

03062



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**INSTITUTO
DE ECOLOGÍA**
UNAM

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE PROCARIONTES USANDO
EL GEN 16S RIBOSOMAL: ORIGEN MARINO DE LA REGIÓN DE
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA

LAURA ESPINOSA ASUAR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. VALERIA SOUZA SALDÍVAR

MÉXICO, D.F.

MARZO DEL 2005

m341444



Universidad Nacional
Autónoma de México




UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM, bajo la dirección de la Dra Valeria Souza Saldívar, con el apoyo de NASA Astrobiology Institute, CONABIO AE015 y CONACyT/SEMARNAT C01-0237

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: LAURA ESPINOSA ASUAR
FECHA: 28 febrero 2005
FIRMA: 

Para Alejandro, siempre
A Emilio y Diego

*Ya sabes, el origen,
desde siempre perdido.
Si es origen, es agua
-dijo la segunda profecía-.
La huella está en el mar. Amar tu huella.*

GRACIELA RAHMAN

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
I Características de Cuatro Ciénegas	2
II Aproximaciones moleculares a los microorganismos	5
III Comunidades acuáticas de bacterias	7
a) Características de algunos phyla	7
b) Patrones de distribución	13
IV Tres formas de usar el gen 16S ARNr	13
V La Ecología Microbiana	17
VI Nuevas técnicas y perspectivas	17
OBJETIVOS	19
HIPÓTESIS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
I Sitios de colecta	20
II Colecta de muestras	20
III Extracción de ADN ambiental	21
IV PCR	21
V Clonación	21
VI Secuenciación	21
VII Análisis de secuencias	22
VIII Origen de las secuencias de referencia	22
IX Análisis comparativo con otros artículos	23
RESULTADOS	24
I Descripción y distribución de las clonas ambientales	24
II Quimeras	27
III Análisis de origen en las secuencias	28
IV Análisis comparativo con otros artículos	30
V Genealogías	35
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
I ¿Qué encontramos?	39
II ¿Endemismo en bacterias?	41
III Las huellas del mar en el desierto	42
a) ¿Todo está en todos lados?	42
b) El origen y las proteobacterias	43
c) Otra interpretación de la distribución cosmopolita	44
IV ¿Qué hacer con las secuencias ambientales?	45
V La Ecología Microbiana, una nueva perspectiva	46
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS	50
APÉNDICES	57
Apéndice I Extracción de ADN	57
Apéndice II Condiciones del PCR 16S rDNA	58
Apéndice III Extracción de bandas de gel	59
Apéndice IV Clonación	60
Apéndice V Extracción de plásmidos	62
Apéndice VI Registros de las clonas de este trabajo en GenBank	63
Apéndice VII Datos sobre las secuencias similares	64
Apéndice VIII Resultados estadísticos	65
Apéndice IX Árbol Neighbor Joining	66
Apéndice X Estimadores de riqueza	67

AGRADECIMIENTOS

A Valeria por ayudarme a recuperar el gusto por investigar. En parte fue la pasión, empeño, cariño y alegría con la que realiza su trabajo; en parte fue también, su estilo maternal, cuidadoso, atento, con el que sugiere y motiva, apoya y orienta y finalmente, gracias por el maravilloso espacio del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental.

Al jurado de la tesis por sus comentarios y correcciones: Carmen Gómez, Esperanza Martínez, Lorenzo Segovia y Francisco José Fernández.

A Luis, por empujarme a escribir otra vez y así ser iniciador del proceso de quitar las telarañas que había en mi cerebro.

A Alejandro García Carrancá, por su apoyo incondicional en este periodo de crisis. Esta tesis existe gracias al excelente y generoso trabajo en equipo que Valeria y Luis han promovido en el laboratorio. Gracias especialmente a los que colaboraron directamente en él: a los que fueron a Cuatro Ciénegas (Ana, René y Aldo) y trajeron muestras de sitios que conocí mucho después; a Aldo Valera y Toño, por su excelente asesoría técnica; a la señora Silvia por su ejemplo de honestidad y colaboración, siempre ayudando; a Julia Domínguez, Alejandra y Amor, que colaboraron para obtener los datos del análisis estadístico, y a Julia le toca doble, pues además trabajó las secuencias y también protestaron sus ojos; a Lourdes Lloret por su generosa donación de clonas que permitieron completar este trabajo.

Al laboratorio y cuates de Biomédicas, por una larga amistad de muchos años, hijos y/o bodas compartidas: Carla y Gino, Miriam y Alfredo, Benito y Alejandra, Lupichis, Marce, Denhí y Enrique.

Gracias a mi querido lab de Ecología, a los de antes y los de ahora, sobre todo por estar allí, y por aguantarme mis inevitables histerias: Arturo, Ana Elena, Rodrigo, René, Luisa, Toño, Aldo, Amanda, el "Richard", Manuel, Julia, Erika,

Martha (¡gracias por las vueltas!), Jaime, Andrea, Xitlalli, Yuriko, Luciana, Laura, Nuria y Enrique.

A Meli y Jordan, que también pusieron su granito de arena para que yo siga por aquí...

A los cuates con los que compartimos la maravillosa experiencia de los hijos: Nadia y Carlos, Luz María y el Villis, Claudia y Tito, Mari Paz y Adolfo, y a todos los pequeños, por cambiarnos la vida, abrimos los ojos y quitarnos de encima el egoísmo.

Gracias a los "Abus" por todo, a la abuelicha y al abuelo Gabriel y a los nonos por la compañía, el apoyo y la presencia; a cada uno de los Araujo Espinosa y de los Ramírez Araujo, sin la ayuda y paciencia de todos ellos no podría haber escrito esta tesis.

A la má en especial, por la estupenda corrección editorial.

Al mani por estar, nunca falla.

A los Araujo y a los Espinosa, porque sí.

Por último quisiera agradecer a Irma y a Rodolfo -a quienes tuve presentes durante todo este proceso de escritura- por tanta fortaleza de ambos, no cabe duda que el amor es lo más importante para vivir.

ABREVIATURAS

ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ANOVA	Análisis de varianza (del inglés <i>Analysis of Variance</i>)
DGGE	Gel de electroforesis de gradiente desnaturalizante (del inglés <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DMF	Dimetilformamida
LB	Luria Base
μ s	Micro sims (unidad utilizada para medir conductividad)
ms	Mili sims (unidad utilizada para medir conductividad)
ON	Dejar toda la noche (del inglés <i>Over Nighth</i>)
OTUs	Unidad Taxonómica Operativa (del inglés <i>Operational Taxonomic Unit</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforesis de campos pulsados (del inglés <i>Pulsed Field Gel Eletrophoresis</i>)
pH	Potencial de Hidrógeno
RAPDs	ADN polimórfico amplificado al azar (del inglés <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RDB	Ribosomal Data Base Project
rpm	Revoluciones por minuto
SN	Sobrenadante
SSCP	Conformación polimórfica de cadena sencilla (del inglés <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)
TA	Temperatura ambiente
T-RFLPs	Fragmentos finales y polimórficos por el tamaño de restricción (del inglés <i>Terminal Restriction Fragments Lenght Polimorfism</i>)
U	Unidad

RESUMEN

El ecosistema acuático del Valle de Cuatro Ciénegas, ubicado en el corazón del desierto de Chihuahua, presenta un conjunto de condiciones particulares que lo hacen ser, además de área de interés natural, un espacio idóneo para la investigación ecológica. Una de las características más interesantes de la zona es que el agua presenta contenidos muy bajos en fósforo, lo cual, sumado a la pobreza de nutrientes, genera condiciones de vida extremas; estas condiciones impiden el desarrollo de algas en los manantiales, por lo que es posible que la base de la pirámide alimenticia esté formada por bacterias, lo que invita a estudiarlas.

Uno de los problemas de este tipo de trabajos es la dificultad de cultivar estas bacterias con los métodos estándares de la microbiología. Ante esta dificultad, los recientes avances en las técnicas moleculares nos han permitido describir a las comunidades bacterianas con métodos independientes del cultivo como los que hemos utilizado en este trabajo, por lo que presentamos datos de bacterias en hábitats acuáticos de Cuatro Ciénegas y otros dos valles (El Hundido y Calaveras) utilizando una librería de clonas del gen 16S ribosomal. Encontramos que la mayor parte de la diversidad está representada por las proteobacterias y, en menor proporción, por bacterias de otros 7 phyla: *Nitrospira*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*. Además logramos obtener algunas clonas de arqueas, del phylum *Chrenarchaeota*.

Si tomamos en cuenta que Cuatro Ciénegas y los valles vecinos están en el desierto chihuahuense, muy lejos de la costa, resulta interesante que en los tres valles detectamos que cerca del 50% de las secuencias de bacterias y arqueas son similares a secuencias obtenidas en ambientes marinos. En una comparación estadística con otros estudios encontramos que este patrón es distinto al que presentan estudios en lagos salados y es similar a cuerpos de agua relacionados con el mar, como son los lagos de la Antártida o los lagos del desierto de Atacama, territorios lacustres que han sido considerados de origen marino. Si a los datos que hemos obtenido mediante el análisis molecular, le sumamos los datos geológicos descritos, es posible conformar un conjunto de evidencias que sugieren un origen marino de la zona en la que se encuentran los acuíferos analizados.

Este trabajo plantea que es posible rastrear el origen de las bacterias utilizando análisis genéticos como el que aquí presentamos; la interpretación debe hacerse en forma cuidadosa, y es necesario vincularla con una interpretación ecológica.

ANTECEDENTES

I Características de Cuatro Ciénegas

El valle de Cuatro Ciénegas, localizado en la zona central de Coahuila, se decretó como área natural protegida en la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna. El decreto se publicó en el Diario Oficial de la Federación el 7 de noviembre de 1994. Es considerado el humedal más importante dentro del Desierto Chihuahuense y uno de los humedales más importantes en México. En este valle subsisten una gran cantidad de especies endémicas, que son la justificación más importante del decreto.

Cuatro Ciénegas se encuentra orientado hacia al este de la región conocida como altiplano septentrional o Desierto Chihuahuense, en la parte central del estado de Coahuila, a 80 km al oeste de la ciudad de Monclova; está localizado entre los dos macizos montañosos más grandes de México, al este de la Sierra Madre Oriental y al oeste de la Sierra Madre Occidental. La humedad que viene tanto del Golfo de México como del Pacífico es bloqueada por ambas montañas, fenómeno que dio origen al desarrollo de este desierto. El valle está rodeado por montañas de hasta 3 000 m de altura, y en promedio tiene una altitud de 740 m (Minckley 1969), con una extensión aproximada de 40 km de este a oeste y de 30 km de norte a sur (Minckley 1969), estando cortado en dos por la Sierra de San Marcos y Pinos (figura A1).

El Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatro Ciénegas tiene una superficie de cerca de 85 000 ha, y se localiza entre las coordenadas 26° 45' 00" y 27° 00' 00" de latitud Norte; 101° 48' 49" y 102° 17' 53" de longitud Oeste.

De los valles del Hundido y Calaveras, al oeste y al norte de Cuatro Ciénegas respectivamente, existe muy poca información. El valle del Hundido está formado por sierras y lomeríos, y es de topografía muy accidentada debido a la presencia de cañones profundos; se encuentra entre la Sierra La Fragua y los valles el Sobaco y Buenavista. El valle Calaveras, al norte de Cuatro Ciénegas (conocido también como Ocampo) a su vez se ubica entre la Sierra de la Madera y Sierra de Menchaca. Son regiones poco estudiadas, existe escasa información sobre la flora y fauna de estos valles

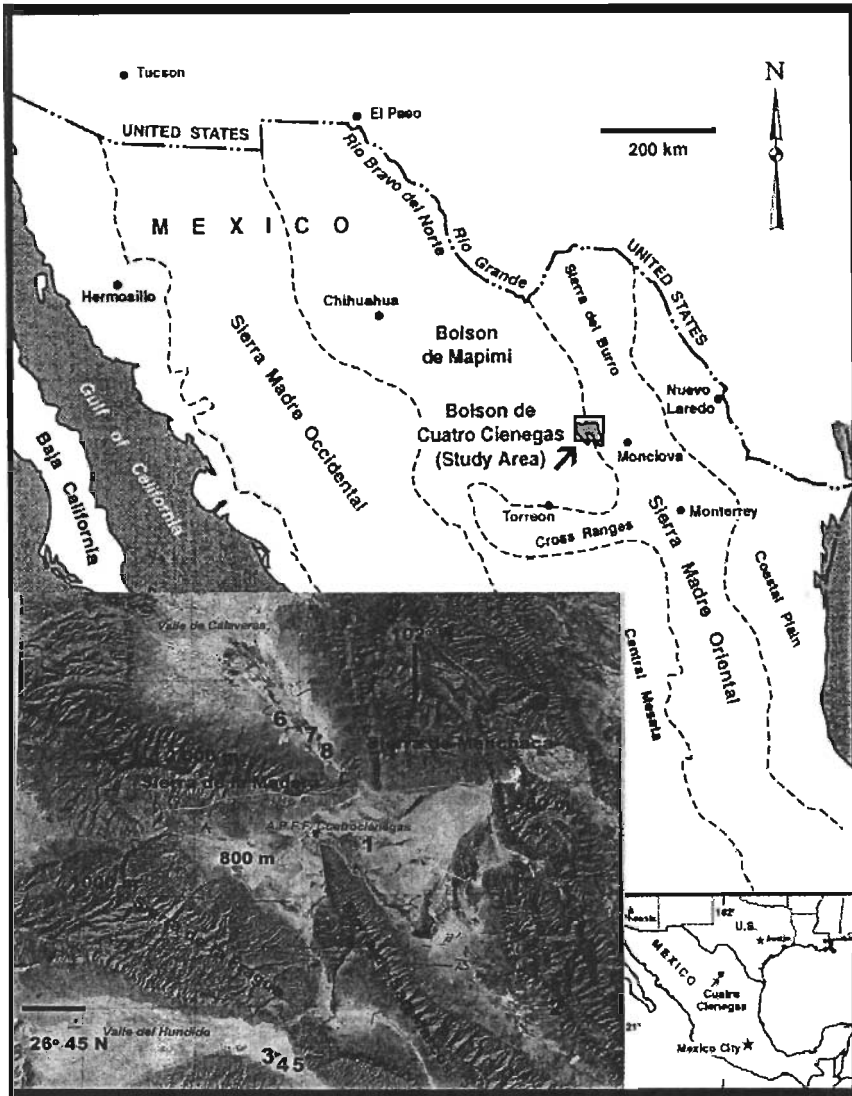


Figura A1. Ubicación del área de estudio. Muestras 1 (16 Escobedo), 2 (24 Mina Rosario), en Cuatro Ciénegas; 3 (26 Hundido), 4 (Santa Teresa), 5 (Tanque Nuevo), en el valle del Hundido; y 6 (27 El Retiro), 7 (28 La Luz), 8 (29 La Ximena), en el valle de Calaveras (figura modificada de Johanneson *et al.* 2004).

y los recursos hídricos principales: presas, lagos salinos, bordos ganaderos y agrícolas, arroyos y ríos han sido sobreexplotados, por lo que la escasa recarga de acuíferos ha llevado a la sobreexplotación del manto freático (CONABIO, página web).

El clima de la zona es muy árido, con una precipitación anual de menos de 200 mm, sobre todo durante mayo y octubre (Shreve 1944), y temperaturas extremas de 44 °C en verano, y un mínimo de 0 °C en invierno (Minckley 1969).

Con tan poca precipitación anual, la gran cantidad de agua subterránea es la causa de la existencia de manantiales en el valle de Cuatro Ciénegas, que a su vez forman arroyos permanentes y áreas inundadas donde se concentra el agua de los manantiales. Los manantiales se llaman localmente pozas; las áreas inundadas se conocen como lagunas o lagos, algunos de los cuales son lagunas de desecación. Casi todos estos ambientes acuáticos tienen agua con pocos nutrientes y con altas concentraciones de minerales provenientes de las rocas cársticas que existen en la zona, sobre todo iones sulfato y calcio resultado de la evaporación y precipitación de carbonato de calcio y sulfato de calcio (yeso); en menor proporción se han encontrado iones de sodio, magnesio y cloro (Winsborough 1990).

Los cuerpos de agua tienen además un contenido bajo de fósforo en el agua y la pobreza de nutrientes no permite el desarrollo de algas, por lo que la base de la pirámide alimenticia parece estar formada principalmente por las bacterias. En muchas de las pozas y ríos, tanto de agua salada como de agua dulce, hay estromatolitos (depósitos de carbonatos construidos por comunidades de bacterias) que son poco comunes en el mundo (Winsborough and Seeler 1984, Winsborough 1990).

Los numerosos cuerpos de agua que brotan de manantiales tienen diámetros que van desde menos de un metro hasta más de cien; las profundidades de los mismos van desde 50 cm hasta 18 m; algunas de las pozas están comunicadas entre sí por un complicado sistema de drenaje.

La mayor parte de los manantiales se ubican en las faldas de la Sierra de San Marcos y Pinos, formando alrededor de 200 pozas dentro del Valle de Cuatro Ciénegas. Las características físico-químicas de las pozas son muy variables, la temperatura varía en un rango de 18 a 35 °C; el pH es de 5.76 a 8.3; la conductividad tiene valores entre 782 μ S y 7.52 mS y los sólidos disueltos se encuentran en un rango que va de 292 mg/l a 3.77 g/l.

Como resultado de la exportación del agua fuera del valle y su uso dentro del mismo, se provocaron serios desequilibrios, como son la interconexión artificial de los

manantiales, la disminución de las áreas inundadas y cambios en los niveles de agua en muchas de las pozas (INE 2000).

La explotación de agua en otros valles de los alrededores de Cuatro Ciénegas (como son Hundido y Calaveras) ha sido motivo de preocupación, ya que la escasa información geológica e hidrológica de la zona no ha permitido determinar con claridad las rutas de flujo del agua subterránea. Por este motivo, la sobreexplotación en los valles vecinos podría afectar seriamente al área natural protegida de Cuatro Ciénegas.

II Aproximaciones moleculares a los microorganismos, una nueva forma de conocerlos

El desarrollo de técnicas moleculares nos ha permitido ir conociendo en los últimos 15 años la enorme e inesperada diversidad del mundo microbiano. Norman Pace y su grupo (Olsen *et al.* 1986, Pace *et al.* 1986) y Woese (Woese 1987, Woese *et al.* 1990) publican a finales de los años 1980 las primeras aproximaciones hacia la evolución y ecología de los microorganismos utilizando técnicas moleculares. Su propuesta se basa en el análisis del gen conocido como 16S ARNr. Este gen ha sido elegido para clasificar a distintos tipos de organismos gracias a que está presente en los tres dominios de la vida conocidos: Bacteria, Archaea y Eucarya. Mediante la comparación de las secuencias de este gen se ha generado lo que hoy conocemos como "el árbol de la vida" que incluye a miles de organismos distintos (figura A2). Los tres grandes dominios (eucariótico, procariótico y arquea) quedan así claramente resueltos desde entonces (Woese *et al.* 1990).

El gen utilizado como cronómetro evolutivo, codifica para la molécula del 16S o 18S ARNr (16S en procariontes y 18S en eucariontes, cuyos ribosomas son más grandes y complejos que en los procariontes; además, el contenido de ARN y proteínas es mayor), el cual es parte de la subunidad pequeña de los ribosomas (llamada 30S en bacterias) que está formada por unas 20 proteínas asociadas al 16S ARNr. Una característica por la que ha sido posible definir relaciones filogenéticas entre organismos tan distantes con este gen es que tiene tasas de cambio muy distintas a lo largo de su secuencia (Woese 1987).

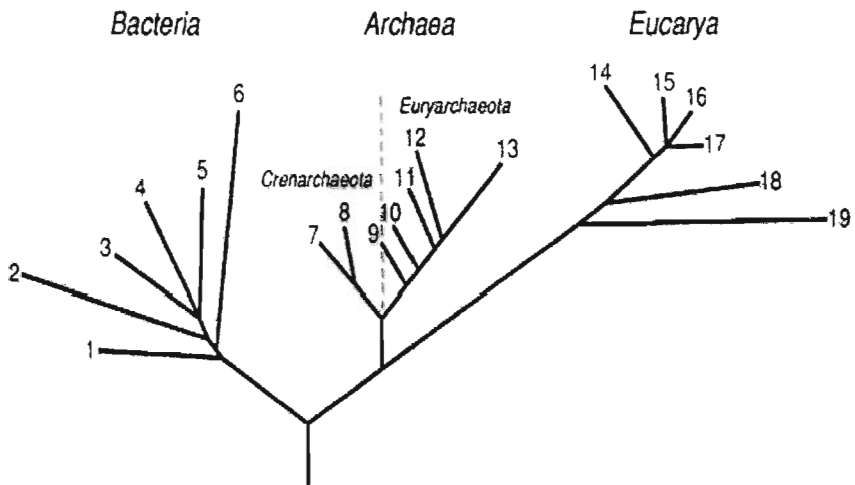


Figura A2. Árbol filogenético universal que muestra los tres dominios. El orden y largo de las ramas fue determinado haciendo comparaciones de secuencias del gen 16S y 18S ribosomal (Woese 1990).

Del dominio **Bacteria**: 1 *Thermotogae*, 2 *Bacteroidetes*, 3 *Cyanobacterias*, 4 *Proteobacterias*, 5 Gram positivas, 6 *Chlorobi*.

De las **Archaeas**, la línea punteada divide a las Crenarchaeota: 7 *Ayredicium* y 8 *Thermoproteus*, del reino Euryarchaeota: 9 *Thermococcales*, 10 *metanococcales*, 11 *Methanobacterias*, 12 *Methanomicrobiales* y 13 *Halófilas* extremas.

Del dominio **Eucarya**: 14 animales, 15 ciliados, 16 plantas verdes, 17 hongos, 18 flagelados y 19 micropodia.

Los sitios con gran estabilidad se deben a la función del ARN en el ribosoma: los múltiples sitios de interacción con sus proteínas deben ser altamente conservados, y las estructuras tridimensionales que se han reportado (Ramakrishnan y Moore 2000) han revelado sitios libres de proteína, que interactúan directamente con el ARN mensajero y con los ARNs de transferencia (figura A3).

Los sitios más variables en esta molécula forman parte de la estructura de algunas de las asas, que básicamente están implicadas en la estructura secundaria de la molécula. Una mutación en una base en estas zonas conlleva a su vez otro cambio en la base complementaria de la cadena que forma la estructura de las asas.

Con esta herramienta también se ha establecido una clasificación para las bacterias, que ha sido incorporada por el *Manual de Bergey's* (Garrity 2001) y el libro de texto titulado *The Prokaryots* (Dworkin et al. 2004), dos de las fuentes más utilizadas por los taxónomos. En la publicación original de Woese en 1987 se proponen 11 grupos o linajes de bacterias (figura A4) los cuales se han llamado con nombres taxonómicos distintos: reinos, phyla, clases, órdenes o divisiones (Rappé y Giovannoni 2003). De aquí en adelante, retomando la propuesta de Rappé y Giovannoni quienes siguen el ejemplo de la taxonomía propuesta en el *Manual de Bergey's*, a estos grupos nosotros los denominaremos phyla.

III Comunidades acuáticas de bacterias. Una revisión general de algunos phyla y sus patrones de distribución

a) Características de algunos phyla

Los 11 phyla originales propuestos por Woese se han reorganizado desde entonces (figura A5, los 11 originales están coloreados en negro).

Mencionaremos brevemente algunas características de los phyla que tienen relación con los resultados de este trabajo, de acuerdo con algunos libros de texto –*The Prokaryots* (Dworkin et al. 2004) y *Brock Biology of Microorganisms* (Madigan MT et al. 2000) y con la información que hasta hoy se tiene. Los microorganismos han resultado tan complejos que, día a día, existe información nueva y sorprendente; de esta forma han surgido una gran cantidad de phyla nuevos, triplicando el número original (como puede verse en la figura A5), muchos de ellos clasificados como "candidatos a divisiones" ya que

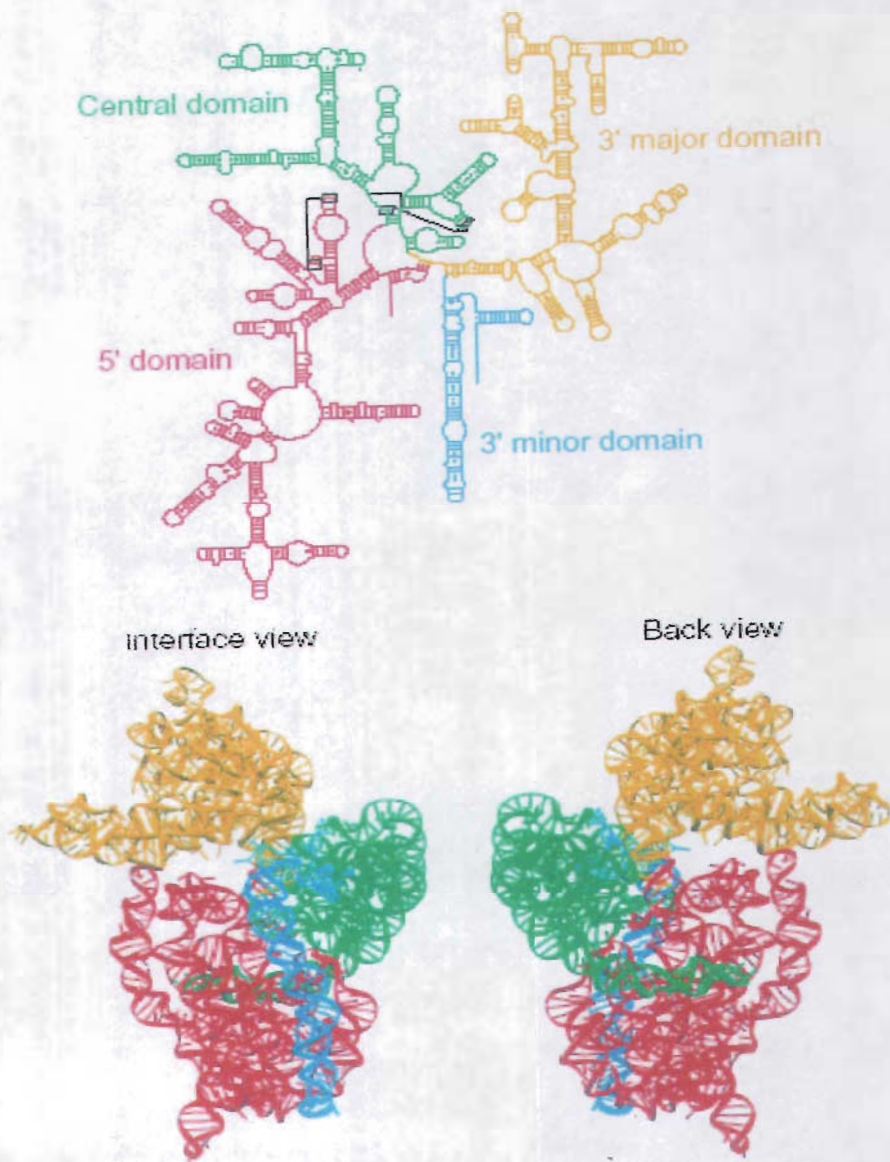


Figura A3. Estructura secundaria (arriba) y terciaria (abajo) de la molécula 16S ARNr (Ramakrishnan y Moore 2000)

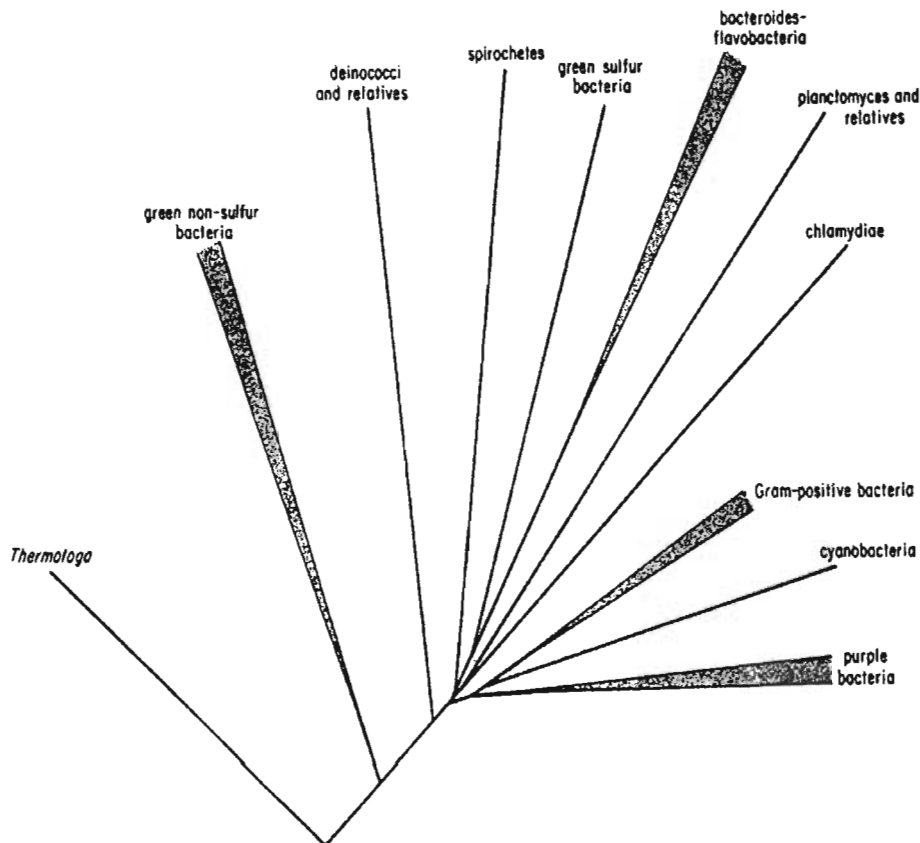


Figura A4. Estos son los primeros 11 linajes taxonómicos (o phyla) que fueron propuestos por Woese utilizando secuencias del gen 16S para el ARNr (Woese 1987). La nomenclatura utilizada en este trabajo se corresponde con la de Woese en la siguiente forma: **Thermotoga** es *Thermotogae*. **Green non-sulfur bacteria** es *Chloroflexi*. **Deinococci and relatives** es *Deinococcus-Thermus*. **Spirochetes** es *Spirochaetes*. **Green sulfur bacteria** es *Chlorobi*. **Bacteroides-flavobacteria** es *Bacteroidetes*. **Planctomyces** es *Planctomycetes*. **Chlamydiae** es *Chlamydiae*. **Gram positive bacteria** es *Firmicutes* y *Actinobacteria*. **Cyanobacteria** es *Cyanobacteria*. **Purple bacteria** es *Proteobacterias*.

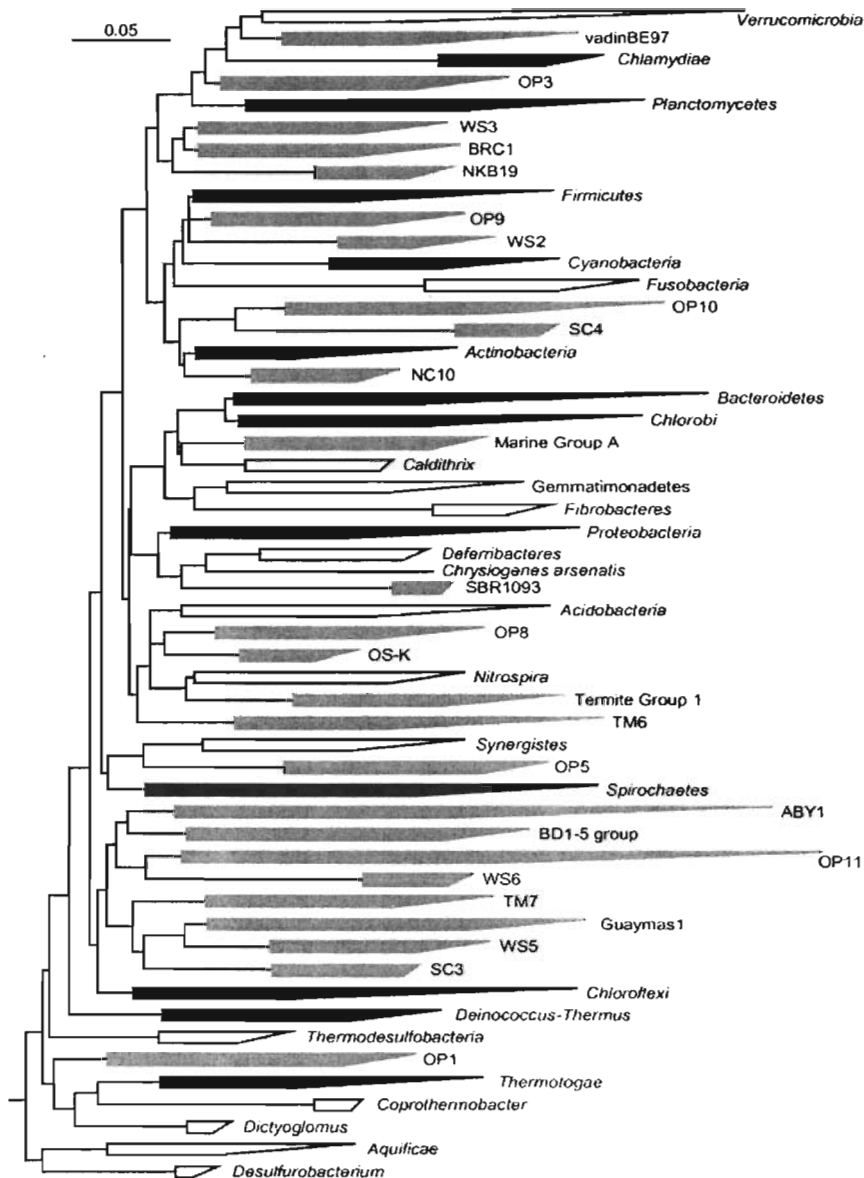


Figura A5. Se han obtenido una gran cantidad de nuevos phyla de bacterias. Los 11 originales están coloreados **en negro**; en blanco, los phyla que han sido descubiertos posteriormente; y en **gris** son los phyla que no han sido cultivados y de los que únicamente se conocen las secuencias del gen 16S para el ARNr (tomado de Rappé y Giovannoni 2003).

son secuencias que pertenecen a microorganismos que no han sido cultivados (phyla, coloreados en gris); casi nada se sabe sobre su ecología o fisiología y no podrán clasificarse con precisión hasta que exista mayor información que nos permita conocerlos.

Entre los phyla originales está el de *Proteobacteria*, las clásicas bacterias Gram negativas, reconocidas como uno de los grupos más exitosos en el planeta (Rappé y Giovannoni 2003) y con gran abundancia en prácticamente todos los ambientes acuáticos; incluso se han reportado distribuciones globales en regiones de todo el mundo: *Roseobacter* es hoy el ejemplo más reciente de alfa proteobacterias con esta característica (Selje *et al.* 2004). Las beta proteobacterias son más comúnmente encontradas en ambientes de agua dulce; en ambientes salinos han estado asociadas a la nitrificación (Nold y Zwart 1998).

También de los phyla originales son las *Cyanobacterias* o bacterias fotosintéticas aeróbicas; hoy se sabe que estos organismos son los responsables en gran medida del mantenimiento del oxígeno atmosférico de la tierra y se distribuyen ampliamente tanto en hábitats acuáticos como terrestres. Las bacterias Gram positivas están presentes en todos los ambientes acuáticos y hoy se dividen en dos: *Firmicutes* (bajo G+C), que generalmente son anaeróbicas y forman endoesporas, y *Actinobacterias* (alto G+C), las cuales casi siempre tienen un fenotipo de actinomicetos: células filamentosas y ramificadas con crecimiento de micelios.

El phylum *Chloroflexi*, o bacterias verdes no sulfurosas, no se esperaba que estuviera formado por bacterias metabólicamente tan distintas como *Chloroflexus* (bacterias anoxifótótrofas termofilicas), *Thermomicrobium* (quimioheterótrofos hipertermofilicos) y *Herpetosiphon* (mesofilicos quimioheterótrofos); se han encontrado casi siempre en sedimentos de lagos o marinos y se ha demostrado que no es un linaje muy abundante en el océano (Gordon y Giovannoni 1996). También los *Bacteroidetes* están formados por tres géneros que se creía poco relacionados entre sí: *Cytophaga*, *Bacteroides* y *Flavobacterium*; se encuentran en gran abundancia en el mar o en sistemas eutróficos como lagunas costeras, y son poco abundantes en aguas oligotróficas (Jaspers 2001). El phylum *Deinococcus-Thermus* también agrupa a dos tipos de bacterias completamente diferentes. Entre ellas mencionaremos a la familia *Deinococcaceae*, que es muy conocida por su asombrosa capacidad de resistencia a la radiación, microorganismos que son aislados principalmente de suelo, carne molida o polvo, y es poco frecuente obtenerlos en clones ambientales de ambientes acuáticos.

Entre los phyla descritos con posterioridad a estos 11 iniciales cabe resaltar el llamado *Acidobacteria*, el cual ha pasado sorprendentemente de ser un tipo de bacteria

desconocido a ser uno de los más comunes, tras la utilización de los métodos de identificación independientes de cultivo; se ha encontrado en todos los ambientes y con gran abundancia (sobre todo en suelos).

Planctomycetes y *Chlamydiae* son los dos únicos phyla que se conocen con paredes celulares que no están compuestas por peptidoglicanos. El phylum *Planctomycetes* está formado por bacterias que son comunes en suelos y sedimentos, así como en agua dulce, el mar y ventilas hidrotermales. Estos dos phyla, junto con *Verrucomicrobia*, tienen características que no son típicas de las eubacterias, por lo que es posible que en un futuro puedan relacionarse como un solo phylum cuando sus genomas estén disponibles (Woese, en *The Prokaryots*). El phylum *Verrucomicrobia* está formado por bacterias de agua dulce y suelo, casi todas aeróbicas, heterótrofas y tienen una pared celular característica que las protege de factores ambientales (prosteca).

El phylum *Nitrospira* se compone de bacterias quimiolitótrofas obligadas, que oxidan nitrato o hierro ferroso, y que también parecen estar presentes en distintos ambientes como el suelo, mar, agua dulce y en plantas de tratamiento de aguas residuales (Abeliovich 2001).

Por último, el dominio Archaea fue propuesto por Carl Woese a finales de los años 1970 (Woese 1977), cuando expuso la idea de la existencia de los tres dominios llamados en ese entonces Eukaryota, Eubacteria y Archaeobacteria. Después el nombre de Archaeobacteria fue modificado a Archaea. Las arqueas son organismos unicelulares, por lo cual es complicado distinguirlas del dominio de las bacterias bajo el microscopio. Las condiciones extremas en las que viven muchas de ellas las hacen difícilmente cultivables.

En un principio se pensó que este dominio era exclusivo de ambientes extremos, como ventilas hidrotermales o ambientes con alta salinidad, aunque también se han descubierto arqueas en plancton y sedimentos marinos, en el tracto digestivo de rumiantes e incluso en depósitos de petróleo en el subsuelo (Madigan *et al.* 2000). El dominio de las arqueas se divide en tres phyla; mencionaremos al denominado Crenarchaeota, que es el que tiene relación con este trabajo; ha sido encontrado en distintos hábitats como suelos y agua de lagos, además de ambientes extremos como ventilas hidrotermales y ambientes muy fríos (de -2 °C a 4 °C), por ejemplo en el océano Atlántico (DeLong 1997). Muchos de los Crenarchaeota se especializan en metabolizar azufre, y aunque hasta ahora ha sido muy difícil cultivarlos, las secuencias del gen 16S ARNr que se han podido obtener indican que este grupo podría ser ecológicamente importante en distintos ambientes (Dworking *et al.* 2004).

b) Patrones de distribución

Se ha calculado que el número de procariontes existentes en ecosistemas acuáticos es de 5×10^5 células por ml en el mar (Whitman 1998) y el doble para los sistemas acuáticos terrestres (ríos y lagos dulces o salados). Para los sedimentos marinos la cantidad que se calcula es impresionante, de alrededor de $4\,600 \times 10^5$ células por ml. Así pues, la mayor cantidad de procariontes, de acuerdo a estos cálculos, forman parte de ecosistemas acuáticos, localizándose la mayoría en el océano abierto y en sus sedimentos, dado el enorme volumen de agua que existe en nuestro planeta.

Siguiendo el ejemplo de Nold y Zwart (1998), en el presente trabajo hemos retomado algunos de sus datos y compilado otros de artículos relacionados con ambientes acuáticos, para darnos una idea general sobre lo que se sabe de la distribución de las bacterias a partir de la utilización de los nuevos métodos moleculares. La metodología que hoy se utiliza más comúnmente implica trabajar con el gen 16S ARNr; se pueden producir sesgos en los resultados en varios puntos de la metodología: desde la forma de lisis de las muestras, las técnicas de extracción del ADN, condiciones de amplificación y tipo de oligos utilizados o la forma de clonar. Los problemas metodológicos han sido muy discutidos, y existe una gran variedad de propuestas para evitarlos (Eg. Qiu *et al.* 2001, Hugenholtz y Huber 2003, Acinas *et al.* 2004, Forney *et al.* 2004). Aún así, los ambientes acuáticos tienden a tener características similares que nos dan una idea general de la distribución de los distintos phyla (figura A6).

IV Tres formas de usar el gen 16S ARNr

Desde la propuesta de Woese, una gran parte de los artículos relacionados con la microbiología han utilizado estas secuencias del 16S ARNr; el *boom* de información en los últimos años ha generado preguntas y objetivos de estudio diferentes; muchos de ellos incorporan nuevos enfoques con planteamientos ecológicos y evolutivos. Para fines prácticos dividiremos estos enfoques en tres tipos, aunque los tres están íntimamente relacionados:

Al primer enfoque lo llamaremos taxonómico; lo aplican estudios que se interesan por la taxonomía o clasificación de los procariontes. Una de las herramientas comúnmente utilizadas en este sentido ha sido el formar grupos de secuencias de este gen con una similitud de por lo menos el 97%; se ha establecido que estos grupos similares representan una especie en bacterias. No es el único criterio que hoy se sugiere para establecer especies en bacterias (Roselló-Mora y Amann 2001): se recomienda además utilizar otros datos fenotípicos (pruebas bioquímicas, ácidos grasos, etc.) así como información genómica (RAPDs, PFGE, contenido de GC, hibridación ADN-ADN, por ejemplo). Con estos criterios, el consenso que hoy se acepta para definir una especie bacteriana requiere del trabajo con bacterias en cultivo.

Muchos de los estudios con bacterias que han sentado las bases para el desarrollo de la microbiología se han desarrollado con cultivos puros, aunque hoy sabemos que las bacterias cultivables son sólo una pequeña parte de las bacterias que existen en la naturaleza. Los avances en los métodos moleculares conseguidos en la última década (por ejemplo el desarrollo de nuevas enzimas y termocicladores que permiten hacer cada vez más eficiente la técnica de PCR, o el uso de tecnologías computarizadas para el procesamiento de muestras y el análisis de datos) han posibilitado el conocimiento de un asombroso número de linajes filogenéticos, de bacterias y arqueas que no han podido cultivarse, pero con estas nuevas metodologías no ha sido necesario hacerlo.

Esto nos lleva hacia la descripción de lo que llamaremos el segundo enfoque, que se interesa por estos microorganismos ambientales que no es posible cultivar. Las preguntas a responder son, principalmente ¿quién está ahí?; ¿cuántos hay?; ¿quiénes son? Una gran parte de las secuencias registradas en GenBank corresponden a este tipo de secuencias, clasificadas como "clonas ambientales" o "no cultivables"; el procedimiento utilizado para obtenerlas es extrayendo el ADN de todas las bacterias presentes en las muestras a estudiar; con ese ADN se amplifica el gen del para el 16S ARNr con oligonucleótidos universales (o diseñados para cierto grupo de bacterias); después los productos de PCR son clonados o separados por otro método (por ejemplo T-RFLPs o DGGE) y así se obtienen secuencias o datos los cuales nos describen a los microorganismos que en ese momento se encontraban en la muestra. La gran mayoría de estos estudios tiene como objetivo conocer la diversidad de las bacterias, agrupándolas en "filotipos" o grupos de secuencias similares (también llamados OTUs), muchas veces con el mismo criterio del 97% establecido para las especies. Algunos investigadores han

utilizado esta información para estimar la diversidad de bacterias, pero hasta hoy no hay consenso sobre una manera precisa de hacerlo con estos métodos (Ward 2002). Existen algunas revisiones que discuten y proponen distintas aproximaciones metodológicas y estadísticas para calcularlo (Huges *et al.* 2001, Curtis *et al.* 2002, Martin 2002, Bohannan y Huges 2003, Stach *et al.* 2003, Curtis y Sloan 2004, Kemp y Aller 2004 a y b, Lunn *et al.* 2004).

El tercer enfoque está relacionado con la distribución de los microorganismos y la biogeografía. El punto de vista tradicional en microbiología plantea desde 1930 que las grandes tasas de dispersión de los microorganismos han producido distribuciones cosmopolitas y que no hay barreras geográficas para la distribución de los procariontes (Baas-Becking 1934). En 2002, el estudio de Finlay con protozoarios ha reforzado el punto de vista de que las bacterias "están en todos lados" (Finlay y Clark 1999, Finlay 2002), argumento que se fundamenta básicamente en números (Fenchel 2003), ya que los tamaños poblacionales de los microorganismos son muy grandes y, por lo tanto, la probabilidad de dispersión se argumenta que será muy alta. En la última década se ha generado un debate que aún no termina: existen tanto evidencias que hablan de patrones de distribución biogeográfica en procariontes (Cho y Tiedje, 2000, Oda *et al.* 2003, Papke *et al.* 2003, Whitaker *et al.* 2003, Falcón *et al.* 2004, Glaeser y Overmann 2004), como evidencias que hablan de distribuciones cosmopolitas (García-Pichel *et al.* 1996, Glökner *et al.* 2000, Hagstrom *et al.* 2002, Hentschel *et al.* 2002, Brinkmeyer *et al.* 2003, Purdy *et al.* 2003, Selje N *et al.* 2004).

Estas tres formas de aproximarse al estudio de los procariontes tienen en común que han utilizado el gen del 16S para el ARNr como una herramienta fundamental para conocer a los microorganismos. Existe un consenso cada vez más generalizado sobre la necesidad de utilizar cuidadosamente esta información, apoyando las conclusiones generadas en otro tipo de datos (como son otras técnicas moleculares o datos fisicoquímicos que complementen la información que hasta hoy se tiene). La mayor crítica se relaciona con el sesgo que conlleva el uso de un solo gen para definir relaciones entre organismos, y el hecho de basarse en una sola molécula para hacer inferencias sobre diversidad, definición de especies o biogeografía puede llevar a conclusiones poco precisas (Roselló-Mora y Amann 2001).

V La Ecología Microbiana

La microbiología hoy se encuentra en una etapa de cambios, y se está generando gran cantidad de información novedosa y sorprendente. Las secuencias de las bacterias no cultivables han demostrado que el número de especies procariontes podría exceder al de todas las otras formas de vida en el planeta (Curtis *et al.* 2002), y esto nos recuerda que los microorganismos son claves en la mayoría de los ciclos biogeoquímicos, la cadena alimenticia y son responsables de la regulación de la temperatura del planeta. Tienen además gran importancia en la agricultura, la industria y la biotecnología, por sólo mencionar algunas disciplinas. De esta forma, la interacción de la microbiología con otras disciplinas es cada vez más frecuente y necesaria, y hoy está en proceso de formación lo que se ha venido a denominar Ecología Microbiana: un enfoque y punto de vista novedoso, que se comienza a utilizar cada vez más, en el que las teorías y propuestas de la ecología son herramientas para describir procesos microbiológicos en un contexto evolutivo y ecológico. Por ejemplo, se han encontrado patrones ecológicos y evolutivos en poblaciones naturales de bacterias (Zhou *et al.* 2004; para una revisión véanse Horner-Devine *et al.* 2003); también se han encontrado relaciones entre la diversidad microbiana y la función en un ecosistema (Morin y McGrady-Steed 2004), o se ha descrito el papel de fenómenos evolutivos como el aislamiento físico y su importancia para la evolución de los procariontes (Papke y Ward 2004), por mencionar sólo algunos de los muchos trabajos que se han reportado en este sentido.

VI Nuevas técnicas y perspectivas

La metagenómica –o el análisis genómico independiente de cultivo– es hoy la propuesta que apunta hacia el conocimiento de los genomas de los microorganismos por medio de la reconstrucción de genomas enteros en una población (para una revisión veáanse Riesenfeld *et al.* 2004). Este año ha sido posible hacerlo para dos ambientes distintos: un biofilm acidófilo (Tyson *et al.* 2004) y en el Mar del Sargazo (Venter *et al.* 2004).

Con la información que tenemos hasta ahora, incluyendo los datos que existen de bacterias cultivables como *E.coli* y *Salmonella*, se sabe que el genoma de los microorganismos puede ser dividido en dos tipos: el genoma base, el cual contiene los

genes para el funcionamiento y el metabolismo básico de la bacteria —razón por la que se ha propuesto como una posible solución para definir con base en esta información a las especies bacterianas (Doolittle 2002)— y el resto del genoma, que comprende los genes más interesantes desde el punto de vista de la ecología: los genes que determinan la patogenicidad, el papel ecológico o el nicho de una cepa dada por ejemplo, y que además es la parte del genoma más variable y que se ha visto involucrada en los procesos de transferencia entre organismos.

Ya desde hace tiempo existe el planeamiento de una aproximación ecológica que involucre la información del genoma completo de los procariontes (DeLong 2002, Rodríguez-Valera 2002), lo que nos permitiría entender a otros niveles las funciones microbianas en las poblaciones, redefinir la importancia de los distintos procesos de transferencia genómica, y sobre todo entender con más claridad cuál es la unidad de selección en los microorganismos (Castillo *et al.* en prensa).

Recientemente se ha propuesto otro modelo filogenético, llamado “el anillo de la vida” (Rivera y Lake 2004), que incorpora la idea del movimiento lateral de genes a grandes distancias filogenéticas y utiliza el análisis de genomas completos. Este nuevo planteamiento, en vez de proponer las tres grandes divisiones ya mencionadas, sugiere un árbol filogenético en forma circular en el que se representa el genoma eucarionte como la fusión de dos genomas procariontes distintos, lo cual nos habla sobre las relaciones evolutivas más antiguas, que hasta ahora no habían podido resumirse en filogenias (Martin y Embley 2004).

En cualquier caso, éste es el inicio de una nueva etapa. La interpretación de los datos para la reconstrucción genómica de las comunidades no ha sido fácil, por la gran cantidad de eventos de recombinación y transferencia horizontal de los genes. Así, se han obtenido pocos metagenomas completos, sólo dos en el caso del grupo de Tyson, y seis en el de Venter, siendo una técnica poco accesible por ahora para los microbiólogos (Falkowski y de Vargas 2004). No hay que olvidar además que la presencia de genes no implica necesariamente su expresión, por lo que la detección de la expresión de ARN o de las proteínas tendrá que tomarse en cuenta también para entender el papel y el contexto ecológico de las poblaciones de microorganismos.

Estamos pues, iniciando el desarrollo de una nueva disciplina en la microbiología. Todavía queda mucho por hacer y mucho que acordar, pero es un hecho que las bases teóricas y metodológicas de la ecología microbiana están en proceso de transformación.

OBJETIVOS

General

Describir las clonas ambientales de bacterias obtenidas en cuerpos de agua en los valles de Cuatro Ciénegas, Calaveras y el Hundido, utilizando secuencias del gen 16S ARNr.

Particulares

- Obtener y analizar la genealogía de las secuencias.
- Caracterizar los patrones de distribución de los phyla obtenidos.
- Obtener datos que permitan analizar el origen de las secuencias y determinar si los patrones de origen obtenidos son similares a los de otros cuerpos de agua salada en el mundo.

HIPÓTESIS

H₀: Las clonas ambientales de Cuatro Ciénegas son un reflejo de la amplia distribución de los microorganismos en el mundo, por lo que obtendremos patrones similares a otros estudios en lagos salados de otras partes del planeta.

H_i: Las clonas ambientales de Cuatro Ciénegas reflejan el origen del lugar, por lo que los patrones obtenidos serán característicos y distintos a los patrones de lagos salados en otras partes del mundo.

OBJETIVOS

General

Describir las clonas ambientales de bacterias obtenidas en cuerpos de agua en los valles de Cuatro Ciénegas, Calaveras y el Hundido, utilizando secuencias del gen 16S ARNr.

Particulares

- Obtener y analizar la genealogía de las secuencias.
- Caracterizar los patrones de distribución de los phyla obtenidos.
- Obtener datos que permitan analizar el origen de las secuencias y determinar si los patrones de origen obtenidos son similares a los de otros cuerpos de agua salada en el mundo.

HIPÓTESIS

H₀: Las clonas ambientales de Cuatro Ciénegas son un reflejo de la amplia distribución de los microorganismos en el mundo, por lo que obtendremos patrones similares a otros estudios en lagos salados de otras partes del planeta.

H₁: Las clonas ambientales de Cuatro Ciénegas reflejan el origen del lugar, por lo que los patrones obtenidos serán característicos y distintos a los patrones de lagos salados en otras partes del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

I Sitios de colecta

En octubre de 2002 se hizo la colecta de muestras de agua en los sitios indicados en el mapa presentado en el apartado Antecedentes (véase figura A1). Las coordenadas y características del tipo de muestra se especifican en la tabla 1.

Valle en que fue colectada	Nombre del lugar	Tipo de muestra	Coordenadas		Nombre asignado a las clonas
			Lat. (N)	Long. (O)	
Cuatro Ciénegas	1. Escobedo	Sedimento	26°53.51'	102°05.178'	CC.xP
Cuatro Ciénegas	1. Escobedo	Columna de agua de manantial	26°53.51'	102°05.178'	CC16.x
Cuatro Ciénegas	2. Mina Rosario	Columna de agua en la mina 600 m profundidad	26°41.3'	101°47.65'	Rosario24.x
Hundido	3. Hundido	Columna de agua de manantial	26°35.6'	102°12.86'	Hundido26.x
Hundido	4. Tanque Nuevo	Pozo de riego 200 m profundidad	26°32.245'	102°10.103'	Hundidotn.x
Hundido	5. Santa Teresa	Pozo de riego 200 m profundidad	26°32.245'	102°10.103'	Hundidost.x
Calaveras	6. Rancho el Retiro	Columna de agua	27°03.87'	102°08.75'	Calaveras27.x
Calaveras	7. Rancho la Luz	Columna de agua	27°02.875'	102°06.375'	Calaveras28.x
Calaveras	8. Rancho la Ximena	Columna de agua	27°05.07'	102°11.5'	Calaveras29.x

Tabla 1. El número del sitio de colecta se indica en el nombre de cada clona (excepto en las clonas "CCxP") a la izquierda del punto. Para el Hundido, "tn" significa Tanque Nuevo y "st" Santa Teresa; "x" es el número de cada clona.

II Colecta de muestras

Se utilizaron galones con agua para beber; el agua se desechó en el momento; a continuación, el bote se enjuagó primero con un poco de agua del sitio para de inmediato llenarlo con ella.

El día de la colecta se filtró el agua a través de filtros Millipore de 0.45 mm, los cuales se guardaron congelados para procesarlos después.

III Extracción de ADN ambiental

Cada uno de los filtros fue procesado con el kit "Ultra Clean Water DNA" (Mo Bio Lab. Inc), de acuerdo al instructivo con algunas modificaciones (véase Apéndice I).

IV PCR

El gen que codifica para el 16S ARNr fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos universales (para bacterias y arqueas):

515F (5'-GCGGATCCTCTAGACTGCAGTGCCAGCAGCCGC GGTA-3') y 1492R (5'-GGCTCGAGCGGCCGCCCCGGTTACCTTGTTACGA CTT-3')

(Angert *et al.* 1998), en las condiciones del Apéndice II.

V Clonación

Para clonar los productos de PCR, se utilizó una mezcla de tres amplificaciones por cada muestra de ADN; la banda del tamaño correspondiente se extrajo en geles de agarosa con el kit "Quiaquick gel extraction" de Quiagen (véase Apéndice III).

La clonación de los productos se hizo en el vector pCR2.1 de acuerdo a las indicaciones del kit "TOPO A Cloning de Invitrogene", también con algunas modificaciones (véase Apéndice IV).

Las clonas con inserto se seleccionaron de acuerdo al tamaño del plásmido observado en un gel de agarosa al 1% (véase Apéndice IV).

VI Secuenciación

Los plásmidos con inserto se aislaron con el kit "SNAP miniprep" (Invitrogen Corp, San Diego Calif., (véase Apéndice V), y fueron secuenciados en la Universidad de Arizona con los oligos M13F (para las secuencias iniciales) y M13R.

Las clonas obtenidas de sedimento (véase tabla 1) fueron generosamente donadas por Lourdes Lloret; los plásmidos fueron aislados y secuenciados de la misma manera que los nuestros.

VII Análisis de secuencias

En total se obtuvieron 98 secuencias iniciales (utilizando el oligo M13F), de aproximadamente 350 pb, que fueron editadas y alineadas en BioEdit, para después compararlas con secuencias conocidas utilizando BLAST (Atschul *et al.* 1990) en MedLine. Con estos datos se asignó a cada clona su afiliación filogenética aproximada. Para asignar los nombres taxonómicos de cada phylum se utilizaron como referencias el *Manual de Bergey's* (Garrity 2001) y el libro *Brock microbiología de microorganismos* (Madigan *et al.* 2000), así como el trabajo de Rappé y Giovannoni en 2003.

Fueron seleccionadas 50 clonas por ser distintas entre ellas en más del 2%, las cuales se mandaron a secuenciar en ambos extremos. Las secuencias fueron ensambladas en BioEdit y se trabajó con el cromatograma de cada una manualmente, para evitar errores en las bases. Una vez revisadas y ensambladas, algunas fueron descartadas por mala calidad de la secuencia o la posibilidad de un origen quimérico. Se hicieron tres tipos de análisis para detección de quimeras: con el programa "Chimera_Check" del RDB (Cole *et al.* 2003), con el programa "Bellerephon" (Huber *et al.* 2004) y por detección de incongruencias en el orden de las ramas; se generaron árboles genealógicos inferidos en distintas zonas del alineamiento (533-873 y 874-1215, numeración de *E. coli*).

Se obtuvieron 38 filotipos únicos, cuyas secuencias se analizaron nuevamente en BLAST (Atschul *et al.* 1990) y en Sequence Match en RDB (Cole *et al.* 2003), y la secuencia más parecida propuesta por cada una de las bases de datos fue seleccionada y alineada para el análisis filogenético.

Se utilizaron 690 pb comunes a todas las secuencias (de 533 a 1215 numeración de *E. coli*) para generar árboles mediante los métodos de "Neighbor Joining" y Máxima Parsimonia en el programa MEGA2. Estas secuencias fueron registradas en la base de datos del GenBank (véase Apéndice VI)

VIII Origen de las secuencias de referencia

Se investigó el sitio de muestreo del que proceden las secuencias más parecidas a las clonas obtenidas en nuestro análisis. Este dato de origen o procedencia no siempre se obtiene directamente; para muchas secuencias se tuvo que investigar en el artículo en el que fueron publicadas, y, en algunos casos, fue preciso consultar en las bases de datos de colecciones de bacterias como el ATCC.

IX Análisis comparativo con otros artículos

Se trabajó con las clonas o secuencias del gen para el 16S ARNr obtenidas en otros estudios, con el fin de compararlas con las de Cuatro Ciénegas. Seleccionamos 9 artículos con las siguientes características: 1) estudios con metodologías similares (principalmente que se trabajara con secuencias ambientales del gen para el 16S ARNr, en clonas o SSCP); 2) con un registro en GenBank de las secuencias para tener acceso a ellas; y 3) que fueran representativos de distintos hábitats: tanto de cuerpos de agua similares a Cuatro Ciénegas, como de otros diferentes.

Se obtuvieron las secuencias reportadas para cada artículo, analizándose cada una mediante un BLAST; se formó así una base de datos en la cual se incluyó lo siguiente: el número de acceso de las cinco primeras secuencias más parecidas -muchas de los registros en GenBank pertenecen a la misma clona obtenida varias veces en cada estudio, por lo que se eliminaron aquellas que provenían del mismo artículo y que tuvieran porcentaje de similitud y valor E iguales-, el porcentaje de similitud y también el valor E; además se investigó el origen de cada una de esas cinco secuencias.

El programa BLAST despliega en orden descendiente las secuencias más parecidas que encuentra en su base de datos, por lo cual se trabajó principalmente con la primera de ellas. Se calculó un "índice marino" para cada secuencia reportada, de la siguiente manera: se asignó un valor de uno (1) si se trataba de una muestra de origen marino, o de cero (0) para las muestras no marinas. Si el porcentaje de similitud y el valor de E eran iguales entre la primera y las siguientes secuencias propuestas, se les asignó valores también a las siguientes (cinco máximo), y para obtener el "índice marino" se hizo un promedio entre ellas. Se eliminaron del análisis las secuencias en las que se obtuvieron índices de similitud menores que 90%.

Para cada artículo se promediaron los valores asignados a cada una de sus secuencias y se calcularon tanto la media como el error estándar. Con estos valores se calculó una prueba de T y ANOVA con los paquetes JMP y STATISTICA.

RESULTADOS

I Descripción y distribución de las clonas ambientales

Del muestreo en Cuatro Ciénegas en octubre de 2002, se obtuvieron 98 clonas, cuyas secuencias se analizaron por BLAST, utilizando un solo sentido de la secuencia (aprox. unos 350 pares de bases), para obtener la distribución filogenética aproximada que se muestra en las figuras R1 y R2.

Con esta información, es posible definir cuáles son los filotipos más abundantes que forman parte de los ecosistemas acuáticos muestreados en Cuatro Ciénegas, y hacer una descripción de la diversidad de las comunidades, considerando diversidad como "el número de clonas obtenidas por cada filotipo". La mayor parte de la diversidad está representada por las proteobacterias y, en menor proporción, bacterias de otros 7 phyla: *Nitrospira*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*. Las gamma proteobacterias son el grupo dominante (40%) y además de las secuencias de bacterias logramos obtener algunas secuencias de arqueas. Cada sitio de muestreo tiene condiciones ambientales distintas que determinan una composición de la comunidad diferente (véase tabla 1).

Sitio	pH	Conductividad específica ($\mu\text{S/cm}$)
16 Escobedo	7.58	2 040
24 Mina Rosario	8.0	5 000
26 El Hundido	6.9	3 200
27 Calaveras (El Retiro)	7.0	2 900
28 Calaveras (La Luz)	7.0	2 750
29 Calaveras (La Ximena)	7.1	3 430

Tabla 1. pH y conductividad de cada muestra (datos medidos por Ana Escalante).

En los Valles del Hundido y Calaveras (véase figura R2), encontramos una mayor predominancia del grupo de proteobacterias, y obtuvimos representantes de 2 phyla de bacterias, a diferencia de Cuatro Ciénegas y Mina Rosario, en los que obtuvimos 5 y 4 phyla, respectivamente.

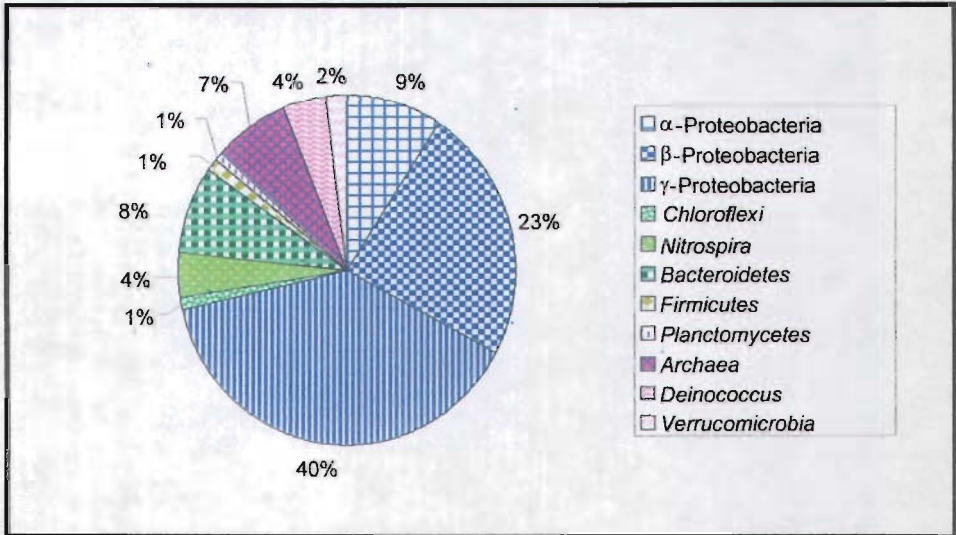


Figura R1. Distribución filogenética de las 98 clonas del estudio.

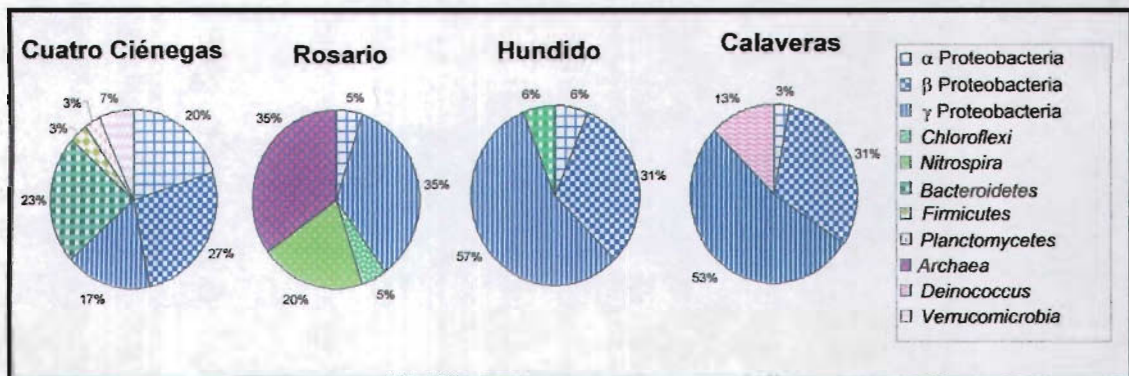


Figura R2. Distribución filogenética de las 96 clonas del estudio por valles. Véase tabla 2 para la distribución de las muestras en cada valle.

Se eliminaron 21 clonas que no fueron consideradas en los análisis posteriores, por la calidad de las secuencias o por los resultados de los análisis de detección de quimeras.

El número de clonas que se utilizaron para cada análisis se muestra en la tabla 2.

Origen por sitio de muestreo o por valles		Número de clonas para el análisis de diversidad		Número de clonas para el análisis de origen	
16 Escobedo (agua)	Valle Cuatro Ciénegas	13	30	9	26
16 Escobedo (suelo)		17		17	
24 Mina Rosario	Mina Rosario	20	20	14	14
26 Hundido	Valle del Hundido	13	16	9	12
Tanque Nuevo y Santa Teresa		3		3	
27 Calaveras (El Retiro)	Valle Calaveras	5	32	2	25
28 Calaveras (La Luz)		10		7	
29 Calaveras (La Ximena)		17		16	
Total		98		77	

Tabla 2. Número de clonas utilizadas en este trabajo.

II Quimeras

Con los tres tipos de análisis que se hicieron (Quimera check, bellerephon y análisis de ramas de árbol, véase apartado Material y métodos) se identificaron 7 quimeras, formadas por la unión de fragmentos entre distintos tipos de bacterias (véase tabla 3).

Clona	Grupo filogenético asociado a la primera parte del fragmento	RDB ¹	Grupo filogenético asociado a la segunda parte del fragmento	RDB ¹
16.10	β proteobacteria (<i>Dechlorimonas</i>)	0.843	CFB (<i>Thermonema lapsum</i>)	0.566
16.27	α proteobacteria (<i>Aquaspirillum</i>)	0.824	CFB (<i>Bacteroides cellulosolvens</i>)	0.829
26.8	γ proteobacteria (<i>Reinheimnera</i>)	0.902	γ proteobacteria (<i>Aeromonas</i>)	1.000
26.17	CFB (<i>Flavobacteria</i> clona bs3)	0.884	γ proteobacteria (<i>Reinheimnera</i> htb021)	0.983
26.19	β proteobacteria (<i>Acidovorax temperans</i>)	0.952	γ proteobacteria (<i>Pseudomonas flavescens</i>)	0.957
28.17	Deinococcus (<i>Deinococcus grandis</i>)	0.936	γ proteobacteria (<i>Pseudomonas</i> sp)	0.982
29.23	γ proteobacteria (SCB11)	0.829	α proteobacteria	0.945

Tabla 3. Fragmentos de PCR que formaron parte de las quimeras obtenidas.

¹: Índice de similitud reportado por el RDB

III Análisis de origen en las secuencias

Al comparar las secuencias de este trabajo con las bases de datos mundiales, se observó que muchas de las secuencias que las bases de datos mostraban como las más parecidas a las nuestras provenían de estudios realizados en ambientes marinos, por lo cual decidimos estructurar la información sobre estas secuencias utilizando dos bases de datos distintas (GENBANK y RDB).

Las 77 clonas de mayor calidad que se obtuvieron fueron agrupadas en 38 representantes (véase tabla 4) a los que les llamaremos filotipos. Cada filotipo fue seleccionado de acuerdo a un índice de diferencia entre filotipos de $>2\%$. Estas 38 clonas se enviaron a secuenciar en ambos sentidos, y también fueron limpiadas y editadas manualmente, con el fin de utilizar un fragmento mayor, de aproximadamente 680 pb. En la véase tabla 3 se reporta cuál es la secuencia que fue encontrada por estas dos bases de datos como la más similar; en la siguiente columna a la derecha se anota el lugar donde se obtuvo esa secuencia, y también se anotó el índice de similitud con respecto a la secuencia obtenida en Cuatro Ciénegas.

Grupo filogenético	Clona	N	GenBank			RDB			
			Secuencia más parecida	Procedencia	IS	Secuencia más parecida	Procedencia	IS	
α Proteobacteria	CC41P	1	AJ002565	Marino	97	AJ002565	Marino	97	
	CC42P	1	AY442178	No reportado	98	AB026194	Marino	96	
	CC37P	1	AY258088	Marino	97	X78315	Marino	93	
	CC43P	1	AY258085	Marino	99	AF098495	Marino	95	
	Rosario24.28	1	AJ567562	Marino	90	AF104473	Marino	88	
β proteobacteria	Hundido26.12	1	AY212600	Agua dulce	97	AJ227774	Lodos activados	95	
	CC16.24	6	AF236005	No reportado	98	AF078756	Agua destilada	98	
	Hundido26.13	1	AJ556799	Agua dulce	99	AF089858	Agua dulce	97	
	Hundido1tn6	1	AF422679	Sedimento, lago Waiau	95	AJ130765	No reportado	94	
	Hundido2st6	1	AF011347	Raíces	99	AF011347	Raíces	99	
γ Proteobacteria	Hundido1tn4	1	AF035052	Agua dulce	99	AF035052	Agua dulce	99	
	Calaveras27.3	2	AF522999	Agua dulce	100	Y10146	Raíces	94	
	Calaveras28.21	5	AF227863	No reportado	96	AB021385	Suelo	97	
	CC30P	1	AY310506	Marino	95	U77478	Ventila hidrotermal	93	
	CC38P	1	AF328198	Fango móvil	98	AJ240993	Marino	92	
	CC45P	1	AY171368	Marino	97	AJ240993	Marino	94	
	CC44P	1	D89929	Marino	93	AF172991	Marino	92	
	CC32P	1	AJ514914	Marino	99	X74716	Marino	99	
	Rosario24.17	5	AY499915	Marino	95	L25711	Marino	94	
	Hundido26.20	2	AY328792	Agua dulce	99	AJ002813	Estómago de microartrópodo	94	
Chloroflexi	Hundido26.11	2	AY493941	Suelo	99	AJ002006	Marino	96	
	Hundido26.7	3	AY212677	Agua dulce	98	AB010858	Marino	97	
	Calaveras29.29	14	AY028398	Marino	95	Z31658	Marino	96	
	Calaveras29.17	1	AY095889	Marino	99	U70696	Marino	97	
	Calaveras29.1	1	AY345489	Sedimento, lago Waiau	99	Y18228	Marino	99	
	Rosario24.49	1	AF524023	Humedal reforestado	91	AF050608	Agua profunda contaminada	88	
	Nitrospira	Rosario24.38	1	AY493920	Suelo	95	Z95707	Suelo	93
		Bacteroidetes	CC16.31	1	AY258122	Marino	90	M58792	Suelo
	CC31P		1	AJ567581	Marino	93	AB015524	Marino	92
	CC36P		1	AF521195	Marino	91	M62799	Marino	86
CC26P	1		AB116508	Marino	95	AF170779	Marino	87	
CC50P	1		AF188173	Marino	89	M58792	Suelo	90	
CC27P	2		AY345434	Agua del lago Kauhako	94	M62799	Marino	91	
Firmicutes	CC16.23		1	AB011057	Composta	91	X71847	Pasto en proceso de composta	92
	Planctomycetes		CC16.22	1	AJ519649	Depósitos de molienda de uranio	90	AJ131819	Biofilm
2		AY114325		Marino	98	AJ000726	Pozo petrolero	87	
Verrucomicrobia	CC29P	2	AB022911	No reportado	98	AB022911	No reportado	98	
									Deinococcus-Thermus
Archaea	Rosario24.44	6	AJ347776	Marino	94	AB019730	Ventila hidrotermal	93	

Tabla 4. Datos sobre las clonas (de acuerdo al origen de la secuencia más parecida en GenBank o RDB), agrupadas en filotipos. Para mayor información sobre estas secuencias, puede consultarse el Apéndice VII (IS, índice de similitud, en porcentaje).

Las secuencias propuestas por la base de datos del GenBank tienen índices de similitud mayores que las del RDB y, al agruparlas en rangos de similitud, el GenBank tiene una mayor cantidad de secuencias en el rango que va de 97% a 100% (tabla 5).

<i>Rango</i>	<i>GenBank</i>	<i>RDB</i>
85%-90%	4	8
91%-96%	15	20
97%-100%	20	11

Tabla 5. Comparación de la distribución de los índices de similitud de las secuencias más parecidas a nuestras clonas, propuestas por GenBank y RDB.

Una gran parte (cerca del 50%) de las secuencias propuestas por ambas bases de datos fue obtenida en ambientes marinos (figuras R3 y R4). En estas gráficas hay además secuencias que han sido aisladas de ambientes volcánicos como ventilas hidrotermales (9% para RDB) o lagos formados en cráteres de volcanes (6% para GenBank), y una proporción importante proviene de agua dulce (11 y 13% en RDB y GenBank) o de suelos (15% y 9% respectivamente).

Al dividir las muestras de acuerdo al valle donde fueron obtenidas (figuras R5 y R6), para los datos del RDB, observamos que, en los cuatro valles, existen secuencias de origen marino. En las propuestas por el Genbank, en todos los sitios hay secuencias relacionadas con el mar, excepto en el Valle del Hundido, con bacterias que provienen principalmente de agua dulce.

IV Análisis comparativo con otros artículos

La presencia de taxones marinos en Cuatro Ciénegas nos hace preguntarnos si en otros cuerpos de agua salados y alejados del mar también existen bacterias de origen marino, para lo cual investigamos el origen de otras clonas, reportadas en artículos con características similares a nuestro trabajo, en cuerpos de agua parecidos a Cuatro Ciénegas y también en hábitats distintos. El lugar de muestreo de cada artículo se muestra en la tabla 6, y los resultados de este análisis pueden verse en la figura R7 (en el Apéndice VIII se incluyen los resultados estadísticos detallados).

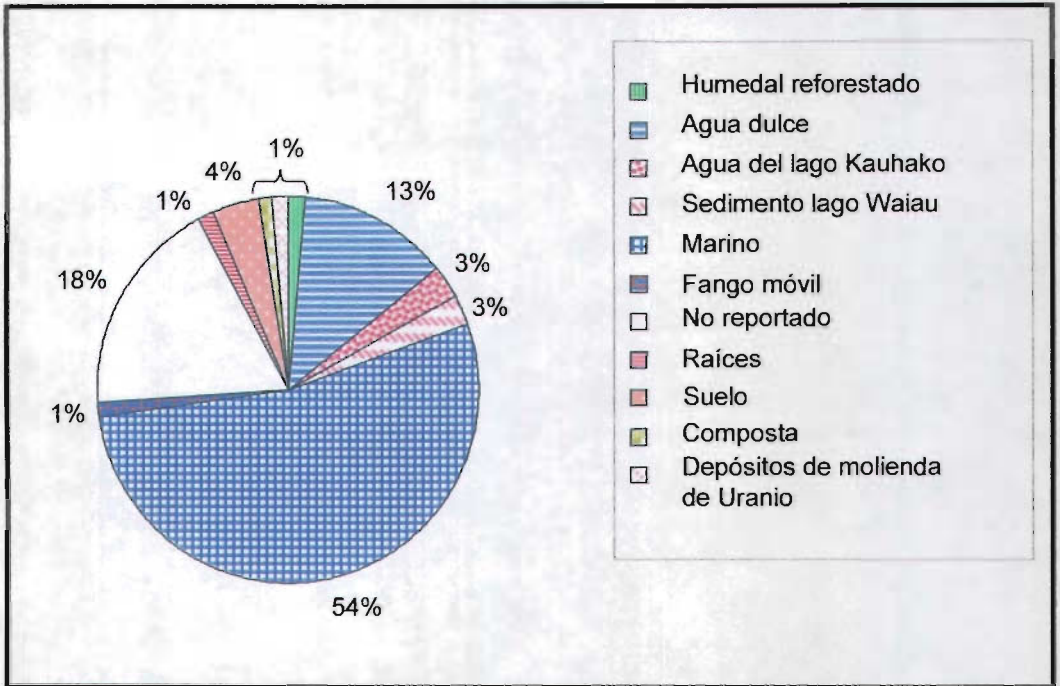


Figura R3. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en GenBank.

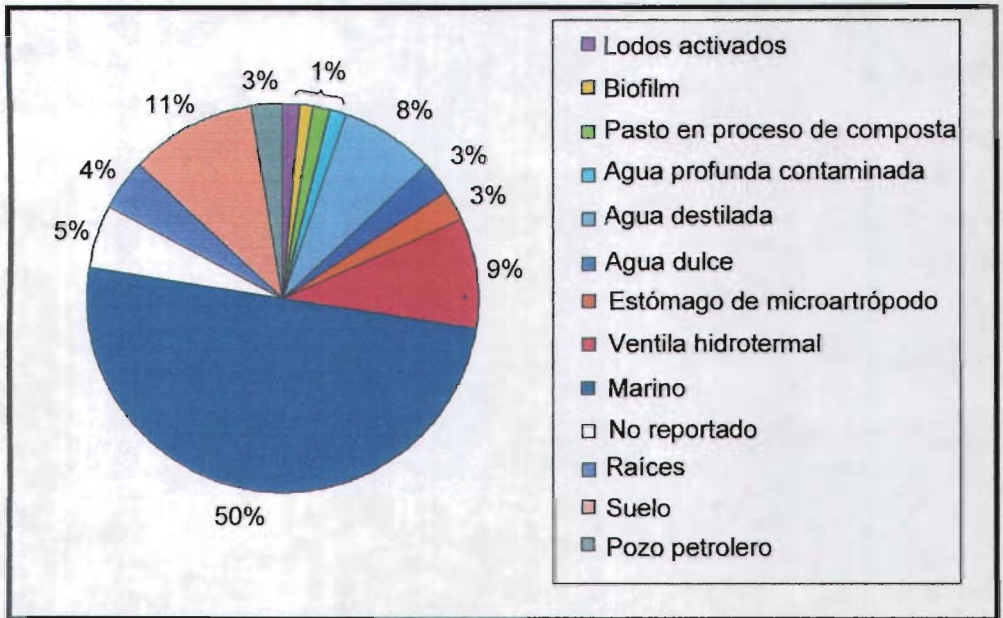


Figura R4. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en RDB.

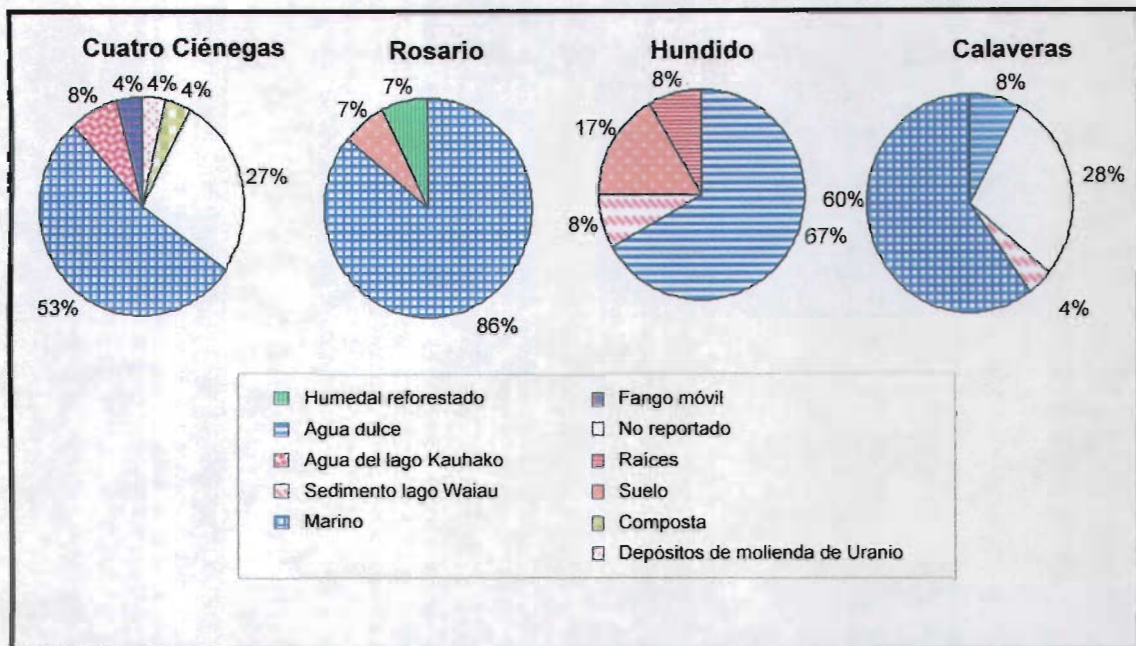


Figura R5. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en GenBank, distribuidas por valles.

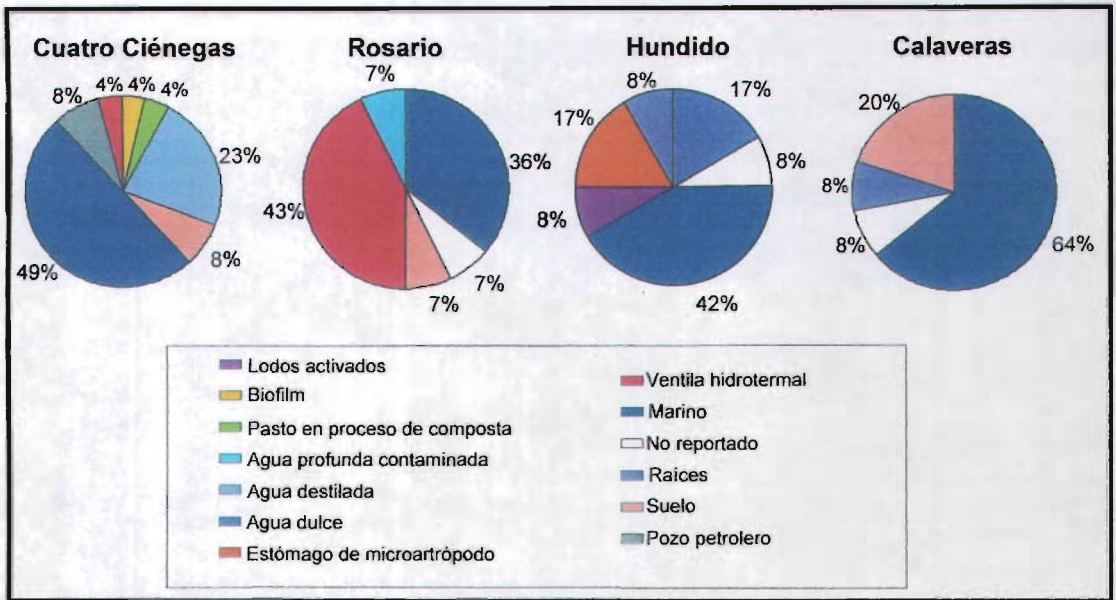


Figura R6. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en RDB, distribuidas por valles.

<i>Autor</i>	<i>Clonas analizadas</i>	<i>Lugar de estudio</i>
Este trabajo (CCC)	38	Cuatro Ciénegas, Coahuila
Casamayor <i>et al.</i> 2000 (LAGOSAL1)	21	Lagos sulfurosos: lago Cisó y Vilar, España
Demergasso <i>et al.</i> 2004 (LAGOSAL2)	31	Lagos en el desierto de Atacama, norte de Chile
Humayoun <i>et al.</i> 2003 (LAGOSAL3)	63	Mono Lake, California
Kuske <i>et al.</i> 1997 (SUELO)	39	Suelos áridos en el suroeste de EE UU
Sekigushi <i>et al.</i> 2002 (RÍO)	27	Río Changjiang, China
Angert <i>et al.</i> 1998 (RÍO SUBT.)	16	Río sulfuroso, Parker Cave, Kentucky
Madrid <i>et al.</i> 2001 (MAR)	68	Carriaco Basin
Bowman <i>et al.</i> 2000 (LAGOANT)	30	Lagos hipersalinos de la Antártida
Williams <i>et al.</i> 2004 (AGUA DULCE)	17	Agua potable

Tabla 6. Datos sobre los artículos elegidos para la comparación estadística con secuencias obtenidas en otros sistemas acuáticos y terrestres.

Recordemos que se analizaron las clonas o secuencias obtenidas en cada artículo, utilizando valores de cero (0) para las clonas o secuencias que en BLAST tuvieron un origen distinto al mar, y de uno (1) para las marinas. Para cada artículo se generó un promedio de los valores de todas las secuencias, y estos promedios por artículo se compararon estadísticamente. Obtuvimos que los artículos enfocados al estudio de bacterias marinas quedan agrupados junto con nuestro estudio (figura R7), con valores más cercanos a 1, y que son significativamente distintos del grupo de secuencias obtenidas en sitios no marinos (incluidos aquí lagos salados), con valores cercanos a 0, en la prueba de "T de student" y con ANOVA de $p > 0.001$.

V Genealogías

En los árboles se incluyeron las secuencias de las 38 clonas representativas, y, para cada una de las 38, también se alinearon otras dos secuencias similares, que son las propuestas por las dos bases de datos utilizadas (véase tabla 4).

Para las genealogías se utilizaron métodos distintos: "Neighbor Joining" y Máxima Parsimonia. En los dos casos obtuvimos genealogías similares, con una distribución de las clonas en los árboles muy parecida, por lo cual aquí presentamos uno de ellos, el de Máxima Parsimonia (figura R8), y el otro lo mostramos en el Apéndice IX.

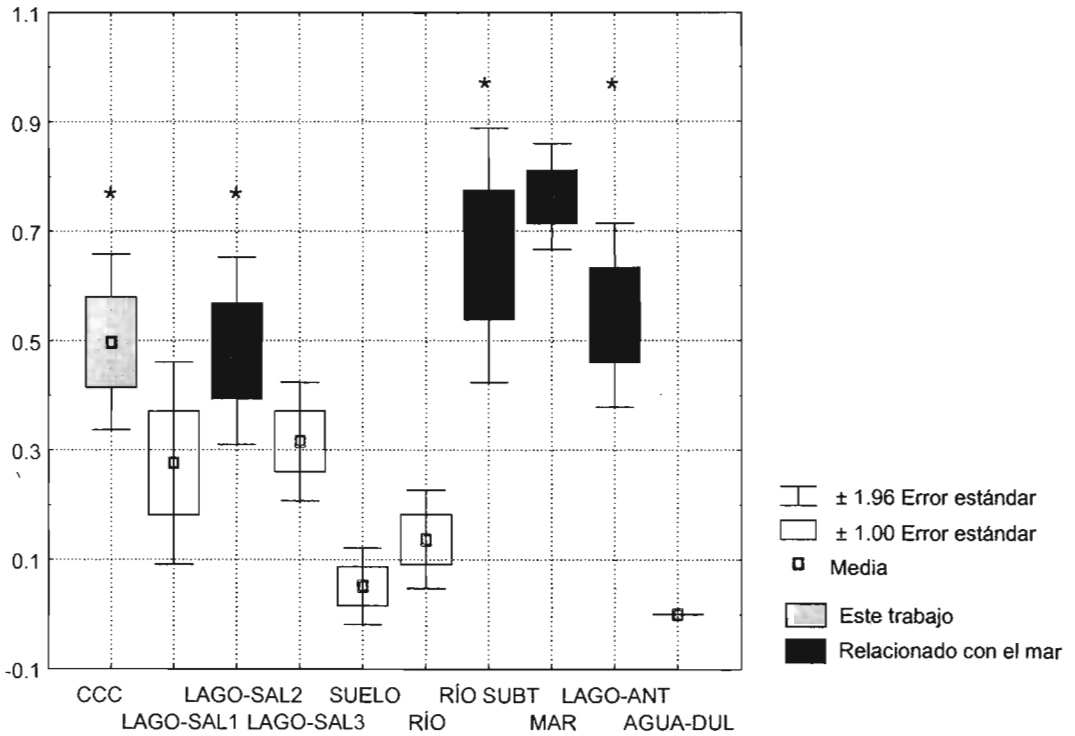


Figura R7. Análisis comparativo: promedios de los valores marino (1) o no marino (0) de las secuencias reportadas en 9 artículos (véase apartado Material y métodos). Con asterisco (*) se muestran los promedios que son similares y significativamente distintos al resto.

Sitio de muestreo

- ▲ Valle de Cuatro Ciénegas
- Valle del Hundido
- Valle Calaveras
- ◆ Mina Rosario

Origen de las secuencias más cercanas

- Marinas
- Suelo
- Agua dulce
- Volcánico
- No reportado u otro

1000 bootstrap, árbol con MP de 690 pb de las clonas del 16S

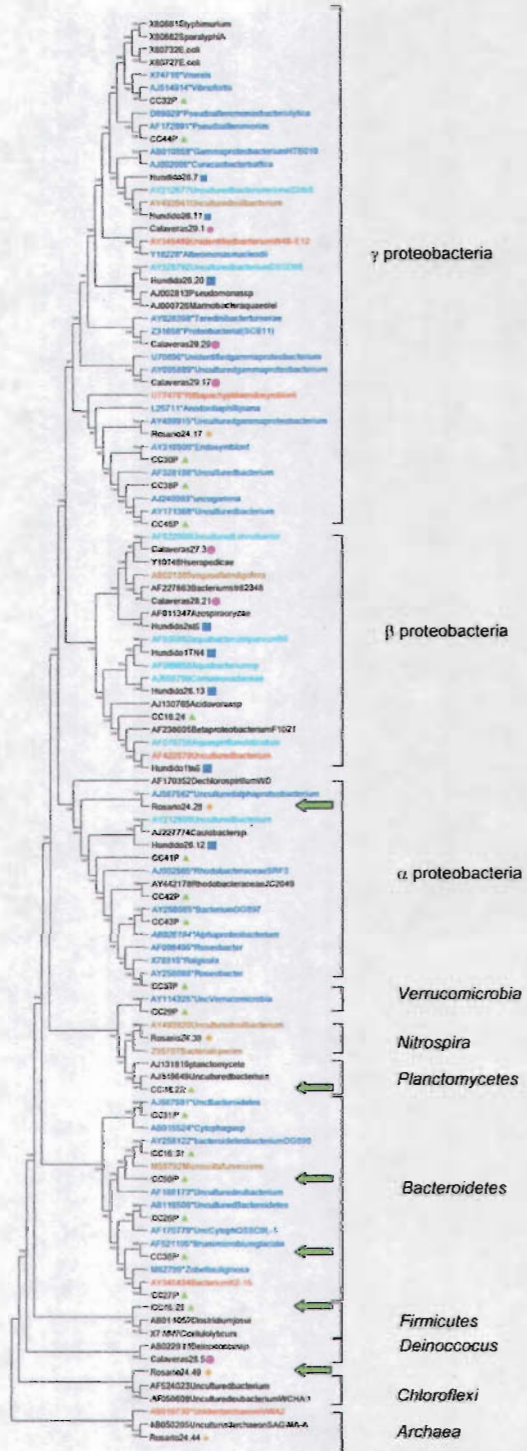


Figura R8. Árbol filogenético. Con flechas se muestran las posibles clonas endémicas

Nuestra genealogía es congruente con las reportadas para las bacterias. Entre las proteobacterias, el grupo beta proteobacterias forma un subgrupo de las gamma proteobacterias, como ya se ha reportado (Woese, en *The Prokaryotes*). En nuestro caso hemos notado además que los dos grupos de gamma proteobacteria que se forman podrían estar asociados a bacterias reductoras y no reductoras de azufre, de acuerdo a los datos obtenidos de las secuencias más parecidas a nuestras clonas (véanse tabla 4 y apéndice VII).

Todos los tipos de bacterias están distribuidos en forma uniforme en el árbol, y no se observa alguna correlación entre los tipos de bacteria con el valle de donde proceden.

Las posibles seis clonas endémicas que tuvieron menor índice de similitud, valor E y *score (bits)* en el BLAST, y/o que en todos los árboles formaron filotipos únicos, están marcadas con flechas en el árbol (CC50P, CC36P, CC16.22, CC16.23, Rosario24.28 y Rosario24.49).

También en el árbol puede observarse la asociación de las clonas de Cuatro Ciéngas con secuencias de referencia que tienen un origen marino, secuencias que pertenecen a 4 phyla: alfa y gamma proteobacterias, *Bacteroides*, *Verrucomicrobia* y arqueas. Además, podemos notar que las clonas de Cuatro Ciéngas presentan menor distancia hacia las secuencias propuestas por BLAST que a las propuestas por RDB; esto es, hay mayor similitud hacia las que provienen del GenBank.

RESULTADOS

I Descripción y distribución de las clonas ambientales

Del muestreo en Cuatro Ciénegas en octubre de 2002, se obtuvieron 98 clonas, cuyas secuencias se analizaron por BLAST, utilizando un solo sentido de la secuencia (aprox. unos 350 pares de bases), para obtener la distribución filogenética aproximada que se muestra en las figuras R1 y R2.

Con esta información, es posible definir cuáles son los filotipos más abundantes que forman parte de los ecosistemas acuáticos muestreados en Cuatro Ciénegas, y hacer una descripción de la diversidad de las comunidades, considerando diversidad como “el número de clonas obtenidas por cada filotipo”. La mayor parte de la diversidad está representada por las proteobacterias y, en menor proporción, bacterias de otros 7 phyla: *Nitrospira*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*. Las gamma proteobacterias son el grupo dominante (40%) y además de las secuencias de bacterias logramos obtener algunas secuencias de arqueas. Cada sitio de muestreo tiene condiciones ambientales distintas que determinan una composición de la comunidad diferente (véase tabla 1).

Sitio	pH	Conductividad específica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
16 Escobedo	7.58	2 040
24 Mina Rosario	8.0	5 000
26 El Hundido	6.9	3 200
27 Calaveras (El Retiro)	7.0	2 900
28 Calaveras (La Luz)	7.0	2 750
29 Calaveras (La Ximena)	7.1	3 430

Tabla 1. pH y conductividad de cada muestra (datos medidos por Ana Escalante).

En los Valles del Hundido y Calaveras (véase figura R2), encontramos una mayor predominancia del grupo de proteobacterias, y obtuvimos representantes de 2 phyla de bacterias, a diferencia de Cuatro Ciénegas y Mina Rosario, en los que obtuvimos 5 y 4 phyla, respectivamente.

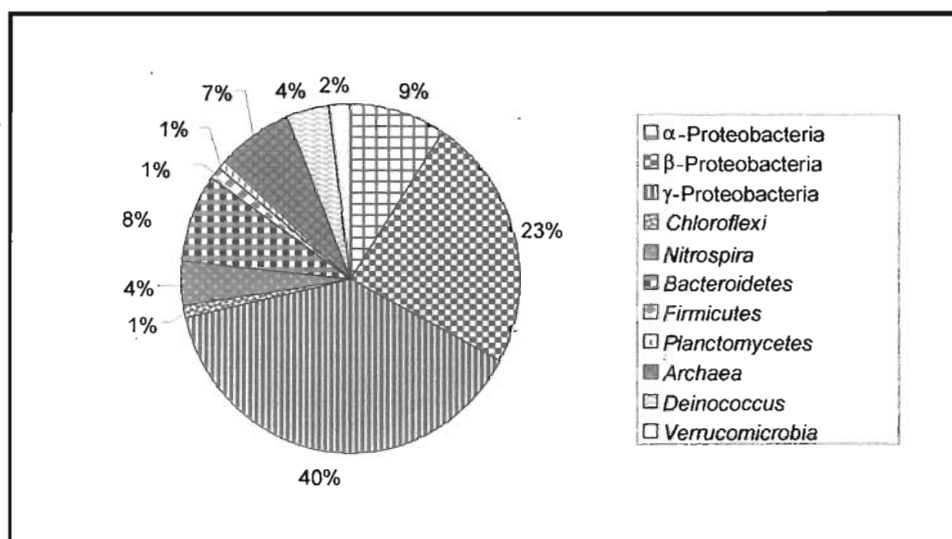


Figura R1. Distribución filogenética de las 98 clonas del estudio.

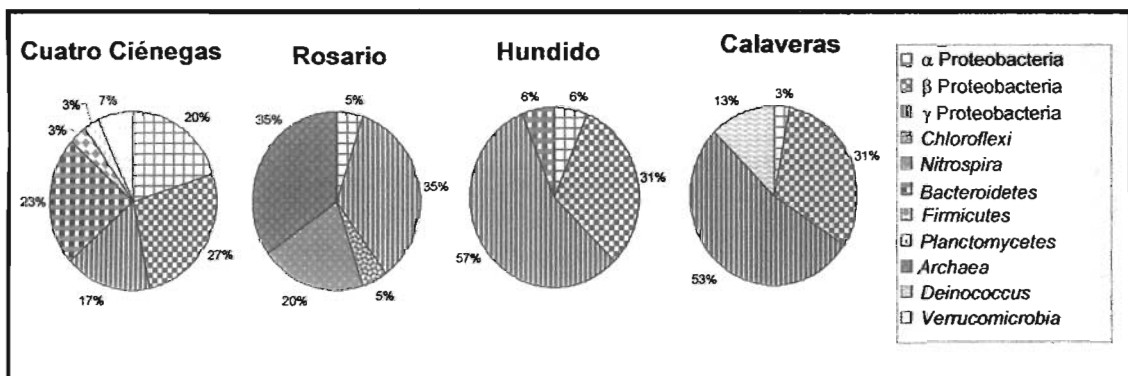


Figura R2. Distribución filogenética de las 96 clonas del estudio por valles. Véase tabla 2 para la distribución de las muestras en cada valle.

Se eliminaron 21 clonas que no fueron consideradas en los análisis posteriores, por la calidad de las secuencias o por los resultados de los análisis de detección de quimeras.

El número de clonas que se utilizaron para cada análisis se muestra en la tabla 2.

Origen por sitio de muestreo o por valles		Número de clonas para el análisis de diversidad		Número de clonas para el análisis de origen	
16 Escobedo (agua)	Valle Cuatro Ciénegas	13	30	9	26
16 Escobedo (suelo)		17		17	
24 Mina Rosario	Mina Rosario	20	20	14	14
26 Hundido	Valle del Hundido	13	16	9	12
Tanque Nuevo y Santa Teresa		3		3	
27 Calaveras (El Retiro)	Valle Calaveras	5	32	2	25
28 Calaveras (La Luz)		10		7	
29 Calaveras (La Ximena)		17		16	
Total		98		77	

Tabla 2. Número de clonas utilizadas en este trabajo.

II Quimeras

Con los tres tipos de análisis que se hicieron (Quimera check, bellerephon y análisis de ramas de árbol, véase apartado Material y métodos) se identificaron 7 quimeras, formadas por la unión de fragmentos entre distintos tipos de bacterias (véase tabla 3).

Clona	Grupo filogenético asociado a la primera parte del fragmento	RDB ¹	Grupo filogenético asociado a la segunda parte del fragmento	RDB ¹
16.10	β proteobacteria (<i>Dechlorimonas</i>)	0.843	CFB (<i>Thermonema lapsum</i>)	0.566
16.27	α proteobacteria (<i>Aquaspirillum</i>)	0.824	CFB (<i>Bacteroides cellulosolvens</i>)	0.829
26.8	γ proteobacteria (<i>Reinheimnera</i>)	0.902	γ proteobacteria (<i>Aeromonas</i>)	1.000
26.17	CFB (<i>Flavobacteria</i> clona bs3)	0.884	γ proteobacteria (<i>Reinheimnera</i> htb021)	0.983
26.19	β proteobacteria (<i>Acidovorax temperans</i>)	0.952	γ proteobacteria (<i>Pseudomonas flavescens</i>)	0.957
28.17	Deinococcus (<i>Deinococcus grandis</i>)	0.936	γ proteobacteria (<i>Pseudomonas</i> sp)	0.982
29.23	γ proteobacteria (SCB11)	0.829	α proteobacteria	0.945

Tabla 3. Fragmentos de PCR que formaron parte de las quimeras obtenidas.

¹: Índice de similitud reportado por el RDB

III Análisis de origen en las secuencias

Al comparar las secuencias de este trabajo con las bases de datos mundiales, se observó que muchas de las secuencias que las bases de datos mostraban como las más parecidas a las nuestras provenían de estudios realizados en ambientes marinos, por lo cual decidimos estructurar la información sobre estas secuencias utilizando dos bases de datos distintas (GENBANK y RDB).

Las 77 clonas de mayor calidad que se obtuvieron fueron agrupadas en 38 representantes (véase tabla 4) a los que les llamaremos filotipos. Cada filotipo fue seleccionado de acuerdo a un índice de diferencia entre filotipos de $>2\%$. Estas 38 clonas se enviaron a secuenciar en ambos sentidos, y también fueron limpiadas y editadas manualmente, con el fin de utilizar un fragmento mayor, de aproximadamente 680 pb. En la véase tabla 3 se reporta cuál es la secuencia que fue encontrada por estas dos bases de datos como la más similar; en la siguiente columna a la derecha se anota el lugar donde se obtuvo esa secuencia, y también se anotó el índice de similitud con respecto a la secuencia obtenida en Cuatro Ciénegas.

Grupo filogenético	Clona	N	GenBank			RDB			
			Secuencia más parecida	Procedencia	IS	Secuencia más parecida	Procedencia	IS	
α Proteobacteria	CC41P	1	AJ002565	Marino	97	AJ002565	Marino	97	
	CC42P	1	AY442178	No reportado	98	AB026194	Marino	96	
	CC37P	1	AY258088	Marino	97	X78315	Marino	93	
	CC43P	1	AY258085	Marino	99	AF098495	Marino	95	
	Rosario24.28	1	AJ567562	Marino	90	AF104473	Marino	88	
β proteobacteria	Hundido26.12	1	AY212600	Agua dulce	97	AJ227774	Lodos activados	95	
	CC16.24	6	AF236005	No reportado	98	AF078756	Agua destilada	98	
	Hundido26.13	1	AJ556799	Agua dulce	99	AF089858	Agua dulce	97	
	Hundido1tn6	1	AF422679	Sedimento, lago Waiau	95	AJ130765	No reportado	94	
	Hundido2s16	1	AF011347	Raíces	99	AF011347	Raíces	99	
γ Proteobacteria	Hundido1tn4	1	AF035052	Agua dulce	99	AF035052	Agua dulce	99	
	Calaveras27.3	2	AF522999	Agua dulce	100	Y10146	Raíces	94	
	Calaveras28.21	5	AF227863	No reportado	96	AB021385	Suelo	97	
	CC30P	1	AY310506	Marino	95	U77478	Ventila hidrotermal	93	
	CC38P	1	AF328198	Fango móvil	96	AJ240993	Marino	92	
	CC45P	1	AY171368	Marino	97	AJ240993	Marino	94	
	CC44P	1	D89929	Marino	93	AF172991	Marino	92	
	CC32P	1	AJ514914	Marino	99	X74718	Marino	99	
	Rosario24.17	5	AY499915	Marino	95	L25711	Marino	94	
	Hundido26.20	2	AY328792	Agua dulce	99	AJ002813	Estómago de microartrópodo	94	
	Hundido26.11	2	AY493941	Suelo	99	AJ002006	Marino	96	
	Hundido26.7	3	AY212677	Agua dulce	98	AB010858	Marino	97	
	Calaveras29.29	14	AY028398	Marino	95	Z31658	Marino	96	
	Calaveras29.17	1	AY095889	Marino	99	U70696	Marino	97	
	Calaveras29.1	1	AY345489	Sedimento, lago Waiau	99	Y18228	Marino	99	
<i>Chloroflexi</i>	Rosario24.49	1	AF524023	Humedal reforestado	91	AF050608	Agua profunda contaminada	88	
<i>Nitrospira</i>	Rosario24.38	1	AY493920	Suelo	95	Z95707	Suelo	93	
<i>Bacteroidetes</i>	CC16.31	1	AY258122	Marino	90	M58792	Suelo	85	
	CC31P	1	AJ567581	Marino	93	AB015524	Marino	92	
	CC36P	1	AF521195	Marino	91	M62799	Marino	86	
	CC26P	1	AB116508	Marino	95	AF170779	Marino	87	
	CC50P	1	AF188173	Marino	89	M58792	Suelo	90	
	CC27P	2	AY345434	Agua del lago Kauhako	94	M62799	Marino	91	
	<i>Firmicutes</i>	CC16.23	1	AB011057	Composta	91	X71847	Pasto en proceso de composta	92
					Depósitos de molienda de uranio				
<i>Planctomycetes</i>	CC16.22	1	AJ519649		90	AJ131819	Biofilm	85	
<i>Verrucomicrobia</i>	CC29P	2	AY114325	Marino	98	AJ000726	Pozo petrolero	87	
<i>Deinococcus-Thermus</i>	Calaveras28.5	2	AB022911	No reportado	98	AB022911	No reportado	98	
<i>Archaea</i>	Rosario24.44	6	AJ347776	Marino	94	AB019730	Ventila hidrotermal	93	

Tabla 4. Datos sobre las clonas (de acuerdo al origen de la secuencia más parecida en GenBank o RDB), agrupadas en filotipos. Para mayor información sobre estas secuencias, puede consultarse el Apéndice VII (IS, índice de similitud, en porcentaje).

Las secuencias propuestas por la base de datos del GenBank tienen índices de similitud mayores que las del RDB y, al agruparlas en rangos de similitud, el GenBank tiene una mayor cantidad de secuencias en el rango que va de 97% a 100% (tabla 5).

<i>Rango</i>	<i>GenBank</i>	<i>RDB</i>
85%-90%	4	8
91%-96%	15	20
97%-100%	20	11

Tabla 5. Comparación de la distribución de los índices de similitud de las secuencias más parecidas a nuestras clonas, propuestas por GenBank y RDB.

Una gran parte (cerca del 50%) de las secuencias propuestas por ambas bases de datos fue obtenida en ambientes marinos (figuras R3 y R4). En estas gráficas hay además secuencias que han sido aisladas de ambientes volcánicos como ventilas hidrotermales (9% para RDB) o lagos formados en cráteres de volcanes (6% para GenBank), y una proporción importante proviene de agua dulce (11 y 13% en RDB y GenBank) o de suelos (15% y 9% respectivamente).

Al dividir las muestras de acuerdo al valle donde fueron obtenidas (figuras R5 y R6), para los datos del RDB, observamos que, en los cuatro valles, existen secuencias de origen marino. En las propuestas por el Genbank, en todos los sitios hay secuencias relacionadas con el mar, excepto en el Valle del Hundido, con bacterias que provienen principalmente de agua dulce.

IV Análisis comparativo con otros artículos

La presencia de taxones marinos en Cuatro Ciénegas nos hace preguntarnos si en otros cuerpos de agua salados y alejados del mar también existen bacterias de origen marino, para lo cual investigamos el origen de otras clonas, reportadas en artículos con características similares a nuestro trabajo, en cuerpos de agua parecidos a Cuatro Ciénegas y también en hábitats distintos. El lugar de muestreo de cada artículo se muestra en la tabla 6, y los resultados de este análisis pueden verse en la figura R7 (en el Apéndice VIII se incluyen los resultados estadísticos detallados).

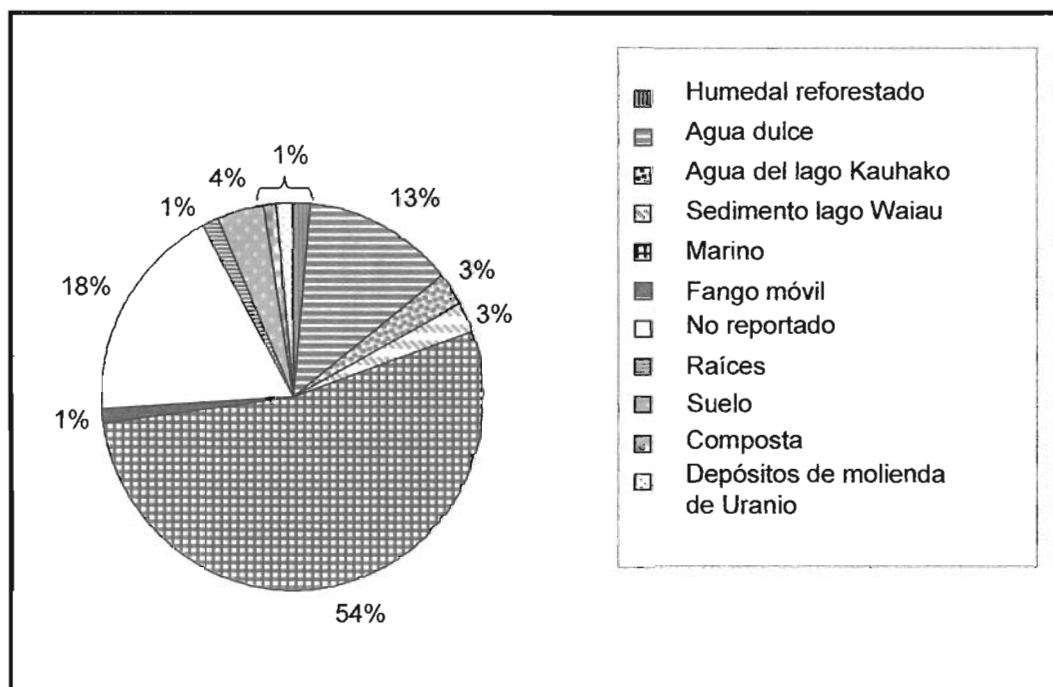


Figura R3. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en GenBank.

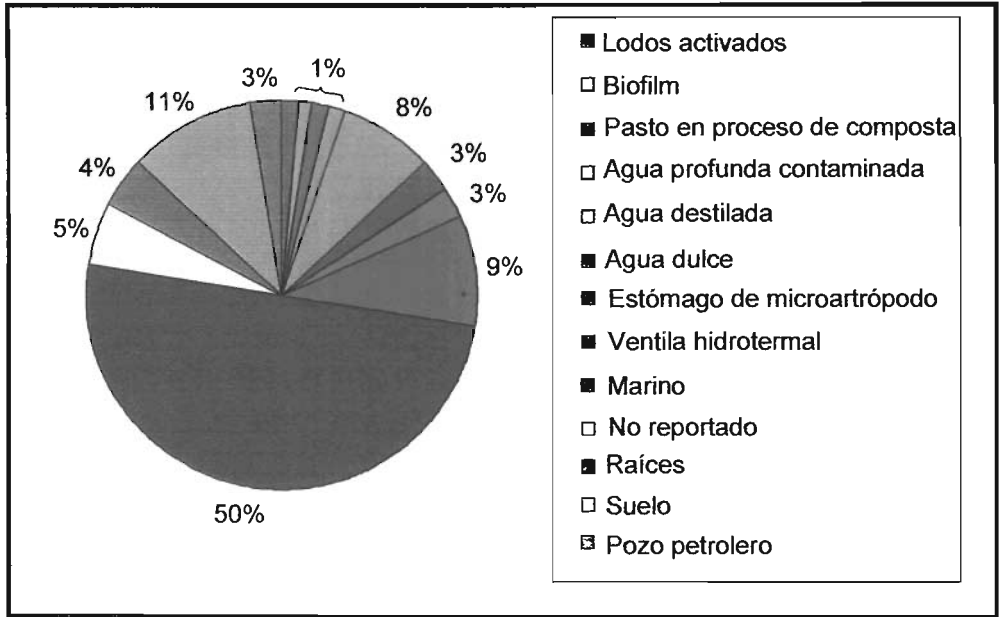


Figura R4. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en RDB.

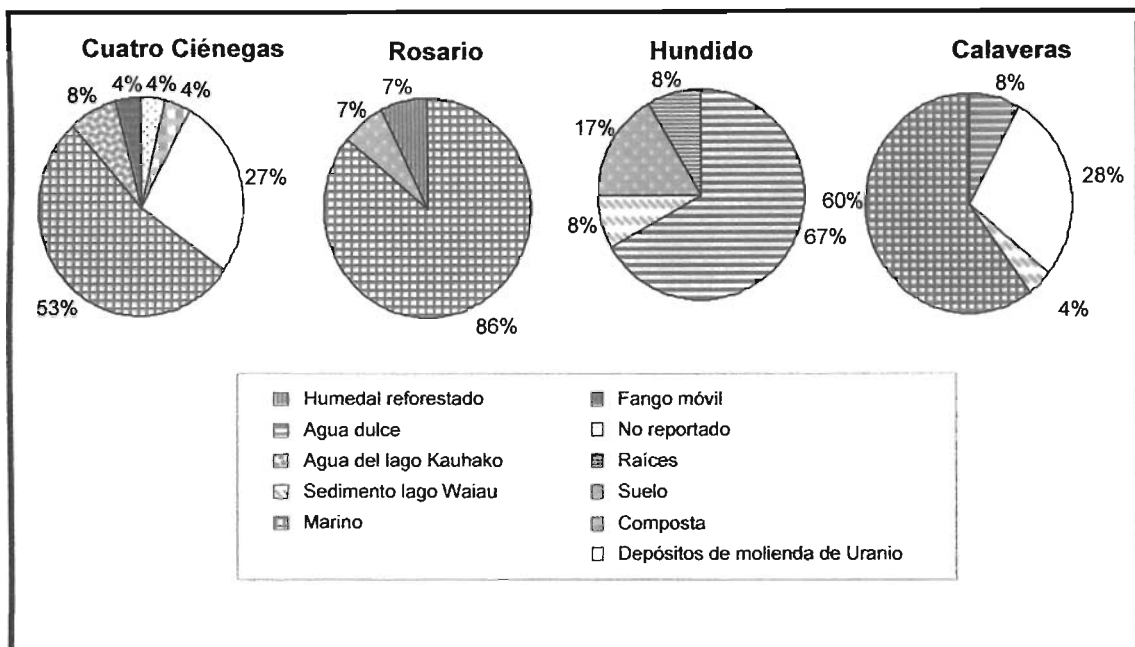


Figura R5. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en GenBank, distribuidas por valles.

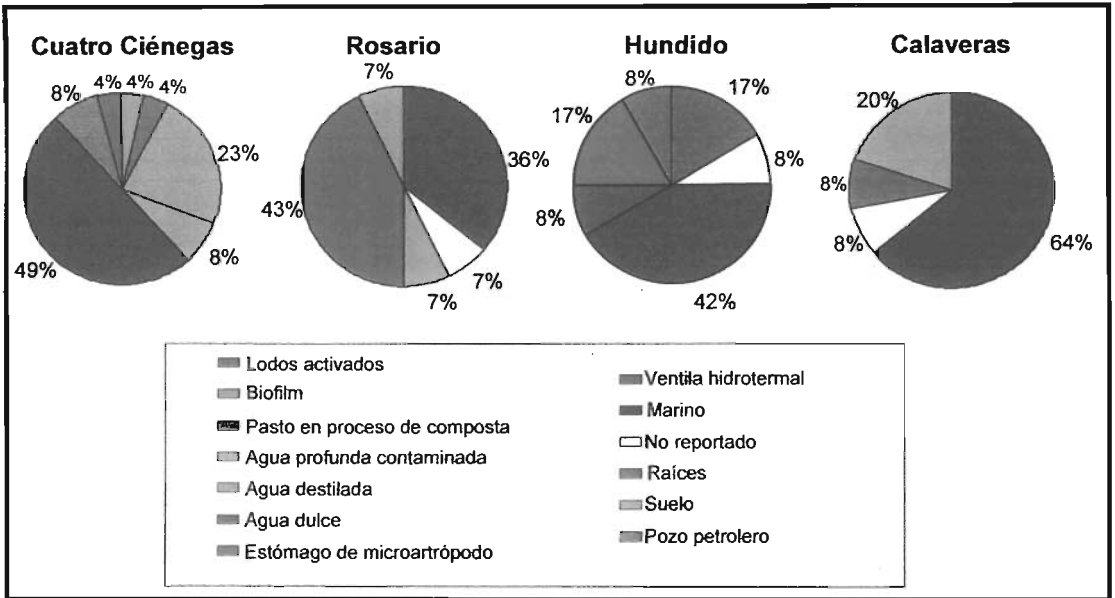


Figura R6. Origen de las secuencias más parecidas obtenidas en RDB, distribuidas por valles.

<i>Autor</i>	<i>Clonas analizadas</i>	<i>Lugar de estudio</i>
Este trabajo (CCC)	38	Cuatro Ciénegas, Coahuila
Casamayor <i>et al.</i> 2000 (LAGOSAL1)	21	Lagos sulfurosos: lago Cisó y Vilar, España
Demergasso <i>et al.</i> 2004 (LAGOSAL2)	31	Lagos en el desierto de Atacama, norte de Chile
Humayoun <i>et al.</i> 2003 (LAGOSAL3)	63	Mono Lake, California
Kuske <i>et al.</i> 1997 (SUELO)	39	Suelos áridos en el suroeste de EE UU
Sekigushi <i>et al.</i> 2002 (RÍO)	27	Río Changjiang, China
Angert <i>et al.</i> 1998 (RÍO SUBT.)	16	Río sulfuroso, Parker Cave, Kentucky
Madrid <i>et al.</i> 2001 (MAR)	68	Cariaco Basin
Bowman <i>et al.</i> 2000 (LAGOANT)	30	Lagos hipersalinos de la Antártida
Williams <i>et al.</i> 2004 (AGUA DULCE)	17	Agua potable

Tabla 6. Datos sobre los artículos elegidos para la comparación estadística con secuencias obtenidas en otros sistemas acuáticos y terrestres.

Recordemos que se analizaron las clonas o secuencias obtenidas en cada artículo, utilizando valores de cero (0) para las clonas o secuencias que en BLAST tuvieron un origen distinto al mar, y de uno (1) para las marinas. Para cada artículo se generó un promedio de los valores de todas las secuencias, y estos promedios por artículo se compararon estadísticamente. Obtuvimos que los artículos enfocados al estudio de bacterias marinas quedan agrupados junto con nuestro estudio (figura R7), con valores más cercanos a 1, y que son significativamente distintos del grupo de secuencias obtenidas en sitios no marinos (incluidos aquí lagos salados), con valores cercanos a 0, en la prueba de "T de student" y con ANOVA de $p > 0.001$.

V Genealogías

En los árboles se incluyeron las secuencias de las 38 clonas representativas, y, para cada una de las 38, también se alinearon otras dos secuencias similares, que son las propuestas por las dos bases de datos utilizadas (véase tabla 4).

Para las genealogías se utilizaron métodos distintos: "Neighbor Joining" y Máxima Parsimonia. En los dos casos obtuvimos genealogías similares, con una distribución de las clonas en los árboles muy parecida, por lo cual aquí presentamos uno de ellos, el de Máxima Parsimonia (figura R8), y el otro lo mostramos en el Apéndice IX.

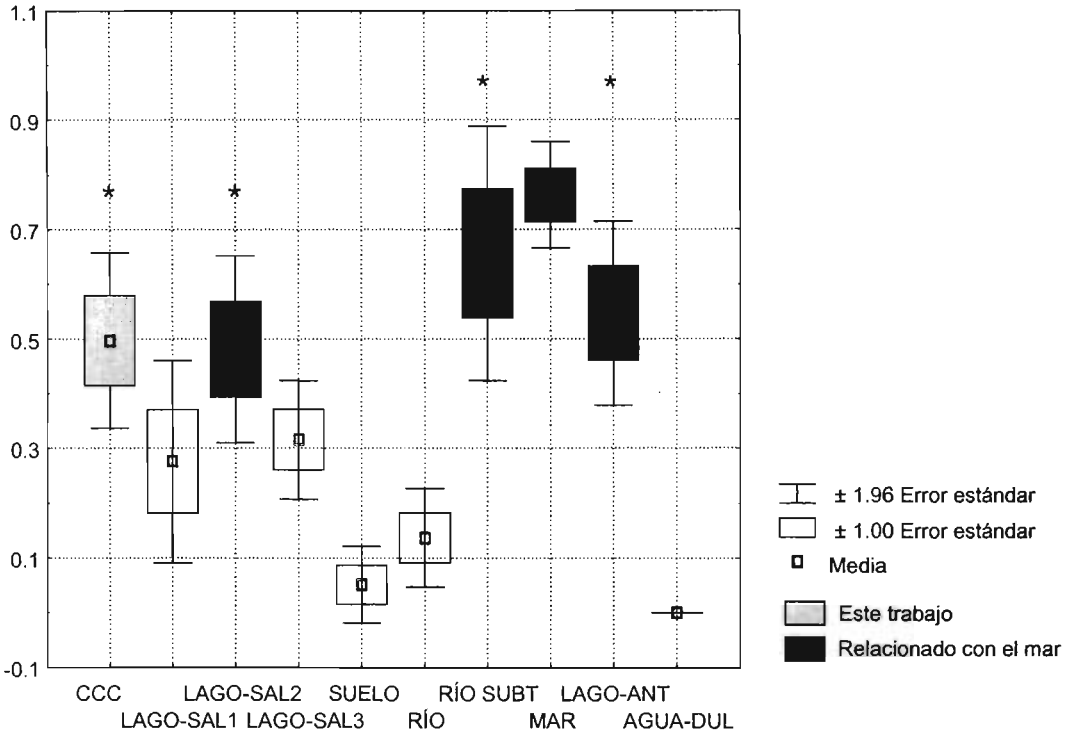


Figura R7. Análisis comparativo: promedios de los valores marino (1) o no marino (0) de las secuencias reportadas en 9 artículos (véase apartado Material y métodos). Con asterisco (*) se muestran los promedios que son similares y significativamente distintos al resto.

Sitio de muestreo

- ▲ Valle de Cuatro Ciénegas
- Valle del Hundido
- Valle Calaveras
- ◆ Mina Rosario

Origen de las secuencias más cercanas

- Marinas
- Suelo
- Agua dulce
- Volcánico
- No reportado u otro

1000 bootstrap, árbol con MP de 690 pb de las clonas del 16S

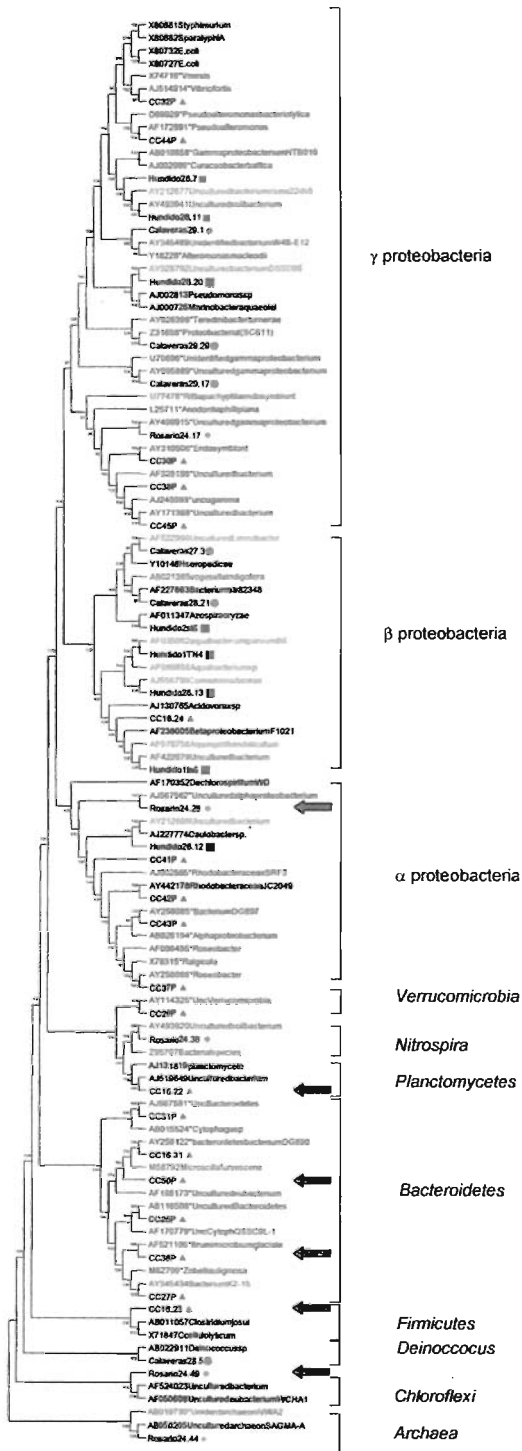


Figura R8. Árbol filogenético. Con flechas se muestran las posibles clonas endémicas

Nuestra genealogía es congruente con las reportadas para las bacterias. Entre las proteobacterias, el grupo beta proteobacterias forma un subgrupo de las gamma proteobacterias, como ya se ha reportado (Woese, en *The Prokaryotes*). En nuestro caso hemos notado además que los dos grupos de gamma proteobacteria que se forman podrían estar asociados a bacterias reductoras y no reductoras de azufre, de acuerdo a los datos obtenidos de las secuencias más parecidas a nuestras clonas (véanse tabla 4 y apéndice VII).

Todos los tipos de bacterias están distribuidos en forma uniforme en el árbol, y no se observa alguna correlación entre los tipos de bacteria con el valle de donde proceden.

Las posibles seis clonas endémicas que tuvieron menor índice de similitud, valor E y *score (bits)* en el BLAST, y/o que en todos los árboles formaron filotipos únicos, están marcadas con flechas en el árbol (CC50P, CC36P, CC16.22, CC16.23, Rosario24.28 y Rosario24.49).

También en el árbol puede observarse la asociación de las clonas de Cuatro Ciénegas con secuencias de referencia que tienen un origen marino, secuencias que pertenecen a 4 phyla: alfa y gamma proteobacterias, *Bacteroides*, *Verrucomicrobia* y arqueas. Además, podemos notar que las clonas de Cuatro Ciéngas presentan menor distancia hacia las secuencias propuestas por BLAST que a las propuestas por RDB; esto es, hay mayor similitud hacia las que provienen del GenBank.

CONCLUSIONES

En resumen, los puntos a resaltar de este trabajo son los siguientes:

1. Las secuencias de bacterias de este estudio representan a 8 phyla: Proteobacterias, *Nitrospira*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, y *Verrucomicrobia*; obtuvimos igualmente secuencias que pertenecen al phylum *Crenarchaeota*, del dominio *Archaea*.
2. Las clonas fueron similares a secuencias de ambientes marinos; generaron un patrón significativamente distinto al de secuencias de estudios en lagos salados y fueron similares a patrones de secuencias obtenidas en cuerpos de agua relacionados con el mar, por lo tanto proponemos que las clonas ambientales de Cuatro Ciénegas reflejan el origen marino de este lugar.
3. Encontramos 6 secuencias que podrían pertenecer a bacterias endémicas, ya que hasta ahora no existen reportes de secuencias similares en el mundo.
4. Es necesario utilizar enfoques evolutivos y ecológicos para el análisis de clonas ambientales. En este trabajo proponemos que el gen para el 16S ARNr puede ser usado como un indicador del origen de algunos tipos de secuencias, lo que nos habla del contexto evolutivo de esa comunidad. El contexto ecológico será necesario aclararlo con otros marcadores genéticos.

PERSPECTIVAS

Este trabajo deja abiertas muchos interrogantes; hay aún mucho por explorar sobre la diversidad de las bacterias de Cuatro Ciénegas. Una de las primeras cosas por hacer es utilizar muestreos con réplicas que permitan robustecer los análisis que se hagan. La primera pregunta que ha quedado abierta es ¿cuál es el límite del área de muestreo en la que se obtiene la señal filogenética de bacterias similares a bacterias obtenidas en ambientes marinos? Para responderla es necesario trabajar en un muestreo amplio de los cuerpos de agua alrededor del valle de Cuatro Ciénegas. Otra pregunta que sería interesante responder es sobre los patrones de distribución de procariontes en esta zona, que podría estudiarse con un número más amplio de clonas ambientales del gen 16S ARNr, utilizando además clonas de genes metabólicos o constitutivos, específicos para aquéllos grupos que sean similares a bacterias de hábitats marinos, como las proteobacterias. La técnica de TRFLPs es una buena herramienta para explorar previamente cada muestra –para así seleccionar solamente los sitios y las muestras más representativos– con lo cual el tiempo y el costo de la clonación se reduce muchísimo. Con estos datos será posible entonces utilizar estimados de diversidad y genealogías que nos permitan comparar entre las muestras y llegar a conclusiones más precisas que analicen a mayor profundidad estas huellas del mar en el desierto.

REFERENCIAS

- Abeliovich A. 2001. The Nitrite oxidizing bacteria. In M. Dworkin *et al.*, eds., *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III edición, release 3.7, 2/11/2001, Springer-Verlag, Nueva York.
<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Acinas S.G., V. Klepac-Ceraj, D.E. Hunt, C. Phaino, E. Ceraj, D.L. Distel. y M.F. Polz 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430: 551–554.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. Myers y D.J. Lipman 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 522–529.
- Angert E.R, D.E. Northup, A.L. Reysenbach, A.S. Peek, B.M. Goebel y N.R. Pace 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogists* 83: 1583–1592.
- Baas-Becking L.G. 1934. *Geologie of inleiding tot de milieukunde*. The Netherlands: WP Van Stockum, La Haya.
- Bahr M., J.E. Hobbie y M.L. Sogin 1996. Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster. *Aquat. Microb. Ecol.* 11: 271–277.
- Béja O., E.V. Koonin, L. Aravind, L.T. Taylor, H. Seitz, J.L. Stein, D.C. Bensen, R.A. Feldman, R.V. Swanson y E.F. DeLong 2002. Comparative genomic analysis of archaea genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 335–345.
- Benlloc S., A. López López, E.O. Casamayor, L. Ovreas, V. Goddard, F. Lise Daae, G. Smerdon, R. Massana, I. Joint, F. Thingstad, C. Pedrós-Alió y F. Rodríguez Valera 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4: 349–360.
- Bennasar, A., R. Rossello Mora, J. Lalucat y E.R.B. Moore 1996. 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 200–205.
- Bohannon B.J.M. y J. Hughes 2003. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 282–287.
- Bowman J.P., S.A. McCammon, S.M. Rea y T.A. McMeekin 2000. The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 81–88.
- Bowman J.P. y R.D. McCuaig 2003. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2463–2483.

- Brinkmeyer R., K. Knittel, J. Jurgens, H. Weyland, R. Amann y E. Helmke 2003. Diversity and structure of bacterial communities in arctic versus Antarctic pack ice. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6610–6619.
- Brümmer I.H.M., A. Felske e I. Wagner-Dobler 2003. Diversity and seasonal variability of β -Proteobacteria in Biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4463–4473.
- Casamayor E.O., H. Schafer, L. Baneras, C. Pedrós-Alió y G. Muyzer 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 499–508.
- Castillo A., L. Eguarte y V. Souza (en prensa). A genomic population genetics analysis of the pathogenic LEE island in *E. coli*: The search of the unit of selection. *PNAS*.
- Cho, Jae-Chang y J.M. Tiedje 2000. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5448–5456.
- Cole J.R., B. Chai, T.L. Marsh, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, S. Chandra, D.M. McGarrell, T.M. Schmidt, G.M. Garrity y J.M. Tiedje 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31: 442–443.
- CONABIO, página web
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp_049.htm
- Crump B.C., E.V. Armbrust y J.A. Baross 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3192–3204.
- Crump B.C., C.S. Hopkinson, M.L. Sogin y J.E. Hobbie 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1494–1505.
- Curtis T.P., W.T. Sloan y J.W. Scannell 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10494–10499.
- Curtis T.P. y W.T. Sloan 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 221–226.
- DeLong E. F. 1997. Marine microbial diversity: the tip of the iceberg. *Trends Biotechnol.* 15: 203–207.
- 2002. Microbial population genomics and ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 520–524.
- Demergasso C., E.O. Casamayor, G. Chong, P. Galleguillos, L. Escudero, C. Pedrós-Alió 2004. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microb. Ecol.* 48: 57–69.
- Doolittle F. 2002. Diversity squared. *Environ. Microbiol.* 4: 3–17.
- Dworkin M. et al., eds. 2004. *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community 2004*, Springer-Verlag, Nueva York.
<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Elshahed M.S., J.M. Senko, F.Z. Najar, S.M. Kenton, B.A. Roe, T.A. Dewers, J.R. Spear y L.R. Krumholz 2003. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5609–5621.

- Falcón L.I., E.J. Carpenter, F. Cipriano, B. Bergman y D.G. Capone 2004. N₂ fixation by unicellular bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans: phylogeny and in situ rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 765–770.
- Falkowski P.G. y C. de Vargas 2004. Genomics and evolution. Shotgun sequencing in the sea: a blast from the past? *Science* 304: 58–60.
- Fenchel T. 2003. Biogeography for Bacteria. *Science* 301: 925–926.
- Field K.G., D. Gordon, T. Wright, M. Rappé, E. Urbach, K. Vergin y S.J. Giovannoni 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 63–70.
- Finlay B.J. y K.J. Clark 1999. Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature* 400: 828.
- Finlay B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–1063.
- Forney L.J., X. Zhou y C.J. Brown 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 210–220.
- García Pichel F., L. Prufert-Bebout y G. Muyzer 1996. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3284–3291.
- Garity G.M. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, Nueva York, II edición.
- Giovannoni S.J., T.B. Britschgi, C.L. Moyer y K.G. Field 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 344: 60–63.
- Glaeser J. y J. Overmann 2004. Biogeography, evolution and diversity of epibionts in phototrophic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4821–4830.
- Glockner F.O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler y R. Amann 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5053–5065.
- Gogarten J.P., W.F. Doolittle y J.G. Lawrence 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2226–2238.
- Gordon D.A. y S.J. Giovannoni 1996. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1171–1177.
- Gray J.P. y R.P. Herwig 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4049–4059.
- Hagström A., T. Pommier, F. Rohwer, K. Simu, W. Stolle, D. Svensson y U.L. Zweifel 2002. Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3628–3633.
- Hentschel U., J. Hopke, M. Horn, A.B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker y B.S. Moore 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponger from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4431–4440.
- Homer-Devine M.C., K.M. Carney y B.J.M. Bohannan 2003. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings: Biological Sciences* 271: 113–122.

- Huber T., G. Faulkner y P. Hugenholtz 2004. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20: 2317–2319.
- Hugenholtz P., C. Pitulle, K.L. Hershberger y N.R. Pace 1988. Novel division level bacterial diversity in a yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180: 366–376.
- Hugenholtz P. y T. Huber 2003. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 289–293.
- Hughes J.B., J.J. Hellmann, T.H. Ricketts y B.J. Bohannon 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4399–4406.
- Humayoun S.B., N. Bano N. y J.T. Hollibaugh 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1030–1042.
- Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P. y W. Liesack 1997. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 437.
- INE 2000. *Programa de manejo del área de protección de flora y fauna Cuatrociénegas, México*. Instituto Nacional de Ecología, México, febrero, 166 pp.
- Jain R., M.C. Rivera, J.E. Moore y J.A. Lake 2002. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theoret. Popul. Biol.* 61: 489–495.
- Jaspers E., K. Nauhaus, H. Cypionka y J. Overmann 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 153–164.
- Jaspers E. y J. Overmann 2004. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4831–4839.
- Johannesson K.H., A. Cortés y K.C. Kilroy 2004. Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. *J. South. Am. Earth Sciences* 17: 171–180.
- Kemp P.F. y J.Y. Aller 2004a. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol. Oceanogr.: Methods* 2: 114–125.
- Kemp P. F. y J.Y. Aller 2004b. Bacterial diversity in aquatic and other Environments: What 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 161–177.
- Kesters K., P. deVos, M. Gillis, J. Swings, P. Vandamme y E. Stackebrandt 2003. Introduction to the Proteobacteria. In M. Dworkin *et al.*, eds., *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III edición, release 3.12, 3/28/2003, Springer-Verlag, Nueva York.
<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Kuske C.R., S.M. Bams y J.D. Busch 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3614–3621.
- Lawrence J.G. y H. Hendrickson 2003. Lateral gene transfer: when will adolescence end? *Mol. Microbiol.* 50: 739–749.
- Loy A., H. Matthias y M. Wagner 2003. ProbeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucl. Acids Res.* 31: 514–516.

- Lunn M., W.T. Sloan y T.P. Curtis 2004. Estimating bacterial diversity from clone libraries with flat rank abundance distributions. *Environ. Microbiol.* 6:1081-1085.
- Madigan M.T., J.M. Martinko y J. Parker 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Faltá NY USA. IX edición.
- Madrid V.M., G.T. Taylor, M.I. Scranton y A.Y. Chistoserdov 2001. Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1663–1674.
- Martin A.P. 2002. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3673–3682.
- Martin W. y T.M. Embley 2004. Early evolution comes full circle. *Nature* 431: 134–137.
- McKee J.W., N.W. Jones y L.E. Long 1990. Stratigraphy and provenance of strata along the San Marcos fault, central Coahuila, Mexico. *Geol. Soc. Amer. Bull.* 102: 593–614.
- Methé B.A., W.D. Hiorns y J.P. Zehr 1998. Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George, NY and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* 43: 368–379
- Minkley, W.L. 1969. Environments of the Bolsón of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México, with special reference to the aquatic biota. University of Texas, El Paso. *Science Series* 2, 65 pp.
- Morin P.J y J. McGrady-Steed 2004. Biodiversity and ecosystem functioning in aquatic microbial systems: a new analysis of temporal variation and species richness-predictability relations. *Oikos* 104: 458–466.
- Mullins T.D., T.B. Britschgi, R.L. Krest y S.J. Giovannoni 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 40: 148–158
- Noguez A.M., H.T. Arita, A.E. Escalante, L.J. Forne, F. García-Oliva y V. Souza (en prensa). Microbial macroecology: Highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecol. and Biogeogr.*
- Nold S.C. y G. Zwart 1998. Patterns and governing forces in aquatic microbial communities. *Aquatic Ecol.* 32: 17–35.
- Ochman H., J.G. Lawrence y E.A. Groisman 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299–304.
- Oda Y., B. Star, L.A. Huisman, J.C. Gottschal y L.J. Forney 2003. Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5186–5191.
- Olsen G.J., D.L. Lane, S.J. Giovannoni y N.R. Pace 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337–365.
- Pace N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane y G.J. Olsen 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9: 1–55.
- Papke R.T., N.B. Ramsig, M.M. Bateson y D.M. Ward 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 5: 650–659.
- Papke R.T. y D.M. Ward 2004. The importance of physical isolation to microbial diversification *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 293–303.

- Purdy K.J., D.B. Nedwell y T.M. Embley 2003. Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 :3181–3191.
- Qiu X., L. Wu, H. Huang, P.E. McDonel, A.V. Palumbo, J.M. Tiedje y J. Zhou 2001. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 880–887.
- Ramakrishnan V. y P.B. Moore 2000. Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11: 144–154.
- Rappé M.S. y S.J. Giovannoni 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369–394.
- Rauch E. M. y Y. Bar-Yam 2004. Theory predicts the uneven distribution of genetic diversity within species. *Nature.* 43: 449–452.
- Riesenfeld C.S., P.D. Schloss y J. Handelsman 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525–552.
- Rivera M.C. y J.A. Lake 2004. The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature.* 431: 152–155.
- Rodríguez-Valera F. 2002. Approaches to procaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ. Microbiol.* 4: 628–633.
- Roselló-Mora R. y Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39–67.
- Sekiguchi H., M. Watanabe, T. Nakahara, B. Xu y H. Uchiyama 2002. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5142–5150.
- Selje N., M. Simon y T. Brinkhoff 2004. A newly discovered Roseobacter cluster in temperate and polar oceans. *Nature* 427: 445–448.
- Shreve F. 1944. Rainfall of northern Mexico. *Ecology* 25: 105–111.
- Snyder A.R., N. Williams, L. Baer, K.E. Walker y O.C. Stine 2002. 16S rDNA sequence analysis of Environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2089–2094.
- Stach J.E., L.A. Maldonado, D.G. Masson, A.C. Ward, M. Goodfellow y A.T. Bull 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6189–6200.
- Tanner M.A., C.L. Everett, W.J. Coleman, M.M. Yang y D.C. Youvan 2000. Complex microbial communities inhabiting sulfide-rich black mud from marine coastal environments. *Biotech. et alia.* 8: 1–16.
- Tyson G.W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E.E. Alleri, R.J. Ram, P.M. Richardson, V.V. Solovyev, E.M. Rubin, D.S. Rokhsar y J.F. Banfield 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the Environment. *Nature* 428: 37–43.
- Venter J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H. Knap, M.W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.H. Rogers y H.O. Smith 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74.

- Ward B.B. 2002. How many species of prokaryotes are there? *PNAS* 99: 10234–10236.
- Ward D.M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 271–277.
- Watanabe K., Y. Kodama y N. Kaku 2002. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiology* 2: 23.
- Whitaker R.J., D.W. Grogan y J.W. Taylor 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301: 976–978.
- Whitman W.B., D.C. Coleman y W.J. Wiebe 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *PNAS* 95: 6578–6583.
- Williams M.M., J.W. Domingo, M.C. Meckes, C.A. Kelty, H.S. Rochon 2004. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J. Appl. Microbiol.* 96: 954–964.
- Winsborough, B.M. y J.S. Seeler 1984. The relationship of diatom epiflora to the growth of limnic stromatolites and microbial mats. *8th Diatom Symposium 1984. Diatom Epiflora, Limnic Stromatolites and Microbial Mats.*: 395–407.
- Winsborough, B.M. 1990. Some ecological aspects of modern fresh water stromatolites in lakes and streams of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. Doctoral dissertation, University of Texas, Austin.
- Wise M.G., J.V. McArthur y L.J. Shimkets 1997. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1505–1514.
- Woese, C. R. y G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domains: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5088–5090.
- Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–271.
- Woese C.R., O. Kandler y M.L. Wheelis 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *PNAS* 87: 4576–4579.
- Woese C.R. (sin fecha). How we do, don't and should look at Bacteria and bacteriology. In M. Dworkin *et al.*, eds., *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III edición, release 3.14 Springer-Verlag, Nueva York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Zhou J., B. Xia, H. Huang, A.V. Palumbo y J.M. Tiedje 2004. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1723–1734.

APÉNDICES

APÉNDICE I

EXTRACCIÓN DE ADN

Ultraclean water DNA kit, marca MoBio. Cat. No. 148 00-25

1. Colocar 1 ó 2 filtros en el *bead tube* y agregar 4 ml de *bead solution*, vortex 1 minutos. Es posible colocar más de 2 filtros en un mismo tubo, en particular para muestras de agua que utilizaron muchos filtros. Si es necesario, poner 0.5 ml más de solución.
2. Agregar 0.5 ml de solución WD1 y 5 μ l de RNAsa, vortex 30 segs. Colocar los tubos horizontalmente en el agitador y mezclar a toda velocidad durante 15 minutos.
3. Centrifugar los tubos a 5 000 rpm durante 3 minutos. Eliminar los filtros con cuidado antes de centrifugar.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 15 ml y agregar 0.6 ml de solución WD2. Vortex 5 segs, incubar a 4°C durante 30 minutos.
5. Centrifugar a 5 000 rpm durante 6 minutos. Transferir el sobrenadante con la pipeta a un tubo limpio y agregarle 8 ml de solución WD3. Vortex 5 seg.
6. Poner la mezcla en un "tubo-filtro" y centrifugar a 4 000 rpm durante 3 minutos. Eliminar el filtrado.
7. Agregar 3 ml de solución WD4 y centrifugar a 4 000 rpm durante 3 minutos. Descartar el filtrado.
8. Repetir el paso anterior (el 7) con WD4 para asegurar que el ADN quede muy limpio.
9. Centrifugar nuevamente a 5 000 rpm durante 5 minutos.
10. Secar el filtro durante 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Colocar el filtro en un nuevo tubo y agregar 3 ml de solución WD5.
12. Dejar en reposo durante 12 horas a 4°C
13. Centrifugar a 5 000 rpm durante 3 minutos. Ahora el ADN está eluido en el filtrado.

APÉNDICE II

CONDICIONES DEL PCR 16S ADNr

Para 50 μ l:

Concentración inicial de cada reactivo	Concentración final	Cantidad en μ l
Buffer 10X	1X	5.0
MgCl ₂ 25 mM	2.75 mM	5.5
dNTPs 10 mM	0.20 mM	1.0
Oligos 10 μ M	0.06 μ M	0.3 de cada uno
Taq polimerasa (ABI) 5 U/ μ l	1U	0.2
DMSO 100%	5%	2.5
Agua		35.2

Los ciclos del PCR fueron las siguientes: 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de: 92°C por 1.5 minutos; 50°C 1.5 minutos; 72°C por 2 minutos; 2°C por 30 minutos de extensión final para asegurar una mejor adenilación.

APÉNDICE III

EXTRACCIÓN DE BANDAS DE GEL *Qiaquick gel extraction kit*, marca Quiagen. Cat. No. 28706

Procesar un máximo de 400 mg de agarosa por columna. Todos los pasos de centrifugación son o bien a 10 000 g o bien a 13 000 rpm (en microcentrifuga ALC 4214 Rotor 6642).

1. Cortar las bandas del tamaño deseado, tratando de tomar la menor cantidad de agarosa posible.
2. Pesar la banda. Añadir 3 volúmenes de buffer QG por un volumen de gel (100 mg son equivalentes a 100 μ l).
3. Incubar a 50° durante 10 min, o hasta que se disuelva la agarosa. Vortex cada 2-3 minutos
4. Comprobar que el color del buffer sea amarillo. Si es naranja o violeta, ajustar el pH con 10 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.
5. Si el tamaño del fragmento es menor a 500 pb o mayor a 4 000 pb, añadir un volumen de isopropanol por cada volumen de gel.
6. Armar la columna, agregar la muestra y centrifugar durante 1 minuto. Si el volumen es mayor a 800 μ l, cargar y centrifugar varias veces. Tirar lo centrifugado.
7. Añadir 0.5 ml de buffer QG a la columna y centrifugar 1 minuto. Tirar lo centrifugado
8. Para lavar, poner 0.75 ml de Buffer PE. Incubar 2-5 min a TA y centrifugar 1 minutos. Tirar lo centrifugado.
9. Centrifugar la columna durante 1 minuto adicional; antes, asegurarse de que el tubo de abajo no tenga líquido para que en este paso se elimine todo el etanol.
10. Poner la columna en un tubo limpio de 1.5 ml.
11. Para eluir el ADN, añadir 50 μ l de buffer EB o agua al centro de la membrana, y centrifugar la columna a máxima velocidad. Para aumentar la concentración, eluir en 30 μ l, incubar durante 1 minuto y centrifugar durante 1 minuto.
12. Guardar la muestra a -20°C.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE IV

CLONACIÓN

Topo TA Cloning kit, PCR 2.1 Topo Vector, marca Invitrogen. Cat No. 45-0641

Preparación de la clonación

1. Para muestras ambientales que han sido extraídas de gel, el producto se poliadena nuevamente justo antes de clonar, en una reacción que contiene: 100 ng del producto, 1 unidad de taq, buffer 1X con 1.5 mM de MgCl₂ y 166 μM dATP de la siguiente forma:

- De 100 a 200 ng del producto en 22 μl
- 3 μl buffer 10X con magnesio ya incluido
- 5 μl dATP a 1mM
- 0.2 μl Taq

Esta reacción se incubaba a 72° durante 10-15 minutos.

2. Para empezar a clonar, tener listos:

- Tubos estériles
- Baño a 42 grados
- 2 Cajas con LB con 50 μg/ml ampi o 50 μg/ml kanamicina por cada vial de bacterias competentes
- 40 mg/ml de X gal en DMF
- Incubadora a 37 grados

3. Antes de empezar el experimento:

- Encender baño a 42°C
- Calentar medio SOC a TA
- Calentar cajas de LB a 37°C, durante 30 minutos
- Después de los 30 minutos, esparcir 40 μl de X gal en cada caja; incubar a 37°C hasta que se usen
- Descongelar en hielo; un vial de bacterias por cada transformación

Para ligar el producto

1. Hacer la mezcla siguiente:

- Poner de 0.5 a 4 μl del producto de PCR a ligar (para productos ambientales se usaron 4 μl, unos 10-20 ng)
- Agregar 1 μl de SALT SOLUTION
- Añadir agua estéril para completar 5 μl
- En estos 5 μl añadir 1 μl del vector TOPO

2. Mezclar suavemente e incubar a TA 5 minutos; para productos más grandes (>1kb) o si se trata de una mezcla de productos, incubar durante 30 minutos.

3. Poner la reacción en hielo y empezar a transformar.

(La reacción se puede guardar a -20°C ON).

Transformación

1. Añadir 2 μl de la reacción de ligación en un vial de bacterias competentes. NO MEZCLAR PIPETEANDO.

2. Incubar en hielo de 5 a 30 minutos (para clonar PCRs grandes o mezclas de productos es mejor dejarlo 30 minutos).

3. Poner las bacterias a 42°C durante 60 segundos para inducirles a "Heat-Shock".

4. Transferir el tubo en hielo inmediatamente.

5. Añadir 250 μl de medio SOC a TA.

6. Tapar el tubo y agitarlo horizontalmente a 200 rpm a 37°C durante una hora.

7. Sembrar de 10 a 50 μl de cada reacción de transformación en las cajas de medio precalentadas. Se recomienda sembrar dos volúmenes distintos de bacterias para asegurar una correcta cantidad de colonias. Para clonación de productos ambientales, sembrar 100 μl y 200 μl .

8. Una reacción de clonación eficiente producirá cientos de colonias. Elegir unas 10 blancas o azules claras para analizar. NO ELEGIR LAS COLONIAS AZUL OSCURO.

Selección de clonas positivas

1. Con un palillo se tomó una pequeña muestra de la colonia y se resuspendió en 10 μl de agua limpia; se incubó a 96°C durante una hora en un tubo de PCR y se cargaron los 10 μl en un gel de agarosa al 1% para visualizar el tamaño de los plásmidos.

2. Las colonias con inserto fueron incubadas ON en LB con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina o ampicilina, y se congelaron en 1 ml de LB con glicerol al 15% (V/V).

APÉNDICE V

EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS *SNAP miniprep kit*, marca Invitrogen. Cat. No. 45-0453

Lisis y precipitación

1. Centrifugar 1-3 ml de cultivo ON (de 1 a 1.5×10^9 células /ml; yo usé generalmente 1 ml).
2. Resuspender el precipitado en 150 μ l de *Resuspension Buffer* con vortex o con la pipeta.
3. Añadir 150 μ l de *Lysis Buffer* y mezclar suavemente invirtiendo de 5 a 6 veces. Incubar 3 minutos a TA.
4. Añadir 150 μ l de *Precipitation Salt* frío e invertir de 6 a 8 veces.
5. Centrifugar a TA 14 000 g durante 5 minutos. Mientras se centrifuga, poner la mini columna en el tubo de 2 ml del kit.

Pegado del plásmido

6. Pasar el SN a un tubo estéril. Tirar el precipitado gelatinoso.
7. Añadir 600 μ l de *Binding Buffer* y mezclar invirtiendo de 5 a 6 veces. Pasar todo esto a la mini columna.
8. Centrifugar la mini columna con el tubo a TA a 1 000 – 3 000 g durante 30 segundos.
9. Tirar lo que se centrifugue.
10. Añadir 500 μ l de *Wash Buffer*.
11. Centrifugar la mini columna con el tubo a TA a 1 000 – 3 000 g entre 10 – 30 segundos.
12. Añadir 900 μ l de *1X Final Wash* y centrifugar igual que el paso anterior.
13. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto para secar la resina.

Elución del plásmido

14. Poner la minicolumna en un tubo estéril y añadir 60 μ l de agua estéril directamente en la resina. Incubar 3 minutos a TA.
15. Centrifugar a TA a máxima velocidad durante 30 segundos. Guardar el eluido y tirar la columna.

APÉNDICE VI

REGISTROS DE LAS CLONAS DE ESTE TRABAJO EN GENBANK (No disponibles al público todavía)

AY604936	Hundido26.11
AY604937	Rosario24.49
AY604938	Rosario24.44
AY604939	CC30P
AY604940	Rosario24.17
AY604941	Calaveras29.17
AY604942	Hundido26.20
AY604943	CC38P
AY604944	CC45P
AY604945	Calaveras29.29
AY604946	CC29P
AY604947	CC32P
AY604948	Hundido26.7
AY604949	Calaveras29.1
AY604950	CC44P
AY604951	Hundido1tn4
AY604952	Hundido26.13
AY604953	CC16.24
AY604954	Hundido1tn6
AY604955	Calaveras28.21
AY604956	Hundido2st6
AY604957	Calaveras27.3
AY604958	Calaveras28.5
AY604959	CC37P
AY604960	CC42P
AY604961	CC41P
AY604962	CC43P
AY604963	Hundido26.12
AY604964	Rosario24.28
AY604965	CC16.23
AY604966	Rosario24.38
AY604967	CC26P
AY604968	CC16.22
AY604969	CC31P
AY604970	CC36P
AY604971	CC50P
AY604972	CC27P
AY604973	CC16.31

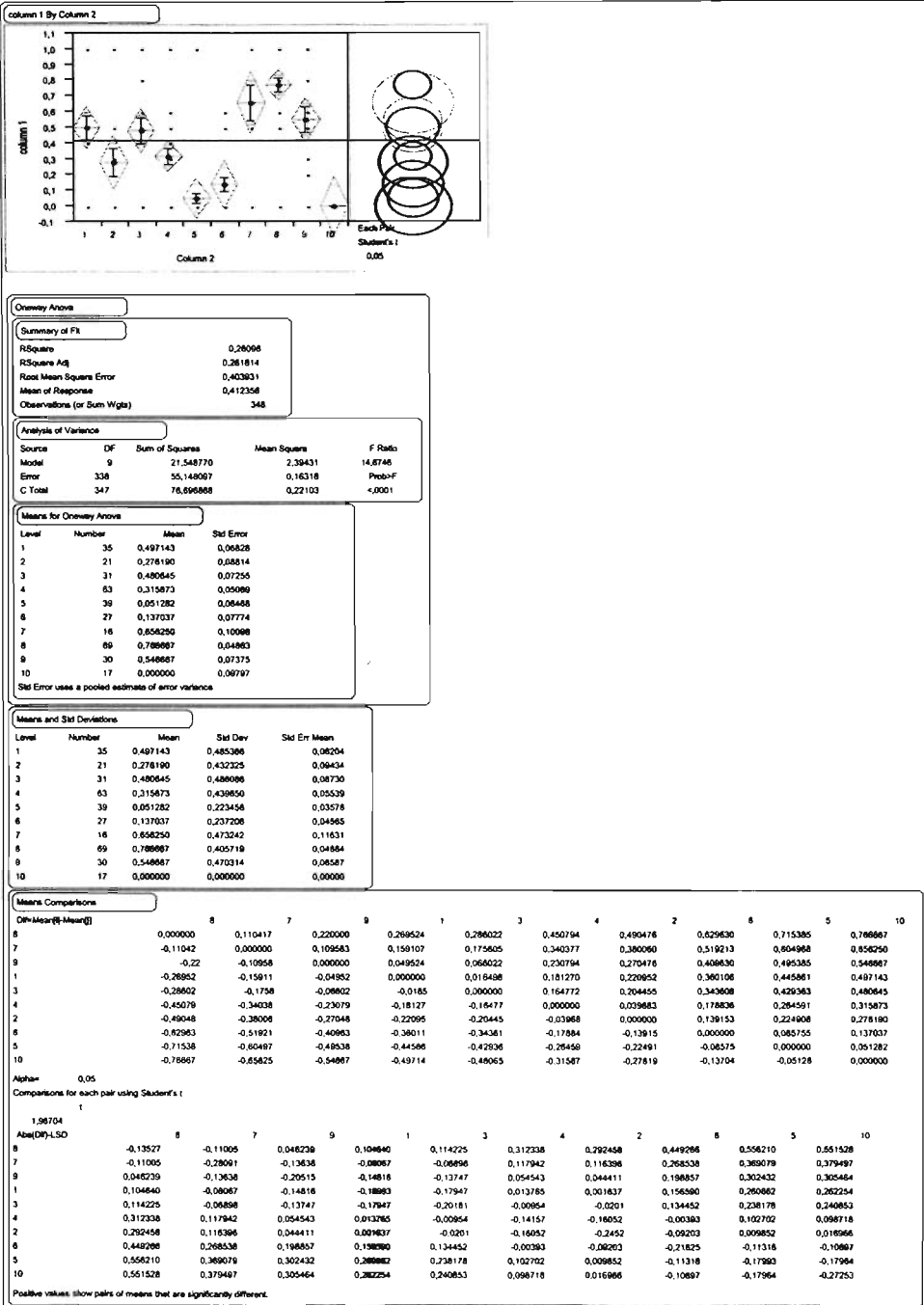
APÉNDICE VII

DATOS DE LAS SECUENCIAS SIMILARES A LAS DE ESTE TRABAJO (En orden alfabético de acuerdo a la clave de registro de GenBank).

AB010858	γ proteobacteria HTB010	AJ519649	Bacteria sin cultivar
AB011057	<i>Clostridium josui</i>	AJ556799	Comamonadaceae MWH55
AB015524	<i>Cytophaga</i> sp. Str. BD1-15	AJ567562	Alfa proteobacteria sin cultivar
AB019730	Arquea no identificada p1VWA2	AJ567581	bacteroidetes sin cultivar
AB021385	<i>Vogesella indigofera</i> ATCC 19706 (T)	AY028398	<i>Teredinibacter turnerae</i>
AB022911	<i>Deinococcus</i> sp. str. MBIC3950	AY095889	Gamma proteobacteria sin cultivar
AB026194	Alfa proteobacteria MBIC1876	AY114325	Verrucomicrobia sin cultivar
AB116508	Bacteroidetes sin cultivar	AY171368	Bacteria sin cultivar
AF011347	<i>Azospira oryzae</i> str. 6a3	AY212600	Bacteria sin cultivar
AF035052	<i>Aquabacterium parvum</i> str. B6	AY212677	Bacteria sin cultivar
AF050608	<i>Unc eubacterium</i> WCHA 1-16	AY258085	Bacteria DG897
AF078756	<i>Aquaspirillum delicatum</i> str.	AY258088	<i>Roseobacter</i> sp. DG942
AF089858	<i>Aquabacterium</i> Aqua2	AY258122	<i>Bacteroidetes bacterium</i> DG890
AF098495	<i>Roseobacter</i> ISM	AY310506	Endosimbionte de caracol no identificado
AF104473	Endosimbionte de <i>Olavius loisae</i>	AY328792	Bacteria sin cultivar
AF170779	Clona sin cultivar <i>Cytophagales</i>	AY345434	Bacteria K2-15
AF172991	<i>Pseudoalteromonas</i> UL1	AY345489	Bacteria no identificada
AF188173	Eubacteria sin cultivar Keppib22	AY442178	Rhodobacteraceae JC2049
AF227863	<i>Bacterium cepa</i> 82348	AY493920	Bacteria sin cultivar de suelo
AF236005	Beta proteobacterium F1021	AY493941	Bacteria sin cultivar de suelo
AF328198	Bacteria sin cultivar	AY499915	Gamma proteobacteria sin cultivar
AF422679	Bacteria no identificada	D89929	<i>Pseudoalteromonas bacterioolytica</i>
AF521195	<i>Brumimicrobium glaciale</i>	L25711	Simbionte de <i>Anodontia philippiana</i> (molusco bivalvo)
AF522999	<i>Limnobacter</i> sp sin cultivar	M58792	<i>Microscilla furvescens</i> str. TV-2 ATCC 23129,
AF524023	Bacteria sin cultivar	M62799	<i>Zobellia uliginosa</i> ATCC 14397
AJ000726	<i>Marinobacter aquaeolei</i> str.VT8	U70696	Gamma proteobacteria sin cultivar OM60
AJ002006	<i>Curacaobacter ballica</i> str.OS 140	U77478	Endosimbionte de <i>Riftia pachyptila</i>
AJ002565	Rhodobacteraceae SRF3	X71847	<i>Clostridium cellulolyticum</i> ATCC 35319 (T)
AJ002813	<i>Pseudomonas</i> str. S2	X74716	<i>Vibrio nereis</i> ATCC 25917
AJ130765	<i>Acidovorax</i> LW1	X78315	<i>Ruegeria algicola</i> str. T-FF3 ATCC 51440 (T)
AJ131819	<i>Planctomycete</i> clone 14	Y10146	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ATCC 35892
AJ227774	<i>Caulobacter</i> sp. str. FWC38	Y18228	<i>Alterosomas macleodii</i> DSM 6062
AJ240993	γ proteobacteria sin cultivar Sva0120	Z31658	Proteobacteria SCB11
AJ347776	Sin cultivar (<i>Chrenarchaeote</i>)	Z95707	Clona de eubacteria 11-14
AJ514914	<i>Vibrio fortis</i>		

APÉNDICE VIII

Resultados estadísticos (T de student, ANOVA) utilizando el programa JMP.



APÉNDICE IX

Árbol genealógico generado con 1000 bootstrap en Neighbor Joining.



APÉNDICE X

Estimadores de riqueza (S_{ACE} y S_{Chao1}) utilizando la página web sugerida por Kemp y Aller (Kemp y Aller 2004) para evaluar la representatividad de la diversidad de la muestra en de este trabajo.

Fig. 1. Predicted S_{ACE}

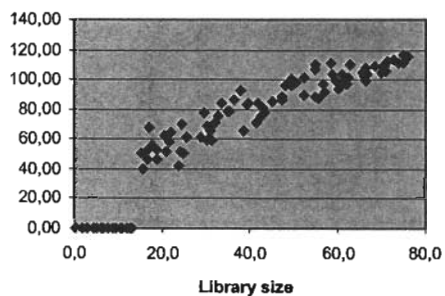


Fig. 2. Predicted S_{Chao1}

