

# Diversidad molecular bacteriana en tapetes microbianos de pozas termales de Araró, Michoacán

*Cristina M. Prieto-Barajas, Eduardo Valencia-Cantero y Gustavo Santoyo-Pizano.*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH.

## Resumen

En el presente estudio se analizó la diversidad procariota de los tapetes microbianos de la zona geotermal de Araró, Michoacán. Para ello se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones intergénicas y los genes ribosomales 16S a partir de ADN metagenómico extraído de muestras de dos pozas termales. Se construyó una genoteca de 200 clones de genes ribosomales en la bacteria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y de 39 de ellas se obtuvo la secuencia nucleotídica. El análisis de las regiones intergénicas mostró una escasa diversidad genética. Con respecto a la genoteca de genes ribosomales, se encontró que los principales componentes de los tapetes microbianos lo constituyen los géneros cianobacterianos *Synechococcus* (49%) y *Cyanobium* (5%), así como cianobacterias (26%) y bacterias no cultivadas (20%). Es interesante resaltar que el 46% del total de clones analizadas mostraron homología con bacterias no cultivables. Nuestros resultados sugieren que el género *Synechococcus* predomina dentro de la diversidad procariota encontrada en los tapetes microbianos de las pozas geotermales analizadas. Finalmente, la presencia de secuencias con identidad al género *Cyanobium* podría demostrar un nuevo estilo de vida termófilo para este género.

**Palabras clave:** Diversidad microbiana, cianobacterias, genes ribosomales, poza geotermal.

## Introducción

Los manantiales o pozas geotermales son ecosistemas interesantes por las diversas interacciones y roles ecológicos que juega la diversidad microbiana termófila (Brock, 1978). Estos manantiales contienen usualmente tapetes microbianos, los cuales están constituidos principalmente por arqueas y cianobacterias termófilas, ya que sus temperaturas pueden llegar al punto de ebullición, aunque la mayoría de estos hábitats presentan temperaturas de 50 a 70°C. Las altas temperaturas, así como la presencia de metales pesados, la falta de oxígeno y otros elementos abióticos pueden limitar la sobrevivencia de otros organismos, principalmente eucariotes (Ward et al, 1998).

Desde hace unas décadas se han realizado un gran número de trabajos en los que se analizan la diversidad bacteriana endémica de hábitats termales (Ward et al. 1998). Uno de los sistemas mejor estudiados respecto a su diversidad procariota, lo constituyen los manantiales termales del parque nacional de Yellowstone en Wyoming, EUA. En 1994, Barns y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el cual se analizó la diversidad de arqueas por medio de métodos moleculares, encontrando una diversidad de secuencias inesperadas. Incluso se reportó un grupo filogenético denominado korarqueota, del cual no existen organismos cultivados en laboratorio (Barns et al. 1994). Los manantiales termales han sido estudiados no solo desde el punto de vista ecológico, sino también como reservorios de organismos que produzcan compuestos con bioactividades o con alguna aplicación biotecnológica. De hecho, en 1969 Thomas Brock aisló de un manantial termal de Yellowstone la bacteria *Thermus aquaticus* (Brock y Freeze, 1969), que sintetiza la Taq polimerasa, una enzima ampliamente usada en reacciones de PCR (*Polimerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) y fundamental en el desarrollo de la ingeniería genética.

Sin embargo, los manantiales termales y sus tapetes microbianos contienen también cianobacterias, las cuales son habitantes comunes y productores primarios (Ward et al. 1998). En estos ambientes, las cianobacterias son los microorganismos responsables de las tonalidades verde-amarillentas que visualmente se puede observar (Castenholtz 1973; Hongmei et al, 2005). Recientemente, se analizaron los tapetes microbianos en manantiales termales (con temperaturas entre 50°C-57°C) en Tailandia. Dichos tapetes están constituidos por tres capas; una verde (la más externa), le sigue una capa verde amarillenta y la más profunda de color rojo. Utilizando el método de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (o DGGE) compararon la composición de cada capa del tapete. Sus resultados arrojaron que los principales componentes son miembros de los géneros *Cyanobacteria* y *Chloroflexi*; en la capa verde los miembros dominantes pertenecen al Orden Chroococcales mientras que en la capa de color rojo se encontró que los miembros dominantes están cercanamente relacionados a *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (también del Orden Chroococcales), y por último, el filotipo dominante en la capa verde amarillosa es una bacteria

termofílica, una *Cyanobacteria* no cultivada. Sus resultados confirmaron que existen diferencias claras en la composición de las diferentes capas que constituyen el tapete microbiano y que el papel ecológico que juegan puede ser también muy diferente en cada microecosistema (Portillo *et al*, 2009).

En este sentido, México es uno de los países con mayor presencia de manifestaciones superficiales del calor interno de la Tierra, ya que un gran número de manantiales termales se encuentran por todo el país. En particular, la zona geotérmica de Los Azufres, así como las pozas térmicas de la localidad de Araró, municipio de Zinapécuaro, en Michoacán, son dos sistemas que están siendo estudiados (J. Campos-García, comunicación personal). Algunos autores proponen que las pozas termales de Araró, pueden ser un sistema independiente del de Los Azufres (Viggiano-Guerra *et al*, 2005). Estas dos zonas termales representan una gran oportunidad para descubrir nuevos microorganismos, sus interacciones ecológicas y su potencial biotecnológico. En el presente trabajo analizamos la diversidad procarionta de los tapetes microbianos en dos pozas termales de la localidad de Araró, Michoacán por métodos moleculares.

## Materiales y Métodos

### Descripción geográfica y geoquímica del área de estudio.

La localidad de Araró pertenece al municipio de Zinapécuaro, es una zona geotermal localizada en la porción noreste de Michoacán a unos 40 km al noreste de la capital del estado (Morelia) y a unos 20 km del campo geotérmico de Los Azufres, en el centro de México (Fig. 1.). Sus principales manantiales termales se localizan en el pueblo de Zimirao, cuyas coordenadas son 19°53'54" Latitud Norte y 100°49'50" Longitud Oeste (Viggiano-Guerra *et al*. 2005).



**Figura 1.** Localización de la zona geotermal de Araró en el estado de Michoacán, México.

El tipo geoquímico de las aguas de Araró son sódico-cloruradas (Israde-Alcántara et al. 2002), cuyas concentraciones de cloruro de sodio son en promedio de 2340 partes por millón (ppm) del total de sólidos disueltos, sus aguas también contienen hasta 78 ppm de boro, pero en promedio 55.5 ppm. La presencia de Boro y Litio sugieren un origen hipertermal (Israde-Alcántara et al. 2002). Los manantiales de Zimirao parecen ser los únicos cuyas aguas proceden de las profundidades de toda la zona de Araró, dadas las propiedades físico-químicas. La temperatura puede variar dependiendo de la época; sin embargo se ha observado un promedio de 71 °C para la zona de Zimirao, región donde se analizaron las pozas en este estudio. Al momento de tomar la muestra se observó una temperatura de 65 °C.

### **Toma de las muestras**

Se realizó un muestreo en la zona geotermal de Araró. Se eligieron dos pozas termales con base en el grado de conservación que presentaban (evitando aquellas que estuvieran perturbadas o contaminadas por factores humanos). Las muestras de los tapetes microbianos se sellaron con Parafilm® y aluminio, se conservaron en hielo hasta su transporte al laboratorio y se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento.

### **Extracción del ADN metagenómico y amplificación por PCR**

La extracción del ADN metagenómico de cada poza se llevó a cabo utilizando el kit PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO laboratorios, inc.), siguiendo las sugerencias del proveedor. Se emplearon los oligonucleótidos universales para amplificar los genes 16S ribosomales (Posiciones 8 a 28 y 1526 a 1542 de el 16S rDNA de *Escherichia coli*) de bacterias: fD1 5' CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3' y rD1 5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3' (Weisburg et al. 1991). Para amplificar los espacios intergénicos entre los genes ADNr 16S y 23S de bacterias se usaron los oligos B1055 5' AAT GGC TGT CGT CAG CTC GT 3', y 23SOR 5' TGC CAA GGC ATC CAC CGT 3' (Acinas et al. 1999; Jan-Roblero et al. 2004). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: con los oligos universales: Desnaturalización (95 °C), alineamiento (53 °C) y amplificación (72 °C) por 30 ciclos. Para la amplificación de las regiones intergénicas varió la temperatura de alineamiento (55 °C).

### **Construcción de la genoteca de genes ribosomales**

Los productos de PCR se purificaron usando el kit Wizard® SVGel and PCR Clean-Up System y se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Posterior a la ligación se transformó por el método de calcio en la bacteria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , seleccionándose en cajas LB con X-Gal y ampicilina (40  $\mu$ g/ml). Los plásmidos se extrajeron por lisis alcalina y se purificaron de nuevo con el kit Wizard® SVGel and PCR Clean-Up System. Aquellas clonas que mostraron la clonación del inserto o gen ribosomales se mandaron a secuenciar.

## Secuenciación de clonas

La secuenciación de las muestras se realizó en la Unidad de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en Irapuato, Guanajuato.

## Resultados y Discusión

### Los tapetes microbianos de las pozas de Araró como modelos de estudio

El estudio de los tapetes microbianos tiene gran importancia por la presencia de diversas especies procariotas que pueden jugar diferentes roles ecológicos. Las condiciones físico-químicas del ambiente, tales como las altas temperaturas, la presencia de metales pesados, el exceso de materia orgánica, entre otros factores, limitan la diversidad de organismos eucariotes. Por lo tanto, el estudio comparativo de la diversidad, la ecología, la evolución y aspectos fisiológicos nos ayudan a entender mejor la vida en ambientes extremos (Ward et al. 1998).



**Figura 2.** Fotografías de las pozas termales estudiadas en Araró, Michoacán. a) Poza número 1 y b) poza número 2.

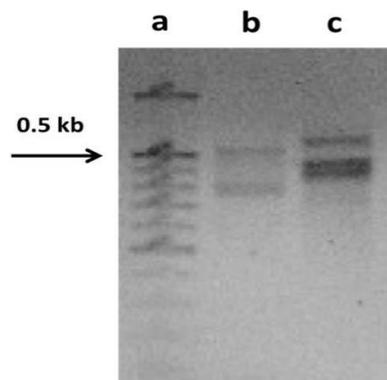
En este trabajo se analizó la diversidad filogenética de la comunidad bacteriana de los tapetes microbianos localizados en dos pozas de la zona geotermal de Araró, Michoacán, México (Figura 1 y 2). Esta región colinda con la zona conocida como Los Azufres, también localizada en el Estado de Michoacán. Sin embargo, datos geoquímicos presentados por Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín (2005), sugieren que el origen de estas dos zonas geotérmicas son independientes y no se encuentran comunicadas. Esto toma relevancia para nuestro estudio ya que otros grupos de investigación están realizando estudios metagenómicos de la zona geotérmica de los Azufres (J. Campos-García, comunicación personal). En

el futuro será interesante realizar un análisis comparativo de estos trabajos de investigación para saber si ambas zonas geotermales contienen diferentes especies microbianas o si estas comparten alguna similitud a nivel del ADN. Los resultados podrían apoyar los datos geoquímicos presentados por Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín (2005), que sugieren un origen independiente de ambas zonas geotérmicas.

### Análisis de las regiones intergénicas

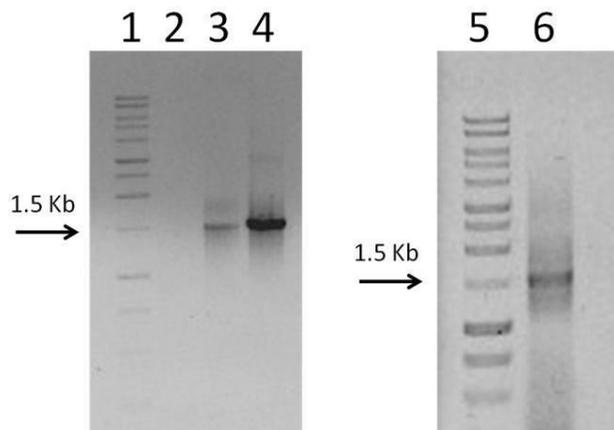
Para determinar de forma preliminar la diversidad microbiana en las pozas termales de Araró, se emplearon oligos que amplifican las regiones intergénicas entre los genes ribosomales 16S y 23S de *E. coli*, posiciones 1055 a 1074 y 21 a 38, respectivamente (Acinas *et al.* 1999). Cabe destacar que estas regiones intergénicas contienen diversos tamaños en las diversas especies bacterianas y de arqueobacterias, por lo que la cantidad de bandas (aproximadamente de 600 a 1500 pares de bases) amplificadas está relacionado con el grado de diversidad en la muestra. En este trabajo se encontraron muy pocas bandas de ADN intergénico amplificado (Figura 3). Sin embargo, los datos sugieren que las pozas 1 y 2 (Fig. 3, a y b) contienen diferentes poblaciones bacterianas, ya que el patrón de bandas es diferente. Lo anterior de alguna manera se esperaba, ya que las condiciones físicas y químicas de las pozas pueden considerarse como extremas para la vida microbiana (Ward *et al.* 1998). Además de que se ha sugerido que unas cuantas especies (decenas) son las formadoras de los tapetes microbianos en diversas pozas termales del mundo (Ferris *et al.*, 1996; Portillo *et al.*, 2009). Sin duda si se compara con otros ambientes como lagos o suelos la diversidad es muy limitada (Jan-Roblero *et al.* 2004; Fierer y Jackson, 2006).

**Figura 3.** Amplificación de las regiones intergénicas entre los genes ribosomales 16S y 23S de eubacterias de las pozas termales. a) Marcador de peso molecular, b) regiones intergénicas del metagenoma de la poza 1 y c) poza 2.



### Análisis de la diversidad bacteriana

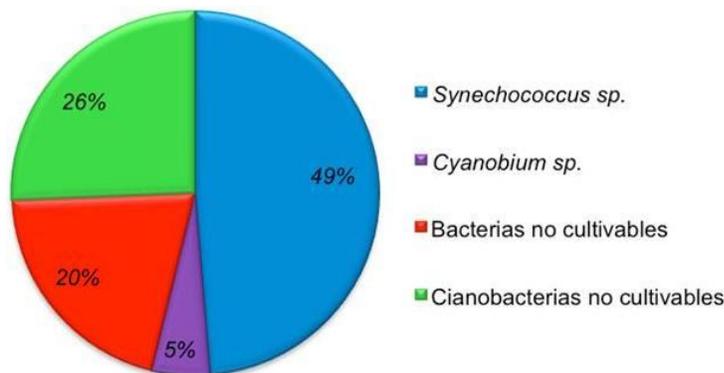
Para conocer la diversidad molecular bacteriana se emplearon los oligos universales fD1 y rD1 (Weisburg *et al.* 1991), amplificando una banda de banda de 1.5 kb aproximadamente, correspondiente al tamaño aproximado de los genes ribosomales 16 de eubacterias (Fig. 4). Una vez que se obtuvieron las secuencias de la genoteca de los productos del PCR,

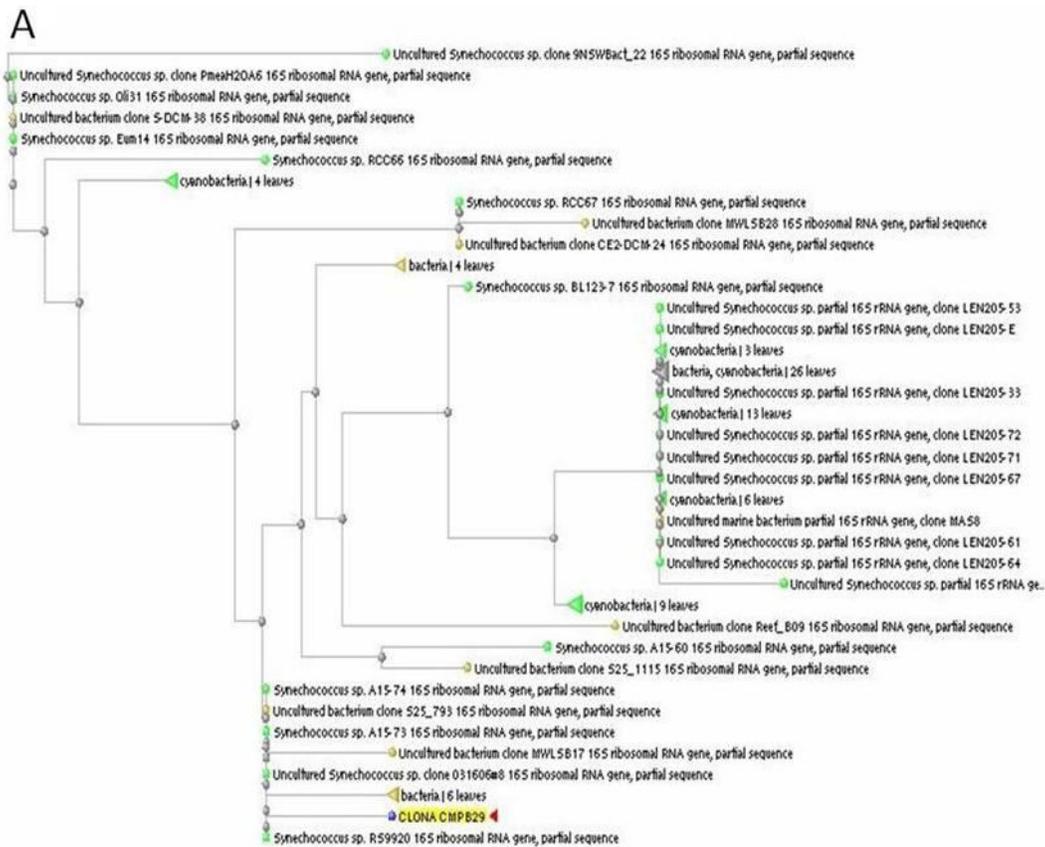


**Figura 4.** Amplificación por PCR de los genes 16S ribosomales de la pozas. Carril 1, Marcador de peso molecular; 2, control negativo; 3, Poza 1; 4, Control positivo con ADN genómico de *E. coli*; 5, Marcador de peso molecular; 6, Poza 2.

los genes ADNr 16S se secuenciaron obteniendo 39 secuencias de buena calidad. Las secuencias analizadas que se reportan en este trabajo mostraron similitudes en los análisis tipo Blast (NCBI) del 98 al 100% de identidad con sus respectivos homólogos en la base de datos. Los resultados muestran que las clonas analizadas muestran que los tapetes microbianos lo constituyen los géneros cianobacterianos; *Synechococcus* (49%) y *Cyanobium* (5%), así como diversas cianobacterias (26%) y bacterias no cultivadas (20%) (Fig. 5). Es interesante resaltar que el 46% del total de clonas analizadas mostraron homología con bacterias no cultivadas. Esto es importante ya que nos demuestra la importancia de emplear técnicas moleculares independientes de cultivo para conocer la diversidad procariota de ecosistemas como los tapetes microbianos (Weisburg et al., 1991; Ward et al., 1998). La figura 6 muestra las relaciones filogenéticas de secuencias 16S ribosomales de la genoteca construida, empleando el método del vecino más cercano (Neighbor joining) donde se unen los OTU's más cercanos. Lo anterior confirma las relaciones de identidad de las secuencias obtenidas en los análisis tipo Blast con géneros como *Synechococcus*, *Cyanobium*, así como diversas cianobacterias y bacterias no cultivadas.

**Figura 5.** Porcentajes de la diversidad procariota encontrados en la genoteca de genes ribosomales 16S amplificados del metagenoma de las pozas de Araró, Michoacán. Los análisis de similitud se basan en búsquedas tipo Blastn en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

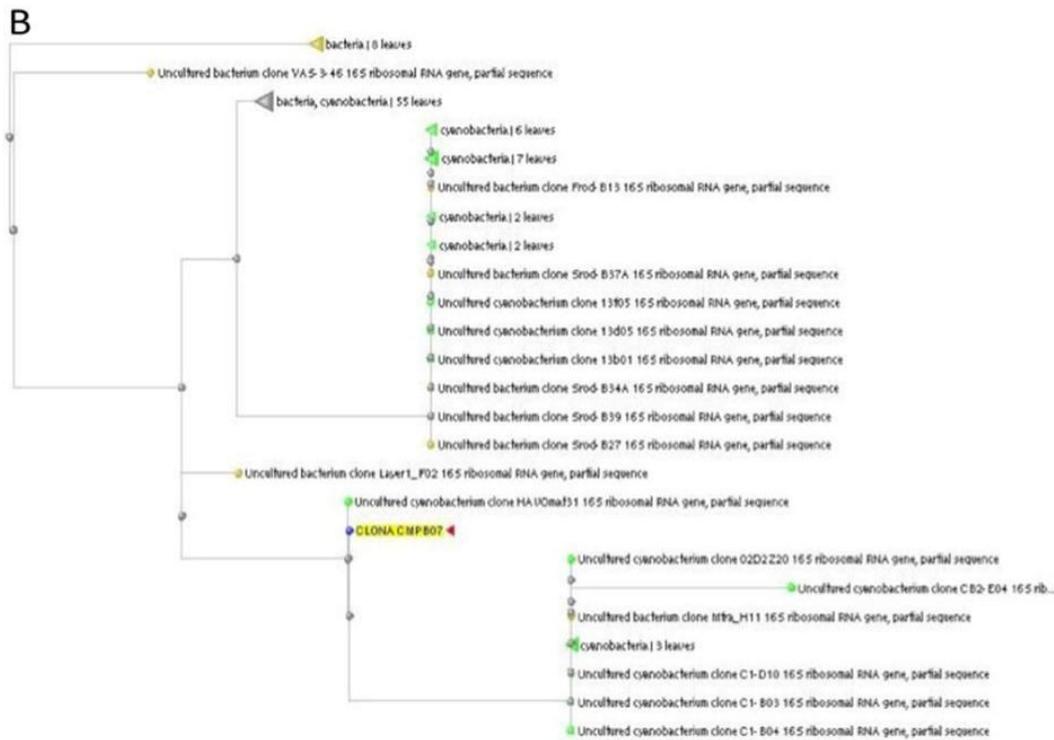




**Figura 6.** Análisis filogenético de tres clonas representativas de la genoteca. A) Clona CMPB29 agrupada en un cluster con identidad a secuencias 16S ribosomales pertenecientes a *Synechococcus*; Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el Programa Blast Tree View del NCBI, mediante el uso del Método del vecino más cercano (Neighbor Joining). Algunos nodos fueron eliminados con objetivos didácticos.

El Phylum *Cyanobacteria* se ha reportado como el grupo microbiano que comúnmente se encuentra constituyendo los tapetes microbianos en manantiales termales, así como parte de los principales productores primarios en estos ecosistemas (Castenholz, 1973). La mayoría de las secuencias, el 83%, tuvieron similitud con *Synechococcus* sp., coincidiendo con otros resultados, donde se reporta que dicho género de cianobacterias está presente como una especie dominante en tapetes microbianos de manantiales termales (Castenholz

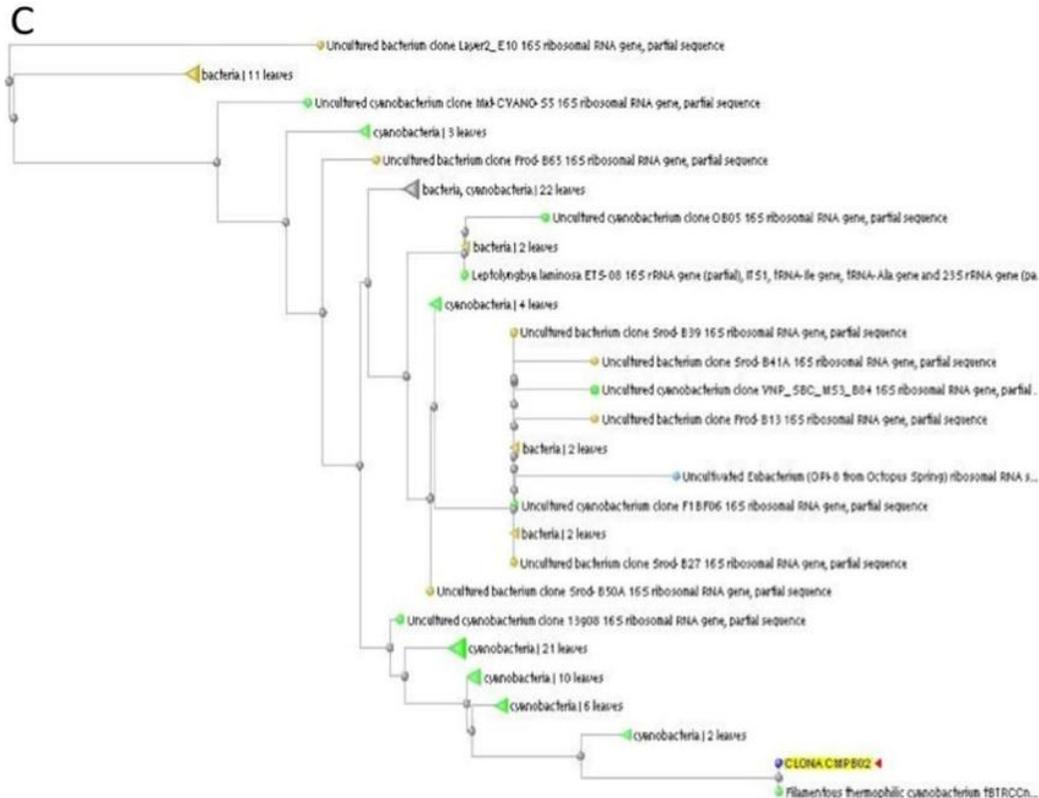
1973; Weller *et al.* 1991; Ruff-Roberts *et al.* 1994; Ward *et al.* 1998; Portillo *et al.* 2009). Sin embargo, el género *Synechococcus* parece ser un grupo polifilético, por lo que se sugiere ampliar el estudio y la secuenciación de más clonas para determinar con especificidad de algunas secuencias ribosomales. De hecho, en un trabajo por Robertson y colaboradores (2001) analizaron distintas cepas de *Synechococcus* y en un análisis filogenético, este parece evolutivamente relacionado con géneros tales como; *Microcystis*, *Oscillatoria* y *Chamaesiphon*.



**Figura 6 (cont...).** Análisis filogenético de tres clonas representativas de la genoteca. **B)** Clona CMPB07 agrupada en un cluster con identidad a secuencias 16S ribosomales pertenecientes a bacterias no cultivables.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el Programa Blast Tree View del NCBI, mediante el uso del Método del vecino más cercano (Neighbor Joining). Algunos nodos fueron eliminados con objetivos didácticos.

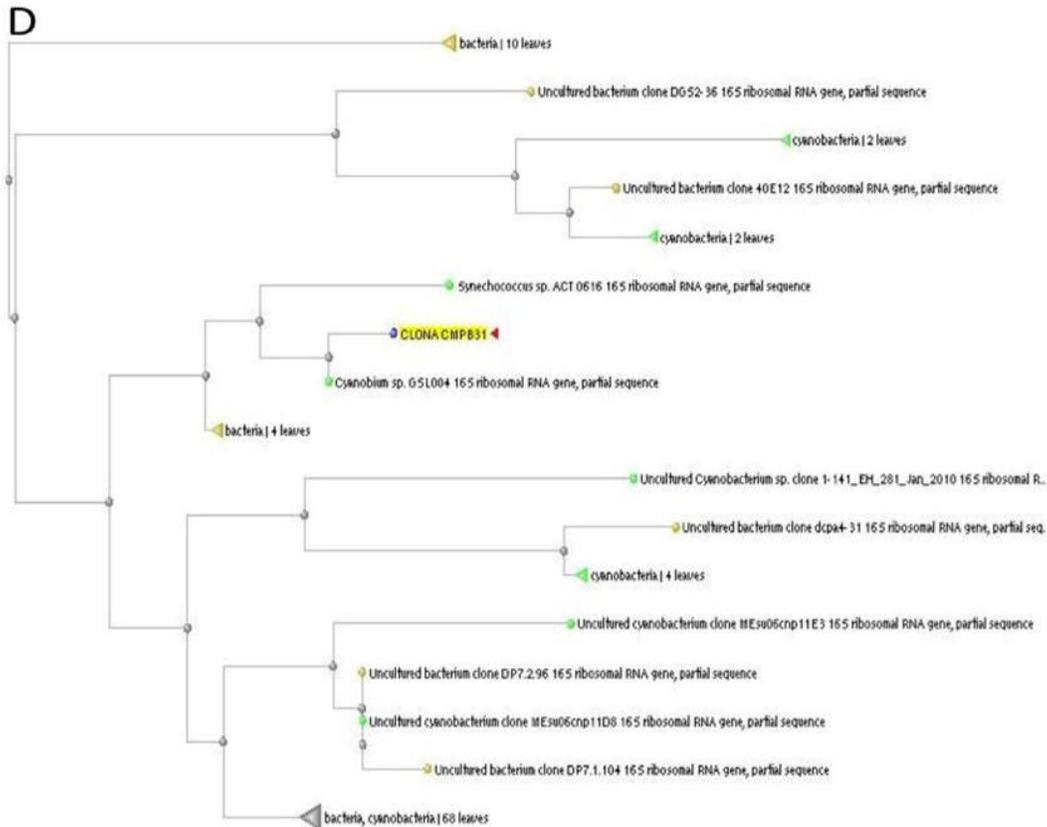
Otro género encontrado en la genoteca de clonas ribosomales es *Cyanobium*. Es importante recalcar que, hasta donde sabemos, el género *Cyanobium* no ha sido reportado como formador de tapetes microbianos (Portillo *et al.* 2009, Ward *et al.* 1998, Ruff-Roberts *et al.* 1994); sin embargo, nuestras secuencias lo señalan como habitante del tapete microbia-



**Figura 6 (cont...).** Análisis filogenético de tres clonas representativas de la genoteca. C) Clona CMPB02 agrupada en un cluster con identidad a secuencias 16S ribosomales pertenecientes a Cianobacterias filamentosas termofílicas. Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el Programa Blast Tree View del NCBI, mediante el uso del Método del vecino más cercano (Neighbor Joining). Algunos nodos fueron eliminados con objetivos didácticos.

no de las pozas termales de la localidad de Araró, Michoacán. Este dato es relevante y aporta un nuevo estilo de vida termófilo para este género cianobacteriano, ya que se los reportes por diversos autores sugieren que *Cyanobium* habita ecosistemas acuíferos como lagos, ríos y mares (Lopes et al., 2010; Ward et al., 1998). De hecho, se han aislado cepas de *Cyanobium* del Estuario Atlántico de Portugal con actividades tóxicas contra *Artemia salina* y *Paracentrotus lividus* (Lopes et al., 2010). En nuestro laboratorio sería interesante aislar cepas de *Cyanobium* de estas pozas termales de Araró y analizar su potencial para sintetizar biocompuestos, los cuales podrían ser termoestables.

Ward *et al.* (1998) sugiere que los tapetes microbianos se desarrollan en pozas termales con temperaturas alrededor de los 65°C. Las temperaturas de las pozas analizadas en este estudio pueden variar según la época del año, sin embargo, el promedio anual de la



**Figura 6 (cont...).** Análisis filogenético de tres clonas representativas de la genoteca. **D)** Clona CMPB31 agrupada en un cluster con identidad a secuencias 16S ribosomales pertenecientes a *Cyanobium*. Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el Programa Blast Tree View del NCBI, mediante el uso del Método del vecino más cercano (Neighbor Joining). Algunos nodos fueron eliminados con objetivos didácticos.

temperatura según Viggiano-Guerra y Gutiérrez-Negrín (2005), es de 71°C. A estas temperaturas otros microorganismos termófilos podrían compartir el hábitat con especies como *Synechococcus*. Incluso, algunos miembros del género *Chloroflexi*, se han encontrado en tapetes microbianos donde cohabitan con especies de *Synechococcus* (Weller *et al.* 1992; Moyer *et al.* 1995). Se ha propuesto que *Synechococcus* juega un papel como productor primario en estos ambientes, y que junto con bacterias del filo *Chloroflexi* (algunas hetero o quimioheterótrofas) podrían ser mutualistas. De esta manera, se pretende continuar con el análisis de más clonas para determinar que otras especies conviven en los tapetes microbianos, y así, tener una muestra más representativa del metagenoma de este sistema. De hecho, se sugiere analizar muestras de agua filtrada, así como realizar un análisis más deta-

llado de las capas de los tapetes con diversos colores, ya que según Portillo y colaboradores (2009) en un estudio demostraron que dependiendo de la capa (y color) analizada de un tapete microbiano, se puede encontrar diferentes estructuras poblacionales de especies, donde pueden estar presentando diferentes actividades metabólicas y papeles ecológicos.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica, UMSNH (2010-2011). Se agradece a los revisores anónimos por las sugerencias y comentarios.

## Referencias

- Acinas, S. G., J. Antón y F. Rodríguez-Valera. 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:514-522.
- Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries y N. R. Pace. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1609-1613.
- Brock, T. D. 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Brock, T. D., Y H. Freeze. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98:289-297.
- Castenholtz, R. W. 1973. Ecology of blue-green algae in hot springs. In: Carr NG, Whitton BA (eds) The biology of blue-green algae. University of California Press, Los Angeles, pp:379-414.
- Ferris, M. J., A. L. Ruff-Roberts, E. D. Kopyczynski, M.M. Bateson y D.M. Ward. 1996. Enrichment Culture and Microscopy Conceal Diverse Thermophilic *Synechococcus* Populations in a Single Hot Spring Microbial Mat Habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1045-1050.
- Fierer, N. y R. B. Jackson. 2006. The Diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:626-631.
- Hongmei J, Aitchison JC, Lacap DC, Peerapornpisal Y, Sompong U, Pointing SB. 2005. Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacterial mats from China, the Philippines and Thailand. *Extremophiles.* 9:325-332.
- Israde-Alcántara, V.H. Garduño Monroy y R. Ortega Murillo. 2002. Paleoambiente del cuaternario tardío en el centro del Lago de Cuitzeo. *Hidrobiológica.* 12:61-78.
- Jan- Roblero J., X. Magos, L. Fernández, C. Hernández- Rodríguez y S. Le Borgne. 2004. Phylogenetic analysis of Bacterial populations in waters of the former Texcoco Lake, Mexico. *Can. J. Microbiol.* 50:1049-1059.

- Lopes VR, Fernández N, Martins RF y Vasconcelos V. 2010. Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Mar Drugs*. 8:471-482.
- Moyer C.L., Dobbs F.C. y Karl D.M. 1995. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1555–1562.
- Portillo MC, Sririn V, Kanoksilapatham W y Gonzalez JM. 2009. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles*. 13:321-31.
- Robertson, B.R., N. Tezuka y M. M. Watanabe. 2001. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:861-871.
- Ruff-Roberts, A.L., J.G. Kuenen y D. M. Ward. 1994. Distribution of Cultivated and Uncultivated Cyanobacteria and *Chloroflexus*-Like Bacteria in Hot Spring Microbial Mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:697-704.
- Viggiano-Guerra, J. y L.C.A. Gutiérrez-Negrín. 2005. The Geothermal System of Araró, Mexico, as an Independent System of Los Azufres. *Proceedings World Geothermal Congress*. 24-29.
- Ward, D.M., M.J. Ferris, S. C. Nold y M.M. Bateson. 1998. A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1353-1370.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D. A. Pelletier y D. J. Lanet. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Weller, R., J.W. Weller y D.M. Ward. 1991. 16S rRNA Sequences of Uncultivated Hot Spring Cyanobacterial Mat Inhabitants Retrieved as Randomly Primed cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1146-1151.