salamanca and Celaya. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 65 (1), 169-188.
- Armienta MA, Vilaclara G, De la Cruz-Reyna S, Ramos S, Cenicerros N, Cruz O, Aguayo A, Arcega-Cabrera F. (2008) Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2008.06.019>.
- Arndt D, Xia J, Liu Y, Zhou Y, Gou AC, Sineelnikov I, Budwill K, Nesbø CL, Wishart DS (2012) METAGENassist: A comprehensive web server for comparative metagenomics. *Nucleic Acids Res* 40:W88-W95
- Baatar B, Chiang PW, Rogozin DY, Wu YT, Tseng CH, Yang CY, Chiu HH, Oyuntsetseg B, Degermendzhy AG, Tang SL (2016) Bacterial communities of three saline meromictic lakes in Central Asia. *PLoS ONE* 11:e0150847
- Black EM, Chimenti MS, Just CL (2017) Effect of freshwater mussels on the vertical

distribution of anaerobic ammonia oxidizers and other nitrogen transforming microorganisms in upper Mississippi river sediment. doi:10.7717/peerj.3536.

Bondoso J, Godoy-Vitorino F, Balagué V, Gasol JM, Harder J, Lage OM (2017) Epiphytic Planctomycetes communities associated with three main groups of macroalgae. *FEMS Microbiol Ecol* 93:fiw255

Breiman L, Cutler A, (Fortran original) Liaw A, Wiener M (R port) (2018) Breiman and Cutler's Random forests for classification and regression. Package 'randomForest'. Version: 4.6-14

Bremner JM (1996) Nitrogen-Total. In: Sparks DL (ed) *Methods of soil analysis: Chemical methods Part 3*. ASA, SSSA Madison, WI, pp 1085-1122

Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, Desantis TZ, Andersen GL, Knight R (2010a) PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26:266-267

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon Ji, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335-336

Cassel DK, Nielsen DR (1986) Field capacity and available water capacity. In: Klute A, Campbell GS, Jackson RD, Mortland MM, Nielsen DR (eds) *Methods of soil analysis. Part 1. Physical, mineralogical methods*. ASA, SSSA, Madison, WI, pp 901-924.

Ceja-Navarro JA, Rivera-Orduña FN, Patiño-Zúñiga L, Villa-Sanjurjo A, Crossa J, Govaerts B, Dendooven L (2010) Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 76:3685-3691

Chaudhary DR, Rathore AP, Jha B (2016) Effects of seawater irrigation on soil microbial community structure and physiological function. *Int J Environ Sci Technol* 13:2199-2208

- Coman C, et al. (2015) Structure, mineralogy, and microbial diversity of geothermal spring microbialites associated with a deep oil drilling in Romania doi: 10.3389/fmicb.2015.00253
- Compte-Port S, Borrego CM, Moussard H, Jeanbille M, Restrepo-Ortiz CX, de Diego A, Rodriguez-Iruretagoiena A, Gredilla A, Fdez-Ortiz de Vallejuelo S, Galand PE, Kalenitchenko D, Rols JL, Pokrovsky OS, Gonzalez AG, Camarero L, Muñiz S, Navarro- Navarro E, Auguet JC (2018) Metal contaminations impact archaeal community composition, abundance and function in remote alpine lakes. *Environ Microbiol* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14252>
- Comte J, Berga M, Severin I, Logue JB, Lindström ES (2017) Contribution of different bacterial dispersal sources to lakes: Population and community effects in different seasons. *Environ Microbiol* 19:2391-2404
- Corral P, Gutiérrez MC, Castillo AM, Dominguez M, Lopalco P, Corcelli A, Ventosa A (2013) *Natronococcus roseus* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:104-108
- Crépeau V, Cambon Bonavita M, Lesongeur F, Randrianalivelo H, Sarradin P, Sarrazin J, Godfroy A (2011) Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiology Ecology*, 76: 524-540
- Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, Pace NR (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied Environ Microbiol* 64(10):3869-3977
- dC Rubin SS, Marín I, Gómez MJ, Morales EA, Zekker I, San Martín-Uriz P, Rodríguez N, Amils R (2017) Prokaryotic diversity and community composition in the Salar de Uyuni, a large scale, chaotopic salt flat. *Environ Microbiol* 19:3745-3754
- Delmont TO, Quince C, Shaiber A, Esen OC, Lee STM, Rappé MS, McLellan SI, Lüscher S, Eren AM (2018) Nitrogen-fixing populations of Planctomycetes and Proteobacteria are abundant in surface ocean metagenomes. *Nature Microbiology* 3:804–813
- Dupraz C y Visscher PT (2005) Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends Microbiol.* 13: 429–438.

- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- El-Sayed WS, Al-Senani SR, Elbahloul Y (2018) Diversity of dehalorespiring bacteria and selective enrichment of aryl halides-dechlorinating consortium from sedimentary environment near an oil refinery. *J Taibah Univ Sci* 12:711-722
- Embarcadero S, Rivera F.N, Wang, En. (2015). Bacterial communities estimated by pyrosequencing in the soils of chinampa, a traditional sustainable agro-ecosystem in Mexico. *Journal of Soils and Sediments*. 16. . 10.1007/s11368-015-1277-1.
- Escolero FOA, Alcocer DJ (2004) Desecación de los lagos cráter del Valle de Santiago, Guanajuato. In: Jiménez, B., Marín, L.E. (Eds.), *El Agua en México Vista desde la Academia*. Academia Mexicana de Ciencias, México, D.F., pp. 99–115.
- Fan X, Xing P (2016) The vertical distribution of sediment archaeal community in the “Black Bloom” disturbing Zhushan bay of lake Taihu. *Archaea*
- Fang H, Chen Y, Huang L, He G (2017) Analysis of biofilm bacterial communities under different shear stresses using size-fractionated sediment. *Sci Rep* 7:1299
- Fernández AB, Rasuk MC, Visscher PT, Contreras M, Novoa F, Poire DG, Patterson MM, Ventosa A, Farias ME (2016) Microbial diversity in sediment ecosystems (evaporites domes, microbial mats, and crusts) of hypersaline laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Front Microbiol* 7:1284
- Ferrari L, Lopez-Martinez M, Aguirre-Díaz G, Carrasco-Núñez G (1999) Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: From the Sierra Madre Occidental to the Mexican volcanic belt: *Geology* 27:303 – 306.
- Fichtel K, Mathes F, Könneke M, Cypionka H, Engelen B (2012) Isolation of sulfate reducing bacteria from sediments above the deep-subseafloor aquifer. *Front Microbiol* . 3: 65
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364. +
- Fillol M, Sánchez-Melsió A, Gich F, Borrego C. 2015. Diversity of Miscellaneous Crenarchaeotic Group archaea in freshwater karstic lakes and their segregation between planktonic and sediment habitats, *FEMS Microbiology Ecology*. 91(4)

- Fujimura R, Kim SW, Sato Y,I, Oshima K, Hattori M, Kamijo T, Ohta H. 2016. Unique pioneer microbial communities exposed to volcanic sulfur dioxide. *Scientific Reports* 6, 1-9.
- Gee GW, Bauder JW (1986) Particle size analysis. In Klute A (ed) *Methods of soil analysis, Part 1: Physical and mineralogical Methods*, ASA, SSSA, Madison, WI, pp 383-411
- Gilbert JA, Field D, Swift P, Newbold L, Oliver A, Smyth T, Somerfield PJ, Huse S, Joint I (2009) The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environ Microbiol* 11:3132-3139
- Giller KE, Witter E, Mcgrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol Biochem* 30:1389-1414
- Harrell Jr FE, with contributions from Charles Dupont and many others. 2016. Hmisc: Harrell miscellaneous. R package version 4.0-2. Available at <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
- Hofman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57:267-272.
- Hug LA, et al. (2013) Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. doi: 10.1186/2049-2618-1-22.
- Hussein EI, Jacob JH, Shakhathreh MAK, Abd Al-razaq MA, Juhmani AF, Cornelison CT (2017) Exploring the microbial diversity in Jordanian hot springs by comparative metagenomic analysis. *Microbiol Open* 6:e00521
- Kambura AK, Mwirichia RK, Kasili RW, Karanja EN, Makonde HM, Boga HI (2016) Bacteria and Archaea diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya. *BMC microbiology*, 16(1), 136.
- Kienel U, Wulf-Bowen S, Byrne R, Park J, Böhnelt H, Dulski P, Luhr J, Siebert L, Haug G., Negendank JFW 2009. First lacustrine varve chronologies from Mexico: impact of droughts, ENSO and human activity since AD 1840 as recorded in maar sediments

- from Valle de Santiago. *J. Paleolimnol.* 42, 587-609.
- Kim TY, Kim SJ, Park SJ, Kim JG, Cha IT, Jung MY, Lee SA, Roh SW, Yim KJ, Itoh T, Rhee SK (2013) *Natronomonas gomsonensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *A Van Leeuw J Microb* 10:627-635
- Kindzierski V, Raschke S, Knabe N, Siedler F, Scheffer B, Pflüger-Grau K, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Marin-Sanguino A, Kunte HJ (2017) Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: A case study for integrative systems biology. *PLoS ONE* 12:e0168818
- Kolde KR (2015) Maintainer Raivo, Package 'pheatmap', Version: 1.0.8
- Kubo K, Lloyd KG, F Biddle J, Amann R, Teske A, Knittel K (2012) Archaea of the miscellaneous crenarchaeotal group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *ISME J* 6:1949-1965
- Lehmann MF, et al. (2002) Preservation of organic matter and alteration of its carbon and nitrogen isotope composition during simulated and in situ early sedimentary diagenesis. doi: 10.1016/S0016-7037(02)00968-7.
- Liu X, Bagwell CE, Wu L, Devol AH, Zhou J (2003) Molecular diversity of sulfate-reducing bacteria from two different continental margin habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6073–6081.
- Lorenz V (1986) On the growth of the maars and diatremes and its relevance to the formation of tuff rings. *Bulletin of Volcanology.* 48:265-274.
- Mahmoudi N, Beaupré SR, Steen AD, Pearson A (2017) Sequential bioavailability of sedimentary organic matter to heterotrophic bacteria. *Environ Microbiol.* 19:2629-2644
- Murphy GP (1986) The chronology, pyroclastic stratigraphy and petrology of the Valle de Santiago Maar Field. Central Mexico. University of California, Berkeley, p 55
- Navarrete AA, Venturini AM, Meyer KM Klein AM, Tiedje JM, Bohannon BJ, Nüsslein K, Tsai SM, Rodrigues JL (2015) Differential response of Acidobacteria subgroups to forest- to-pasture conversion and their biogeographic patterns in the western Brazilian Amazon. *Front Microbiol* 6:1443
- Navarro-Noya YE, Valenzuela-Encinas C, Sandoval-Yuriar A, Jiménez-Bueno NG, Marsch

- R, Dendooven L (2015) Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil. *Archaea*
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H (2017) Vegan package in R. Community Ecology Package. Version: 2.4-3
- Oren A (2014) Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles* 18:825-834
- Pasquaré G, Garduño V, Tibaldi A, Ferrari M (1988) Stress pattern evolution in the central sector of the Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics* 146:353–364.
- Pizzetti I, Fuchs BM, Gerdt G, Wichels A, Wiltshire KH, Amann R (2011) Temporal variability of coastal Planctomycetes clades at Kabeltonne station, North Sea. *Appl Environ Microbiol* 77:5009-5017
- Prieto-Barajas CM, Valencia-Centeno E, Santoyo G. (2018) Microbial mats ecosystems: Structure types, functional diversity and biotechnological application. *Electronic Journal of Biotechnology*. 31: 48-56
- Rhoades JD, Manteghi NA, Shouse PJ, Alves WJ (1989) Estimating soil salinity from saturated soil-paste electrical conductivity. *Soil Sci Soc Am J* 53:428-433
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, USA
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, USA
- Schubotz F, Meyer-Dombard DR, Bradley AS, Fredricks HF, Hinrichs KU, Shock EL, Summons RE (2013) Spatial and temporal variability of biomarkers and microbial diversity reveal metabolic and community flexibility in streamer biofilm communities in the Lower Geyser Basin, Yellowstone National Park. *Geobiology* 11:549-569
- Shivlata, L., Satyanarayana T., (2015) Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1014. doi: [10.3389/fmicb.2015.01014]

- Sirisena, K. A. et al. (2018) 'Microbial Diversity of Hypersaline Sediments from Lake Lucero Playa in White Sands National Monument, New Mexico, USA', *Microbial Ecology*. doi: 10.1007/s00248-018-1142-z
- Sorokin DY, Berben T, Melton ED, Overmars L, Vavourakis CD, Muyzer G (2014) Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* 18:791-809
- Sorokin DY, Kuenen JG, Muyzer G (2011) The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. *Front Microbiol.* 2:44
- Spang, A. et al. (2012) 'The genome of the ammonia-oxidizing candidatus nitrososphaera gargensis: Insights into metabolic versatility and environmental adaptations', *Environmental Microbiology*, 14(12), p. 3122-3145. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02893.x.
- Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, et al. (2015) Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* 348(6237):1261359
- Thomas GW (1996) Soil pH and soil acidity. In: Sparks DK (ed) *Methods of soil analysis: chemical methods. Part 3.* ASA, SSSA, Madison, WI, pp 475-490
- USEPA (1996) "Method 3050B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils" Revision 2. Washington, DC.
- Valdespino-Castillo PM, Hu P, Merino-Ibarra M, López-Gómez LM, Cerqueda-García D, González-De Zayas R, Pi-Puig T, Lestayo JA, Holman HY, Falcón LI (2018) Exploring biogeochemistry and microbial diversity of extant microbialites in Mexico and Cuba. *Front Microbiol* 9:510
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández RJ, Enríquez-Aragón JA, Estrada-Alvarado I, Hernández-Rodríguez C, Dendooven L, Marsch R (2008) Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles* 12:247-254
- van Niftrik, L. and Devos, D. P. (2017) 'Editorial: Planctomycetes-verrucomicrobia-chlamydiae bacterial superphylum: New model organisms for evolutionary cell biology', *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2017.01458

- Vuillemin A, et al. (2019) Archaea dominate oxic subseafloor communities over millimillennium time scales. doi 10.1126/sciadv.aaw4108
- Vuillemin A, Ariztegui D (2013) Geomicrobiological investigations in subsaline maar lake sediments over the last 1500 years. *Quat Sci Rev* 71:119-130
- Vuillemin A, Ariztegui D, Lücke A, Mayr C, the PASADO Science Team (2014) Paleoenvironmental conditions define current sustainability of microbial populations in Laguna Potrok Aike sediments, Argentina. *Aquatic Sciences* 76, 101-114
- Wang H, Gilbert JA, Zhu Y, Yang X (2018) Salinity is a key factor driving the nitrogen cycling in the mangrove sediment *Sci Total Environ.* 631:1342-1349
- Wang NF, Zhang T, Yang X, Wang S, Yu Y, Dong LL, Guo YD, Ma YX, Zang JY (2016) Diversity and composition of bacterial community in soils and lake sediments from an arctic lake area. *Front Microbiol* 7:1170
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5261-5267 DOI 10.1128/AEM.00062-07.
- Wani AL, Ara A, Usmani JA (2015) Lead toxicity: A review. *Interdiscip Toxicol* 8:55-64
- Watanabe, Y. et al. (2015) 'Response of the ammonia oxidation activity of microorganisms in surface sediment to a controlled sub-seabed release of CO₂ doi: 10.1016/J.IJGGC.2014.11.013.
- Wu H, Li Y, Zhang J, Niu L, Zhang W, Cai W, Zhu X (2017) Sediment bacterial communities in a eutrophic lake influenced by multiple inflow-rivers. *Environ Sci Pollut Res* 24:19795-19806
- Wu L, Kellogg L, Devol AH, Tiedje JM, Zhou J (2008) Microarray-based characterization of microbial community functional structure and heterogeneity in marine sediments from the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 74:4516–4529
- Xie K, Deng Y, Zhang X, Wang X, Kang G, Bai L, Huang H (2018) Biases in Prokaryotic community amplicon sequencing affected by DNA extraction methods in both saline and non-saline soil. *Front Microbiol* 9:1796

Zhong ZP, Liu Y, Miao LL, Wang F, Chu LM, Wang JL, Liu ZP (2016)
Prokaryotic community structure driven by salinity and ionic concentrations in plateau
lakes of the Tibetan plateau. *Appl Environ Microbiol* 82:1846-1858

ANEXO I

Soluciones para extracción de DNA

➤ **Solución de pirofosfato de sodio 2L**

Pesar 133.76 g de pirofosfato de sodio y disolver en 1 600 mL de agua destilada previamente calentada a 60 °C, cuando esté disuelto completamente el pirofosfato se deja enfriar y se afora a 2 000 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

➤ **Solución de buffer de fosfatos pH 8**

Solución I :

Pesar 71.6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ disolver con agua destilada y aforar a 1 000 mL .

Solución II :

Pesar 5.92 g de NaH_2PO_4 anhidro se disuelve en agua destilada y se afora a 250 mL.

Mezclar 948 mL de la Solución I con 52 mL de la Solución II, mezclar y verificar el pH 8 y ajustar a 2 000 mL.

*Esterilizar con calor húmedo

➤ **Soluciones de lisis del protocolo de Valenzuela-Encinas et al. 2008.**

Solución de Lisis I 250 mL

Pesar 2.1 de NaCl y agregar 50 mL de EDTA 0.5 M pH 8 disolver y aforar a 250 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO 4:
Solución

Solución de Lisis II 250 mL

Pesar 1.46 g de NaCl y disolver en 125 mL de tris HCl 1M. Pesar 30 g de SDS y disolver en la solución ajustar el pH 8 y aforar a 250 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

➤ **Solución de lisis método Hoffman y Winston 1987**

Preparar 250 mL de solución. Pesar 2.5 g de SDS (1 % w/v), por separado medir 5 mL de tritón X- 100 (v/v), mezclar con una solución de 10 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM de NaCl, y 1 mM de EDTA. Mezclar suavemente hasta quedar disuelto.

*Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 µm. Almacenar a temperatura ambiente.

➤ **Soluciones de lisis para el protocolo Sambrook y Rusel 2001.**

Buffer de lisozima EDTA 0.25 M pH 8 200 mL.

Medir 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8 y llevar a un volumen de 200 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

Lisozima 10 mg mL⁻¹ prepara 10 mL

Pesar 100 mg de lisozima y disolver en Tris-Cl 10 mM pH 8 (100 µL) con 9.9 mL de agua destilada, disolver suavemente evitando la formación de espuma.

*Esterilizar por filtración con membrana y almacenar a 4°C.

Solución de SDS al 10% 250 mL

Pesar 25 g de SDS y disolver en agua destilada y aforar a 250 mL.

*Esterilizar por calor húmedo:

➤ **Soluciones para purificar**

Acetato de potasio 5 M 100 mL

Pesar 29.4 g de acetato de potasio y disolver en 60 mL de agua destilada. Adicionar 11.5 mL de ácido acético glacial y aforar a 100 mL con agua destilada.

*almacenar a temperatura ambiente. [L] [SEP]

Solución de EDTA 0.5M pH 8 1000 mL

Pesar 186.1 g de EDTA *2H₂O sal disódica, adicionar 800 mL de agua destilada disolver.; ajustar a pH 8 con NaOH. [L] [SEP] Aforar a 1L con agua destilada. [L] [SEP]

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

Cloroformo alcohol isoamílico (24:1) 100 mL

Añadir 96 mL de cloroformo a 4 mL de alcohol isoamílico. Tener la precaución de que el frasco este completamente seco. Almacenar la solución a 4 °C .

Solución de Polientilenglicol (PEG) 13% 250 mL

Pesar 23.4 g de NaCl y disolver en 200 mL de H₂O destilada, agregar 32.5 g de PEG y aforar a 250 mL. [L] [SEP]

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO I

Permiso de colecta



DESPACHO DE LA DIRECCIÓN GENERAL
Oficio No. IEE-DG-473/17

Asunto: Permiso para proyecto de investigación en ANP
Guanajuato, Gto., 06 de octubre de 2017

DR. ELOY CONDE BARAJAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA
DR. LUC DENDOOVEN V.
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
CINVESTAV IPN MÉXICO
P R E S E N T E

En respuesta a su solicitud para la obtención de permiso, recibido con fecha del 19 de septiembre y entregando información complementaria el 26 de septiembre, para la realización del proyecto de investigación denominado "Biogeografía microbiana del suelo salino del cráter del Rincón de Parangueo, Guanajuato", en el Área Natural Protegida (ANP) "Región Volcánica Siete Luminarias", a realizar el 10 de octubre del presente año, considerando que en el proyecto ejecutivo se indica lo siguiente:

I. Datos generales.

Nombre del promovente:

Dr. Eloy Conde Barajas, Departamento de Ingeniería Ambiental del Instituto Tecnológico de Celaya, Gto. Tel: 01 (461) 611 75 75 Ext: 8 y (461) 200 81 52, correo: eloy.conde@itcelaya.edu.mx

Dr. Luc Dendooven V., Departamento de Biotecnología del CINVESTAV IPN MÉXICO, correo: dendooven@me.com

II. Curriculum vitae

Anexa curriculum vitae de los promotores

a) Denominación del proyecto:

"Biogeografía microbiana del suelo salino del cráter del Rincón de Parangueo, Guanajuato".
TNM-Instituto Tecnológico en Celaya, Depto. De Ing. Ambiental y Posgrado de Ing. Bioquímica.

b) Responsables y colaboradores:

Responsables

- Dr. Eloy Conde Barajas
Departamento de ingeniería Ambiental. ITCelaya
- Dr. Luc Dendooven V.
Departamento de Biotecnología. CINVESTAV IPN MÉXICO.

Calle Poza Rica No. 402 A, Col. Bellavista, Salamanca, Gto. C.P. 36730. Tel: (473) 735 26 00
ecologia.guanajuato.gob.mx



The microbial community in an alkaline saline sediment of a former maar lake bed

Claudia L. Ibarra-Sánchez¹ · Laurette Prince¹ · José L. Aguirre-Noyola¹ · Karla E. Sánchez-Cerda¹ · Yendi E. Navaro-Noya² · Marco Luna-Guido¹ · Eloy Conde-Barajas² · Luc Dendooven¹ · Elizabeth Selene Gomez-Acata³

Received: 19 December 2018 / Accepted: 1 June 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose The “Hoya del Rincón de Parangueo (HRP)” is a maar that contained a perennial alkaline lake that drained in the 1980s so that a sediment with high pH and extreme salinity remained. The aim of this work was to determine how the bacterial and archaeal community was controlled by these extreme conditions.

Materials and methods Sediment samples were collected from the 0–20-cm layer along a crater-wide transect. Physicochemical characteristics and the archaeal and bacterial community were determined by analysis of the 16S rRNA through Illumina sequencing. **Results and discussion** The sediment samples had a pH 10 and an electrolytic conductivity (EC) that ranged from 29.8 to 74.4 dS m⁻¹. Three archaeal and 37 bacterial phyla were detected with Euryarchaeota (relative abundance 62.7 ± 17.6%) dominating the Archaea, and Proteobacteria (28.2 ± 10.7%) and Actinobacteria (21.1 ± 6.4%) the Bacteria. The most abundant archaeal genus was *Candidatus Nitrososphaera* while *Euzebya*, *Halomonas*, *KSA1* and *Planctomycetes* dominated the bacterial gene. Thaumarchaeota were enriched in sediment samples with a higher Pb content and Euryarchaeota in sediment with a higher Mg content, while Crenarchaeota and *Candidatus Nitrososphaera* were enriched in sediment with a higher sand, total N and organic C content. Proteobacteria were enriched in sediment with a higher organic C and total N, Si and sand content, while Bacteroidetes and Planctomycetes in sediment with a higher water holding capacity and clay and Mg content. Members of *KSA1* and *Euzebya* were enriched in sediment with a lower EC, organic C and total N content. Although a large number of bacterial and archaeal groups were correlated significantly with a range of sediment characteristics, the sediment characteristics explained the variation of only two bacterial groups > 50% (*TM6* and *Desulfonatronospira*) using the machine learning tool randomForest and none of the archaeal groups. Archaeal and bacterial functional guilds were dominated by ammonium oxidation and nitrite reduction.

Conclusions Although the different sediment samples were dominated often by similar bacterial and archaeal groups, the measured sediment characteristics explained little of the variation found between the sampling points. The high bacterial and archaeal diversity indicated that the site might be a source of unclassified species and phylotypes with specific metabolic capacities involved in the N and S cycles.

Keywords Alpha diversity · Diversity analysis · Illumina sequencing · Maar · Microbial communities · Transect

Responsible editor: Terrence H. Bell

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11368-019-02371-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Elizabeth Selene Gomez-Acata
mistral_1984@hotmail.com

¹ Laboratory of Soil Ecology, ABACUS, Cinvestav,
07360 México, Mexico

² CONACYT-Tlaxcala Autonomous University,
90000 Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

³ Laboratory of Environmental Biotechnology, TNM-Instituto
Tecnológico en Celaya, 38010 Celaya, Guanajuato, Mexico