



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Distribución y diversidad del phylum  
Planctomycetes en Pozas Azules, Cuatro  
Ciénegas, utilizando el gen que codifica para  
16S ARNr.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**BLANCA LORENA PEÑA GARCÍA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**M. EN I.B.B. LAURA ESPINOSA ASUAR.**

**2014**





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.

1.- Datos del alumno

Peña  
García  
Blanca Lorena  
26213598  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de ciencias  
Biología  
306088904

2. Datos del tutor

M. en I. B. B  
Laura  
Espinosa  
Asuar

3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Daniel  
Piñero  
Dalmau

4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Edmundo  
Calva  
Mercado

5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Erick Alejandro  
García  
Trejo

6. Datos del sinodal 4

M. en C. B.  
Jorge Antonio  
Valdivia  
Anistro

7.- Datos del trabajo escrito.

Distribución y diversidad del phylum Planctomycetes en Pozas Azules, Cuatro  
Ciénegas, utilizando el gen que codifica para 16S ARNr.

83 P  
2014

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM, como parte de los proyectos del taller *Sistemática molecular y genética de la conservación de vertebrados y plantas* de la Facultad de Ciencias. Su realización fue posible gracias a los apoyos 0237A1 de SEP-CONACyT y de ECOIE410 WWF-Alianza Carlos Slim.

A la M. en I. I. B. Laura Espinosa Asuar por el apoyo, la paciencia, consejos, motivación y enseñanza diaria en la realización de esta tesis.

A todo el comité de sinodales; Dr. Daniel Piñero, Dr. Edmundo Calva, Dr. Erick G. Trejo y M. Jorge Anistro por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Valeria Souza y Dr. Luis Eguiarte por el espacio en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental (LEMyE). A la Dra. Erika Aguirre Planter, a Silvia Barrientos y al M.V.Z. Manuel Rosas por su apoyo técnico.

Al Dr. Felipe García Oliva del CIEco en Morelia, por su colaboración en el análisis de nutrientes de las muestras.

Al Biol. Jaime Gasca por su ayuda en el análisis filogenético.

Al equipo de muestreo en 2007 Eria Rebollar, Morena Avitia, Esmeralda López Lozano, René Cerritos, Enrique Scheinvar y Germán Bonilla, por toda su ayuda en el campo. A Juan Carlos Ramírez Gloria y PRONATURA Noreste por el acceso a Rancho Pozas Azules. Y a la Dra. Silvia Pajares por su ayuda en algunas técnicas de laboratorio.

A Jazmín Blaz por el trabajo en conjunto, por su amistad, compañía y aprendizaje.

A todo los compañeros del laboratorio que hicieron de mi estancia en el laboratorio un momento maravilloso, por su amistad, enseñanza y afectuosidad; Marco Rodríguez, Sebastián, Josué, Jaz, Mirna, Paola.

A toda mi familia que siempre ha sido mi gran apoyo, a mis papás Félix y Petra, a mis hermanas Elva y Vero y a mi hermano Arturo.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por darme la vida, su amor, cariño, dedicación y apodo incondicional en toda mi carrera. A ti mamá porque siempre regaste esta semillita que con mucho esfuerzo logro germinar, porque nunca la descuidaste. Me diste cariño cuando más lo necesité, me procuraste cuando más débil me sentí y me guiaste en todo momento.

A ti papá porque contigo conocí lo valiente y fuerte que puedo llegar a ser, porque cuando más vulnerable estuve, tu compañía nunca me faltó, por tus ánimos en este largo camino de la vida, por tu insistencia para formar parte de la UNAM.

A mis hermanos quienes han sido mis mejores amigos y confidentes. Elva tú siempre me has escuchado y aconsejado, porque me diste ánimo en el proceso de mi tesis. Arturo (Boris) por tus consejos sabios que me ayudaron a sobre llevar las cosas con mayor inteligencia. Vero por los ánimos y sueños compartidos que me motivaron a seguir adelante.

A mi abuela Gregoria Dominga Salas Ruiz que aunque ya no estás con nosotros fuiste una pieza importante en la vida de esta Bióloga, por tus canciones, cariño e historias que me encantaba escuchar.

A David por tu apoyo en todo momento, por hacerme ver la vida de otra forma, por tus consejos, por tu cariño y por las risas y sueños compartidos.

A todos mis amigos de la hermosa Facultad de Ciencias y demás: Sandra, Marbella, Alejandro, Andrea, Ernesto, por sus palabras, consejos, apoyo, risas, tristezas, desvelos y fiestas compartidas.

A Dios por rodearme de personas tan maravillosas y no maravillosas porque de ellas aprendí lecciones que me ayudaron a formarme en el largo proceso de mi carrera.

A la máxima casa de estudios la UNAM por que en sus aulas me formé, porque allí conocí excelentes profesores.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	2
DEDICATORIA .....	3
RESUMEN .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Ubicación, clima e hidrología del valle de Cuatro Ciénegas .....	9
1.1.2 Clima .....	9
1.1.3 Hidrología .....	9
1.1.4 Sitio de estudio: Pozas Azules .....	10
1.2 Planctomycetes .....	11
1.2.1 Características morfológicas y fisiológicas .....	11
1.2.2 Clasificación .....	12
1.2.3 Importancia ecológica y evolutiva .....	14
1.2.4 Planctomycetes en otros sistemas .....	14
1.2.5 Planctomycetes en Cuatro Ciénegas .....	16
1.3 ¿Cómo se estudia a los microorganismos? .....	16
1.3.1 Biodiversidad microbiana .....	16
1.3.2 Medidas de diversidad .....	17
1.4 Biogeografía y ecología microbiana .....	18
1.4.1 ¿Los patrones de diversidad varían conforme al nivel jerárquico utilizado? .....	20
1.4.2 Hipótesis sobre la biogeografía microbiana .....	21
1.4.3 Factores locales y regionales que generan y mantienen la distribución de la diversidad microbiana .....	22
1.4.4 Patrones en organismos especialistas- generalistas .....	24

2. OBJETIVOS .....	26
3. JUSTIFICACIÓN .....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
4.1 Colecta de campo.....	27
4.2 Laboratorio .....	29
4.2.1 Extracción y amplificación de DNA.....	29
4.2.2 T-RFLPs.....	29
4.2.3 Clonación .....	30
4.2.4 Análisis de secuencias .....	31
4.2.5 Análisis estadísticos .....	31
4.2.6 Filogenias.....	35
4.2.7 Análisis del origen de las secuencias .....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 T-RFLPs .....	36
5.2 CLONAS.....	37
5.2.1 Descripción de la diversidad.....	37
5.2.2 Índices de diversidad alfa y beta .....	38
5.2.3 Curvas de Rarefacción .....	40
5.2.4 Análisis de origen de las secuencias.....	41
5.3 Análisis de los parámetros ambientales en Pozas Azules.....	44
5.4 Patrones de Distribución.....	46
5.5 Filogenia .....	47
6. DISCUSIÓN .....	48
6.1 T-RFLPs .....	48
6.2 CLONAS.....	49

6.2.1 ¿Planctomycetes forma parte de la biósfera rara? .....	49
6.2.2 Diversidad del phylum Planctomycetes .....	50
6.2.3 Origen de las secuencias .....	51
6.2.4 Filogenia y patrones de distribución .....	52
6.2.5 ¿Todo está en todos lados? El caso de Planctomycetes .....	55
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	56
8. ANEXOS (Protocolos).....	59
Determinación de nutrientes.....	59
Filtrado de muestras de agua .....	59
Extracción de ADN .....	60
PCR del gen que codifica para 16S ARNr .....	62
Extracción de bandas de gel .....	63
Protocolo para T-RFLPs .....	64
Clonación.....	65
Extracción de plásmidos.....	68
Digestión de plásmidos con EcoR1 .....	70
Comandos para R .....	70
Análisis de los componentes principales.....	70
Análisis de correspondencia canónica .....	71
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	72
I. Análisis de componentes principales (PCA).....	72
II. Prueba de Mantel .....	73
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74



## RESUMEN

Uno de los objetivos de la microbiología es comprender la enorme diversidad de los procariontes, utilizando conocimientos de otras disciplinas como la biogeografía y ecología microbiana que nos permiten describir su distribución y diversidad. El valle de Cuatro Ciénegas ubicado en el desierto chihuahuense, posee múltiples sistemas acuáticos oligotróficos, que albergan una alta diversidad de procariontes (Souza *et al.* 2004). Uno de estos sistemas es Pozas Azules, que se caracteriza por cientos de cuerpos de agua bien delimitados conocidos como pozas, las cuales se distribuyen a manera de islas. Se ha reportado que estos cuerpos de agua son estables en cuanto a su temperatura y propiedades químicas sobre el tiempo.

Las características de distribución a manera de islas de los cuerpos de agua de Pozas Azules y su baja variación ambiental (pH y conductividad principalmente) presente en las pozas seleccionadas para este estudio, nos permiten examinar el efecto de los factores históricos y locales que podrían incidir en la composición y estructura de las comunidades bacterianas de Planctomycetes. Con este fin se utilizó la técnica de T-RFLPs para conocer la diversidad de los cuatro sitios y determinar el número de clonas necesarias para cada uno. Se construyeron librerías de clonas del gen que codifica para la subunidad del 16S ARNr. Las secuencias obtenidas fueron clasificadas taxonómicamente, agrupadas de acuerdo a su origen y filogenia. Se hicieron pruebas de Mantel para medir la correlación de la diversidad beta con respecto a la distancia geográfica y condiciones ambientales. Además se hicieron dos tipos de análisis multivariados; Análisis de los Componentes Principales (PCA) y de Correspondencia Canónica (CCA).

En primer lugar se encontró un patrón en la distribución de Planctomycetes, similar al de los macroorganismos como plantas y animales: pocas Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs por sus siglas en inglés) presentes en la mayoría de las pozas y muchas resultaron únicas entre los sitios, por lo que cada cuerpo de agua tuvo una composición particular. Las OTUs fueron en gran parte (41%), cercanas filogenéticamente a secuencias de ambientes marinos, lo que es

congruente con trabajos previos. Por otro lado se obtuvieron OTUs que podrían ser endémicas (35.2%) en tres (B, C y F) de las cuatro pozas.

El método de T-RFLPs (Restricción Terminal de Fragmentos de Longitud Polimórfica; por sus siglas en inglés) no representó la diversidad real del phylum, debido a que muchos de los OTUs amplificados mediante esta técnica correspondían a otros grupos filogenéticos (como Cianobacterias), corroborado mediante la comparación de dichos fragmentos con los obtenidos por medio del análisis de librerías de clonas, lo que dificultó la comparación de ambos métodos.

Finalmente se determinó que la estructura de las comunidades de Planctomycetes (diversidad beta) no está influenciada por ninguno de los factores medidos (locales e históricos), sin embargo si existe una asociación de algunos OTUs a ciertas variables ambientales mostrado por el método de correspondencia canónica.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Ubicación, clima e hidrología del valle de Cuatro Ciénegas**

Está ubicado en el desierto chihuahuense y presenta una extensión de aproximadamente 150,000 kilómetros cuadrados. Su altitud promedio es de 735 metros, 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, al centro del Estado de Coahuila, ubicado entre dos sistemas montañosos: al Este se ubica la Sierra Madre Oriental y al Oeste la Sierra Madre Occidental (Souza *et al.* 2004). Este valle es considerado uno de los humedales más importantes en México, por lo que fue decretado por el gobierno de México como Área Natural Protegida, mientras que el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF por sus siglas en inglés) y la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO) lo incluyen como un sitio prioritario para la conservación. En este valle subsisten una gran cantidad de especies endémicas de procariontes, organismos vertebrados e invertebrados como peces y caracoles que son la justificación más importante del decreto.

### **1.1.2 Clima**

Generalmente es seco y semicálido a cálido extremo, con pocas lluvias en verano y ocasionalmente algunas en invierno (INEGI 1988, SEMARNAT 2007). Se caracteriza por una fuerte variación en su temperatura, las escasas precipitaciones pluviales que predominan anualmente varían entre 100 y 440 mm, se presentan en su gran mayoría en verano, manifestándose en escasos aguaceros siendo relativamente común la condición de sequía (SEMARNAP, 1999).

### **1.1.3 Hidrología**

Existen numerosos cuerpos de agua, los cuales brotan de manantiales. Sus diámetros van desde menos de un metro a más de cien, y las profundidades de los mismos van desde 50 centímetros hasta 18 metros. Las características físico-químicas son muy variables, la temperatura varía en un rango de 18 a 35 °C, el pH varía de 5.76 a 8.3, la conductividad tiene valores entre 782 µS y 7.52 mS y los

sólidos disueltos se encuentran en un rango que va de 292 mg/l hasta 3.77 g/l. (SEMARNAT 1999, Forti P. 2004).

Cuatro Ciénegas se encuentra delimitado por grandes sistemas montañosos formados a partir de una compleja historia geológica (Souza *et al.* 2006). Sus múltiples sistemas acuáticos son oligotróficos y poseen condiciones ambientales únicas: es decir, su bajo contenido de nutrientes principalmente de fósforo y nitrógeno, cuyas formas inorgánicas principales son los fosfatos ( $\text{PO}_4$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ), y nitratos ( $\text{NO}_3$ ), genera condiciones de vida extrema (Espinosa-Asuar 2005). A pesar de esta limitante, el valle presenta una alta diversidad de especies, de plantas, animales y bacterias (Bonilla-Rosso *et al.* 2012, Escalante 2008, Pajares *et al.* 2012, 2013, Peimbert *et al.* 2012), algunas de las cuales son endémicas (Souza *et al.* 2006).

#### **1.1.4 Sitio de estudio: Pozas Azules**

Pozas Azules es un sistema que se ubica al suroeste de la sierra de Marcos, caracterizado por cientos cuerpos de agua bien delimitados conocidos como pozas dispuestos en forma de Islas con distancias máximas de 2 Km. Algunos de estos sitios han sido descritos, en cuanto a la diversidad presente en tapetes bacterianos por Bonilla-Rosso *et al.*(2012) y Breitbart *et al.* (2009), como sistemas oligotróficos altamente diversos, en comparación con tapetes de Pozas Rojas y que además poseen una alta diversidad de microorganismos de funciones metabólicas únicas, algunos de los cuales son organismos endémicos. Estos mismos estudios y otros han reportado que la proporción de nitrógeno presente en las pozas es muy baja, así como magnesio, potasio, sulfatos y sodio (Peimbert *et al.* 2012, Bonilla *et al.* 2012, Wolaver *et al.* 2013).

De acuerdo con (Peimbert *et al.* 2012, Pajares *et al.* 2013), Pozas Azules ha sido descrito como un sistema muy estable en cuanto a sus características fisicoquímicas, entre las que destaca la temperatura registrada como constante de 25°C a 28°C sobre el tiempo (Forti P. 2004). Las pozas se encuentran dispuestas en forma de islas de agua (archipiélago) separadas una de otra (Fig. 1). Este sistema acuático constituye un interesante modelo de estudio ya que constituye un

archipiélago de pozas de agua que permite medir efectos geográficos y ambientales en la distribución de Planctomycetes.



Fig. 1. Vista aérea del sistema Pozos Azules. Foto reproducida con permiso de APFCC (<http://www.deserfishes.org/cuatroc/images/web-pictures/habitats/Aquatic/PozosAzules.jpg>).

## 1.2 Planctomycetes

Son un grupo de microorganismos gram negativos que se distribuyen ampliamente en agua o suelo (Fuerst & Sagulenko 2011). Pueden vivir en lugares tan extremos como el desierto de Atacama en América del Sur o en zonas del Océano Atlántico que tienen concentraciones mínimas en oxígeno. Es un grupo bacteriano poco estudiado.

### 1.2.1 Características morfológicas y fisiológicas

Planctomycetes revela una serie de inusuales características, como la ausencia de peptidoglicanos en sus paredes celulares (Lindsay *et al.* 2001) y son las únicas bacterias que poseen compartimentos internos que delimitan regiones celulares (Lindsay *et al.* 2001, Fuerst & Sagulenko 2011, Fuchsman *et al.* 2012). Su reproducción es por gemación o por fusión binaria (Fig. 2), son ovoides y heterótrofos en su mayoría. Algunos grupos son móviles en sus primeras etapas o después desarrollan un disco sésil que les permite adherirse a la superficie de organismos como algas y diatomeas, o ambos (Pizzetti *et al.* 2011).

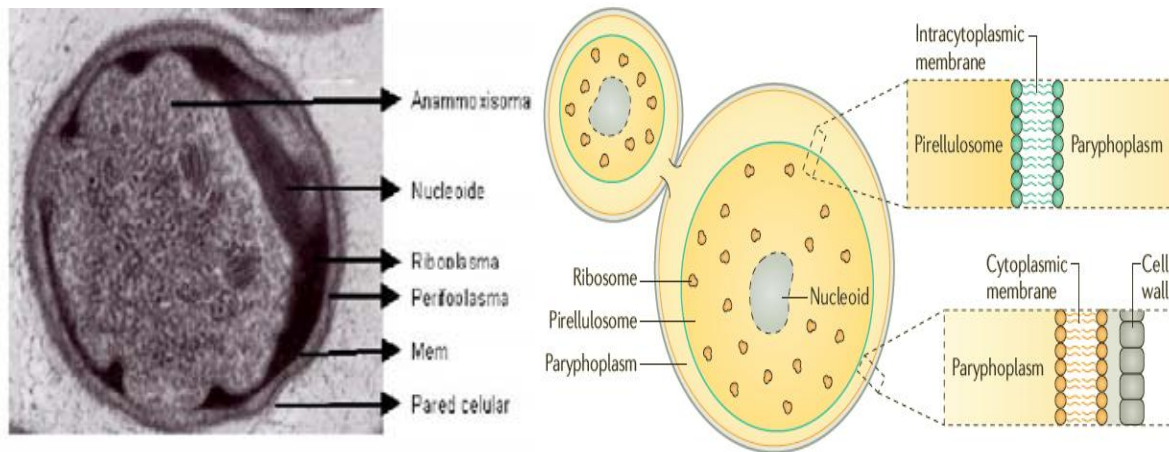


Fig. 2. Estructura celular de Planctomycetes (Kuenen, 2008).

Sólo algunos géneros poseen metabolismo anammox (oxidación anaeróbica del ion amonio). Presentan una estructura interna compleja llamada anamoxisoma, que corresponde a más del 30% del volumen celular (Jetten *et al.* 2005); las funciones atribuidas a este compartimento son la división celular, la replicación cromosómica y la oxidación del amonio a nitrógeno (Fuerst & Sagulenko 2011, Schlesner 1994, Staley, J. T., Fuerst, J. A., Giovannoni, S. & Schlesner 1992; Wang *et al.* 2013).

### 1.2.2 Clasificación

Planctomycetes se ha agrupado con otros phyla bacterianos para formar el super-phylum Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae (PVC) (Fuerst & Sagulenko 2011), que incluye los phyla Verrucomicrobia (principalmente bacterias del suelo), Lentisphaerae (organismos marinos), 'Candidatus Poribacteria' (simbiontes de esponjas marinas), Clamidas (principalmente patógenos humanos), y Candidato OP3 (formado por especies que se encuentran en hábitats anóxicos).

Actualmente el phylum de Planctomycetes se compone de dos clases, Planctomycetacia y Phycisphaerae, aunque se ha propuesto una tercer clase, formada sólo de bacterias anammox, que actualmente están incluidas en la clase Planctomycetacia dentro del orden Brocadiales y el género Candidatus (Fuchsman *et al.* 2012).

La clase de Planctomycetacia se organiza en dos órdenes, Planctomycetales y Brocadiales (Fig. 3). El orden Planctomycetales se compone de la familia Planctomycetaceae con nueve géneros aceptados (*Planctomyces*, *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*, *Singulisphaera*, *Schlesneria*) (Schlesner *et al.* 2004, Kulichevskaya *et al.* 2007, Ward *et al.* 2006, Kulichevskaya *et al.* 2009). El orden Brocadiales se compone de una familia Brocadiaceae que contiene cinco géneros: *Candidatus* Kuenenia, *Candidatus* Brocadia, *Candidatus* Scalindua, *Candidatus* Anammoxoglobus, *Candidatus* Jettenia).

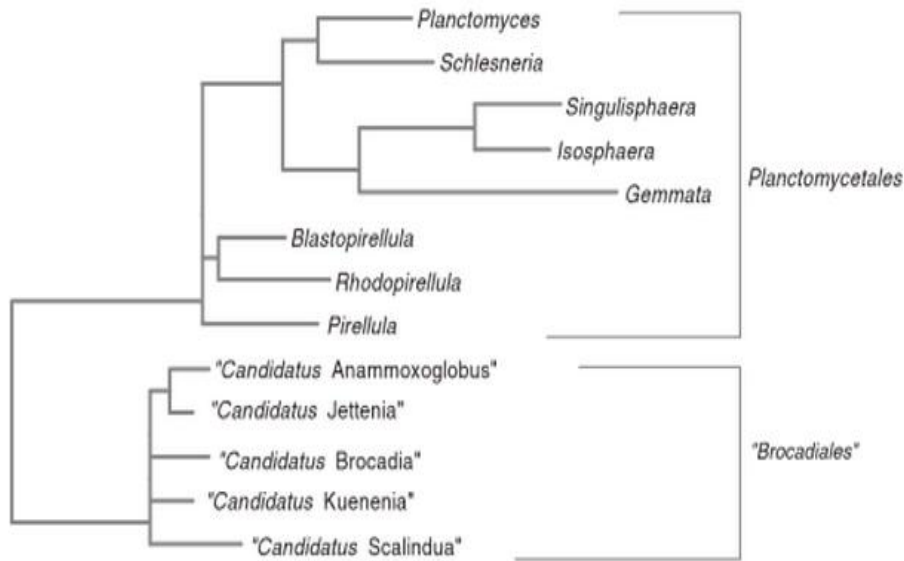


Fig. 3. Clasificación de la clase Planctomycetacia (tomada de NR Krieg *et al.* 2010).

Algunas características generales de la clase de Planctomycetacia, es que son ovoides, pueden ser unicelulares o también agruparse, no todos los géneros son móviles, algunos desarrollan discos adhesivos (*Pirellula*, *Schlesneria*), se dividen por gemación, y son heterótrofas en su mayoría (NR Krieg *et al.* 2010).

Phycisphaerae es una clase recientemente aceptada (Fukunaga *et al.* 2009), compuesta por una sola especie hasta el momento, *P. mikurensis*, que se encuentra asociada a algas (*Porphyra sp.*). *P. mikurensis* es una bacteria gram negativa con forma esférica. Es anaeróbica y su reproducción es por fusión binaria. Cuentan con un flagelo (por lo cual son móviles) y con pili. Se encuentran principalmente en ambientes marinos, y en el suelo, también se han reportado unida a algas marinas (Fukunaga *et al.* 2009).

### **1.2.3 Importancia ecológica y evolutiva**

Las bibliotecas de secuencias del gen que codifica para 16S ARNr de este phylum revelan que estos organismos ocupan diversos nichos ecológicos (Fuerst & Sagulenko 2011) como sedimentos, biofilms, ecosistemas acuáticos y ventilas hidrotermales; también se han reportado en aguas residuales, birreactores de tratamiento de residuos, sedimentos marinos y agregados marinos lo cual es consistente con su papel de degradar materia orgánica compleja, como el carbono obtenido a partir de algunas algas (Kirkpatrick *et al.* 2006, Fuchsman *et al.* 2012).

El reciente descubrimiento de que algunos de estos microorganismos son los responsables de la oxidación anaerobia-autotrófica de amonio (Jetten 2008, Van Niftrik & Jetten 2012), resalta la importancia potencial de estas bacterias para el flujo de nutrientes en el medio ambiente, pues se ha estimado que el 50% de las moléculas de nitrógeno en la atmósfera son metabolizadas por estos organismos (Fuerst & Sagulenko 2011). Por esta razón, son importantes para el ciclo global del nitrógeno-amoniaco y para la remediación de aguas residuales.

Evolutivamente, Planctomycetes presenta características fenotípicas poco habituales entre las bacterias, como la ausencia de peptidoglicanos en su pared celular que los asemeja a las arqueas y como ya se mencionó con anterioridad el descubrimiento de su compartimentación celular caracterizada por orgánulos delimitados, ha levantado preguntas fundamentalmente sobre la evolución de los eucariontes debido a que podrían tener un ancestro en común (Fuchsman *et al.* 2012). Por ello constituyen una de las principales secciones del dominio de las bacterias para comprender la biodiversidad y la ecología microbiana (Fuerst 1995, Lindsay 2001).

### **1.2.4 Planctomycetes en otros sistemas**

No existen muchos reportes sobre los patrones de distribución de Planctomycetes hasta ahora. Los que han sido publicados ponen de manifiesto que no todos los grupos de Planctomycetes se distribuyen de manera homogénea (esto es, que cambia la composición a lo largo de la columna de agua), debido a que no



todos las OTUs presentan los mismos requerimientos metabólicos (Fuchsman *et al.* 2012).

La abundancia de este phylum ha sido correlacionada con el crecimiento de algas (*Phycisphaera murikensis*), y de algunas diatomeas (Bengtsson y Øvreås 2010) de las aguas superficiales de Helgoland en Alemania (Pizzetti *et al.* 2011). Se ha reportado que su diversidad cambia con respecto a las estaciones del año, encontrando un mayor porcentaje de diversidad en primavera, ya documentado por Morris *et al.* 2006, además que su distribución se encontró positivamente correlacionada con el amonio. Estos datos son similares con otro estudio en el Lago di Paola, Italia (Pizzetti *et al.* 2011), que reporta mayores valores de abundancia en las aguas superficiales en verano y una correlación positiva con el crecimiento de diatomeas. Además se encontró que la diversidad de este grupo se encuentra fuertemente influenciada por los cambios en las concentraciones de oxígeno sobre los diferentes niveles de la columna de agua. En este sentido, otros estudios han documentado que la distribución filogenética de Planctomycetes en la columna de agua del Mar Negro (Kirkpatrick *et al.* 2006, Fuchsman *et al.* 2012) se encuentra relacionada con los perfiles de profundidad de la zona (conforme a las concentraciones de oxígeno).

Por ejemplo, algunos grupos se distribuyen tanto en zonas subóxicas (bajas concentraciones de oxígeno) como en zonas muy oxigenadas, lo que significa que estos organismos se adhieren a partículas que se mantienen en la superficie (zona óxica) y que posteriormente se hunden a las zonas subóxicas, mientras que otro grupo de Planctomycetes (específicamente el grupo anammox, que son principalmente autótrofos) estaban presentes sólo en condiciones de poco oxígeno, lo que permite la oxidación de amonio a nitrito.

Además de las concentraciones de oxígeno también se determinó que la distribución de Planctomycetes del tipo anammox se encuentra relacionada con las altas concentraciones de nitrito/nitrato, y bajas concentraciones de amonio dentro de la zona subóxica. Un estudio con resultados muy similares al anterior se realizó en el Norte de Rusia pero en humedales ácidos a diferentes niveles de profundidad del sedimento (Ivanova y Dedysh 2012), y se encontró la misma asociación de este

grupo anammox a concentraciones bajas de oxígeno. Además la abundancia de Planctomycetes mostró una correlación lineal positiva con el pH, (mayor abundancia en pH de 5.3 a 6, y menor abundancia fue a pH muy ácido (3.7-4.5).

### **1.2.5 Planctomycetes en Cuatro Ciénegas**

Dentro del valle de Cuatro Ciénegas, Planctomycetes no está presente en todos los sistemas, aunque se ha detectado en bajas proporciones en sistemas acuáticos como Pozas Azules, Escobedo, Rio Mezquites y Churince (Espinosa-Asuar 2005, Escalante *et al.* 2009, Blaz 2014), en tapetes microbianos (Breitbart *et al.* 2009 y Bonilla *et al.* 2012), y en suelos (López-Lozano *et al.* 2012). Únicamente Breitbart (2009) determinó que Planctomycetes es un grupo dominante en tapetes microbianos de Poza Azul II.

Por otro lado, los trabajos de (Pajares *et al.* 2012, 2013) analizan un mesocosmos formado por comunidades de bacterias en este mismo sistema, en donde Planctomycetes es detectado solamente en algunos tratamientos experimentales como temperatura fluctuante y 40<sup>0</sup>C, así como exposición a UV.

## **1.3 ¿Cómo se estudia a los microorganismos?**

### **1.3.1 Biodiversidad microbiana**

Actualmente, sabemos que los procariontes son los organismos más antiguos, abundantes y diversos del planeta. Se estima que pueden existir alrededor de  $4 \times 10^{30}$  células procariontes distribuidas principalmente en los océanos, lagunas, ríos, suelos y sedimentos (Whitman *et al.* 1998). Por su abundancia, los procariontes representan la mayor reserva de nutrientes en el planeta, incluso por arriba de la concentración de nutrientes presentes en las plantas, por lo que son una parte esencial en el flujo de nutrientes (Rebollar 2012, Whitman *et al.* 1998).

Los primeros acercamientos de los científicos a los organismos procariontes fueron gracias a las enfermedades humanas causadas por éstos. A la fecha, la gran mayoría de los genomas secuenciados corresponden a organismos de importancia médica o agrícola. Por lo anterior, los microorganismos patógenos (en particular las

bacterias) son hasta la fecha los más estudiados, sin embargo, la mayor parte de la diversidad procarionte se encuentra en otros ambientes naturales (no asociados al humano) (Whitman *et al.* 1998). Es en estos ambientes naturales, donde se encuentran las comunidades más complejas de procariontes, así como las más diversas genética y metabólicamente (DeLong y Pace 2001). En general la caracterización de estas comunidades microbianas se hace actualmente mediante el gen que codifica para la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr). El uso de este gen ha revelado una extensa diversidad insospechada, que hasta ahora comenzamos a abordar con las tecnologías de secuenciación y el uso adecuado de parámetros estadísticos para su medición. De esta forma la diversidad de una comunidad microbiana puede describirse a partir del número de especies de organismos diferentes (determinada por las distintas secuencias del gen que codifica para 16S ARNr), y su abundancia relativa en una comunidad determinada. Las medidas de diversidad microbiana son importantes para entender la estructura y dinámica de una comunidad.

Mediante el mejoramiento de técnicas de análisis ha sido posible evaluar la composición de las comunidades microbianas (es decir el número y la identidad de las unidades taxonómicas) y la estructura (es decir, la distribución de abundancias entre estas unidades, así como su relación filogenética) (Christen 2008, Escalas *et al.* 2013).

### **1.3.2 Medidas de diversidad**

La biodiversidad clásicamente se descompone a través de escalas espacio-temporales en tres niveles, considerados como: diversidad local (alfa), diversidad regional (gamma) y diferencia entre las comunidades locales (beta).

**Diversidad alfa ( $\alpha$ ):** es la diversidad dentro de una determinada localidad, la cual se estima por lo general con el número total de especies, conocida como riqueza específica (con índices como; Sobs, Chao 1 (Chao 1984), entre otros) o con métodos basados en la estructura de la comunidad que proporcionan el valor de importancia de cada especie como el índice de Simpson, que sólo considera la dominancia. Existen otros índices que además consideran la equitatividad que

expresa la abundancia proporcional relativa de las especies en una comunidad, por ejemplo Shannon (Calixto *et al.* 2008, Lozupone and Knight 2008).

Otro método que nos permite comparar riqueza de especies entre sitios con diferentes tamaños de muestreo son las curvas de rarefacción. Este método puede ser utilizado para evaluar el esfuerzo de muestreo de las librerías de clonas, con la finalidad de saber si el número de especies (OTUs ) obtenidas representa a la muestra natural (Escalante 2008) y también para comparar la riqueza de especies, en muestras de diferentes tamaños (Pajares *et al.* 2012).

**Diversidad beta ( $\beta$ ):** la diversidad  $\beta$  fue concebida originalmente por Whittaker (1960) como una medida del recambio en la diversidad de especies a lo largo de transectos o través de gradientes ambientales. Las medidas de diversidad  $\beta$  evalúan el grado en que dos o más comunidades difieren.

La diversidad beta es calculada a partir de coeficientes de similitud o disimilitud como Jaccard o Morisita-Horn entre otros.

**Diversidad gamma ( $\gamma$ ):** es la riqueza global de especies en todas las localidades, es decir, a escala regional (Escalas *et al.* 2013, Nemergut *et al.* 2013).

## 1.4 Biogeografía y ecología microbiana

La biogeografía es el estudio de la distribución de los organismos a través del espacio y del tiempo, con el objetivo de revelar los mecanismos que generan y mantienen la diversidad (por ejemplo especiación, extinción, dispersión e interacción de las especies), además de dilucidar en dónde viven y cuál es su abundancia (Green y Bohannan 2006, Hanson *et al.* 2012). Por otro lado, un objetivo central de la ecología es entender la distribución de los organismos dentro de un rango posible de hábitats y los factores que controlan su distribución (Mormile *et al.* 2012). Ambas herramientas son fundamentales para entender la distribución de los microorganismos, y un objetivo importante en los últimos años ha sido dilucidar si esta distribución se encuentra influenciada por causas históricas (cuando los patrones en la diversidad se deben al origen, dispersión y/o extinción de las especies) o ecológicas (los patrones de la diversidad están asociados a

interacciones entre organismos con su ambiente físico) (Lomolino *et al.* 2006, Lindström y Langenheder 2012).

El interés por el estudio de los patrones espaciales de los procariontes tiene su origen a inicios del siglo XX. En 1934, científicos como Bass-Becking creían que las bacterias eran cosmopolitas, y propuso la famosa frase “todo está en todos lados pero el ambiente selecciona”, que hasta nuestros días es tema de discusión en la biogeografía microbiana. Esta frase sugiere que dado el tamaño y gran abundancia de los microbios, existe una elevada tasa de sobrevivencia y dispersión geográfica, que borra los efectos de los factores históricos (como distancia geográfica), lo que implicaría que los microorganismos no tienen patrones de distribución geográfica. En otras palabras, en realidad no habría limitación de la dispersión (biogeografía histórica) (Nemergut *et al.* 2011, Lindström y Langenheder 2012) y los patrones biogeográficos reflejarían exclusivamente las condiciones ambientales contemporáneas (biogeografía ecológica), por lo que entornos similares albergarían taxones microbianos similares, independientemente de la distancia geográfica entre los ambientes.

Sin embargo, con el desarrollo de herramientas moleculares, muchos investigadores comenzaron a cuestionar la existencia de bacterias ampliamente distribuidas, lo que implicaría que no todos los microorganismos están en todas partes como se creía (Ramette y Tiedje 2006). Actualmente se ha reportado la existencia de patrones geográficos en un amplio rango de microorganismos (Hanson *et al.* 2012), con formas de vida acuáticas y terrestres (Cho y Tedje 2000, Whitaker *et al.* 2003, Papke *et al.* 2003, Gilbert *et al.* 2012, Oakley *et al.* 2010 y Shapiro *et al.* 2012, entre otros). Por otra parte también se han documentado casos en donde los patrones geográficos de microorganismos son influenciados por ambas variables ambientales y geográficas (Langenheder y Ragnarsson 2007, Keymer & Boehm 2009).

### 1.4.1 ¿Los patrones de diversidad varían conforme al nivel jerárquico utilizado?

Hay pocos estudios publicados que comparan distintos niveles jerárquicos para analizar patrones de distribución de microorganismos. Uno de ellos es el de (Bissett *et al.* 2010), en el que analiza el papel potencial de la distancia geográfica en la estructuración de las comunidades de bacterias del suelo en diez sitios similares. El estudio exploró una comunidad bacteriana, así como taxa específicos postulados *a priori* por tener capacidades de dispersión limitada (Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae y Xanthomonadaceae) y distintos grupos (por ejemplo formadores de esporas como Bacillaceae, Clostridiaceae y Nitrosomonadaceae). Este trabajo arrojó resultados que diferían de acuerdo con el nivel jerárquico utilizado: a nivel de phyla los sitios fueron muy similares en composición, sin embargo a nivel de OTU los sitios fueron claramente distinguibles en cuanto a la composición de la comunidad.

Por otro lado se encontró un efecto significativo de la distancia geográfica en la estructuración de los taxa con dispersión limitada, que no tuvo ninguna influencia sobre la estructuración de los taxa con mayor dispersión. En este sentido, (Storch y Šizling 2008) mencionan que algunos patrones pueden ser universales, independientemente del nivel jerárquico estudiado, por ejemplo la distribución especie-abundancia, sin embargo existen algunos otros patrones que no son invariantes y que cambian al modificar el nivel jerárquico de estudio, como el trabajo de (Bissett *et al.* 2010). Por lo tanto las consideraciones teóricas generales, limitan notablemente el conjunto de posibles patrones ya que algunos de ellos no siempre pueden ser simultáneamente válidos para un taxón y sus subtaxa, por ejemplo la relación taxón-área no sigue el mismo principio para todos los niveles jerárquicos de estudio, de la misma manera la disponibilidad de energía relacionado a los factores locales no puede afectar a la diversidad de todas las unidades taxonómicas de la misma manera (Storch y Šizling 2008).

Ramette y Tiedje (2006) proponen que el nivel jerárquico debe tomarse en cuenta cuando se buscan patrones geográficos en las distintas escalas espaciales o ambientales, además de su historia de vida. Mencionan además que en general

niveles jerárquicos superiores (amplios como el caso de las Cyanobacterias) han identificado distribuciones cosmopolitas, sin embargo a niveles jerárquicos menores (estrechos como el género *Synechococcus*) han demostrado que ciertas bacterias pueden no estar distribuidas uniformemente sobre la superficie de la Tierra.

### **1.4.2 Hipótesis sobre la biogeografía microbiana**

Actualmente falta mucho por entender y conocer sobre los procesos de la biogeografía microbiana. Martiny *et al.* (2006) proponen cuatro alternativas, para entender la distribución espacial de las comunidades microbianas, de acuerdo con la diversidad beta (Lindström y Langenheder 2012, Pagaling *et al.* 2009). La diversidad beta está determinada por factores ambientales o del hábitat (también llamados factores locales) y geográficos (relacionados entre otras cosas, a la dispersión, llamados factores regionales). En el apartado siguiente ambos factores se describen con mayor precisión. De acuerdo a esto, se plantean las cuatro hipótesis:

1.- La primera hipótesis, o hipótesis nula, se basa en la idea de que los microorganismos están distribuidos al azar sobre el espacio, es decir, la distribución no está determinada por factores locales (biogeografía ecológica como variables ambientales) o regionales (biogeografía histórica, como variables geográficas). Hasta ahora no existen reportes de distribución de este tipo.

2.- La distribución está determinada únicamente por las condiciones locales, la variación espacial de los microorganismos refleja la influencia de la variación ambiental contemporánea.

3.- Plantea que la variación de los microorganismos es moldeada por eventos evolutivos (distancia geográfica) como limitación de la dispersión, lo que condujo a la divergencia genética entre las diferentes comunidades microbianas.

4.- La biogeografía de los microorganismos está determinada tanto por condiciones de hábitat locales como por condiciones regionales (limitación de la dispersión), reflejando la influencia de condiciones ambientales contemporáneas y de eventos evolutivos del pasado (distancia geográfica). Considera que la similitud biótica presente en diferentes conjuntos microbianos debe ser correlacionada con la

similitud ambiental y distancia geográfica respectivamente, distribuciones que reflejarían las influencias de los acontecimientos del pasado y de las condiciones actuales del medio ambiente.

### **1.4.3 Factores locales y regionales que generan y mantienen la distribución de la diversidad microbiana**

Las comunidades pueden ser regulados por factores locales y regionales como:

1. Factores locales: aquéllos que se encuentran relacionados con el medio ambiente y su heterogeneidad. Los factores locales se miden partir de un conjunto de variables ambientales Por ejemplo, Lozupone y Knight (2008), encontraron que la salinidad resultó ser un factor importante en la estructuración de las comunidades microbianas de lagos, demostrando una marcada diferencia entre tipos de hábitats salinos y no salinos. Otros ejemplos se pueden ver en la Tabla 1, marcados en color azul.

2. Factores regionales: son aquéllos que se encuentran relacionados con la dispersión y determinan las tasas de inmigración para la comunidad local. Este tipo de factores son estimados a partir de la distancia geográfica entre sitios y son también importantes para entender la composición de las comunidades bacterianas (Lindström y Langenheder 2012). Ver ejemplos en Tabla 1, marcados en color naranja.

Actualmente se ha registrado en muchos casos que la distribución de las bacterias obedece a diferentes factores locales (ambiente) o regionales (distancia geográfica) según el grupo de estudio, lo que hace evidente que los procariontes presentan patrones biogeográficos, y no se encuentran distribuidos al azar (Tabla1).



Hábitat	organismo	Escala	Técnica	Tamaño de muestra	Variables ambientales	Patrón biogeográfico	A	D	Referencias
<b>Suelo</b>	<i>Pseudomonas fluorescentes</i>	Paisaje	16S-23S ADNr			Endemismo	*		Cho y Tiedje 2000
<b>Sedimento</b>	<i>Sulfolobus</i>	5-9 Km	Análisis Multilocus		pH y T	Divergencia entre poblaciones.	*		Whitaker <i>et al.</i> 2003
<b>Tapete microbiano</b>	<i>Synerococcus</i>	Continental	Clonación de 16s ADNr ITSr	45 genotipos	T, pH, Ca, NaCl y Mg, so <sub>4</sub> , arsénico,	Patrones filogenéticos y de distribución	*		Papke <i>et al.</i> 2003.
<b>Marino</b>	<i>Bacterioplancton</i>	1 Km	PCR (ARISA)	171 OTUs	No mencionadas	Variación de distribución y abundancia	*		Fuhrma <i>et al.</i> 2006.
<b>Manantiales</b>	<i>Mastigocladus laminosus</i>	50 km	16S ADNr, ITS y tres loci codificantes				*		Miller-Coleman <i>et al.</i> 2012).
<b>Suelo</b>	<i>Myxococcus xantus</i>	Local 4445 Km	Análisis Multilocus (clpX, csgA, fibA, icd y sglK)	145 clonas	No considera	Endemismo	*		Vos & Velicer 2008
<b>Pozas de aguas termales</b>	<i>Sulfurihydrogenibium</i>	5-79 Km	Clonación 16s ADNr	1728 clonas	T, pH, H <sub>2</sub> S, conductividad, PO <sub>4</sub> , SiO <sub>2</sub> ,	Endemismo	*		Everroad <i>et al.</i> 2012
<b>Marino</b>	<i>Vibrio cholerae</i>	Costa central de california	ERIC-PCR	115 genotipos	T, salinidad, O <sub>2</sub> , pH, NH <sub>4</sub> , PO <sub>4</sub> , NO <sub>2</sub> y SiO <sub>2</sub> .	Coocurrencia no azarosa. Asociación a variables ambientales y restricción geográfica	*		Keymer & Boehm 2009
<b>Lacustre</b>	Bacterias heterótrofas y Cianobacterias	13 lagos	ARISA	---	T, P conductividad, pH, CO, N <sub>2</sub> .	-heterótrofos con divergencia neutral -Cianobacterias asociación ambiental.	*		Drakare & Liess 2010.
<b>Sedimento estuarino</b>	<i>Desulfolobus</i>	15.5 Km.	PCR cuantitativo DGGE		sulfato y cloruro	Divergencia entre poblaciones	*	*	Oakley <i>et al.</i> 2010.
<b>Marino</b>	Microorganismos	2 Km	Región hipervariable 16s ADNr pirosecuenciación TRFLP'S 16s ADNr	13 OTUs	424	No mencionado	*		Caporaso, <i>et al.</i> 2011.
<b>Lacustre</b>	Bacterioplancton y Zooplancton	700 Km		97 OTUs	T, N, P, pH y conductividad	Decaimiento de similitud biológica por distancia	*		Soininen, <i>et al.</i> 2011.
<b>Marino</b>	Microorganismos	0.1 Km	16s ADNr 16s pirosecuenciación	747 secuencias	496	NH <sub>4</sub> , NO <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> , PO <sub>4</sub> , SiO <sub>4</sub> , CT y N <sub>2</sub> y salinidad. Productividad primaria	*		Gilbert, <i>et al.</i> 2012.
<b>Marino sedimento</b>	Exigobacterium	Cuatro Ciénegas: 4 sistemas acuáticos	16s ADNr 16s, genes concatenados: citC, rpoB, recA y hsp7	183 aislados		pH y salinidad contrastante entre sitios	*		Rebollar 2012
<b>Marino costero</b>	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	Local	16s ADNr	20 genomas	No mencionado	Diferenciación de nicho	*		Shapiro <i>et al.</i> 2012

Tabla1. Revisión de trabajos en donde la distribución de los microorganismos se encontró asociada a factores geográficos (D= distancia geográfica) y a variables ambientales (A). T (temperatura), CO (carbono orgánico) y CT (carbono total).

#### **1.4.4 Patrones en organismos especialistas- generalistas**

Así, la heterogeneidad ambiental es un factor importante en el establecimiento de muchos organismos. Un ambiente heterogéneo es aquél que se haya constituido por diferentes unidades especializadas (Begon *et al.* 1996). La mayoría de los ambientes contienen gradientes de condiciones o de recursos disponibles, o ambos (pueden tratarse de gradientes en el espacio o en el tiempo).

La heterogeneidad ambiental actúa como fuerza diversificadora, porque produce nichos vacantes que pueden ser aprovechados por nuevas variantes (Rainey y Travisano 1998). En ambientes heterogéneos la selección favorecería la emergencia de especialistas. Los modelos de selección en ambientes heterogéneos sugieren, bajo ciertas condiciones correctas, que la diversidad puede mantenerse por selección dependiente de la frecuencia negativa, en donde la adecuación de un genotipo es mayor cuando es raro que cuando es común. Este tipo de selección mantiene la variación genética porque evita que los genotipos raros desaparezcan (Rodríguez-Verdugo 2008).

Los cambios en el medio ambiente pueden promover la diversificación del hábitat, lo que es probable que lleve a un aumento de organismos de hábitats especialistas, es decir, diferentes genotipos adaptados a diferentes nichos. Modelos y estudios de campo previos indican que hay una tendencia en las comunidades ecológicas a ser más hábitats especialistas que generalistas, los últimos suelen mostrar mayor abundancia que los especialistas (Van der Gast *et al.* 2011). En general, los especialistas parecen estar más afectados por factores ambientales, mientras que los generalistas parecen responder fundamentalmente a factores espaciales como la distancia geográfica (Logares *et al.* 2013).

La estacionalidad produce fluctuaciones temporales del ambiente y es una de las manifestaciones más evidentes de heterogeneidad ambiental que tiene un alto impacto en la diversidad, estructura, distribución y abundancia de los microorganismos de una comunidad (Rodríguez-Verdugo 2008).

Por otra parte, se observa con frecuencia que las comunidades bacterianas locales están dominados por taxones que también son dominantes a escala regional

(Sloan *et al.* 2006, Östman *et al.* 2010). En otras palabras, los taxones generalistas abundantes parecen ser también los más prevalentes a escala local. Esta llamada invariancia regional encaja bien con la predicción hecha por la teoría neutral (Hubbell 2001), según la cual las especies comparten características y adecuación similares (éxito reproductivo). Por lo tanto, la composición de la comunidad local está regulada principalmente por la inmigración y la emigración, además de otros procesos conocidos como la deriva genética que en ciertas condiciones puede conducir a la especiación y a la extinción. La invariancia regional también puede predominar si las comunidades bacterianas consistieran de generalistas con amplios nichos, es decir, los taxones se presentan en un rango más amplio de condiciones ambientales locales (Östman *et al.* 2010).

En resumen, los factores que influyen en la distribución de una comunidad son diferentes dependiendo de las historias de vida de los microorganismos que las componen, difiriendo, por ejemplo, entre generalistas y especialistas, como se describió previamente, y entre los taxones de diferente capacidad de dispersión y movilidad. En general se ha visto que los microorganismos considerados como buenos colonizadores parecen estar menos afectados por la distancia geográfica, contrario a lo que sucede en organismos considerados como malos colonizadores quienes parecen estar más influenciados por la distancia geográfica (Bissett *et al.* 2010; Lindström y Langenheder 2012; Wang *et al.* 2013, entre otros).

Los estudios actuales de la diversidad y distribución microbiana derivados de varios enfoques son complementarios para hacer un estudio biogeográfico de los procariontes en específico en niveles jerárquicos menores como Planctomycetes de los que pocos estudios se han desarrollado y que son fundamentales para probar hipótesis y generar información que contribuya a construir modelos que describan y expliquen la distribución de este phylum hasta ahora casi desconocida en sistemas acuáticos, valiosos desde el punto de vista de la conservación, evolución y biotecnológico.

A partir de esto Planctomycetes podría ser considerado como un grupo con distribución semejante a la presente en organismos especialistas de acuerdo con lo reportado en otros sistemas y en Cuatro Ciénegas a niveles jerárquicos

comparables con Planctomycetes, en los que hasta ahora sólo han evidenciado a los factores locales como los responsables de la estructuración de sus comunidades en diversos sistemas acuáticos contrastantes (Cerritos *et al.* 2011, Rebollar 2012) en ambos casos. Sin embargo también planteamos la posibilidad de efectos históricos (medidos partir de la distancia geográfica) sobre la diversidad de este phylum que hasta ahora no han sido detectados en ningún estudio.

## **2. OBJETIVOS**

### **General**

Describir la distribución y diversidad del phylum Planctomycetes en los ambientes acuáticos del sistema Pozas Azules, en el valle de Cuatro Ciénegas, utilizando dos técnicas diferentes (T-RFLPs y clonas ambientales del gen que codifica para 16S ARNr).

### **Particulares**

Determinar si existen patrones de distribución dentro del phylum Planctomycetes y si están asociados a factores históricos (distancia geográfica) y/o a factores ecológicos (variables ambientales).

Contrastar los resultados obtenidos con las dos técnicas moleculares que se utilizaron.

## **3. JUSTIFICACIÓN**

Uno de los principales objetivos de la biogeografía es estudiar la distribución de los organismos en el espacio y en el tiempo, con la finalidad de entender las causas ambientales y/o geográficas de los patrones de distribución que generan y mantienen la diversidad (Hanson *et al.* 2012). Se ha sugerido un tipo de muestreo en estudio biogeográficos el cual consiste en el estudio de sitios con condiciones ambientales similares, con la finalidad de distinguir la influencia de factores geográficos de los ambientales sin que los primeros se vean oscurecidos por

grandes diferencias marcadas en factores ambientales. De este modo uno de los sitios ideales para estudiar la distribución de los microorganismos es Pozas Azules (PA), debido a la disposición de sus diferentes cuerpos de agua (conocidos como pozas) en forma de islas, además de la baja variación ambiental entre las pozas seleccionadas. Estas dos características nos permiten evaluar la contribución de los factores geográficos y factores ambientales a un nivel jerárquico menor, en este caso usando el phylum Planctomycetes, que es un grupo poco estudiado.

Los miembros de este phylum tienen características biológicas, ecológicas y evolutivas poco habituales entre las bacterias que podrían ayudarnos a entender la evolución de los eucariontes, ya que recientemente se ha propuesto que ambos comparten un ancestro en común (Fuchsman *et al.* 2012). Comprender sus distribuciones presentes en los diversos ambientes que ocupan (Fuerst Sagulenko 2011, Lage y Bondoso 2012) es un gran paso que permitirá un mayor acercamiento al conocimiento de estas taxa poco estudiados, ya que representan un excelente ejemplo del valor de estudiar patrones de distribución en otras bacterias que no sean modelos clásicos como *Escherichia. coli*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Colecta de campo**

En febrero del año 2007 se realizó un muestreo en el valle de Cuatro Ciénegas, específicamente en cuatro pozas diferentes del sistema Pozas Azules en un rango de 1.9 km (Fig. 4). Éstas fueron seleccionadas con poca variación ambiental entre ellas, lo que permite que los efectos geográficos (distancia geográfica) no se vean oscurecidos por fuertes efectos ambientales (Bissett *et al.* 2010).

Los cuatro sitios fueron georreferidos con la finalidad de calcular las distancias geográficas que había entre una poza y otra (Poza A o Germán: N 26° 49' 24.4", W 102° 00' 53.2"; Poza B: N 26° 49' 31.8" y W 102° 01' 5"; Poza C o Azul 2: N 26° 49' 34.7" y W 102° 01' 22.8"; Poza F N 26° 48' 37.08" y W 102° 00'

47.64”), información que fue resumida en matrices de distancia geográfica estandarizadas como más adelante se explica.

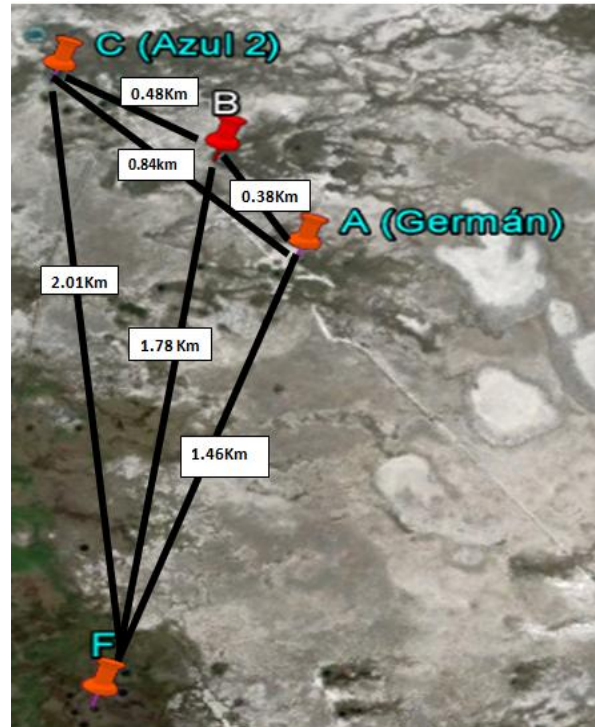


Fig. 4. Sitios de muestreo.

Las variables ambientales (pH, conductividad, sólidos totales disueltos y salinidad) fueron medidas con un equipo Hydrolab YSI600QS (YSI Inc., Yellow Springs, OH) en cinco puntos diferentes dentro de cada poza, de los cuales cuatro puntos fueron tomados a la orilla y uno al centro.

De cada poza se obtuvieron cinco muestras (a medio metro de profundidad), cada una de 2.5 L, las cuales cuatro fueron tomadas de 2 a 4 metros de distancia de la orilla de las pozas y una muestra al centro. Posteriormente estas cinco muestras se revolvieron en garrafones limpios y estériles de 20 L, para formar una muestra compuesta para cada sitio, misma que se dividió en 3 partes iguales, de las cuales se hizo la medición de nutrientes (ver Protocolo 1) y extracción de DNA (ver Protocolo 3), en ambos casos las muestras de agua fueron filtradas con filtros marca Millipore.

## **4.2 Laboratorio**

### **4.2.1 Extracción y amplificación de DNA**

La extracción de ADN de los filtros obtenidos de las muestras de agua por sitio (tres por cada poza) se hizo de acuerdo al Protocolo 3. Posteriormente el ADN obtenido para cada una de las cuatro pozas se amplificó por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando una combinación de oligonucleótidos diseñados para el gen que codifica para la subunidad 16S ARNr del phylum Planctomycetes 27F y Pln930R (Blackwood *et al.* 2005) como se enlista en el Protocolo 4.

### **4.2.2 T-RFLPs**

La Restricción Terminal de Fragmentos de Longitud Polimórfica (T-RFLPs en inglés) es una técnica que ha permitido ampliar el espectro de conocimiento de las comunidades de microorganismos. Esta consiste en la amplificación con oligonucleótidos fluorescentes del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S ARN, mismo que es cortado con enzimas de restricción (específicas de acuerdo al grupo de procariontes a estudiar) generando fragmentos de diferentes tamaños, que representan las diferentes OTUs presentes en una comunidad. Por otro lado, también proporcionan datos de abundancia de los microorganismos (Robledo 2009).

La técnica de T-RFLPs tiene como objetivo dar un panorama preliminar de la diversidad de Planctomycetes presente en los sitios de estudio, y con estos datos determinar cuántas clonas eran necesarias obtener por librería, a partir de la amplificación del gen que codifica para 16S ARNr por la técnica de PCR como se describe enseguida.

Los productos de PCR marcados con oligonucleótidos fluorescentes (tres reacciones para cada sitio, ver Protocolo 4), fueron separados por medio de un gel de agarosa al 1%, mismo que fue visualizado bajo luz UV para la extracción de las bandas del gel como se explica en el Protocolo 5.

Posteriormente los fragmentos amplificados fueron digeridos con tres enzimas diferentes (*Pst I*, *Pvu II* y *Hha I*) para generar una mezcla de patrones de restricción con diferentes longitudes para cada muestra. Estos patrones de restricción fueron procesados y detectados con ayuda de un secuenciador AVANT3100© mediante la técnica de T-RFLPs como se describe en el Protocolo 6.

Las tres enzimas (*Pst I*, *Pvu II* y *Hha I*) usadas fueron seleccionadas por la frecuencia de estos sitios de restricción en secuencias de Planctomycetes obtenidas de Genbank, determinados con mapas de restricción generados en BIOEDIT.

Para conocer los perfiles de las comunidades bacterianas fue necesario analizar los cromatogramas obtenidos con el software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems 2012). Se tomó en cuenta el tamaño de los fragmentos generados a los que se les asignó la categoría de OTU de cada fragmento de restricción, considerando aquellos picos con alturas mínimas de 20 unidades de fluorescencia (Langenheder and Ragnarsson 2007). Con los datos recabados por triplicado para cada sitio, se construyó una tabla de abundancia de OTUs.

Con estos datos se generaron dos dendogramas a partir de índices de disimilitud (diversidad beta): Morisita-Horn y Jaccard con el programa R, versión 3.1.0 (Oksanen *et al.* 2013).

### **4.2.3 Clonación**

La clonación de los productos de PCR del gen que codifica para 16S ARNr se realizó conforme a lo descrito en el Protocolo 7, generando 48 clones en cada sitio de muestreo. Los plásmidos obtenidos se purificaron siguiendo el Protocolo 8.

Con la finalidad de secuenciar sólo los plásmidos que contenían el fragmento de interés, se caracterizaron en geles de agarosa al 1%, conforme a las condiciones y características especificadas en el Protocolo 9. Los plásmidos que contenían el fragmento de interés fueron enviados al laboratorio de la universidad de Washington (Seattle, USA) para secuenciar usando el primer 27F (ver secuencia del oligonucleótido en el protocolo 4), de los cuales se obtuvieron cuatro librerías, una para cada poza (n= 48).



#### **4.2.4 Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas fueron revisadas manualmente con el programa Bioedit versión 7.1.3.0 (Hall 1999) para corregir a ojo errores en las bases. Una vez revisadas, algunas secuencias fueron descartadas por su mala calidad y otras por su origen quimérico. Se hicieron tres tipos de análisis para la detección de quimeras (detalles en el Protocolo 8): con el software Bellerephone (Huber *et al.* 2004), Uchime (Edgar *et al.* 2011) y Decipher (Wright *et al.* 2012). Finalmente fueron alineadas contra la base de datos SILVA en Mothur v.1.31.2 (Slochss *et al.* 2009) con el algoritmo NAST (DeSantis, 2006). Una vez obtenida, esta alineación también fue revisada a ojo en Bioedit.

Las secuencias alineadas y sin quimeras se clasificaron en Ribosomal Database Project (RDP) website (Wang *et al.* 2007) , con lo que se determinó que los oligonucleótidos amplificaron otros grupos de bacterias (Cianobacterias, Alphaproteobacterias, Sphingobacterias, Flavobacterias y Verrucomicrobias) que fueron descartadas del análisis, por lo que finalmente se obtuvieron números desiguales de secuencias de Planctomycetes para cada librería (Librería A: 28, Librería B: 37, Librería C: 24 y Librería F: 30).

#### **4.2.5 Análisis estadísticos**

Las Unidades Operacionales Taxonómicas (OTU's) para las librerías de clonas fueron definidas e identificadas usando el programa Mothur ver. 1.30.1 (Slochss *et al.* 2009) al 97% de similitud. Con este mismo programa se estimaron los índices de diversidad alfa (Shannon y Simpson) y beta (Jaccard y Morisita-Horn) con la finalidad de conocer la diversidad y similitud de OTUs entre los sitios respectivamente, además de calcular estimadores de riqueza (Chao1).

## Índices de diversidad alfa

Chao1 es un estimador que calcula la riqueza de especies observadas en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra (Chao 1984).

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

Donde  $S_{chao1}$  es la riqueza estimada,  $S_{obs}$  es el número de especies observadas,  $n_1$  es el número de OTUs con una sola secuencia y  $n_2$  es el número de OTUs representadas por exactamente dos individuos en la muestra.

Shannon refleja la distribución proporcional de cada especie, tomando en cuenta la riqueza y abundancia relativa de individuos de la misma especie. Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra (Magurran 2001).

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

Donde  $S_{obs}$  es el número de OTUs observada,  $n_i$  el número de individuos en el OTU  $i$  y  $N$  el número total de individuos en la comunidad.

Simpson refleja el grado de dominancia en una comunidad, manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie, es fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes (Magurran 2001).

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde  $S_{obs}$  es el número de OTUs observada,  $n_i$  el número de individuos en el OTU  $i$  y  $N$  el número total de individuos en la comunidad.

## Índices de diversidad Beta

Jaccard estima la similitud entre dos localidades en términos de composición tomando en cuenta la presencia y ausencia, además del número de OTUs compartidos entre éstas (Badii y Landeros 2008).

$$D_{Jaccard} = \frac{S_{AB}}{S_A + S_B - S_{AB}}$$

Donde  $S_{AB}$  es el número de OTUs compartidas entre las comunidades  $A$  y  $B$ ,  $S_A$  es el número de OTUs en  $A$  y  $S_B$  es el número de OTUs en  $B$ .

Morisita-Horn describe la similitud entre dos comunidades en términos de su estructura, tomando en cuenta valores de abundancia proporcional (Badii y Landeros 2008).

$$D_{Morisita-Horn} = 1 - 2 \frac{\sum \frac{S_{A,i}}{n} \frac{S_{B,i}}{m}}{\sum \left(\frac{S_{A,i}}{n}\right)^2 + \sum \left(\frac{S_{B,i}}{m}\right)^2}$$

Donde  $S_{A,i}$  es el número de individuos de la comunidad  $A$  en la  $i$  OTU,  $S_{B,i}$  es el número de individuos de la comunidad  $B$  en la  $i$  OTU,  $n$  es el número de individuos en la comunidad  $A$  y  $m$  es el número de individuos en la comunidad  $B$ .

Ambos índices de diversidad beta fueron transformados restando el valor del índice (1-Jaccard o 1-Morisita-Horn), por lo que reflejan la disimilitud o distancia entre dos comunidades, evaluando composición o estructura según el caso. Los valores obtenidos van de 0 a 1, donde 0 denota comunidades idénticas, mientras que 1 comunidades completamente distintas.

## Curvas de rarefacción e índices de cobertura

Para evaluar el esfuerzo de muestreo se elaboraron curvas de rarefacción y se calculó el índice de cobertura bajo la siguiente fórmula:  $C = (1 - n/N) \times 100$ , donde  $C$  es el porcentaje de cobertura,  $n$  son las OTUs únicas y  $N$  es el número total de clonas analizadas (Ragon *et al.* 2012).

## **Análisis de los componentes principales (PCA)**

Con la finalidad de caracterizar la variación ambiental de los sitios de muestreo se realizó un análisis de PCA (material suplementario I y comandos R para PCA) en el programa de R versión 3.0.1 (Oksanen *et al.* 2013).

## **Análisis de Correspondencia Canónica (CCA)**

Se realizó para modelar la respuesta de las OTUs frente a los parámetros ambientales (Cuadras 2014), a partir de los datos de abundancia de OTUs y matrices ambientales.

## **Pruebas de Mantel**

Para evaluar la correspondencia de patrones ambientales o geográficos en la distribución de las OTUs se construyeron tres matrices diferentes. La primera fue la matriz de diversidad beta a partir de los índices Jaccard y Morisita-Horn. La segunda matriz fue la de distancia geográfica calculada en Km (a partir de los valores de longitud y latitud). La tercera matriz fue la de distancia ambiental. Para la construcción de esta, los valores ambientales fueron normalizados  $((x - \text{media}) / \text{desviación estándar})$  y estandarizados bajo distancias euclidianas calculando el valor absoluto:  $((\text{valor } x) - (\text{valor } y))^2)^{0.5}$ . Se construyó de dos formas: en el primer caso cada variable se consideró por separado, y en el segundo caso se hizo una matriz única de distancia euclidiana ambiental para las variables ambientales en conjunto. La selección de estas variables explicativas ambientales se hizo conforme a tres criterios estadísticos. El primero fue seleccionar variables con valores de PCA mayores a 0.6 (en este caso se tomó en cuenta el primer componente que explica el 68.82 % de la variación total, e involucra las siguientes variables: DOC, salinidad, Cl, TDS y conductividad). El segundo criterio fue mediante la prueba de correlación de Pearson, con la que se descartaron variables correlacionadas entre sí (COD y Cl ( $r=0.803$ ,  $p=0.046$ ), Cl y salinidad ( $r=0.999$ ,  $p=0.041$ ) y salinidad con TDS ( $r=0.999$ ,  $p=0.049$ ) por lo que fueron seleccionadas Cl y conductividad. Por último también se consideraron variables con relevancia ecológica, en este caso PT (fosforo total), NO<sub>2</sub> (óxido nítrico), pH y CT.

Tomando en cuenta los tres criterios ya mencionados se eligieron un total de seis variables de los diez parámetros fisicoquímicos medidos; pH, conductividad, carbono total, carbono inorgánico, fósforo total y óxido nítrico.

Para los tres tipos de matrices generadas se hicieron pruebas de Mantel (Mantel, 1967) con la finalidad de determinar si existía una correlación de las variables geográficas y ambientales con respecto a la distribución de Planctomycetes en los cuatro sitios, utilizando la función de mantel en R (Oksanen *et al.* 2013).

#### **4.2.6 Filogenias**

La identidad filogenética de las OTUs se confirmó mediante la construcción de dos árboles filogenéticos; (1) Neighbor Joining usando el programa Mega5 (Tamura *et al.* 2011) con 1000 réplicas de bootstrap. Este árbol resultante fue editado con el programa ITOL (index.shtml <http://itol.embl.de/>) con sus respectivas abundancias de OTUs por sitio y (2) Máximum Likelihood bajo el modelo de sustitución F81+I+G, modelo determinado por la prueba AIC de JModel (Darriba *et al.* 2012), usando 10000 réplicas de bootstrap en PhyML v3.0 (Guindon *et al.* 2010).

#### **4.2.7 Análisis del origen de las secuencias**

El análisis del origen de las secuencias tuvo como objetivo determinar a qué ambiente pertenecen el grupo de secuencias obtenidas de Planctomycetes para los cuatro sitios.

Se investigó el sitio de muestreo del que proceden las secuencias más parecidas a las clonas obtenidas en nuestro análisis, a un 97% mediante BLAST, tomando en cuenta sólo las primeras tres clonas con mayor parecido, y descartando aquellas que pertenecieran a la misma publicación, en la base de datos de Pub-Med (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). De este dato de origen o procedencia de nuestras secuencias se hicieron gráficas de los cuatro sitios. Las secuencias que no tuvieron parecido a ninguna otra secuencia de Planctomycetes en el análisis fueron clasificadas como “endémicas” en esta tesis.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 T-RFLPs

Los datos obtenidos con la técnica de T-RFLPs se obtuvieron de cromatogramas similares al del ejemplo que se muestra en la figura 5. Los picos azules hacen referencia a cada uno de los fragmentos de restricción del gen que codifica para 16S ARNr que se generaron, en este caso, para la comunidad de Planctomycetes de la poza A. Por ejemplo, en la figura se observan dos picos azules de 365pb y 65 pb, respectivamente, sin embargo hubo picos más pequeños (que a esta escala no se ven), que también fueron tomados en cuenta. El tamaño y número de los picos fue importante para determinar cuántas clonas eran necesarias para nuestro análisis

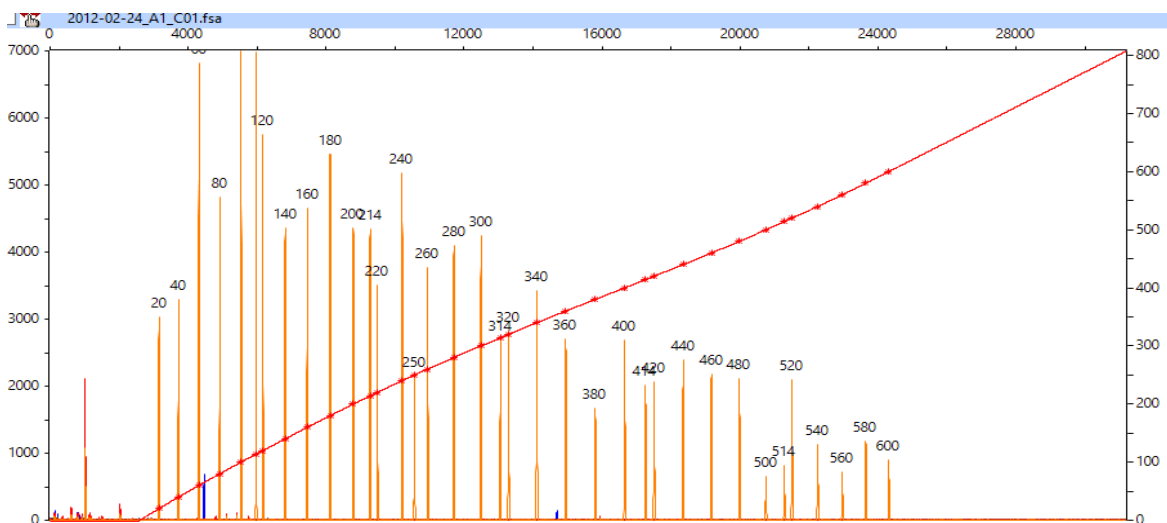


Fig. 5. Perfil de T-RFLPs para el sitio A. Cada pico es equivalente a una banda de ADN en un gel. Los picos naranjas corresponden a la escala del marcador molecular Liz 600, los picos en azul fueron utilizados en este trabajo (OTUs), y son los que corresponden al oligonucleótido 27F. Los picos proporcionan información de riqueza (número total de picos azules para cada perfil) y abundancia, equivalente a las alturas de los picos.

Los datos de abundancia y riqueza de OTUs se ilustran en el dendrograma (Fig. 6.) Se obtuvieron un número total de 30 OTUs, distribuidas de manera diferente entre los sitios. El sitio con mayor número de OTUs fue F (con 22), mientras que el sitio con menor número de OTUs fue la poza A (con 5). Por otro lado las pozas de mayor similitud son C y A seguidas de B y F como se ilustra en el siguiente dendrograma.

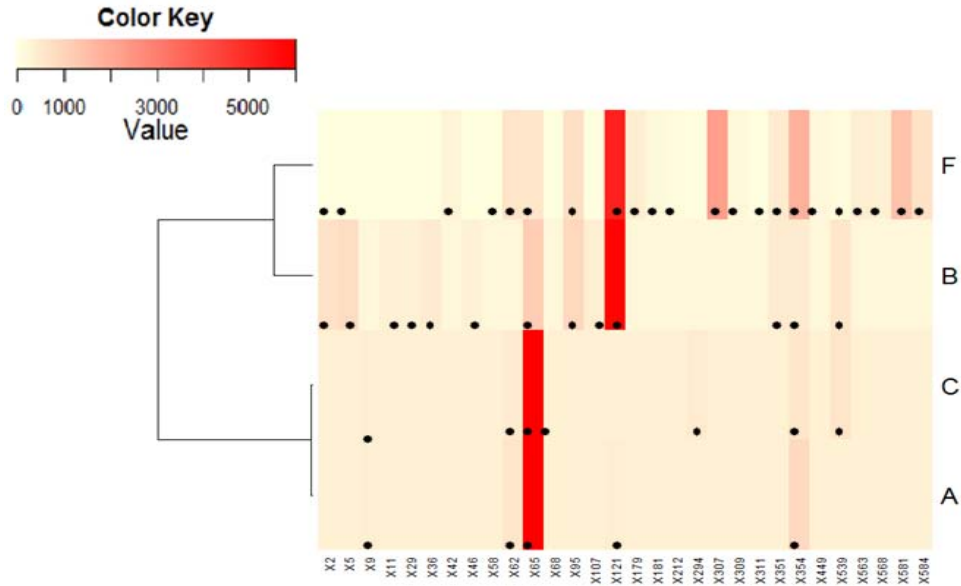


Fig. 6. Dendrograma obtenido a partir del índice de Jaccard, que ilustra la similitud y composición de las pozas. Los 30 OTUs (tamaños de los fragmentos en pares de bases) se encuentran denotados por los diferentes valores inferiores la figura. La intensidad del color indica la abundancia de cada OTU señalado por los valores de la clave de color en la parte superior izquierda. Las figuras negras señalan todas las OTUs para cada sitio.

## 5.2 CLONAS

### 5.2.1 Descripción de la diversidad

En el estudio de diversidad de las comunidades se obtuvieron en total 119 clonas (Librería A: 28, Librería B: 37, Librería C: 24 y Librería F: 30 clonas, respectivamente), de cuyas secuencias se determinaron 17 OTUs al 97% de identidad. Con esta información fue posible definir cuáles eran los filotipos u OTUs más abundantes en los cuatro sistemas de Pozas Azules (Figura 7). Cada comunidad presentó una composición y abundancia diferente: por ejemplo, para las pozas A y C la mayor parte de la diversidad está representada por la clase Phycisphaerae (en tonos naranja en la figura), con una sola OTU para la Poza A y tres OTUs para la poza C. Para las otras dos pozas, B y F, la clase más abundante es Planctomycetacia (en tonos azules) con tres OTUs para la poza B y tres OTUs para la poza F.

Por otra parte, se determinó que en tres pozas (B, C y F) existen grupos endémicos (con un 35.2% del total de OTUs, marcados en color morado en la Fig.

7). Estas OTUs fueron clasificadas como endémicas porque son secuencias únicas de las que no se ha encontrado hasta ahora reporte de una secuencia similar en la literatura o en las bases de datos.

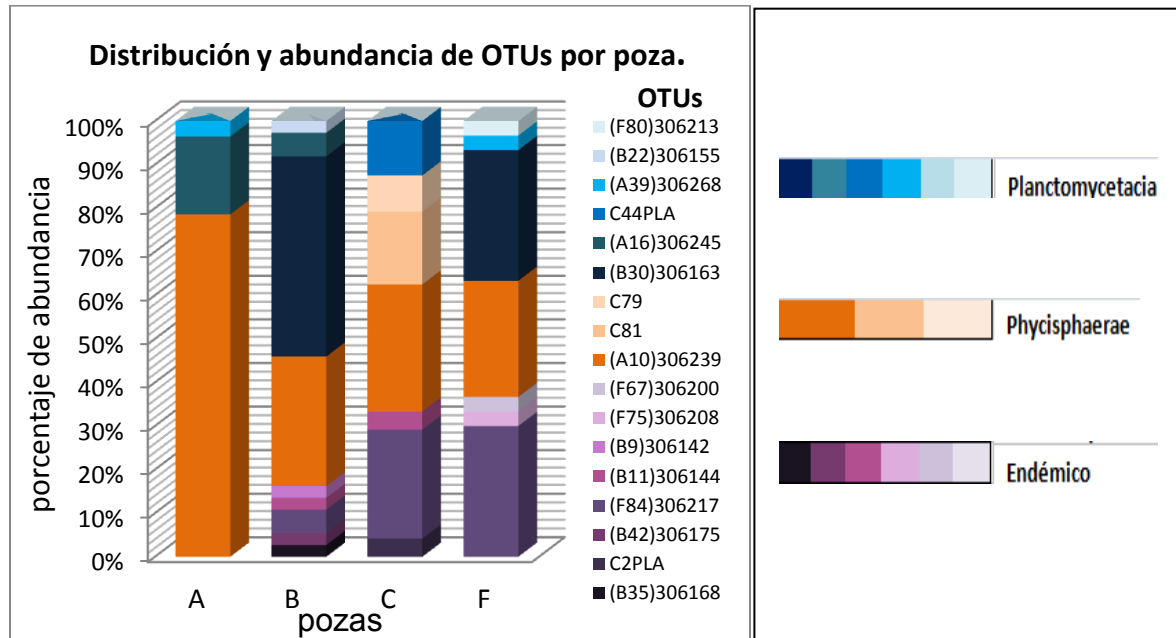


Fig. 7. Distribución y abundancia de OTUs por poza: cada barra ilustra el porcentaje de clonas y el número de OTUs (denotados con diferentes tonalidades de colores como lo indica el cuadro superior) para cada sitio. Morado: OTUs endémicos (no similares a ninguna otra secuencia en las bases de datos), azul: Clase Planctomycetacia, naranja: Clase Phycisphaerae.

## 5.2.2 Índices de diversidad alfa y beta

### Diversidad alfa

Conforme a los valores obtenidos (Tabla 2) podemos decir que la comunidad más diversa de acuerdo con los índices de Shannon y Simpson es C, los cuales evalúan en el primer caso la equitatividad (que se define como la distribución proporcional de las abundancias relativas, es decir, la proporción que representan los individuos de una especie particular respecto al total de los individuos de la comunidad), y en el segundo caso, Simpson evalúa la dominancia, que se define como la posibilidad de extraer de la comunidad dos individuos al azar de la misma especie.



Por su parte, A resultó ser la comunidad con menor diversidad. Por otra parte el índice de Chao muestra que el sitio de mayor diversidad es B, mientras que el menos diverso es A, coincidiendo en este último con los valores de los otros dos índices.

Basado en	Riqueza		Equitatividad	Dominancia
Comparación	Sobs	Chao	Shannon	Simpson
<b>A</b>	3	3	0.616129	0.637566
<b>B</b>	9	15	1.603006	0.274538
<b>C</b>	7	7.5	1.736419	0.166667
<b>F</b>	7	13	1.528345	0.229885

Tabla 2. Índices de diversidad alfa.

## Diversidad beta

La diversidad beta reflejó la diferencia de composición entre los cuatro sitios. (Tabla 3) El índice Jaccard mostró un porcentaje de disimilitud alto en la composición de los sitios (el promedio para todos los sitios fue 0.8103). Por lo tanto, cada poza comparte sólo una pequeña fracción del total de su composición. El Índice de Morisita-Horn mostró valores de disimilitud más bajos que los valores obtenidos con el índice de Jaccard. El promedio para todas las pozas fue de 0.4333, y las pozas con menor disimilitud entre ellas fueron B y F (0.17), seguidas de C y F (0.33). El resto se parecen en menor proporción.

Basado en	Estructura de la comunidad	Miembros de la comunidad
Comparación	Morisita-Horn	Jaccard
A-B	0.49829	0.818182
A-C	0.461986	0.888889
A-F	0.534881	0.75
B-C	0.60129	0.785714
B-F	0.172617	0.785714
C-F	0.331307	0.833333

Tabla 3. Índices de diversidad beta.

### 5.2.3 Curvas de Rarefacción

Las curvas generadas para las pozas A, B, C y F no alcanzan una asíntota (Fig. 8), lo que sugiere que estos sitios requieren de un mayor esfuerzo de muestreo, para completar el inventario de OTUs, sugerido por la evidencia ascendentes de las curvas. Sin embargo, los valores de cobertura (A: 96.43, B: 86.49, C: 91.66, F: 86.66) nos indican que las cuatro pozas fueron muestreadas a más del 80%, lo cual representa un muestreo razonable.

Las curvas de rarefacción ilustran que el mayor número de OTUs que podríamos esperar es para las pozas C y B; por el contrario, la poza menos diversa sería la A. Contrastando estos resultados con los obtenidos para la diversidad alfa observada (Tabla 3), B y C son las pozas que Chao y Shannon respectivamente, consideran como las más diversas. Por otro lado, la poza con menor diversidad (A) coincide para todos los índices.

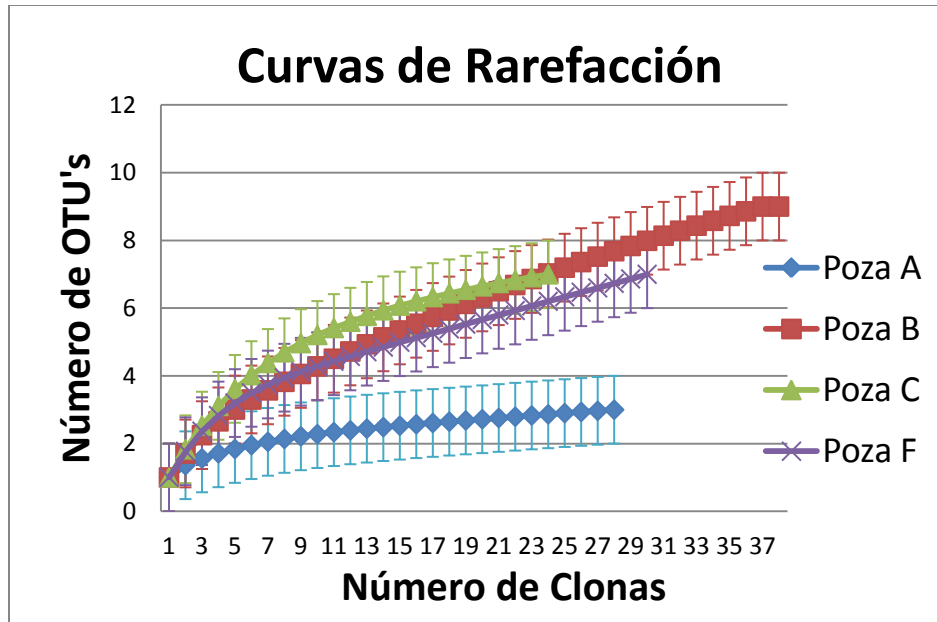


Fig. 8. Curva de rarefacción de las librerías de clones.

### 5.2.4 Análisis de origen de las secuencias

En la clasificación del origen de las secuencias (Fig. 9), se detectaron OTUs que en su mayoría fueron cercanos filogenéticamente a bacterias marinas (41.18%). Así mismo se encontró en menor porcentaje OTUs asociadas a biopelículas (0.84%).

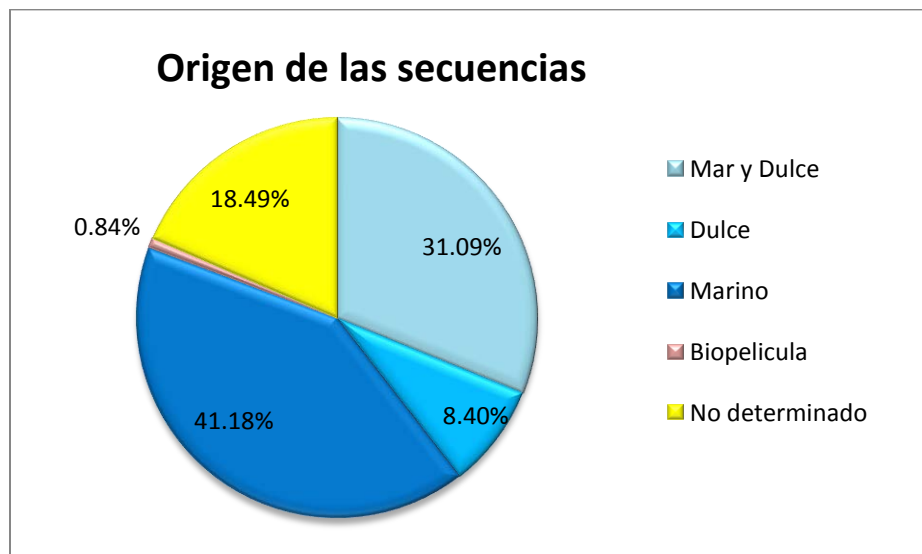


Fig. 9. Origen de las secuencias de todas las pozas. Las OTUs no determinados son aquéllos de los que no se obtuvo información suficiente.

Este mismo análisis dividido por poza (Fig. 10) arrojó los siguientes resultados: en la poza A predominan organismos de origen marino (78.6%); en la poza B los de hábitats marinos y de agua dulce (51%); mientras que la composición de la poza C se encuentra más homogénea, en ésta predominan los OTUs de ambientes marinos y dulces. En la poza F dominan los organismos de origen no determinado.

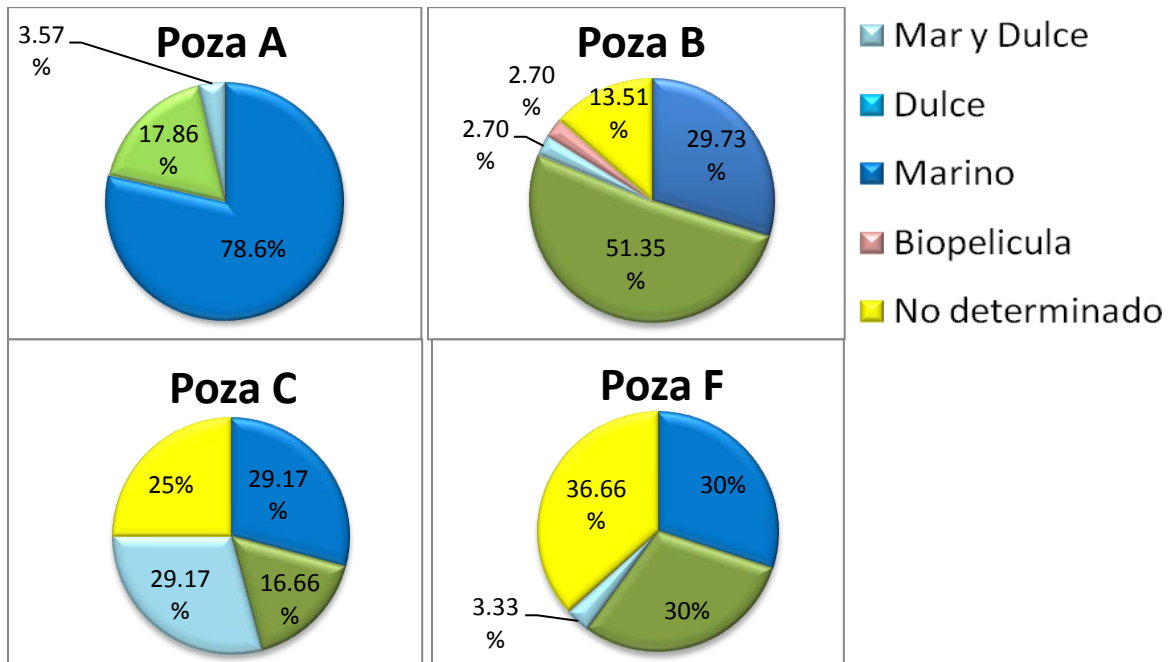


Fig. 10. Origen de los OTUs de acuerdo a Pub-Med por sitio. A con n= 28, B n=37, C n=24 y F n=30.

Además del resumen del hábitat al que se encontraron asociadas las OTUs, en la Tabla 4 se describe a qué grupo filogenético corresponden, cuáles son sus funciones y a qué secuencias son más similares. Conforme a los datos obtenidos, se encontraron organismos de diversas características.

OTU	BLAST %	Secuencia	Ambiente	¿Quién es?	¿Qué hace?
A10	98	FR647651	Marino		Organismos que metabolizan una gran variedad de compuestos de C, por ello se propone que son más diversos en lugares ricos en C o N-acetilglucosamina).
C81	99	AF445715	Agua dulce	Planctomycetes; Phycisphaerae, Phycisphaerales	Son esféricas (0.5-1.3 µm) con un solo flagelo y Pili, móviles, anaeróbicas facultativas. Se reproducen por fisión binaria. Se encuentran principalmente en ambientes marinos y también se han encontrado unidos a algas marinas (Bereich <i>et al.</i> 2005, Fukunaga <i>et al.</i> 2009).
C79	98	AF445715	Agua dulce		
B30	99	NR_074670	Dulce o Marino	Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetales; Planctomycetaceae; Planctomyces; <i>Planctomyces limnophilus</i> .	Organismo Aeróbico, gram negativo. Posee baja tolerancia a la sal, utiliza fuentes de carbono, son colonias rojas. Llevan a cabo la reducción desimilatoria de nitrato. No forma nitrato de forma anaeróbica y es tolerante en un 30% al CO (Labutti <i>et al.</i> 2010). Ciclo celular con células madre ovaladas sésiles con discos adhesivos y tallos celulares que les permiten adherirse a las superficies y células hijas móviles con un solo flagelo producidas por gemación con un flagelo polar, también se encuentran en hábitats salinos (Krieg <i>et al.</i> 2010).
C44	99	AY902716/FR647651	Dulce o Marino		Organismos relacionados al bacterioplancton que se encuentran normalmente en medios que contienen fuentes de carbono complejas, como el extracto de levadura o peptona (Gich <i>et al.</i> 2005). Metabolizan una gran cantidad de compuestos de CO, por lo que su Crecimiento es limitado por falta de COD (Sjöstedt <i>et al.</i> 2012).
B11	99	AY902713	Agua dulce	Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetales	
C2	99	AY902698/FR647651	Agua dulce		
PLA			Marino		

<b>B22</b>	99,	AJ616295	biopelícula	Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetale s;	Formadores de biopelículas importantes en los procesos biogeoquímicos mediante el aumento de almacenamiento transitorio hidrodinámico de los nutrientes y la retención de partículas en suspensión, que provocan cambios estacionales en la composición de las comunidades. Por lo que se cree que estos organismos podrían degradar detritos de plantas y polisacáridos de algas (Brummer <i>et al.</i> 2004).
<b>F67</b>	99	JQ700598	Marino	Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetale s; Planctomycetaceae; Rhodopirellula;	Son aeróbicos, de forma ovoide no móviles en su etapa adulta, Gram-negativas. Es un organismo modelo en la degradación aeróbica de carbohidratos. Tiene forma de roseta (Wecker 2009).
<b>A39</b>	98	FJ844355	Agua dulce	Planctomycetes; Planctomycetia;	Sin descripción
<b>A16</b>	97	EU980228	Agua dulce o Marino	Planctomycetale s	
<b>F84</b>	92	FJ485093	No reportados	Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetale s;	No reportados
<b>B9</b>	92	DQ070829			
<b>B42</b>	89	FJ902304			
<b>B35</b>	90	EU753675			
<b>F75</b>	91	JN825583			
<b>F80</b>	95	CU926888			

Tabla 4. Características de las OTUs obtenidas de acuerdo a su origen. Algunos OTUs obtenidos no tienen descripción (ND), debido a que no se encontró nada parecido en las bases de datos usadas, por lo tanto no hay información sobre ellos.

### 5.3 Análisis de los parámetros ambientales en Pozas Azules

Las pozas son, en general, similares en cuanto a condiciones ambientales (Tabla 5), sin embargo, la Poza F es la que tiene mayor variación en conductividad, CI (carbono inorgánico), CT (carbono total) y salinidad. Además, de las cuatro, esta

poza es la única que posee COD (carbono orgánico disuelto). Por lo tanto existe una cierta variación ambiental, como se muestra en el análisis de PCA, el cual indica que el primer componente explica el 69% de la variación, dividiendo las pozas en dos grupos: La poza F en un lado y las pozas A, B y C en el otro (material suplementario I).

Por otra parte el nitrógeno en forma de NO<sub>2</sub> está presente en la poza C, y ausente para el resto de los sitios. Los niveles de algunos nutrientes resultaron tan bajos que no fueron detectados.

<b>Parámetros ambientales</b>	<b>Poza A</b>	<b>Poza B</b>	<b>Poza C</b>	<b>Poza F</b>
Temperatura (°C)	20.8±0.04	21.6±0	23.7±0.05	---
Conductividad (µs)	2501.60±8.73	2529.0±3.67	2883.20±3.63	1940.00±0
Salinidad (mg/L)	8.704±0.54	8.512±1.24	7.660±0.83	3.180±0
pH	7.76±	7.53±	7.712±0.01	7.805±0.12
TDS (ppt)	1.3±0	1.3±0	1.5±0	1±0
CT (mg/L)	120.265±0.54	109.223±14.04	110.41±19.36	102.280±3.85
CI (mg/L)	120.265±0.54	117.513±7.14	111.28±18.12	41.873±1.38
COD (mg/L)	0	0	0	60.4± 3.54
NT (mg/L)	0	0	0	0
NO <sub>2</sub> (mg/L)	0	0	0.003±0.0015	0
NID (mg/L)	0	0	0	0
PT (mg/L)	0.834±0.09	0.889±0.02	0.873±0.52	0.918±.03
PID (mg/L)	0	0	0	0

Tabla 5. Parámetros ambientales por sitio. TDS (sólidos totales disueltos), CT (carbono total), CI (carbono inorgánico), COD (carbono orgánico), POD (fósforo orgánico disuelto), NID (nitrógeno inorgánico disuelto), NO<sub>2</sub> óxido nítrico, NID (nitrógeno inorgánico disuelto), PT (fósforo total) y PID (fósforo inorgánico disuelto).

## 5.4 Patrones de Distribución

### Correlación de similitud genética con factores ambientales y geográficos

#### Mantel

Para determinar la importancia relativa de las condiciones ambientales y geográficas en la distribución de la diversidad de Planctomycetes se hizo una prueba de Mantel.

De acuerdo con las pruebas de Mantel, no se encontró una correlación significativa de las matrices de similitud genética (Jaccard o Morisita-Horn), con respecto a la distancia geográfica y para ambas matrices ambientales; individuales (material suplementario II) y una general (Tabla 6).

Diversidad $\beta$	Distancia ambiental		Distancia geográfica	
<b>Morisita-Horn</b>	r= -0.4681	P= 0.8297	r= -0.7203	P= 0.9609
<b>Jaccard</b>	r= 0.3547	P= 0.2114	r= -0.1151	P= 0.5844

Tabla 6. Prueba de mantel para la matriz general única de distancia ambiental.

#### Análisis de Correspondencia canónica (CCA)

Para explorar más a fondo la asociación entre la composición de OTUs y parámetros ambientales, realizamos un análisis de Correspondencia canónica (CCA). Muchos OTUs se asociaron a un sitio y además corresponden a variables ambientales específicas. Por ejemplo, la superposición de OTUs en la parte inferior izquierda de la Figura 11 corresponde con la presencia de NO<sub>2</sub>, siendo OTUs únicos del sitio C. En contraste, hay OTUs que no se encuentran asociadas estrictamente con ninguna variable ambiental o poza (más de un sitio) y se distribuyen a través de los ejes del grafico.



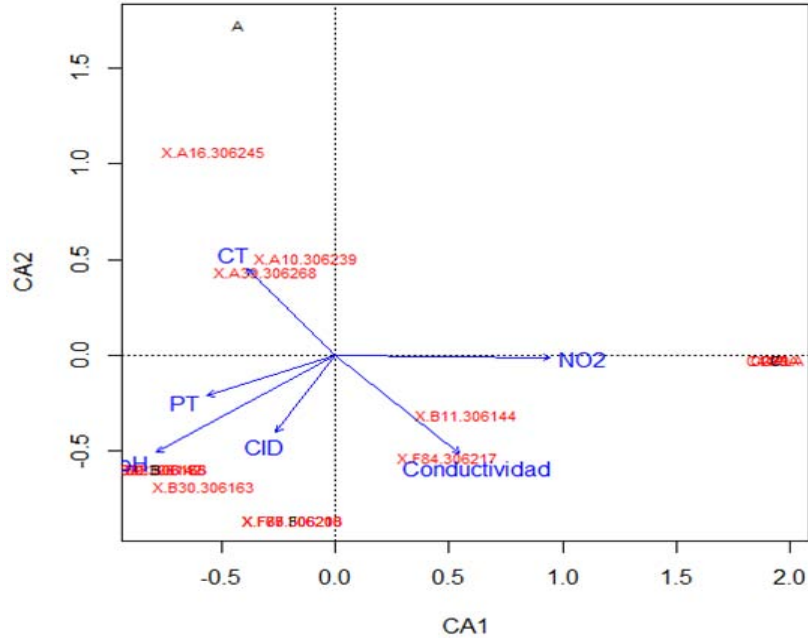


Fig 11. Análisis de correspondencia canónica (CCA) ilustra la respuesta de OTUs a parámetros ambientales. El texto corresponde al nombre de las OTUs para las comunidades de Planctomycetes en cada poza (denotadas con letras A, B, C y F). Los vectores muestran las seis variables ambientales seleccionadas.

## 5.5 Filogenia

En el árbol de máxima verosimilitud (Fig. 12) se aprecia claramente la formación de dos grupos filogenéticos en los Planctomycetes mismos que coinciden con la clasificación de las clases a las que pertenecen (Planctomycetacia y Phycisphaerae). Existen algunos grupos endémicos de Pozas Azules y algunas otras OTUs de las que no se tenía clasificación por ser secuencias que no se parecían a ningún organismo en las bases de datos, pero resultaron pertenecer al phylum Planctomycetes como se ve en la filogenia de máxima verosimilitud, por lo que es posible que sean también sean endémicas.

La OTU A10 (Phycisphaerae), como se puede apreciar, es la única que está presente en todas las pozas como se indica con los colores. La F84 (Phycisphaerae), otra OTU con amplia distribución se encuentra en tres de los cuatro sitios; mientras que A16 (Planctomycetacia) y B30 (Planctomycetacia) ambos presentes en dos de los cuatro sitios y el resto de las OTUs presentan distribuciones restringidas y poco abundantes.

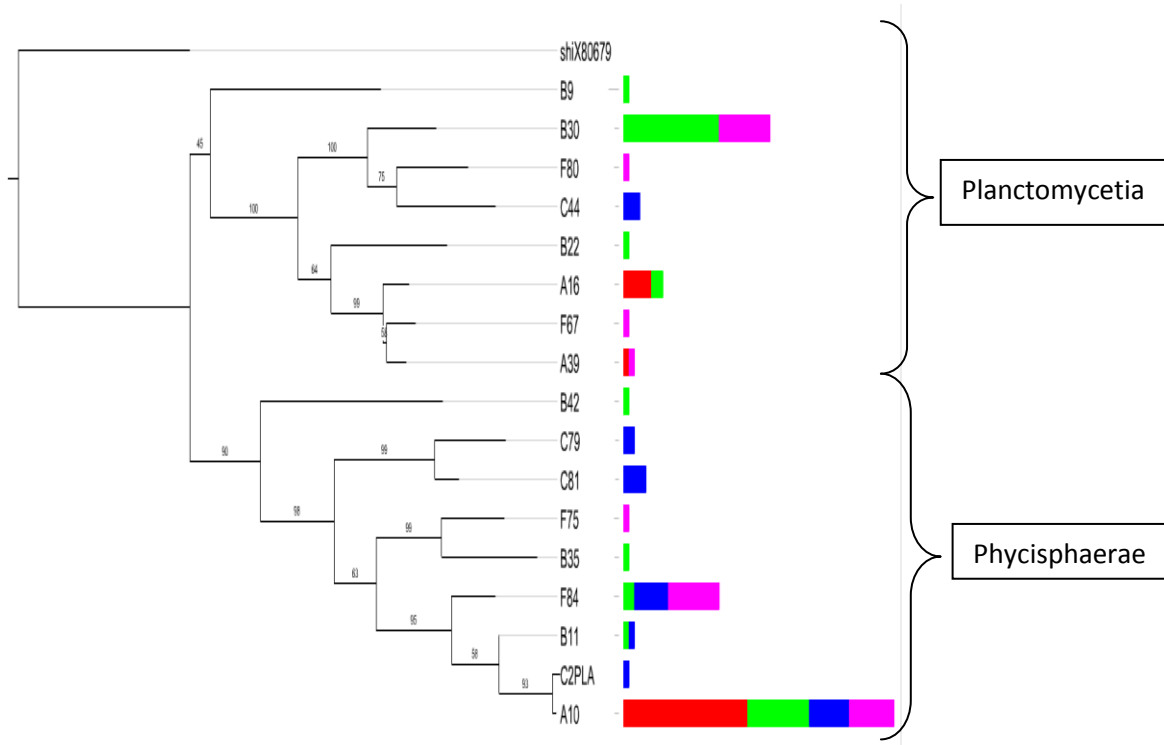


Fig. 12. Árbol de máxima verosimilitud del gen que codifica para 16S ARNr. Los colores corresponden a la abundancia para cada poza (rojo es poza A, verde es poza B, azul es poza C y rosa es poza F). El grupo externo es una secuencia de Proteobacteria.

La topología de la filogenia de Neighbor Joining fue muy similar a la obtenida en el árbol de máxima verosimilitud, por lo que no se muestra.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 T-RFLPs

Los T-RFLPs resultaron ser un buen método para realizar un análisis preliminar de la diversidad de las pozas, por su alta sensibilidad para detectar genomas que se encuentran en concentraciones tan bajas como el 1% total de la comunidad (Eguarte *et al.* 2007). Por ello se obtuvo un panorama general que permitió tener una idea de la cantidad (diferentes tamaños de fragmentos) de OTUs y de su abundancia. Con ello fue posible determinar un tamaño de muestra, que de acuerdo a las curvas de rarefacción y al índice de cobertura, generaron un muestreo razonable.

Los datos obtenidos con este método ilustran mayor diversidad en las pozas B y F, como se puede apreciar en el dendograma (Fig. 6); sin embargo casi todos los sitios presentan bajas abundancias para muchas OTUs). Esta baja abundancia nos permitió suponer que estos microorganismos podrían formar parte de lo que actualmente se conoce como biosfera rara (Pedrós-Alió 2012) en Pozas Azules.

Por otra parte, es importante mencionar que a pesar de ser un buen método, presentó algunas desventajas: distintas especies pueden tener el mismo sitio de corte para la misma endonucleasa, por lo que la biodiversidad presente puede estar sobreestimada por la presencia de fragmentos con el mismo tamaño, que en realidad pudieran pertenecer a organismos totalmente diferentes, es decir por la presencia de homoplasia en los fragmentos (Robledo 2009). En el caso de nuestro análisis, los diferentes fragmentos generados en los perfiles de T-RFLPs no sólo pertenecían a Planctomycetes, si no a otros grupos distintos, principalmente a Cianobacterias, y en menor proporción a otros phyla como Bacteroidetes, Verrucomicrobia y Proteobacterias, porque secuencias pertenecientes a estos phyla fueron obtenidas cuando se generaron las librerías de clonas. Por lo tanto, los datos obtenidos con T-RFLPs en este trabajo, no reflejan totalmente la diversidad real de Planctomycetes en su ambiente natural, por lo cual la comparación de los índices de similitud obtenidos con T-RFLPs contra los obtenidos en las librerías de clonas, fueron diferentes en ambas técnicas.

## **6.2 CLONAS**

### **6.2.1 ¿Planctomycetes forma parte de la biósfera rara?**

Con base en estudios anteriores dentro del valle de Cuatro Ciénegas (Escalante 2008, López-Lozano *et al.* 2012, Pajares *et al.* 2013, Blaz 2014), hemos encontrado que el phylum Planctomycetes es un grupo poco abundante, no distribuido en todos los sistemas del valle. Cabe mencionar que los estudios que han documentado la presencia de este phylum han sido en sistemas acuáticos (Escalante 2008, Espinosa-Asuar 2005, Pajares *et al.* 2012, Blaz 2014), tapetes microbianos de Pozas Azules (Breitbart *et al.* 2009, Bonilla-Rosso *et al.* 2012, Peimbert *et al.* 2012), y en menor proporción en sistemas terrestres (López-Lozano

*et al.* 2012), por lo tanto estas bajas abundancias y distribuciones más restringidas dentro de algunos sistemas nos llevan a pensar que estas bacterias podrían formar parte de la biósfera rara en Cuatro Ciénegas.

### **6.2.2 Diversidad del phylum Planctomycetes**

Las secuencias de clonas analizadas para cada sitio mostraron una diversidad específica diferente, lo que sugiere que cada cuerpo de agua presenta una composición particular. Esto se ve reflejado en los altos índices de disimilitud Jaccard para los cuatro sitios (índice que fue de 0.8 en promedio), es decir, cada poza es muy diferente en composición, esto es, pocas OTUs son compartidas entre los sitios. En contraparte, la estructura (número de OTUs y abundancias) de las pozas presenta menor disimilitud de acuerdo con el índice de Morisita-Horn (0.4 de disimilitud en promedio). Esta diferencia entre los dos índices se explica porque las pozas tienen una composición muy diferente (reflejado con el valor obtenido con el índice de Jaccard), pero las OTUs compartidas son similares en cuanto a su porcentaje de abundancia, y debido a que Morisita-Horn es muy sensible a OTUs dominantes, éstas se toman en cuenta con una mayor contribución en el cálculo de comparación, por lo cual la disimilitud con este último índice resulta menor.

En cuanto a la diversidad alfa, la poza A resultó la menos diversa, corroborado por todos los índices de diversidad que se utilizaron, así como también en los resultados de rarefacción; es importante recordar que las curvas de rarefacción sólo hacen referencia a la riqueza comparable observada. La rarefacción mostró que tanto la poza B como la C son las de mayor riqueza en un punto de muestreo en el que todos los sitios pueden compararse, por lo que sólo nos da una idea de la riqueza observada, mientras que el resto de los índices de riqueza evaluados en este estudio reflejaron que la mayor diversidad se encuentra en una u otra de estas dos pozas. Esto último se explica porque cada índice evalúa la diversidad de diferentes formas, por ejemplo, Chao sólo toma en cuenta la riqueza de OTUs, mientras que Simpson evalúa la dominancia de OTUs y Shannon su equitatividad. Es importante mencionar que los resultados obtenidos reflejan la

diversidad real de los sitios, confirmado por los valores de cobertura a más del 80%, que representa un muestreo razonable.

Sobre el tipo de microorganismos que se encontraron en este trabajo, la clasificación de algunas de las OTUs (de aquellos que tuvieron una certeza del 97% o más de similitud a otras secuencias) nos permite hablar sobre algunas características e historia de vida de los Planctomycetes que habitan las Pozas Azules. Por ejemplo, el OTU B30 resultó similar a secuencias de *Planctomyces limnophilus*, que es un organismo aeróbico, gram negativo, formado por colonias rojas. Su ciclo celular está caracterizado por células hijas móviles y células madres sésiles que desarrollan discos adhesivos (Labutti *et al.* 2010). El OTU F67 se clasificó como *Rhodopirellula*, un género de organismos anaeróbicos de forma ovoide, no móviles (Wecker 2009). Los OTUs C81, C79 y A10 fueron similares a los Phycisphaerales, de quien sólo una especie se encuentra descrita: se cree que metabolizan una gran cantidad de compuestos de carbono y se han encontrado asociados con algunas algas (Fukunaga *et al.* 2009, Sjöstedt *et al.* 2012).

### 6.2.3 Origen de las secuencias

El análisis del origen de las secuencias (Fig. 9) nos permitió determinar en este estudio que las OTUs de Planctomycetes presentes en Pozas Azules son filogenéticamente cercanas a especies marinas. Este hallazgo es congruente con trabajos previos en este lugar, en donde la mayor parte de los linajes bacterianos del valle tienen una similitud con linajes marinos. Esta observación es importante para Cuatro Ciénegas, ya que este sitio era parte del suelo marino hace más de 150 millones de años (Souza *et al.* 2006).

El análisis de origen de las secuencias por sitio (Fig. 10) confirma que estos organismos pueden ocupar diversos nichos ecológicos. Por ejemplo, secuencias similares a la OTU A10 (Phycisphaerae) se han reportado predominantemente en ambientes marinos, el OTU B22 (Planctomycetacia) en biopelículas, y el OTU B30 (*Planctomyces limnophilus*) tanto en ambientes marinos como en los de agua dulce. Los tapetes microbianos también son otro nicho ecológico que puede ser ocupado por estos microorganismos, como lo han reportado (Bonilla-Rosso *et al.* 2012;

Breitbart *et al.* 2009) en este mismo sistema de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, pero las OTUs de este trabajo no coincidieron con las secuencias reportadas por ellos.

En la poza F predominaron los organismos de origen no determinado. Lo que se explica porque esta poza también es la que tuvo un mayor número de OTUs que podrían ser endémicas. Por otro lado, esta poza presentó características ambientales peculiares, al ser la única que tuvo concentraciones detectables de COD, así como concentraciones más bajas en conductividad, carbono inorgánico (CI), carbono total (CT) y salinidad. Estas diferencias podrían deberse a que es la poza más alejada de las cuatro, lo que le confiere una biota bacteriana muy particular.

El análisis sobre el origen de las secuencias reflejó la escasa información que se tiene hasta nuestros días sobre Planctomycetes, ya que muchas de las OTUs que se detectaron en este trabajo, no han sido descritas hasta ahora.

#### **6.2.4 Filogenia y patrones de distribución**

El árbol filogenético de máxima verosimilitud refleja la agrupación de dos clases de Planctomycetes: Planctomycetacia y Phycisphaera, tal como se ha reportado (NR Krieg *et al.* 2010).

Los organismos de la clase Phycisphaera presentes en las cuatro pozas son los que más ampliamente se distribuyeron, a diferencia de la clase Planctomycetacia quienes presentaron distribuciones más restringidas.

En general, Planctomycetes es un phylum del que poco se conoce sobre la estructuración de sus comunidades. Sin embargo, algunos artículos han logrado evidenciar que la distribución y abundancia de estos microorganismos se relaciona con ciertas características ambientales (Fuchsman *et al.* 2012), como la presencia de amonio, carbono, oxígeno (presentes en la columna de agua) y temperatura ligada al crecimiento estacional con algas o diatomeas (Kirkpatrick *et al.* 2006, Bengtsson *et al.* 2010, Ivanova and Dedysh 2012). El único reporte que existe sobre Planctomycetes en otros cuerpos de agua (Pizzetti *et al.* 2011) documenta que, si bien, es verdad que la distribución de Planctomycetes se encuentra relacionada con

variables ambientales, no ocurre lo mismo con los factores geográficos, quienes parecen no tener algún efecto en su distribución.

En este trabajo no se obtuvo una correlación significativa de la similitud genética (Jaccard y Morisita-Horn) con respecto a parámetros geográficos (utilizando la prueba de Mantel), es decir, aparentemente la distribución de Planctomycetes en Pozas Azules no está influenciada por factores geográficos. Esto podría reflejar una hidrología subterránea compleja que no es evidente al medir la distancia geográfica superficial, o bien que el phylum en general no presenta patrones geográficos como se ha reportado (Pizetti *et al.* 2011). Esto es similar a patrones detectados para otros grupos de microorganismos en Cuatro Ciénegas (Rodríguez-Verdugo *et al.* 2008, Cerritos *et al.* 2010 Rebollar, 2012).

En cuanto a la correlación de la similitud genética con respecto a parámetros ambientales, tampoco se obtuvo una correlación significativa, es decir, la distribución de Planctomycetes aparentemente no está influenciada por los factores ambientales analizados en este estudio, aunque es importante mencionar que no todas las variables que pueden influir en la distribución de Planctomycetes pudieron ser detectadas. Por ejemplo, el amonio o el nitrato que ya han sido documentados como un factor importante para la distribución en este phylum (Pizzetti *et al.* 2011), no fueron detectados en las pozas, debido probablemente a que los valores son muy bajos por ser un lugar oligotrófico y la técnica de medición utilizada en nuestro estudio no tuvo la sensibilidad suficiente.

### **Respuesta de OTUs a variables ambientales**

Para explorar más a fondo la relación entre composición de OTUs y parámetros ambientales se realizó un análisis de CCA. A pesar de que no encontramos una asociación clara en las pruebas de mantel, el análisis de CCA mostró asociación de OTUs con algunas variables ambientales. Por ejemplo las OTUs situadas hacia a la variable NO<sub>2</sub> (que son únicas para el sitio C), podrían estar relacionadas a procesos de reducción de nitrógeno (anammox), lo que ya ha sido reportado para algunas especies de Planctomycetes (Sanabria *et al.* 2009) y la OTU A10 (que tiene una amplia distribución), se encuentra relacionada al carbono

total (CT), esto tiene sentido ya que es similar (Tabla 4) a organismos que metabolizan una gran variedad de compuestos de carbono (Bereich *et al.* 2005). En contraparte, otras OTUs no mostraron asociaciones con algún parámetro ambiental específico.

### **Factores ambientales vs factores regionales: ¿Por qué no son evidentes en Planctomycetes en Pozas Azules?**

Logares *et al.* (2012) en su estudio de comunidades microbianas acuáticas sugiere que organismos especialistas parecen estar más afectados por factores ambientales, mientras que las distribuciones de los organismos generalistas parecen responder principalmente a factores espaciales. Esta podría ser una de las razones por la cual en este estudio no encontramos patrones geográficos que moldeen la distribución de este phylum. Podemos sugerir que muchas de las especies en Planctomycetes tienen una distribución similar a la de los especialistas, ya que se ha reportado que los factores ambientales parecen ser los únicos que moldean su distribución en los diferentes sistemas encontrados, por lo tanto se esperaría una asociación a factores locales y no a regionales en este trabajo.

Por otro lado se mencionó con anterioridad que Planctomycetes podría formar parte de la biósfera rara en Pozas Azules, principalmente por las bajas abundancias reportadas en Cuatro Ciénegas (Breitbart *et al.* 2009, Bonilla-Rosso *et al.* 2012, Blaz 2014), como resultado de sus lentas tasas de crecimiento (Lage and Bondoso 2012), característica reportada para los taxa raros (Pedrós-Alió 2012). Se ha reportado que los taxa raros responden ante los factores ambientales que moldean su distribución, sin embargo no se han encontrado correlacionados con la distancia geográfica (Logares *et al.* 2012). Esta sería otra de las posibles razones por las que esperaríamos que Planctomycetes no se encuentre afectado por patrones geográficos, si no únicamente por factores ambientales.

Por último, en cuanto a la no asociación a factores ambientales de las comunidades estudiadas, una razón que podría explicarlo es que la selección de pozas que tuvieron valores ambientales como pH y conductividad no contrastantes, dificultó la detección de factores ambientales asociados a las comunidades.



Estudios en ambientes contrastantes para Planctomycetes han evidenciado el efecto de factores locales en su distribución (Fukunaga *et al.* 2009; Ivanova y Dedysh 2012, Kirkpatrick *et al.* 2006, Pizzetti *et al.* 2011), y otros grupos bacterianos dentro de Cuatro Ciénegas en ambientes contrastantes también han hecho evidente la influencia de factores locales en la distribución de las comunidades bacterianas (Rebollar *et al.* 2012, Cerritos *et al.* 2010), por lo que esperaríamos que exista una asociación de factores ambientales en la distribución de las comunidades de Planctomycetes en Pozas Azules, que podría confirmarse en futuros estudios hechos en ambientes contrastantes.

### **6.2.5 ¿Todo está en todos lados? El caso de Planctomycetes**

A pesar de que aún no son claros los factores que influyen en la distribución de Planctomycetes, en este estudio se puede considerar que este grupo de organismos no son cosmopolitas dentro de Pozas Azules como Finlay (2002) lo plantea para las bacterias, corroborado por los posibles grupos endémicos que se encontraron en este trabajo y algunas secuencias propuestas por Espinosa-Asuar (2005) dentro del valle de Cuatro Ciénegas. Es importante mencionar que en otros sistemas su distribución se ha encontrado asociada a factores ecológicos (Pizzetti *et al.* 2011, entre otros) este hallazgo apoya la idea de que plantomycetes no está en todas partes.

El endemismo de este grupo dentro de las pozas es un indicio claro de que existe una estructuración en las comunidades de Planctomycetes, lo que explica que cada poza presenta grandes diferencias de composición que se ven reflejadas en los índices de disimilitud muy altos (reflejados por el índice de Jaccard) entre los sitios, y que puede ser consecuencia de la influencia de factores locales no detectados en este estudio (diferencias ambientales), que podrían estar estructurando a los Planctomycetes de Pozas Azules.

Otro indicio que apoya la idea de que sí hay factores implicados en la estructuración de estas comunidades, es la similitud con los patrones de distribución de abundancia característicos en los macroorganismos: muchas especies (OTUs

en este caso) poco abundantes (restringidas a un sitio) y pocas especies muy abundantes ampliamente distribuidas (Pedrós-Alió 2012, Pedrós-Alió 2006).

Con lo anterior podemos descartar la primera hipótesis de Martiny *et al.* (2006) que plantea que los microorganismos se distribuyen al azar, ya que se obtuvieron evidencias de que “no están en todos lados”, pero no se encontró asociación a factores geográficos y ambientales que expliquen su distribución.

## **7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

a) Los T-RFLPs fueron un buen método como análisis preliminar de la diversidad de Planctomycetes en Pozas Azules. Sin embargo, no representaron la diversidad real del phylum en los sitios, debido a que la diversidad se encontró sobrestimada, ya que los OTUs obtenidos no sólo correspondieron a Planctomycetes, sino también a otros grupos como Cianobacterias Bacteroidetes, Verrucomicrobia y Proteobacterias. Esto fue corroborado mediante la construcción de las librerías de clonas del gen que codifica para 16S ARNr, por lo tanto consideramos que ambas técnicas no son comparables; librería de clonas y T-RFLPs en este estudio y únicamente las librerías de clonas reflejan la diversidad real de Pozas Azules.

b) Las librerías de clonas resultaron útiles para ampliar el rango de análisis de diversidad de las muestras (Dunbar *et al.* 1999, Dunbar *et al.* 2000), generando índices de similitud más confiables que los calculados para TRFLPs.

c) El phylum Planctomycetes presente en el valle de Cuatro Ciénegas es filogenéticamente cercano y similar a secuencias de ambientes marinos; por lo tanto se propone que las clonas ambientales reflejan el origen marino de este sitio. Como se mencionó anteriormente, este hallazgo es congruente con trabajos previos en donde la mayor parte de los linajes bacterianos en el valle tienen una similitud con linajes marinos, ya que este

sitio era parte del suelo marino hace más de 150 millones de años (Souza *et al.* 2006, Rebolgar 2012).

d) Las secuencias de clonas analizadas para cada sitio mostraron una diversidad específica diferente, lo que sugiere que cada cuerpo de agua presenta una composición propia, misma que se ve reflejada en el alto índice de disimilitud obtenido con Jaccard para los cuatro sitios (diversidad beta).

e) Los factores que moldean la estructuración de las comunidades de Planctomycetes no fueron claros en este estudio; la distribución de la diversidad de este grupo no estuvo asociada significativamente con factores geográficos ni ambientales, sin embargo, los análisis de CCA muestran que existen algunos OTUs restringidas que se encuentran asociados a variables ambientales específicas. Sin embargo, existieron algunas limitaciones en la descripción de las comunidades de Planctomycetes en este trabajo, debido a que el gen que codifica para la subunidad del 16s ARNr no proporcionó la suficiente resolución filogenética para identificar las diferentes especies asociadas a dichos factores. Se propone analizar otros genes que pudiesen darnos datos morfológicos o bioquímicos, y que además proporcionen características sobre sus historias de vida (especialistas-generalistas, buenos y malos dispersores), para hacer estudios biogeográficos posteriores dentro de este phylum que pudieran darnos una mayor información sobre los procesos involucrados en la estructuración de las comunidades de Planctomycetes, un grupo del que actualmente poco se conoce y sin embargo es muy importante en procesos ecológicos, como se mencionó con anterioridad.

f) Es posible que variables ambientales no detectadas (como nitrato o amonio) tengan un papel importante en su distribución como se ha reportado en otros estudios, por lo que sería importante medirlas en estudios posteriores.

g) Se propone que este phylum bacteriano podría formar parte de la biósfera rara en Pozas Azules, como resultado de su crecimiento lento y de acuerdo con las bajas abundancias registradas en otros estudios

(Breitbart *et al.* 2009, Bonilla-Rosso *et al.* 2012, Blaz 2014), y se ha reportado que la distribución de la diversidad de la biósfera rara no está asociada a factores geográficos (Logares *et al.* 2012), tal como se observó en este trabajo.

h) Se encontró que ocho OTUs podrían pertenecer a bacterias endémicas de Pozas Azules, ya que hasta ahora no existen reportes de secuencias similares en las bases de datos. También observamos que pocas OTUs presentan una amplia distribución, mientras que muchas OTUs tienen distribuciones más restringidas, un patrón similar al reportado para macroorganismos (McGeoch y Gaston 2002), y no “todo está en todos lados”.

i) Es importante considerar, en estudios para este phylum, otros métodos con mayor sensibilidad en la detección de nutrientes, con el fin de asegurar mediciones más confiables, cuyos valores podrían ser correlacionados con la distribución de Planctomycetes, por ejemplo utilizando un analizador de nutrientes útil en sistemas oligotróficos como el analizador tipo II reportado en la literatura como un buen medidor de nutrientes en el sistemas de este tipo (Kirkpatrick *et al.* 2006). Otra opción a considerar, sería el estudio de la distribución de este grupo de organismos en ambientes contrastantes como Pozas Rojas y Pozas Azules u otros cuerpos de agua de Pozas Azules más alejados y diferentes, que permitan evidenciar los factores locales que influyen en la estructuración de sus comunidades, como se ha reportado en previos estudios de ambientes contrastantes (Fuchsman *et al.* 2012, Ivanova and Dedysh 2012, Pizzetti *et al.* 2011).

## **8. ANEXOS (Protocolos)**

### **PROTOCOLO 1**

#### **Determinación de nutrientes**

Para la determinación de nutrientes, el agua se filtró a través de filtros de nutricelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  para 100mL de agua por sitio; lo cual se realizó por triplicado en cada poza, obtenidos a partir de muestras compuestas (en cinco puntos de las pozas, cuatro a lo largo de la orilla y uno al centro a medio metro de profundidad); mismas que se guardaron a 4°C en bolsas de plástico oscuras.

El análisis de nutrientes se realizó en el laboratorio de biogeoquímica de suelos a cargo del Dr. Felipe García Oliva en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco) de la UNAM para determinar las concentraciones de carbono, fósforo y nitrógeno (en sus formas totales, orgánicas e inorgánicas) para cada localidad. Se determinaron todas las formas de carbono con un analizador de carbono total (UIC Mod. CM5012.; Chicago, IL, USA), el nitrógeno y fósforo fueron determinados por métodos colorimétricos con el uso de un Auto analizador III (Norderstedt, Alemania) como lo reporta Peimbert *et al.* (2012). Las formas orgánicas de todos los compuestos son el resultado de las formas totales menos las inorgánicas.

### **PROTOCOLO 2**

#### **Filtrado de muestras de agua**

1. Prefiltrar el agua muestreada de cada galón (tres porciones por poza de 4L) en filtros isopore pycarbonate de 45mm (Millipore). Recuperar el agua y marcar en el bote el agua que ha sido prefiltrada. Muestras para la posterior extracción de ADN.
2. Colocar 1 ó 2 filtros en el “bead tube” y agregar 4 ml de “bead solution”, agitar en vortex 1 min. 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. Guardar filtros a -80°C hasta su procesamiento para extracción de DNA y medición de nutrientes.

## PROTOCOLO 3

### Extracción de ADN

#### **“Ultraclean water DNA Kit” Marca MoBio. Cat. No. 148 00-25**

Para la extracción de DNA, las muestras de agua por triplicado por sitio (4L cada una) fueron filtradas a través de un filtro Durapore 10µm, seguido de un filtro Durapore de 0.22µm usando una bomba de campo vacío. Los filtros se almacenaron en tubos estériles Eppendorf de 2 ml, que se conservaron a -80°C hasta la extracción de DNA.

1. Colocar 1 ó 2 filtros en el “bead tube” y agregar 4 ml de “bead solution”, agitar en vortex 1 min. 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 0.5ml más de solución.
2. Agregar 0.5ml de solución WD1 y 5 µl de RNAsa (opcional), vortex 30 segundos. Colocar los tubos horizontalmente en el agitador y mezclar a toda velocidad por 15 min.
3. Centrifugar los tubos a 5000 rpm por 3 min. Eliminar los filtros con cuidado tratando de que no lleven nada de líquido antes de centrifugar. Para retirar los filtros, es importante hacerlo con ayuda de pinzas estériles.
4. Transferir el sobrenadante con la pipeta a un tubo limpio de 15 ml y agregar 0.6 ml de solución WD2. Vortex 5 segundos, incubar a 4°C (en hielo) por 30 min para que las proteínas se asienten. Los tubos deben marcarse cuando son colocados en la centrifuga de la parte externa a ésta, porque es donde el DNA se precipita, por lo que para la extracción del sobrenadante la pipeta debe ponerse del lado opuesto de la marca para evitar llevárnoslo.
5. Centrifugar a 5 000 rpm por 6 min. Transferir el sobrenadante con la pipeta a un tubo limpio y agregarle 8 ml de solución WD3. Vortex 5 segundos.
6. Poner la mezcla en un “tubo-filtro” y centrifugar a 4000 rpm por 3 min. Eliminar el filtrado.
7. Agregar 3 ml de solución WD4 y centrifugar a 4000rpm por 3 min. Descartar el filtrado.

8. Repetir pasó 7 con WD4 para asegurar que el ADN quede muy limpio.
9. Centrifugar nuevamente a 5000rpm por 5 min.
10. Secar el filtro durante 20 min a temperatura ambiente, o en la campana.
11. Colocar el filtro en un nuevo tubo y agregar 3 ml de solución WD5 (esta solución cambia los iones del DNA y lo libera del filtro).
12. Dejar en reposo por 12 hrs. a 4°C ( refrigerador)
13. Centrifugar a 5000rpm por 3 mn. Ahora el ADN está eludido en el filtrado de 3 ml.
14. Guardar 1ml como backup a -20°C

### **Limpieza de la muestra de agua (DNA) con fenol**

A los 2 ml obtenidos en la extracción se les realiza una limpieza con fenol:

1. Transferir el ADN a un falcón de 15 ml.
  2. Añadir 2.5 ml de fenol. Mezclar por inversión. Es importante que el fenol se maneje con guantes diferentes de los que se ocuparon para la extracción del DNA.
  3. Centrifugar a 3,700 rpm por 15 min en canastilla de columpio (o normal si no se tiene).
  4. Recuperar sobrenadante en un tubo Falcón limpio. Es evidente la formación de 2 fases por el fenol, la fase que debe recuperarse es la de arriba.
  5. Añadir fenol: cloroformo: isoamílico 25:24:1
  6. Centrifugar a 3,700 rpm por 15 min en canastilla de columpio
  7. Recuperar sobrenadante en un falcón limpio.
  8. Añadir 4 ml de Glycoblue (para que precipite y de color a la muestra).
  9. Añadir acetato de sodio a concentración final de 0.3M
  10. Agregar 2 volúmenes de etanol (si tenemos 2ml de DNA ponemos 4ml de etanol).
- Nota:** del paso 8 al 10 el orden no debe cambiarse.
11. Mezclar por inversión.
  12. Dejar precipitar 15 mn a -20°C
  13. Centrifugar en ángulo fijo a 7 500 rpm por 30 min a 4°

14. Quitar el alcohol y limpiar el precipitado con 2 ml de EtOH al 70%
15. Dejar secar el precipitado (al menos 1 hora o hasta se seque la muestra).
16. Resuspender en 30  $\mu$ l de agua ultra pura pasando el agua suavemente del lado donde se forma el precipitado.
17. Dividir el ADN en dos alícuotas de 15  $\mu$ l cada una. Si el ADN está en uso guardar una de ellas a 4<sup>0</sup>C y la otra a -20<sup>0</sup>C.

## PROTOCOLO 4

### PCR del gen que codifica para 16S ARNr

Oligonucleótidos

27F AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG (marcado con VIC para TRFLP'S).

930R CTC CAC CGC TTG TGT GA (marcado con FAM para TRFLP'S).

	Concentración inicial de cada reactivo	Concentración Final	Cantidad para 50 $\mu$ l (en $\mu$ l)
La	Buffer sin Mg10X	1X	5
	MgCl 50 mM	2 mM	0.5
	dNTPs 10mM	0.6 mM	3
	BSA	1 mg/mL	2.5
	DMSO	5%	2.5
	Oligonucleótidos 10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	1.5
	Agua	---	32.8
	ADN 10 a 100 ng	0.2 a 2 ng/ $\mu$ l	2
	Taq 5 U/ $\mu$ l (Roche)	1U en 50 $\mu$ l	0.2

amplificación del PCR fue realizada de acuerdo a los siguientes ciclos de reacción:  
 94°C- 5min, 94°C-1min, 52°C-1min, 72°C por 1 min 20 segundos (30 ciclos),  
 extensión final 72°C- 30 min, 4°C  $\infty$



## PROTOCOLO 5

### 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 microcentrífuga ALC 4214 Rotor 6642).

1. Cortar las bandas del tamaño deseado (vistas con luz UV y con una careta), tratando de tomar la menor cantidad de agarosa posible.
2. Pesarse la banda. Añadir 3 volúmenes de buffer QG por un volumen de gel (100 mg son equivalentes a 100 µl).
3. Incubar a 50°C (baño maría) durante 10 min, o hasta que se disuelva la agarosa. Agitar en vortex cada 2-3 min.
4. Comprobar que el color del buffer sea amarillo. Si es naranja o violeta, ajustar el pH con 10 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.
5. Si el tamaño del fragmento es menor a 500 pb o mayor a 4000 pb, añadir un volumen de isopropanol por cada volumen de gel.
6. Armar la columna (tubo con filtro), agregar la muestra y centrifugar durante 1 min. Si el volumen es mayor a 800 µl, cargar y centrifugar varias veces. Tirar lo centrifugado.
7. Añadir 0.5 ml de buffer QG a la columna y centrifugar 1min. Tirar lo centrifugado.
8. Para lavar, poner 0.75 ml de Buffer PE. Incubar 2-5 min a TA y centrifugar 1 min. Tirar lo centrifugado.
9. Centrifugar la columna durante 1 min 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 (filtro) en un tubo limpio de 1.5 ml.
11. Para eluir el ADN, añadir 50 µl de buffer EB o agua al centro de la membrana, y centrifugar la columna a máxima velocidad. Para aumentar la concentración, eluir en 30 µl, incubar durante 1 min y centrifugar durante 1

min.

12. Guardar la muestra a -20°C.

## PROTOCOLO 6

### Protocolo para T-RFLPs

1. Extraer banda en gel con el kit “gel extracción kit” de Quiagen (protocolo 4). Resuspender en 30 µl.
2. Correr el producto en el biofotómetro para estandarizar la cantidad de ADN que se utilizara en la digestión. Poner en cada celda 50µl divididos en: 20 µl de agua y 30 µl de muestra (utilizar 40 ng para cada digestión. En el secuenciador cargar 20 ng y usar los otros 20 ng como “backup”, guardados secos y congelados para que no se echen a perder).
3. Hacer la digestión con enzimas de restricción como sigue: Digestión en 20 µl (calcular la cantidad de producto de PCR que se utilizara de cada muestra para la digestión). No poner más del 10% del volumen final de enzima. Para controles (muestra positivo) siempre deben cargarse 10 ng con enzimas, buffer y agua. Las demás muestras deben aforarse con agua de modo que tengan la misma cantidad.

30 o 40 ng del producto, en 20 µl de agua.

Reactivos concentración	Cantidad por tubo
5 U de enzima	1.5 µl
Buffer 10X	2 µl
BSA	0.2 µl
Agua	1.3 µl
Total	5 µl

Dejar a 37°C por 12 horas y un ciclo de 65°C final para desactivar la reacción

4. Desalar restricción (dividir la reacción en 2 partes, y llevar cada una a 50  $\mu$ l)
  - a) 1/10V (=1 $\mu$ l x cada 10 $\mu$ l de volumen)125 mM EDTA a cada muestra (5 $\mu$ l para 50 ml)
  - b) Añadir 1/10 3MNaOAc (pH5.2) a cada uno. Mezclar con pipeta.(5  $\mu$ l para 50 ml)
  - c) Añadir 2.5V 100% EtOH (125  $\mu$ l para 50 ml)
  - d) Vortex, incubar TA 15 min
  - e) Centrifugar 2500g 30min (placa) o 14 000 g 25 min (tubo)
  - f) Inmediatamente voltear placa o quitar el etanol si es tubo
  - g) Centrifugar 185g 1min para secar (placa)
  - h) Limpiar con 35  $\mu$ l EtOH al 70% a c/pozo (placa) o 100  $\mu$ l si es tubo. Centrifugar igual (e, f y/o g).
  - i) Centrifugar placa invertida 185g x 1min (placa)
  - j) Resuspender en 9.75  $\mu$ l formamida (hidi) y 0.25  $\mu$ l de G600 liz cada tubo. Este último paso se hace justo en el momento en el que se va a secuenciar la muestra. O guardar botón congelado a -20 °C.
  - k) Secuenciar muestras en la placa MicroAmp optical 96 well del secuenciador con 10  $\mu$ l de muestra, tratando de no dejar burbujas. Cada corrida se hace por triplicado con las siguientes condiciones; 70 segundos de inyección, a 10 volts y 10 000 para el tiempo de corrida RT.

## **PROCOLO 7**

### **Clonación**

#### ***TA Cloning kit, PCR 2.1, marca Invitrogen***

##### **a) LIGACION.**

Visualizar los productos de PCR en geles de agarosa al 1%, una vez que la banda de interés es reconocida se procede a la ligación. Antes de hacer la ligación es necesario mezclar en partes iguales las tres reacciones de PCR obtenidas para cada sitio, tomando 3  $\mu$ l como se indica a continuación.

1.- Hacer la siguiente mezcla:

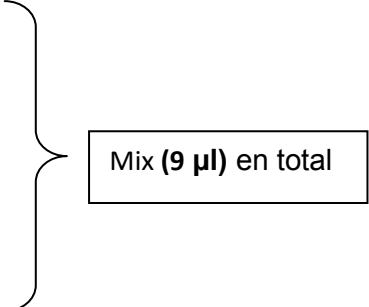
Poner de 0.5 a **3 µl** del producto de PCR a ligar

(No poner más de 3 µl de producto de PCR pues se inhibe la reacción)

Agregar **1 µl** de 10X lig buffer

Añadir **2 µl** del plásmido o vector 2.1

Añadir agua estéril para completar o aforar a 9 µl (**3 µl**)



Mix (**9 µl**) en total

Agregar **1 µl** de T4 ligasa (esta siempre va al final del mix)

2. Mezclar suavemente e incubar durante 20h a 14°C

3. Poner la reacción en hielo y empezar a transformar. (La reacción se puede guardar a -20°C (congelador) ON).

## **b) TRANSFORMACIÓN**

Para comenzar necesitamos:

1.- Cultivos LB-Sólidos con 100 µg/ml ampicilina o 50 µg/ml kanamicina por cada vial de bacterias, ponerlos incubar a 37°C por 30 min, posteriormente esparcir homogéneamente 40µl de X-gal en cada caja y dejar incubando.

2.- Poner a calentar el medio Soc a 37°C.

3.- Preparar baño maría a 42°C, con un termómetro.

4.- Poner las células topo 10 en hielo

5.- Medio 2xLB para el crecimiento de bacterias en placa de 96 pozos.

1. Centrifugar la reacción de ligación y añadir 2µl en un vial de bacterias competentes (Topo 10). Mezclar pipeteando muy suavemente.

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

3. Poner las bacterias a 42°C durante 60s para inducirles a “Heat-Shock”.

4. Transferir el tubo(s) en hielo inmediatamente sin no mover(los) demasiado.

5. Añadir 250 µl de medio SOC a TA.

6. Tapar bien el tubo y agitarlo horizontalmente a 200 rpm a 37°C por 1 hora.
7. Sembrar de 10 µl 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 productos ambientales sembrar 100 µl y 200 µl de cada muestra).
8. Incubar a 37°C. Cambiar la caja a 4 grados y dejarlas un par de horas para que se pinten muy bien de azul.
9. Una reacción de clonación eficiente producirá cientos de colonias. Elegir las colonias blancas. No elegir las colonias azul oscuro.
10. llenar c/u de los pozos de la placa miniprep con 1ml de medio 2x LB.
11. Picar con palillos (estériles) las colonias positivas y dejarlas creciendo en medio 2X LB (liquido) a 37°C y 200 rpm por un día.

#### **MEDIO SOC**

- 2% de triptona
- 0.5% extracto de levadura.
- 10mM NaCl
- 2.5mM KCl
- 10Mm MgSO<sub>4</sub>
- 20Mm glucosa (dextrosa)

#### **MEDIO LB (solido) 1L**

- Triptona 10g
- Ext. Levadura 5g
- NaCl 10g
- Agar 15g
- Kanamicina o ampicilina cuando el medio esta tibio 100 µl cada 100ml (500 µl a 500 ml)

#### **MEDIO 2XLB (liquido para placas) 1L**

- Triptona 20g
- Ext. Levadura 10g
- NaCl 10g
- Kanamicina o ampicilina, siempre contrario a lo que se le agregue al medio LB

**Protocolo 8**  
**Extracción de plásmidos**  
***Montage Plasmid Miniprep kit (Lisado parcial), marca Mlilipore Cat.***  
**No. LSKP09624**

Inocular las *E. coli* host en alícuotas de 1 ml de medio LB 2X con 50mg/mL de Kanamicina en los 96 pozos de la placa de cultivo. Cubrir el bloque e incubarlo a 37°C a 320rpm por 20-24 horas.

1. Centrifugar la placa de cultivo a 1500xg por 5-7 min (Equilibrar la centrifuga con otra placa del mismo peso). Después de la centrifugación, decantar el sobrenadante en un contenedor e invertir la placa de cultivo sobre toallas de papel para remover el sobrenadante residual.
2. Resuspender las pastillas de la placa de cultivo agregando 150 µL de solución 1 a cada pozo. Agitar en el vórtex o pipetear para homogeneizar. Este paso es crítico para el éxito de la lisis.
3. Agregar 150 µL de solución 2 a cada pozo. Mezclar en una placa de agitación (Vórtex) durante 1 minuto. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 2 min. El tiempo total de lisado no debe exceder 5 min.
4. Agregar 150 µL de la Solución 3 a cada pozo. Mezclar inmediata y vigorosamente en el Vórtex durante 2 min. En este punto el lisado de bacterias está listo para la placa CLEARING
5. Colocar la placa PLASMID en el colector de vacío (por debajo de la placa que posee rejillas de metal).
6. Pipetear 200 µl de lisado de cada pozo de la placa de cultivo (mezclando suavemente antes de extraer) y colocarlo en el pozo correspondiente de la placa CLEARING (en orden de filas y columnas ya marcadas)
7. Colocar la placa CLEARING en la parte superior del colector de vacío (encima de las rejillas de metal). Asegurarse de que el colector esté sellado y ajustar el vacío a 8 pulgadas de Hg (para asegurarla obtención del plásmido contenido en el DNA, separándolo de los demás compuestos como proteínas). Aplicar el vacío (con ayuda de una pequeña bomba) durante 3 min aprovechando el lisado a

través de la placa CLEARING en la placa PLASMID. Desechar la placa CLEARING

8. Colocar la placa PLASMID en la parte superior del colector de vacío. Aplicar vacío a 24 pulgadas de Hg durante 5-7 min o hasta que los pozos estén vacíos. El tiempo de filtrado depende de la muestra, temperatura y presión. Los filtros tienen un aspecto brillante si aún no están vacíos.
9. Agregar 200  $\mu$ L de Solución 4 a cada pozo de la placa PLASMID. Aplicar vacío a 24 pulgadas de Hg durante 5-7 min o hasta que los pozos estén vacíos
10. Recuperar el plásmido agregando 50  $\mu$ L de Solución 5 a cada pozo de la placa PLASMID. Colocar la tapa a la placa y agitar durante 5 min en el Vórtex durante 5 min.  
Alternativamente se puede agregar los 50  $\mu$ l de la solución 5 a los pozos y dejar reposar durante 30 min. Las muestras pueden ser recolectadas sin agitación.
11. Pipetear el plásmido retenido de los pozos de la placa PLASMID a una placa limpia de fondo V para su almacenamiento y sus respectivas tapas. Alternativamente, las muestras pueden ser almacenadas en la placa PLASMID por varias semanas en un refrigerador.
12. Las muestras obtenidas son secuenciadas para su posterior análisis.
13. Para identificar secuencias quiméricas se emplearon 3 softwares: bellerephone (Huber *et al.* 2004) con los siguientes parámetros: Huber- Hugenholtz correction, 200bp y sequences are aligned, Uchime (Edgar *et al* 2011) y Decipher (Wright *et al* 2013).

#### **Sustancias utilizadas y su respectiva función**

- |            |  |
|------------|--|
| Solución 1 | Re suspensión de células                         |
| Solución 2 | lisis de células                                 |
| Solución 3 | Neutralización                                   |
| Solución 4 | lavado   |
| Solución 5 | Resuspensión y almacenamiento de plásmido de DNA |

## **PROTOCOLO 9**

### **Digestión de plásmidos con EcoR1**

El vector pCR 2.1 (del TA Cloning kit marca Invitrogen), posee dos sitios de restricción a los lados de la posición donde se liga el inserto. De este modo, una vez purificados los plásmidos, antes de secuenciar se realiza una restricción con la enzima EcoR1 para determinar si los plásmidos obtenidos contiene el fragmento de interés.

Restricción en 20 µl

- 1.- Colocar 2 µl de plásmido en un tubo con 0.2 µl de enzima Eco R1, 2.0 µl de buffer (10x) y aforar con agua a 20 µl.
- 2.- Correr muestras bajo los siguientes ciclos: 1 hora a 37 °C, 20 minutos a 65 °C, 4°C ∞. Sise desea guardar y visualizar en días posteriores, de no ser así únicamente es necesario dejar la reacción 1 hora a 37 °C y posteriormente continuar con el paso 3.
- 3.- Visualizar la digestión por medio de electroforesis para determinar si el plásmido contiene el fragmento de interés para su posterior secuenciación.

## **PROTOCOLO 10**

### **Comandos para R**

Antes de iniciar instalar y cargar Vegan y FactoMineR

```
> library (vegan)
```

```
> library (FactoMineR)
```

### **Análisis de los componentes principales**

```
>Mat2completa<-read.table("MATRIZambiental2.txt", row.names=1) *Para leer un archivo (variables ambientales).
```

```
> PCArda2 <- rda (Mat2completa, scale=TRUE) *Estandariza variables ambientales en distancias euclidianas y hace un PCA.
```

```
> summary (PCArda2) *Genera los resultados del PCA
```



>biplot (PCArda2) \*Crea una grafica por sitio mostrando con vectores las variables ambientales asociadas a cada sitio.

> PCA<-PCA (Mat2completa) \*Para un mejor análisis de las variables ambientales.

>PCA\$var\$contrib \*Calcula contribuciones de variables en valores totales

>PCA.1\$eig \*Para ver eigenvalues y porcentajes de cada componente

Estimación de matrices de distancia

> JacDist <- vegdist (OTUsAb, method="jaccard", binary=TRUE)

> MorisitaDist <- vegdist (OTUsAb, method="horn")

> distAmb<- vegdist(Ambient1, method="euclidean")

> Mantel (JacDist, AmbDist, method="pearson", permut=9999) \*Prueba de Mantel

### **Análisis de correspondencia canónica**

>OTUPLA.CCA<-read.table ("abundanciaCLO.txt",row.names=1) \*Para Leer matriz de abundancias

>PLA.CCA <- cca(OTUPLA.CCA) \*Análisis CCA

>summary (PLA.CCA, scale=1) \*Ordena similitud entre sitios

>summary (PLA.CCA, scale=2) \*Ordena distribución de OTUs

Biplot; explicado en función de las especies y sus variables ambientales

>par (mfrow=c(1,2))

>plot (PLA.CCA, scaling=2, main="Species ordination")

>PLA.CCA.env <- envfit(PLA.CCA, Mat2completa)

>plot (PLA.CCA.env)

## 9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### I. Análisis de componentes principales (PCA)

A)

	Comp1	Comp2	Comp3
<b>Eigenvalor</b>	6.1939	1.5468	1.2593
<b>Porcentaje de varianza explicada</b>	68.8210	17.1870	13.9920
<b>Porcentaje de varianza acumulada</b>	68.8210	86.0080	100.0000

Tabla 7. Porcentaje de varianza explicada por cada uno de los componentes, en este caso el componente uno es el que mejor explica la variación, por lo que las variables ambientales que más contribuyen en este componente fueron seleccionadas como se describe en la metodología.

B)

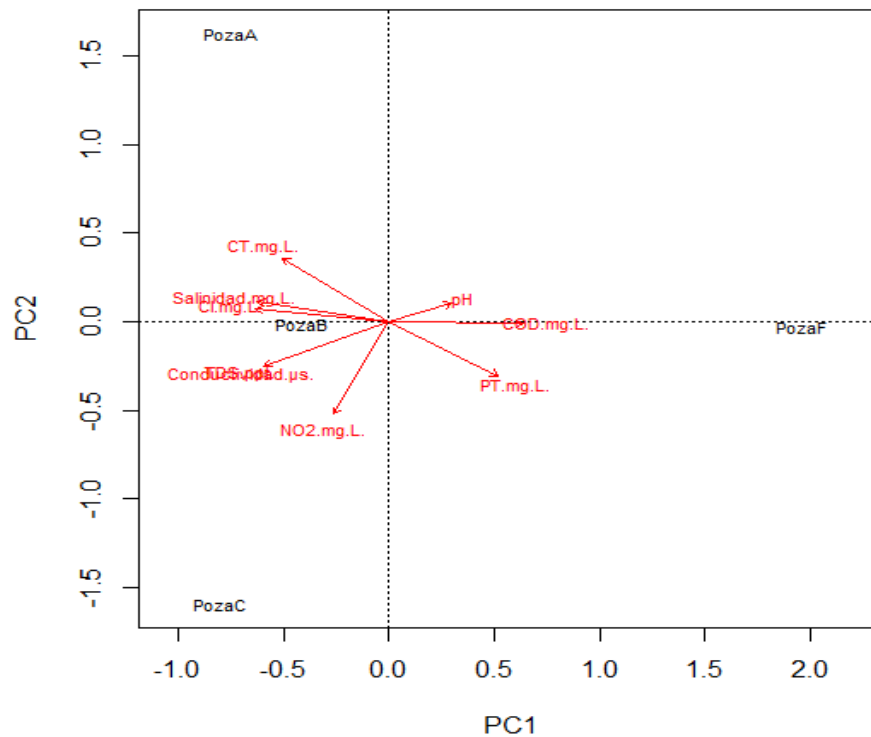


Fig 13. Biplot generado a partir de la estandarización de las variables ambientales (CT = carbono total, CI = carbono inorgánico, NO<sub>2</sub> = nitrito, PT = fósforo total, sal = salinidad, COD = carbono orgánico disuelto TDS = sólidos totales disueltos, Cond = conductividad y pH. Las diferentes pozas se muestran en el gráfico denotadas por letras A, B, C y F.

	Dim. 1	Dim. 2	Dim. 3
<b>Conductividad</b>	13.644785	9.59131912	0.5158386
<b>Salinidad</b>	15.049599	2.03244379	2.8910314
<b>pH</b>	3.441394	1.70086832	60.3943078
<b>TDS</b>	13.593256	9.40449651	0.9987719
<b>CT</b>	9.835820	20.07630965	6.3714007
<b>CI</b>	15.560847	0.80584206	1.8831022
<b>COD</b>	15.859737	0.01256323	1.3874049
<b>NO<sub>2</sub></b>	2.647464	42.12323520	14.6467619
<b>PT</b>	10.367098	14.25292211	10.9113806

Tabla 8. Contribución de las variables a cada componente.

## II. Prueba de Mantel

Parámetros	Jaccard		Morisita-Horn	
	r	P	r	P
<b>Conductividad</b>	0.174433	0.448	-0.057516	0.629
<b>Distancia geográfica</b>	0.158624	0.49	-0.355838	0.872
<b>CT</b>	-0.145672	0.692	0.126094	0.612
<b>CI</b>	-0.487082	0.78	-0.595142	0.877
<b>COD</b>	-0.468747	1	-0.611149	1
<b>NO<sub>2</sub></b>	0.583537	0.257	0.220716	0.26
<b>pH</b>	-0.519055	0.717	-0.541815	0.695
<b>POD</b>	-0.04153	0.752	0.166463	0.453
<b>TDS (ppt)</b>	0.210066	0.766	-0.401465	0.735
<b>Salinidad</b>	-0.493937	0.737	-0.588012	0.83

Tabla 9. Prueba de Mantel utilizando las matrices de similitud genética (Jacard y Morisita-Horn) correlacionadas con variables ambientales individuales y geográficas.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adkins, W, S. (1920). "Cuatro Ciénegas, Coahuila—water resources, Walter Scott Adkins Collection. Center for American History." The University of Texas at Austin, 19.
- Altschul, S, F., Gish, W., Miller, W., Myers, E, W., y Lipman, D, J. 1990. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Baas–Becking, L, G.1934. "Geologie of inleiding tot de milieukunde." The Netherlands: W.P. Van Stockum, La Haya. 263 p.
- Badii, M. H., J, Landeros., and E, Cerna. 2008. "Patrones de asociación de especies y sustentabilidad." *Journal, International Conscience, Good* 3(1):632–60.
- Bengtsson, Mia M., and Lise Øvreås. 2010. "Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*." *BMC microbiology*, 1471–2180.
- Blackwood, Christopher, B., Adam, Oaks, and Jeffrey S. Buyer. 2005. "phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis." *Applied and environmental microbiology*, 6193–98.
- Blaz, S, Jazmin I. 2014. "Análisis de la distribución y diversidad de las comunidades bacterianas de Pozas Azules, Cuatro Ciénegas, usando el gen que codifica el 16S ARNr". Tesis para obtener el título de Biólogo. Instituto de Ecología, UNAM, México.
- Bissett, A., Richardson, A. E., Baker, G., Wakelin, S., & Thrall, P. H. 2010. "Life history determines biogeographical patterns of soil bacterial communities over multiple spatial scales." *Molecular Ecology*, 19(19), 4315–4327.
- Bonilla-Rosso, Germán *et al.* 2012. "Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: community structure and composition in oligotrophic environments." *Astrobiology*, 659–73.

- Breitbart, Mya et al. 2009. "Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico." *Environmental microbiology*, 16–34.
- Calixto, R., L. Herrera & V. Hernández. 2008. *Ecología y medio ambiente*. 2da ed. Cengage Learning Editores, México.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., & Knight, R. 2011. "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4516-4522.
- Cerritos, René et al. 2010. "Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México." *Antonie van Leeuwenhoek*, 303–18.
- Chao, A., 1984. "Non-parametric estimation of the number of classes in a population."
- Cho, J. C., & Tiedje, J. M. 2000. "Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil." *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5448-5456.
- Christen, Richard. 2008. "Global Sequencing: A Review of Current Molecular Data and New Methods Available to Assess Microbial Diversity." *Microbes and Environments*, 253–68.
- Cuadras, Carles M. 2014. Nuevos métodos de análisis multivariante. 63-74.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012 jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9: 772.
- DeLong, E. F., and N. R. Pace. 2001. "Environmental diversity of bacteria and archaea." *Systematic biology*, 470–78.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.
- Escalante, Ana. 2008. "Ecología Evolutiva de Procariontes en Cuatro Ciénegas Coahuila, México."

- Escalas, Arthur *et al.* 2013. "A unifying quantitative framework for exploring the multiple facets of microbial biodiversity across diverse scales." *Environmental microbiology*, 2642–57.
- Espinosa, Laura. 2005. "Análisis de la diversidad de procariontes usando el gen 16S ribosomal: origen marino de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila". Tesis para obtener el grado de maestra en Investigación Biomédica Básica. Instituto de Ecología, UNAM, México.
- Everroad, R, Craig., Otaki, H., And, M. K., & Haruta, S. 2012. "Diversification of Bacterial Community Composition along a Temperature Gradient at a Thermal Spring." *Microbes and Environments*, pp. 374–381.
- Felske, A. D. M. 2004. "Diversity and Seasonal Changes of Uncultured Planctomycetales in River Biofilms." *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5094–5101.
- Finlay B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–1063.
- Forti P, Giulivo I. Mecchia M. Piccini L. 2004. "Las aguas de Cuatro Ciénegas Bajo el desierto: El Misterio de las aguas de Cuatro Ciénegas." 1st ed. Italia: Edizionni, T.
- Fuchsman, Clara a, James T. Staley, Brian B. Oakley, John B. Kirkpatrick, and James W. Murray. 2012. "Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea." *FEMS microbiology ecology*, 1574–6941.
- Fuerst, J. A. 1995. "The Palnctomycetes: emerging models for microbial ecology evolution and cell biology." *Microbiology*, 1493–1506.
- Fuerst, John, A., and Evgeny, Sagulenko. 2011. "Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function." *Nature reviews. Microbiology*, 403–13.
- Fukunaga, Yukiyo *et al.* 2009. "Full Paper Phycisphaera mikurensis gen . nov ., sp . nov ., isolated from a marine alga , and proposal of Phycisphaeraceae fam . nov ., Phycisphaerales ord . nov . and Phycisphaerae classis nov . in the phylum Planctomycetes." *Applied and environmental microbiology*, 267–75.
- Gich, Frederic., Karin, Schubert., Alke, Bruns., Herbert, Hoffelner., and D. Mu. 2005. "Specific Detection , Isolation , and Characterization of Selected , Previously

Uncultured Members of the Freshwater Bacterioplankton Community †." *Applied and environmental microbiology*, 5908–19.

Gilbert, J. A. *et al.* 2012. "Defining seasonal marine microbial community dynamics." *ISME J.* 6, 298–308.

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307–321.

Green, Jessica, and Brendan J. M. Bohannan. 2006. "Spatial scaling of microbial biodiversity." *Microbial ecology*, 501–17.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT., (41), 95–98.

Hanson, China a, Jed a Fuhrman, M. Claire Horner-Devine, and Jennifer B. H. Martiny. 2012. "Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape." *Nature reviews. Microbiology*, 497–506.

Huber, T., G. Faulkner, and P. H. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*.20:2317–2319.

Hubbell SP. 2001. "A unified neutral theory of biodiversity and biogeography." Princeton University Press. Princeton, NJ. J

Ivanova, Anastasia O., and Svetlana N. Dedysh. 2012. "Abundance, diversity, and depth distribution of planctomycetes in acidic northern wetlands." *Frontiers in microbiology*, 1–5.

Jetten, M. S. M. *et al.* 2005. "1994-2004: 10 Years of Research on the Anaerobic Oxidation of Ammonium." *Biochemical Society transactions*, 119–23.

Jetten, Mike S. M. 2008. "The microbial nitrogen cycle." *Environmental microbiology*, 2903–9.

Jogler, C., Glöckner, F. O., & Kolter, R. 2011. "Characterization of Planctomyces limnophilus and development of genetic tools for its manipulation establish it as a model species for the phylum Planctomycetes." *Applied and environmental microbiology*, 77(16), 5826–5829.

- Keymer, D.P., Lam, L.H. and Boehm, A.B. 2009." Biogeographic patterns in genomic diversity among a large collection of *Vibrio cholerae* isolates." *Appl Environ Microbiol* 75, 1658–1666.
- Kirkpatrick, John *et al.* 2006. "Diversity and Distribution of Planctomycetes and Related Bacteria in the Suboxic Zone of the Black Sea." *Applied and environmental microbiology*, 3079–83.
- Kulichevskaya, Irina S. *et al.* 2007. "Schlesneria paludicola gen. nov., sp. nov., the first acidophilic member of the order Planctomycetales, from Sphagnum-dominated boreal wetlands." *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2680–87.
- Kulichevskaya, I. S., Baulina, O. I., Bodelier, P. L., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. S., & Dedysh, S. N. (2009). Zavarzinella formosa gen. nov., sp. nov., a novel stalked, Gemmata-like planctomycete from a Siberian peat bog. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(2), 357-364.
- Lage, Olga M., and Joana Bondoso. 2012. "Bringing Planctomycetes into pure culture." *Microbiology*, 1–6.
- Langenheder, Silke, and Henrik Ragnarsson. 2007. "The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities." *Ecology*, September, 2154–61.
- Langenheder, S., & Székely, A. J. 2011." Species sorting and neutral processes are both important during the initial assembly of bacterial communities." *The ISME journal*, 5(7), 1086–1094.
- Lindsay, Margaret *et al.* 2001. "Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell." *Archives of Microbiology*, 413–29.
- Lindström, Eva S., and Silke Langenheder. 2012. "Local and regional factors influencing bacterial community assembly." *Environmental microbiology reports*, 1–9.
- Logares, Ramiro *et al.* 2013. "Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change." *The ISME journal*, 937–48.
- Lomolino, M, V., Riddle, B, R., and Brown, J, H. 2006. "Biogeography." Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.



- López-Lozano, Nguyen E. *et al.* 2012. "Bacterial communities and the nitrogen cycle in the gypsum soils of Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila: a Mars analogue." *Astrobiology*, 699–709.
- Lozupone, Catherine A., and Rob Knight. 2008. "Species Divergence and the Measurement of Microbial Diversity." *NIH-PA*, 557–78.
- Magurran, A. E. 2004. "Measuring biological diversity." Blackwell, Oxford. 256 p.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209–220.
- McGeoch, M. A., & Gaston, K. J. 2002. "Occupancy frequency distributions: patterns, artefacts and mechanisms." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77(03), 311-331.
- Miller-Coleman, R. L., Dodsworth, J. A., Ross, C. A., Shock, E. L., Williams, A. J., Hartnett, H. E., ... Hedlund, B. P. (2012, January). Korarchaeota diversity, biogeography, and abundance in Yellowstone and Great Basin hot springs and ecological niche modeling based on machine learning. *PloS one*, 7(5), 1–15.
- Nemergut, Diana R. *et al.* 2011. "Global patterns in the biogeography of bacterial taxa." *Environmental microbiology*, 135–44.
- Nemergut, Diana R. *et al.* 2013. "Patterns and processes of microbial community assembly." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 342–56.
- NR, Krieg., W, Ludwig., W, B, Whitman., B, P, Hedlund., B, J, Paster., J, T, Staley., N, Ward., D, Brown. 2010. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Second Ed. edited by Springer. New York.
- Oakley, B. B., Carbonero, F., Van der Gast, C. J., Hawkins, R. J., and Purdy, K. J. 2010. "Evolutionary divergence and biogeography of sympatric niche-differentiated bacterial populations." *The ISME journal*, 4(4), 488-497.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., *et al.* 2013 *Vegan: Community Ecology Package*.

- Östman Ö., Drakare S., Kritzberg E, S., Langenheder, S., Logue J, B., And, and E. S. Lindström. 2010. "Regional invariance among microbial communities." *Ecology letters*, 118–27.
- Pagaling, Eulyn *et al.* 2009. "Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina." *Applied and environmental microbiology*, 5750–60.
- Pajares, Silvia., German, Bonilla-Rosso., Michael, Travisano., Luis, E. Eguiarte., and Valeria, Souza. 2012. "Mesocosms of aquatic bacterial communities from the Cuatro Ciénegas Basin (Mexico): a tool to test bacterial community response to environmental stress." *Microbial ecology*, 346–58.
- Pajares, Silvia., Luis E. Eguiarte., German Bonilla-Rosso., and Valeria, Souza. 2013. "Drastic changes in aquatic bacterial populations from the Cuatro Ciénegas Basin (Mexico) in response to long-term environmental stress." *Antonie van Leeuwenhoek*, December, 1159–75.
- 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.
- Pedrós-Alió, Carlos. 2012. "The Rare Bacterial Biosphere." *Annual Review of Marine Science*, 15, 449–66.
- Pedrós-Alió, C. 2006. "Marine microbial diversity: Can it be determined?." *Trends in microbiology*, 14(6), 257-263.
- Peimbert, Mariana *et al.* 2012. "Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress." *Astrobiology*, July, 648–58.
- Pizzetti, Ilaria *et al.* 2011. "Temporal variability of coastal Planctomycetes clades at Kabeltonne station, North Sea." *Applied and environmental microbiology*, July, 5009–17.
- Ragon, M., Fontaine, M. C., Moreira, D., & López-García, P. 2012. Different biogeographic patterns of prokaryotes and microbial eukaryotes in epilithic biofilms. *Molecular ecology*, 21(15), 3852–3868.
- Rainey, P. B., & Travisano, M. 1998. "Adaptive radiation in a heterogeneous environment." *Nature*, 394, 69-72.

- Ramette, Alban, and James M. Tiedje. 2006. "Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution." *Microbial ecology*, 197–207.
- Rebollar, Eria. 2012. "Exigobacterium como modelo para entender la evolución de las bacterias y su relación con el ambiente." UNAM.
- Robledo, D'Angelo. Omar. 2009. "Estudio de las comunidades bacterianas de diversos vermicomposts mediante T-RFLP."
- Rodríguez-Verdugo, Alejandra. 2008. "Variación estacional en la diversidad de pseudomonas asociadas aun sistema acuático fluctuante." UNAM.
- Sanabria Janeth, Bedoya Leidy, S. J. 2009. Proceso anammox una aplicación en ingeniería: revisión general de los aspectos microbianos. *redalyc*, 83–92.
- Schlesner, H. 1994. "The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling Planctomyces spp., Pirellula spp., and other Planctomycetales from various aquatic habitats using dilute media." *Applied and environmental microbiology*, 135–45.
- Schlesner, H., Rensmann, C., Tindall, B. J., Gade, D., Rabus, R., Pfeiffer, S., & Hirsch, P. 2004. "Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA–DNA hybridization, description of Rhodopirellula baltica gen. nov., sp. nov., transfer of Pirellula marina to the genus Blastopirellula gen. nov. as Blastopirellula marina comb. nov. and emended description of the genus Pirellula." *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1567-1580.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., & Weber, C. F. 2009. "Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities." *Applied and environmental microbiology*, 75( 23), 7537-7541.
- Shapiro *et al.*, 2012. (2012). Population Genomics of Early Events in the Ecological Differentiation of Bacteria. *Science*.336(6077): 48–51.
- Sjöstedt, Johanna et al. 2012. "Recruitment of Members from the Rare Biosphere of Marine Bacterioplankton Communities after an Environmental Disturbance." *Applied and environmental microbiology*, 1361–69.

- Sloan, W. T., Lunn, M., Woodcock, S., Head, I. M., Nee, S., Curtis, T. P. 2006. Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol* 8: 732–740.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. a, Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R., Herndl, G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 12115–12120.
- Soininen, J., Korhonen, J. J., Karhu, J., & Vetterli, A. 2011. Disentangling the spatial patterns in community composition of prokaryotic and eukaryotic lake plankton. *Limnology and Oceanography*, 56(2), 508-520.
- Souza, Valeria, Ana Escalante, Laura Espinoza, and Aldo Valera. 2004. “Cuatro Ciénegas, un laboratorio natural de astrobiología.” *ciencias*, 12.
- Souza, Valeria *et al.* 2006. “An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, April 25, 6565–70.
- Staley, J. T., Fuerst, J. A., Giovannoni, S. & Schlesner, H. 1992. “The order Planctomycetales and the genera Planctomyces, Pirellula, Gemmata and Isosphaera. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.*” *Springer*, 3710–31.
- Storch, David, and Arnošt L. Šizling. 2008. “The Concept of Taxon Invariance in Ecology: Do Diversity Patterns Vary with Changes in Taxonomic Resolution?” *Folia Geobotanica*, November 5, 329–44.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, *et al.* (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Van der Gast, C. J., Walker, A. W., Stressmann, F. A., Rogers, G. B., Scott, P., Daniels, T. W., & Bruce, K. D. 2011. Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *The ISME journal*, 5(5), 780-791.
- Van Niftrik, Laura, and Mike S. M. Jetten. 2012. “Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: unique microorganisms with exceptional properties.” *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, September, 585–96.

- Vos, M., & Velicer, G. J. 2008. Isolation by Distance in the Spore-Forming Soil Bacterium *Myxococcus xanthus*. *Current Biology*, 18(5), 386-391.
- Wang, Jianjun *et al.* 2013a. "Phylogenetic beta diversity in bacterial assemblages across ecosystems: deterministic versus stochastic processes." *The ISME Journal*, 1310–21.
- Wang, Jianjun *et al.* 2013b. "Phylogenetic beta diversity in bacterial assemblages across ecosystems: deterministic versus stochastic processes." *The ISME journal*, 1310–21.
- Ward, N., Staley, J.T., Fuerst, J.A., Giovannoni, S., Schlesner, H., and Stackebrandt, E. 2006. *The order Planctomycetales, including the genera Planctomyces, Pirellula, Gemmata and Isosphaera and the Candidatus genera Brocadia, Kuenenia and Scalindua,*" in *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd. vol 7. edited by Stackebrandt . Dworkin, S.Falkow., E, Rosenberg. K., H, Schleifer., and E. New York: Springer.
- Wecker, Patricia. 2009. "Ecological Aspects of the Marine Planctomycete *Rhodopirellula baltica* SH1 T - a Whole Genome Array Approach - by." Jacobs University.
- Whitman WB, DC Coleman, WJ Wiebe. 1998. "Prokaryotes: the unseen majority." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6578–83.
- Wright ES, Yilmaz LS, Noguera DR. 2012. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 78: 717–725.