

34
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS JERARQUICO EN LA ESTRUCTURA
GENETICA DE *Escherichia coli* ASOCIADA A
MURCIELAGOS DE LA REPUBLICA MEXICANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RENE CERRITOS FLORES



DIRECTORA DE TESIS: VALERIA SOUZA SALDIVAR.

MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258293



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Análisis jerárquico en la estructura genética de *Escherichia coli* asociada a murciélagos de la República Mexicana

realizado por René Cerritos Flores

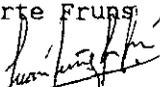
con número de cuenta 8823157-4 , pasante de la carrera de Biología

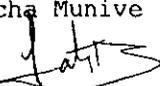
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

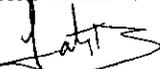
Atentamente

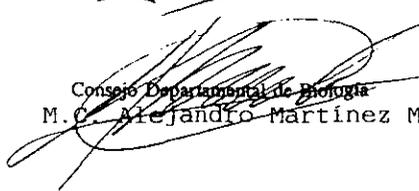

Dra. Valeria Souza Saaldivar
Director de Tesis
Propietario


Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns
Propietario


Dr. Juan Nuñez Farfan
Propietario


Biól. Martha Graciela Rocha Munive
Suplente


Biól. Jorge Ortega Reyes
Suplente


Consejo Departamental de Biología
M. C. Alejandro Martínez Mena

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo al señor Honorio Cerritos porque es mi papá, a la señora Agustina Flores porque es mi mamá y también a mi hermana Claudia esperando.....

A mi abuelito Meliton Cerritos que esta en el cielo matando muchos pelones y fumando sus faros y a mi gran perro Tsuru que aunque se murió de una enfermedad venérea debe de estar en el cielo de los perros.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, del Instituto de Ecología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra Valeria Souza, dentro del proyecto de DGAPA IN-2084 95.

La colecta e identificación de las especies de quiropteros se llevo a cabo bajo la asesoría del Biologo Jorge Ortega, miembro del laboratorio de Mastozoología del mismo Instituto.

1.-INDICE

2.-RESUMEN.....	2
3.-INTRODUCCION.....	3
3.1.-Bacterias.....	3
3.1.1.-Generalidades de bacterias.....	3
3.1.2.- Material genético en bacterias.....	4
3.1.3.- Clasificación taxonómica en bacterias.....	6
3.2.- <i>Escherichia coli</i>	6
3.2.1.-Generalidades.....	6
3.2.2.- Diferenciación bioquímica de <i>E. coli</i>	8
3.3.- Genética de poblaciones en bacterias.....	8
3.4.-Murciélagos.....	14
3.4.1.-Generalidades.....	14
3.4.2.- <i>Artibeus jamaicensis</i>	16
4.-OBJETIVOS.....	18
5.-MATERIALES Y METODO.....	19
5.1.-Obtención de muestras.....	19
5.2.- Tratamiento de las muestras.....	22
5.3.- Selección de <i>E.coli</i>	22
5.4.- Almacenamiento y conservación de las cepas.....	23
5.5.- Electroforesis de isoenzimas.....	23
5.6.- Análisis de los datos.....	25
6.-RESULTADOS.....	27
6.1.-elaboración de jerarquías.....	27
6.2.- Análisis de los datos por jerarquía.....	29
6.3.-Relaciones de parentesco.....	35
7.-DISCUSION.....	37
7.1.-Diversidad genética.....	37
7.2.-Diferenciación genética.....	39
7.3.-Relaciones de parentesco.....	39
8.-CONCLUSIONES.....	42
9.-REFERENCIAS.....	43
10.-ANEXO I.....	53
11.-APENDICE.....	61
A.- Medios de cultivo.....	61
B.- Tinción de enzimas.....	62
C.- Bufferse empleados.....	64

2.-RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la estructura genética de *Escherichia coli* asociada a murciélagos de la República Mexicana. En la mayoría de los estudios sobre genética de poblaciones en *E. coli* se habían analizado cepas de hospederos humanos y algunos otros animales domésticos y de zoológico. En este trabajo se realizó un estudio detallado de las poblaciones de *E. coli* asociadas a murciélagos de una forma jerárquica: tomando únicamente las cepas de un individuo, de varios individuos de una especie, de varias especies en una localidad, de una sola especie en varias localidades y finalmente se realizó un análisis del total de cepas encontradas en murciélagos. Las especies analizadas de los hospederos son: *Artibeus jamaicensis*, *Desmodus rotundus*, *Leptonycteris nivalis*, *Sturnira lilium*, *Choeronycteris mexicana*, *Glossophaga soricina*, *Tadarida brasiliensis*, *Antrozous pallidus*, *Peropteryx macrotis*, y *Natalus stramineus*. Se obtuvo un total de 247 cepas en 8 localidades de la Republica Mexicana, estas localidades son: Cueva murcielagos en Yucatan, cueva Actun Huach en Yucatan, cueva Loltum en Yucatan, cueva Salitre en Morelos, localidad Omitelmi en Guerrero, cueva del diablo en Morelos, localidad Mapimi en Durango y cueva Sayul en Chiapas. La técnica que se realizó fue la de electroforesis de isoenzimas, utilizando para ello 10 enzimas del metabolismo general de *E. coli*, cada enzima presento un solo loci. Se determinó la diversidad genética expresada por la heterosis virtual (H). Los resultados obtenidos demuestran una vez mas que el índice de diversidad es alto para estas poblaciones, encontrando valores de H que van de 0.434 cuando se analizo una sola especie de hoperero (*A. jamaicensis*) hasta valores de H de 0.534, cuando se analizó la población total. Los índices de diversidad genética son muy parecidos a los encontrados en otros estudios en cepas de *E. coli* asociadas a humanos:

Nuestros resultados indican que la dieta del hospedero juega un papel primordial en la distribución de electrotipos, ya que los hospederos con hábitos alimenticios diferentes presentan cepas específicas.

3.-INTRODUCCION

Un paso crucial en el quehacer biológico es poder clasificar los organismos tomando en cuenta los caracteres específicos de cada grupo. Saber reconocer e interpretar estos caracteres suele ser a veces problemático. Los primeros sistemas de clasificación solo reconocieron los reinos vegetal y animal, posteriormente Haeckel propuso otro reino más, al que llamo protista, el cual se definía por la carencia de diferenciación de tejidos, es decir, todos los microorganismos estaban dentro de este reino. Recientemente Robert Wittaker (1969 en Atlas 1990) propone el sistema de clasificación de cinco reinos, basándose en diferencias evolutivas a lo largo de tres modos principales de nutrición: sintética para evolucionar a plantas, adsortiva para evolucionar a hongos e ingestiva para evolucionar a animales. Según Wittaker el sistema mas primitivo de vida, es el reino monera, que abarca todas las bacterias. En 1980, Carl Woese basándose en análisis genéticos a nivel molecular propone un nuevo sistema de clasificación, con tres dominios esenciales: Archaeobacteria, Eubacteria y Eucariota. Tanto las eubacterias como las arqueobacterias son células que carecen de núcleo y otros organelos, por ello se les llama procariontes. Las eubacterias y arqueobacterias están tan distantes entre si como cada una lo está de las células nucleadas (Atlas, 1990).

3.1-BACTERIAS

3.1.1- GENERALIDADES DE BACTERIAS

Las bacterias, aunque son invisibles a la vista, forman una parte muy importante de la biomasa total de la tierra. Las tres cuartas partes de toda la materia viva esta conformada por microorganismos, la mayor parte de los cuales son procariontes (Postgate, 1992). Ahora bien, si tomamos en cuenta que los primeros organismos vivos que poblaron la tierra fueron bacterias, tendremos que la biomasa a través del tiempo en la tierra fue aportado principalmente por bacterias. El organismo microfósil mas antiguo tiene unos 3400 millones de años (Brock y Madigan, 1991).

Las bacterias se reproducen asexualmente por fisión binaria, la cual en *Escherichia coli* se ha reportado que puede ocurrir una vez cada 20 minutos en condiciones óptimas (Atlas, 1990). Las bacterias tienen un tamaño similar al de una mitocondria (0.5-1.0 μm de diámetro; 5-10 μm de largo) (Stansfield, 1992).

La forma de las bacterias no es muy diversa. Los bacilos presentan formas cilíndricas, los cocos son esféricos y en ocasiones se asocian en pares (diplococos) en agrupaciones (estafilococos) o en hebras (estreptococos), finalmente los espirilos en forma helicoidal son con frecuencia tan largos, llegando a medir hasta 50 μm (Postgate, 1992).

Los procariontes desempeñan un papel importante en los intercambios biológicos de materia y energía sobre la tierra. Las bacterias fotosintéticas existentes en el agua dulce y en el mar, capturan la energía solar y la emplean para producir carbohidratos y otros materiales celulares que son empleados, a su vez, como alimentos de otras formas de vida. Algunas bacterias pueden fijar nitrógeno molecular (N_2) de la atmósfera para formar compuestos nitrogenados biológicamente útiles. Las bacterias constituyen de este modo el punto de partida de muchas cadenas tróficas (Stainer, 1986).

Las bacterias participan también en el último eslabón de las cadenas tróficas, descomponiendo los compuestos orgánicos de plantas y organismos muertos en los compuestos más sencillos, de tal manera que puedan entrar a sus ciclos respectivos: carbono, nitrógeno, y oxígeno (Brock y Madigan, 1991).

3.1.2- MATERIAL GENÉTICO EN BACTERIAS

Una de las características primordiales de los procariontes, es la carencia de un núcleo, en consecuencia se forma una región nucleoplasmática, donde se aloja la información genética constituida por una gran molécula de ADN duplex formando un cromosoma, el cual es circular y cerrado por sus extremos. Además contiene pequeñas estructuras circulares de ADN duplex llamados plásmidos. Estos plásmidos le pueden conferir a la bacteria resistencia a

antibióticos, la capacidad de asimilar algunos azúcares y la capacidad para intercambiar genes (Selander, 1986;Atlas, 1990; Lewin, 1990). La sexualidad bacteriana no esta acoplada a la reproducción y esta codificada en el caso de *E. coli* en el plásmido F+, el cual codifica para los genes involucrados en la conjugación bacteriana (Stainer, 1986; Hopwood, 1989). Los plásmidos se transmiten de manera independiente al cromosoma bacteriano y por su tamaño son de fácil captación para otras bacterias, incluyendo algunas que no sean de la misma especie (Stainer, 1986).

Debido a que las bacterias presentan un solo replicón en el cromosoma, la replicación del ADN es mucho mas sencilla que en eucariontes (Brock, 1991). En la célula bacteriana, no hay membranas que separen al ADN de los ribosomas, por lo que la transcripción y la traducción son procesos simultáneos (Brock y Madigan, 1991).

El cromosoma bacteriano puede ser alterado por la mutación o por el intercambio genético, el cual puede ocurrir por conjugación transformación y transducción (Stansfield, 1992). La conjugación bacteriana incluye la unión temporal de dos células de tipo de apareamiento opuesto, seguido por una transferencia unidireccional de parte del material genético a través de un puente citoplasmático de la célula donadora a la célula receptora, y la separación posterior de las células (Hopwood, 1989).

La transformación es la transferencia de ADN desnudo de una célula a otra . La eficiencia de la transformación depende de tres factores: 1)el tamaño de los fragmentos de ADN, 2) la concentración de ADN y 3)la competencia de la célula (Brock y Madigan, 1991).

La transducción, es la transferencia del material genético de una bacteria a otra, usando un virus bacteriano (bacteriófago) como vector (Stansfield, 1992). Cuando un virus infecta a una célula bacteriana, su ADN se puede unir al cromosoma de la bacteria formando un prófago que se replica conjuntamente con la bacteria. Cuando los prófagos se convierten en virus líticos, se pueden llevar

consigo un fragmento de ADN bacteriano. Cuando estas partículas infectan otra célula, el ADN viral transporta una porción del cromosoma de la primera célula al cromosoma de la segunda célula (Maynard Smith, 1989).

3.1.3-CLASIFICACION TAXONOMICA EN BACTERIAS.

En las poblaciones bacterianas, los cambios del genoma tienen lugar con tal rapidez que sería absurdo distinguir unas especies de otras basándose en un número reducido de caracteres controlados por genes únicos. Por ello, la mejor definición aplicable a la especie bacteriana sería: un grupo de cepas que mostrando entre si un grado elevado de similitud fenotípica y genotípica, difieren en muchos caracteres de otros grupos de cepas (Stainer, 1986).

La taxonomía bacteriana está basada en las propiedades bioquímicas, fisiológicas y genéticas de las bacterias(Stainer, 1985).

El esfuerzo más amplio y reconocido para clasificar las bacterias es el Manual de bacteriología sistemática de Bergey (Atlas, 1990). Este manual es un compendio de información clásica y molecular de todas las especies reconocidas de las bacterias y contiene una gran cantidad de claves dicotómicas útiles para la identificación de bacterias. En estudios recientes se incorporan trabajos de secuenciación de genes y datos moleculares, para clasificar a las bacterias (Brock y Madigan, 1991).

3.2-*Escherichia coli*

3.2.1 GENERALIDADES

Escherichia coli se encuentra dentro del grupo de bacterias gram-negativas no fotosintéticas y en particular dentro del grupo entérico. Todas las bacterias de este grupo se caracterizan por ser anaerobias facultativas. Otros integrantes de este grupo están representados por los géneros: *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Erwinia*, y *Photobacterium*.

El genero *Escherichia* esta constituido por cinco especies: *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermani*, *E. vulneris* y *E. coli*. Esta ultima es la especie tipo y del genero (Atlas, 1990). En estudios sobre hibridacion de ADN demuestran la semejanza genética que existe entre *E. coli* con los géneros *Salmonella* y *Shigella* alcanzando un 75% de homologia (Ewing, 1986).

La bacteria *E. coli* es un habitante habitualmente inocuo del tracto gastrointestinal de los humanos y de otros muchos animales superiores. Asimismo es el procarionte estudiado con más intensidad (Selander et al. 1987; Savageau, 1983; Schaechter, 1986). *E. coli* mide alrededor de $2\mu\text{m}$ de longitud y su diámetro es algo menor de $1\mu\text{m}$. Poseen una pared celular protectora y una membrana celular delicada en el interior de la pared. La molécula de ADN de una célula de *E. coli* posee una longitud que es casi 100 veces superior a la de la propia célula, y por tanto debe hallarse plegada muy apretadamente para acoplarse en el cuerpo nuclear cuya dimensión máxima es habitualmente inferior a $1\mu\text{m}$ (Kornberg, 1980).

Existen cepas de *E. coli* consideradas como patógenas oportunistas (Selander et al., 1981), y algunas otras que junto con *Shigella* son patógenas inherentes (Hartl y Dykhuizen, 1985), siendo estas últimas raramente recuperadas de la flora intestinal normal (Oskov y Oskov, 1983).

Los mecanismos de intercambio genético descritos anteriormente, transformación, transducción, y conjugación, se pueden utilizar para realizar el mapa de la ubicación de varios genes del cromosoma unico de las bacterias (Brock y Madigan, 1991). En *E. coli* se han mapeado 1958 genes y mas de 40 estructuras cromosomales (Berlyn et al., 1996). Los estudios físicos de las moléculas de ADN de composición genética conocida permiten correlacionar las distancias en el mapa genético con las distancias físicas en el ADN. La longitud total del genoma de *E. coli*, 100 minutos en el mapa genético, equivale a 4.6×10^6 pares de bases. Como la longitud total del ADN de un cromosoma de *E. coli* en línea recta es alrededor de 1110 a 1400 μm , 1 minuto

de transferencia representa cerca de 11 a 14 μm de ADN (aproximadamente 40 genes por minuto). (Brock, 1991).

3.2.2- DIFERENCIACION BIOQUIMICA DE *E. coli*.

Para seleccionar cualquier bacteria que se desee estudiar, es indispensable recurrir a las propiedades bioquímicas de estas. Para *E. coli* estas propiedades se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Características bioquímicas de *Escherichia coli*.

CARACTERISTICA	RESPUESTA	CARACTERISTICA	RESPUESTA
Patogeneidad para hombre y animales	Varia según la cepa	Producción de indol	Si
Presencia de β galactosidasa	Si	Presencia de ureasa	No
Producción de gas (CO_2 y H_2)	Varia según la cepa	Producción de butanodiol	No
Fermentación de lactosa	SI	producción de triptofano desaminasa	No
Utilización de citrato	No	Motilidad	Varia según la cepa

Datos tomados de Stainer, 1986; Ewing, 1986 y manual Difco, 1984.

3.3- GENETICA DE POBLACIONES EN BACTERIAS

La genética de poblaciones tiene como finalidad evidenciar la variación que existe en las poblaciones de organismos, tanto en el tiempo como en el espacio, asimismo se dedica en dar a conocer las fuerzas evolutivas que afectan dicha variación y sobre todo trata de dar una explicación biológica a estos hechos, dicho de otra manera se dedica a explicar los procesos de evolución. Dentro de los procesos que generan esta variación genética (nuevos genotipos) se puede mencionar a la mutación, a rearreglos del genoma y al intercambio de genes de un individuo a otro. Por otro lado existen procesos que determinan de cierta manera la continuidad de estos genotipos como sería, la selección natural, la migración entre poblaciones y la competencia (Young, 1989).

Resumiendo la genética de poblaciones presenta tres aspectos importantes de estudio: 1) La descripción de variación genética dentro y entre poblaciones, 2) Una aproximación de los procesos que causan esta variación, tanto en el campo como ensayos en laboratorio y 3) Plantear una base teórica que conecte las causas con los efectos, es decir, (Young, 1989). Intrínseco a estos puntos se estudia la dinámica evolutiva dentro de especies (Selander, 1980).

Los patrones de variación genética pueden ser evidenciados utilizando para ello análisis de polimorfismo genético, de análisis de desequilibrio de ligamiento, heterogeneidad en el espacio, y cambios temporales.

Los trabajos sobre genética de poblaciones en eucariontes fueron ampliamente explotados en los años 60, utilizando para ello técnicas bioquímicas que reflejaron dicha variación genética en las poblaciones estudiadas. Los estudios de este tipo en procariontes fueron pocas debido a la dificultad de trabajar en estos organismos por su tamaño y por la poca información que las técnicas aportaban por otro lado, los caracteres fisiológicos y serológicos que se tomaban no correspondían directamente a substituciones alélicas en un loci y por lo tanto no explicaban a ciencia cierta como era la dinámica dentro del genoma de estos organismos (Selander, 1980). Por tanto, al estudiar genética de poblaciones en bacterias debemos de tener en cuenta que estas difieren en mucho con respecto a los eucariontes: Las bacterias son haploides y tienen una reproducción desacoplada del intercambio genético basada en la clonalidad, siendo la recombinación rara. Además se supone que presenta grandes tamaños en su población y cortos periodos de tiempo de generación. Por lo tanto la genética de poblaciones debe orientarse a los procesos que podrían estar generando y manteniendo su adaptación y diversidad.

En la década de los 80 aparecen una gran cantidad de estudios en donde se aplica la electroforesis multilocus de enzimas en poblaciones de bacterias, asociadas al hombre como *Escherichia coli*,

Legionella spp., *Haemophilus influenzae*, *Bordetella sp.* y *Neisseria meningitis*, los cuales revolucionaron el estudio de la variación en los genes cromosómicos, elucidando las principales características de la estructura genética de poblaciones y especies y sobre todo aportando datos importantes en cuanto a procesos evolutivos en poblaciones de bacterias (Selander, 1985).

Estimaciones sobre la distancia genética entre pares de linajes basados en electroforesis de isoenzima han demostrado una correlación con estimaciones de divergencia de secuencia nucleotídica obtenida por hibridación del ADN celular total. Por lo tanto, hay razón para creer que de 15 a 20 genes de isoenzimas normalmente examinados en estudios de población son una muestra representativa del genoma cromosómico y así proveen una buena base para la estimación de niveles de diversidad genética (Selander *et al.*, 1985).

Uno de los primeros estudios sobre genética de poblaciones de bacterias en la naturaleza fue hecho por Milkman (1973), quien utilizó varios cientos de cepas de *E. coli*, para probar la teoría neutral de evolución molecular (Milkman, 1973). Posteriormente Selander y Levin (1980) examinaron 109 clones de *Escherichia coli* en humanos y mamíferos de Estados Unidos, encontrando polimorfismo en 18 de las 20 enzimas analizadas y una diversidad genética (H) total de 0.47, asimismo, la relación entre el número de electrotipos encontrados con el número total de clones examinados fue muy alta (98/109). El establecimiento de electrotipos idénticos o parecidos en hospederos no asociados sugirió que el número de genotipos existentes en *E. coli* es menor del esperado dada la abundancia de esta bacteria y el hecho de que genotipos se mantienen idénticos por largos periodos de tiempo sugiere que *E. coli* es clonal, esto se debe a poca o nula recombinación (Selander y Levin, 1980).

En 1981 Caugant *et al.* realizaron un estudio sobre la variación temporal en un solo individuo, extrayendo un total de 550 clonas en un período de 11 meses. Utilizando la técnica de electroforesis en 15

enzimas, se identificaron 53 electrotipos diferentes y una H total de 0.39. Dos de los electrotipos fueron considerados como residentes, cincuenta fueron transitorios y solo uno fue recurrente. Los genotipos residentes estuvieron representados en un 46% de las cepas aisladas y fluctuaban marcadamente en abundancia. Como muchos de los 11 tipos electroforéticos transitorios estuvieron representados por una sola muestra, el índice de cambio en este segmento de la población fue de 2 a 4 semanas. El hecho de que sucesivos grupos de tipos electroforéticos transitorios estuvieran genéticamente no relacionados con cualquier otra de las cepas residentes, indica que la diversidad fue causada por migración de clones desde fuentes ambientales en vez de recombinación in situ (Caugant *et al.*, 1981).

Uno de los estudios más completos e importantes fue realizado por Whittam en 1983, donde trabajó con 1705 clones extraídos de humanos y animales de Norteamérica y algunas pocas de humanos de Suiza. Los resultados obtenidos mostraron claramente una variación genética dos o tres veces mayor que en eucariontes, encontrando una H total de 0.52, asimismo se descubrió que existía un alto reemplazamiento de cepas en un lapso de 1 a 2 semanas. La estructura de la población resultó ser casi estrictamente clonal y los bajos niveles de recombinación presentaban dos consecuencias evolutivas:

1) Con bajos niveles de recombinación la selección que actúa en la variación sobre un locus repercute en las frecuencias alélicas de otros loci, por tanto Whittam supone que la estructura genética en las poblaciones de *E. coli* esta determinada por la deriva génica y la selección periódica (Whittam, 1983).

La selección periódica actúa cuando los niveles de recombinación son muy bajos y la clonalidad mantiene la diversidad genética, siendo la mutación el principal agente causal de esta diversidad. A partir de una línea clonal se pueden dar procesos de mutación en algunos grupos de bacterias generadas, siendo estas mutaciones benéficas, la línea clonal inicial puede ser reemplazada por estos nuevos grupos.

2) La deriva génica puede afectar la frecuencia de los alelos, causando una extinción de líneas clonales azarosamente, mientras que en otras líneas causaría un crecimiento de la población. Frecuentes extinciones locales pueden generar grandes varianzas en los coeficientes de desequilibrio en una población subdividida.

Por otra parte en un estudio reciente, Pupo y Richardson (1995) examinaron poblaciones naturales de *E. coli* en aguas negras de Australia para saber los cambios temporales de los alelos y haplotipos. La variación genética fue muy alta, encontrando una H total de 0.61. En este trabajo se apoya la idea de que las fuerzas que mantienen la estructura genética en poblaciones naturales de *E. coli* son ciertos niveles de recombinación y que el producto de ésta son sometidos a una selección intensa. Además, proponen que los cambios en genotipos de *E. coli* en la flora intestinal pueden ser atribuidos principalmente a los cambios de dieta de los hospederos (Pupo y Richardson, 1995).

Existe una gran cantidad de estudios sobre genética de poblaciones en *E. coli* asociada a humanos. La mayoría de ellos llega a las siguientes conclusiones:

1) Existe en *E. coli* una alta variabilidad genética (dos otros veces mayor que en eucariontes). Esta variación puede ser detectada por técnica de serotipos, biotipos, electroforesis e hibridación de ADN (Caugant *et al.*, 1981; Whittam *et al.*, 1983; Selander y Whittam, 1983).

2) Hay clones que se presentan en un mismo hospedero y otros son compartidos entre hospederos (Caugant, *et al.*, 1981).

3) Algunos clones se encuentran distribuidos por casi todo el mundo, mientras que otros se restringen a una sola región (Selander y Levin, 1980).

4) La recombinación cromosomal entre clones es muy limitada. Esta conclusión se explica por el alto desequilibrio de ligamiento y la presencia de gran cantidad de clones en los hospederos (Whittam *et al.*, 1983).

5) La flora intestinal de hospederos presentan un gran índice de variación con muchas cepas transitorias unas pocas residentes y otras recurrentes (Caugant *et al.*, 1983).

La mayoría de los estudios sobre genética de poblaciones en *E. coli* se han realizado en humanos y algunos otros mamíferos. La facilidad de obtener las muestras en estos individuos y el interés para entender las formas de virulencia en estas bacterias hace que otros grupos de mamíferos no sean tomados con tanto interés. Si la distribución y la variación genética esta relacionada con ciertos hábitos de los hospederos, como podrían ser dieta, migración, reproducción, hábitat, etc., sería de gran interés saber como es la dinámica poblacional de *E. coli* en otros hospederos con hábitos de vida completamente distintos a la de los humanos.

El grupo de los murciélagos son considerados como organismos con hábitos de vida muy diferentes a la de los demás mamíferos: su dieta, su forma de migración, su hábitat etc., pueden ser un factor determinante en la distribución y la diversidad de su flora intestinal y en este caso en las poblaciones de *E. coli*. Los resultados aquí obtenidos son una buena forma de comparación entre hábitos de vida muy diferentes.

3.4 ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

La electroforesis de enzima multilocus es una técnica ampliamente explotada en genética de poblaciones, ya que la gran cantidad de organismos que puede analizar le permite conocer en un periodo muy corto de tiempo la estructura de las poblaciones en estudio.

La carga neta electrostática y el rango de migración de una proteína durante la electroforesis son determinados por la secuencia de sus aminoácidos. Las variantes de movilidad (electromorfos o aloenzimas) de una enzima puede estar directamente igualado con los alelos en el locus del gene estructural correspondiente (Harris y Hopkinson, 1985).

Estudios recientes de varias proteínas con secuencia conocida indicaron que la electroforesis de gel puede detectar una gran variación (80 a 90%) de sustituciones de aminoácidos (Oxford y Rollinson, 1983). Sin embargo, debido a que algunas sustituciones no afectan la movilidad electroforética, los electromorfos pueden ser secuencialmente heterogéneos (Ayala, 1974) y a nivel de secuenciación de nucleótidos en el gen mismo hay mayor heterogeneidad debido primeramente a las sustituciones silenciosas (Kimura, 1983).

Otras técnicas utilizadas no solo para conocer la estructura genética de bacterias, sino también en estudios clínicos y epidemiológicos, lo constituyen los métodos serológicos, fenotípicos, así como biotípicos.

Sin duda el mejor análisis para conocer la dinámica genética de las poblaciones de bacterias y eucariontes es analizar el ADN. En estudios recientes elaborados por un gran número de investigadores sobre hibridización y secuenciación, los resultados obtenidos son un tanto diferentes a los encontrados por electroforesis de isozimas principalmente en los puntos relacionados con niveles de recombinación (Dykhuizen y Green, 1991).

3.5- MURCIELAGOS

3.5.1- GENERALIDADES

Los murciélagos constituyen uno de los grupos más ampliamente distribuidos dentro de la clase de los mamíferos, con un total de 950 especies vivientes, solo secundado por el orden Rodentia. El orden Chiroptera es el único dentro de la clase Mamalia con facultades de

poder volar. Este grupo apareció hace unos 55 millones de años aproximadamente (Hill y Smith, 1992).

Las oportunidades presentadas por "nichos vacíos", incluyendo sus hábitos nocturnos, capacidad de volar, alimentación a base de insectos, frutas tropicales y flores adaptadas al aparato bucal de los murciélagos hicieron que en este grupo se produjera una radiación adaptativa en un periodo muy corto de tiempo (Hill y Smith, 1992).

Los hábitos alimenticios de los murciélagos son muy variados, incluso dentro de una misma especie, ya que la dieta puede cambiar por temporadas en el año (Fleming *et al*, 1972). La dieta de murciélagos incluye: insectos y pequeños artrópodos (insectívoros), carne de otros vertebrados (carnívoros), pequeños peces (piscívoro), frutas y/o flores (frugívoro), polen y/o néctar (nectarívoros), una gran variedad de alimentos (omnívoro), y sangre de mamíferos grandes (hematófago). El hábito de alimentarse de sangre es único para este orden de mamíferos, así como para todos los vertebrados. La gran variedad de hábitos alimenticios se ve reflejada en la anatomía de los componentes del aparato digestivo, principalmente el estómago y el intestino. Por ejemplo en el caso de los individuos hematófagos el estómago está marcadamente modificado, teniendo una forma completamente diferente a la de los individuos que se alimentan de frutas o insectos (Hill y Smith, 1992).

Muchas especies de este orden presentan hábitos de migración a causa de los cambios de temperatura de los sitios en donde habitan. Normalmente las especies que migran son las especies que habitan cerca de los polos, aproximándose de esta manera hacia el ecuador. La distancia que pueden recorrer es de 300-500 Km, lo cual se considera como una migración moderada, algunos otros alcanzan una distancia de 1000-1500 Km, movilizándose normalmente de norte a sur, aunque hay especies que no necesariamente se movilizan en direcciones latitudinales (Hill y Smith, 1992).

En México existen aproximadamente unas 154 especies de murciélagos, agrupadas en 3 superfamilias, 8 familias, 10 subfamilias y 38 géneros (Villa, 1968). En un recuento más reciente para la región de Norteamérica (Hall, 1981), se reportaron aproximadamente 189 especies, agrupadas en 9 familias.

3.5.2- *Artibeus jamaicensis*

Existen en México 4 subespecies de *Artibeus jamaicensis* (Leach, 1821): *A. paulus* (Davis, 1970), *A. richardsoni* (Allen, 1908), *A. triomylus* (Handley, 1966) y *A. yucatanicus* (Allen, 1904).

A. jamaicensis, conocido como murciélago zapotero es un quiróptero de gran tamaño (longitud total: 65 a 95 mm), aunque presenta una considerable variación morfológica en todo su rango de distribución: siendo más chicos en el norte y de mayor tamaño en el sur (Handley, 1987). Están provistos de una hoja nasal erecta (de 4 a 6 mm de largo) y una serie de verrugas en forma de V en el labio inferior (Silva, 1979). Carecen de cola y el pelaje es de color pardo oscuro, denso pero no muy largo; además presentan dos líneas faciales tenues de color blanco en el rostro que contienen glándulas odoríferas (Dalquest et al., 1952).

Artibeus jamaicensis se distribuye desde la vertiente costera de los estados de Sinaloa y Tamaulipas en México hasta el norte de Bolivia. Su distribución incluye la península de Yucatán, Centroamérica y las islas del Caribe, mientras que en Sudamérica se ha reportado en varios países (Dalquest, 1953).

El murciélago zapotero es una especie altamente frugívora que se alimenta esencialmente de higos silvestres (*Ficus*), aunque también se ha reportado que consume frutos de otras plantas como el ramón (*Brosium alicastrum*), ciruelo (*Spondias purpurea*), pomarrosa (*Syzygium jambos*), zapote (*Manilkara zapota*) así como 92 plantas diferentes más (August, 1981). Además esta especie complementa su hábito alimenticio dependiendo de la temporada del año, con

insectos, pólen, néctar y hojas (Fleming et al, 1977). Los frutos de los que se alimenta son acarreados hasta el sitio de percha. La distancia entre el punto de donde obtiene los frutos al sitio de percha es de 175 metros promedio. El sitio de percha que generalmente es un árbol o una cueva es fácilmente detectable ya que debajo del lugar de forrajeo se encuentran restos de frutos y plántulas de semillas recién germinadas (Kunz y Diaz, 1995).

Artibeus jamaicensis forma unidades sociales de tipo harem estables, es decir, asociación de un macho con varias hembras durante un largo periodo de tiempo, siendo su sistema de apareamiento de tipo poliginico como defensa del recurso para los individuos que viven en los troncos huecos y como defensa de las hembras para los individuos que se encuentran en cuevas (Kunz et al., 1983).

4.-OBJETIVOS

GENERAL

Conocer la estructura genética de *E. coli* asociada a murciélagos

ESPECIFICOS

Determinar la diversidad genética de *E. coli* dentro de un individuo de *A. jamaicensis*, para conocer de una manera más detallada la dinámica de esta especie de bacteria dentro del tracto digestivo del hospedero.

Determinar la estructura genética de *E. coli* en *A. jamaicensis* dentro de una cueva y entre cuevas, para conocer el grado de similitud genética entre cepas de una misma cueva en varios individuos y más ampliamente entre distintas cuevas donde se encontró este hospedero.

Comparar los electrotipos de *E. coli* en *A. jamaicensis* con *E. coli* de otras especies de murciélagos en México para tratar de encontrar algún factor determinante en la distribución y diversidad de las poblaciones bacterianas.

5.-MATERIALES Y METODO

5.1 OBTENCION DE MUESTRAS

Para la obtención de cepas de *E. coli* se capturó a un gran número de murciélagos, ésta captura se llevo a cabo con redes de mano, redes de cubo y redes longitudinales fijas de nylon, posteriormente se metieron estos en costales y con la ayuda de guantes de carnaza se les hizo un frotis anal, utilizando para ello un palillo de dientes forrado de algodón, o en su defecto, un cotonete, al final de este paso se liberaron los murciélagos. Las heces fecales fueron almacenadas en tubos de ensaye con agar de soya tripcaseína (Bioxon-108 -1). Para cada muestra se tomaron los siguientes datos: nombre y localidad de la cueva, especie capturada, sexo del individuo, hábitos alimenticios, estadio, así como la temperatura y humedad relativa de la cueva.

Se muestrearon 10 localidades, en varios estados de la República Mexicana. En 8 localidades se encontró al menos 1 cepa de *E. coli*, mientras que en las dos restantes (Oaxaca Km-10 y Chalk mult), no se encontró ninguna cepa. Así mismo, se les hizo un frotis anal a 53 individuos, de los cuales 24 no presentaron *E. coli*, los 29 restantes presentaron al menos 1 cepa. Las localidades en donde se encontraron cepas de *E. coli* son las siguientes: cueva murciélagos en Yucatán (año-1-113 cepas), cueva Actun Huach en Yucatán (32 cepas), cueva Salitre en Morelos (13 cepas), cueva Loltum en Yucatan (4 cepas), localidad de Omitelmi en Guerrero (17 cepas), cueva Del Diablo en Morelos (34 cepas), localidad de Mapimi en Durango (11 cepas), cueva Sayul en Chiapas (1 cepa) y cueva Murciélagos en Yucatán (año 2-22 cepas)(en la cueva Murciélagos en Yucatan se realizaron dos muestreos, en un período de un año).



Figura 1: Mapa de la República Mexicana que muestra las localidades en donde se obtuvieron cepas de *E. coli* en murciélagos. Las localidades son las siguientes: Cueva Murciélagos (1), cueva Hactun huach (2), cueva Loltum (3), cueva Del Diablo (4), cueva Salitre (5), localidad de Mapimi (6), localidad de Omitelmi (7), y cueva Sayul (8).

Se obtuvo un total de 247 cepas, en 8 localidades distintas de la República Mexicana, representadas por 11 distintas especies de, las cuales están agrupadas en cinco familias. Dentro de la familia Phyllostomidae se encuentran: *Artibeus jamaicensis*, *Desmodus rotundus*, *Leptonycteris nivalis*, *Sturnira lilium*, *Choeronycteris mexicana* y *Glossophaga soricina*; la familia Molossidae representada por *Tadarida brasiliensis*; la familia Vespertilionidae representada por *Antrozous pallidus*; la familia Emballonuridae representada por *Peropteryx macrotis* y finalmente, *Natalus stramineus* agrupada en la familia Natalidae. Se incluyeron además, cuatro cepas de ratón *Mus musculus* de la cueva Loltum. Las cepas encontradas en *Mus musculus* se incluyeron con la finalidad de hacer una comparación entre estas y las cepas obtenidas en

Quiropteros, ya que al encontrarse en un hábitat normalmente ocupado por murciélagos, pero al ser de otro orden (Rodentia), podrían aparecer patrones interesantes.

Tabla 2: Número de cepas por especie en el total de localidades.

LOCALIDAD	VEGETACION	FECHA DE COLECTA	ESPECIES	# CEPAS
Cueva Murcielagos * Yucatan	Selva baja caducifolia	Mayo 1995	<i>Artibeus jamaicensis</i>	86
			<i>Peropterys macrotis</i>	19
Tecax			<i>Natalus stramineus</i>	8
Cueva Actun Huach Yucatan Akil	Selva baja caducifolia	Enero 1996	<i>Artibeus jamaicensis</i>	32
Cueva Salitre Morelos Tetecalita	Selva baja caducifolia	Octubre 1995	<i>Artibeus jamaicensis</i>	13
Cueva Loltum Yucatan	Selva baja caducifolia	Mayo 1995	<i>Mus musculus</i> (Ratón)	4
Omitelmi Guerrero	Selva baja caducifolia	Agosto 1994	<i>Artibeus jamaicensis</i>	7
			<i>Sturnira lilium</i>	8
			<i>Tadarida brasiliensis</i>	2
Cueva del Diablo Morelos Tepoztlan	Selva baja caducifolia	Abril 1994	<i>Desmodus rotundus</i>	5
			<i>Leptonycteris nivalis</i>	8
			<i>Glossophaga soricina</i>	7
			<i>Sturnira lilium</i>	7
			<i>Choeronycteris mexicana</i>	7
Mapimi Durango	Matorral xerofilo	junio 1994	<i>Antrozous pallidus</i>	1
			<i>Tadarida brasiliensis</i>	10
Cueva Sayul Chiapas	Selva alta perennifolia	mayo 1994	<i>Sturnira lilium</i>	1
Cueva murcielagos *	Selva baja caducifolia	Enero 1996	<i>Artibeus jamaicensis</i>	22
Total: 8 Localidades			11 ESPECIES	247 Cepas

5.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El primer paso que se realizó en el laboratorio fue la incubación. A cada tubo se le colocó 1 ml de medio LB líquido, se metieron a una incubadora de movimiento y se dejaron durante 24 horas a una temperatura de 37° C. Posteriormente se tomaron 100µl del medio líquido y se plateo en cajas de petri con LB sólido, finalmente se dejaron crecer durante 24 horas a una temperatura de 37° C.

5.3 SELECCION DE *E. coli*

Se usaron varios medios de cultivo selectivos para aislar poblaciones de *E. coli*. El primer medio que se usó para seleccionar fue M (medio mínimo) y ML (mínimo de lactosa)(ver anexo 1). Se escogieron 50 colonias al azar, las cuales fueron picadas primero en el medio M y posteriormente en ML. Las colonias que crecieron en ML y no así en M (lac+, cit-) se eligieron como posibles *E. coli*.

La segunda prueba selectiva fue con el medio TSI (triple azúcar y hierro Difco- 026-17-11), el cual es de un color rojo a un pH de 7.4 a 24° C . A cada colonia (lac+, cit-) se colocó una pequeña muestra con la ayuda de un asa bacteriológica que se deslizó y se sumergió en el medio TSI, . Al cabo de 24 horas en una incubadora fija a una temperatura de 37° C, se eligieron solamente aquellas cepas que viraron el medio de rojo a amarillo desprendiendo Hidrogeno y Bióxido de carbono. Las cepas elegidas (lac+, cit-, glu+, sac+, gas+, H₂S-) fueron sometidas a base de agar urea (BBL- 11795) . Los tubos de urea presentan un color amarillo (un pH de 6.8 a 24°C). Se incubaron las cepas previamente sembradas en el medio durante tres días a una temperatura de 37° C . Unicamente las cepas que no hidrolizan la urea, es decir, que no viraron el medio a rosa fuerte fueron sometidas al último medio selectivo (lac+,cit-, glu+,sac+, gas+, H₂S-, urea-).

Finalmente las cepas seleccionadas fueron sembradas en cajas de petri con medio McConkey (Bioxon-109) el cual es de un color rojo con un pH final de 7.1 a 24°C incubadas a 37° C durante 24 horas, las colonias que adquirieron un color rosa en McConkey se incluyeron dentro de la colección de *E. coli* asociada a mamíferos.

5.4 ALMACENAMIENTO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS

Las cepas de *E. coli* fueron guardadas en un ultracongelador Revco de -80°C. Se utilizaron dos criotubos de 2 ml para cada cepa: uno, llamado de "uso" y otro llamado "de reserva". En cada criotubo se colocó 1 ml de medio UL líquido, así como una colonia de cada cepa, se dejaron en una incubadora de movimiento durante 5 horas a una temperatura de 37° C. Posteriormente se guardan los criotubos en el ultra congelador de -80°C, debidamente etiquetados.

5.5 ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

A partir de los aislados almacenados en el ultra congelador, se sembraron en medio McConkey sólido cada una de las cepas, con la finalidad de obtener colonias aisladas. Se incubó por 24 horas a una temperatura de 37° C. Cada colonia aislada de cada cepa se sembró en 15 ml de LB líquido, vertidos en pequeños matraces, se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37° C en una incubadora de movimiento. Transcurrido este tiempo se colocó el caldo en tubos de centrifugado. Se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 5 minutos, después de este tiempo, el sobrenadante se tiro, en tanto, a la pastilla se le colocó 1.5 ml de solución buffer (HCl pH 8) y 150 μ l de lisozima, se agitó hasta deshacer la pastilla. Para que la pared y la membrana celular de las bacterias quedaran completamente rotas se congelaron los lisados en el ultra congelador de -80°C durante un tiempo de 10 a 15 minutos, posteriormente se descongeló y nuevamente se congeló por el mismo tiempo. Los lisados fueron vertidos en tubos eppendorff, debidamente etiquetados, para después, almacenarlos en el ultra congelador.

Se utilizaron 10 enzimas del metabolismo general de *E. coli*, todas ellas con un solo loci. Las enzimas fueron: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), arginina kinasa (ARK), malato deshidrogenasa (MDH), manosa 6 fosfato deshidrogenasa (MPI), fosfoglucomutasa (PGM), malato deshidrogenasa NADP⁺ (ME), peptidasa (PEP), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH), alcohol deshidrogenasa (ADH) y xantina deshidrogenasa (XDH) en buffer TG pH 8.5)(Hebert, 1993).

Para este tipo de análisis fue necesario la utilización de marcadores para cada enzima. Se utilizaron cepas de la colección de *E. coli* asociada a mamíferos, así como, marcadores donde ya se les había asignado un número para cada cepa y para cada enzima (electrotipo,ET)(Hebert, 1993; *et al*, 1988)

A partir de los lisados almacenados en el ultra congelador de -80° C se tomaron 9 μ l de cada lisado el cual fue colocado en uno de los 12 pozos del contenedor, en cada contenedor se colocaron 10 lisados de diferentes cepas, los dos pozos restantes se ocuparon para verter las cepas marcadores.

A cada acetato, previamente contenido en buffer (TG pH 8.5) se le impregnaron los lisados por medio del aplicador. Los acetatos fueron puestos en la cámara de electroforesis, la cual contiene buffer TG pH 8.5. Cada acetato se colocó de tal manera que las proteínas con una corriente eléctrica de 200 volt. durante 15 minutos pudieran emigrar del ánodo al catodo.

Inmediatamente después de pasados los 15 minutos, se procedió a teñir las respectivas enzimas. El proceso de tinción tiene como función evidenciar las bandas de las enzimas. Cada enzima tiene una serie de reactivos, según su actividad catalítica. De manera general el proceso de tinción consistió en: colocar una solución buffer, un donador de electrones (NADP, NAD), el sustrato de la enzima, su cofactor (MgCl), la sustancia de tinción la cual detecta la reacción enzima-sustrato y 2ml de agar, los cuales se mezclan y se vierten en

el acetato, posteriormente este se guarda por 45 minutos aproximadamente en un lugar obscuro. Todos los reactivos para cada enzima se anexan en el apéndice.

En la lectura de los acetatos la asignación de números relativos para la numeración de las bandas es producto de su movilidad en relación a los marcadores puestos en el mismo acetato (Selander *et al.*, 1986). Para comprobar los números obtenidos en la primera corrida, se realizó un segundo corrimiento, colocando las cepas con bandas del mismo número en un mismo acetato.

5.6 ANALISIS DE LOS DATOS

A partir de los datos obtenidos en las lecturas de electroforesis se corrió el programa que calcula la diversidad genética

Con el programa ETDIV (Whittam, 1990) se calculó la diversidad genética a partir de las frecuencias alélicas de cada locus. Como en los procariontes no se puede medir la heterocigosis (por ser haploides), la diversidad genética se considera como la heterosis virtual. Para cada muestra de tipo electroforetico la diversidad genética en un locus es expresado como $h = 1 - \sum xi^2 / (n/n-1)$, donde xi es la frecuencia del alelo en el locus y n es el número de aislados o electrotipos. La diversidad por locus que se define como H , es el promedio aritmético de h sobre todo loci estudiado (Selander, 1986).

Así mismo, dentro de programa ETDIV, se encuentra el programa ETCLUS (Average linkage cluster análisis), en el cual se obtiene un árbol de distancias de acuerdo a las diferencias en los electrotipos. Los electrotipos con más diferencias entre ellos serán los más distantes, mientras que los más parecidos serán los más cercanos formando grupos a una distancia mínima. Para el análisis del árbol se tomó en cuenta, el individuo por especie, la especie, y las cuevas, donde finalmente se estaría analizando la relación entre filogenia y/o la distribución geográfica con la diversidad genética de *E. coli*

Después de haber calculado la diversidad genética para cada jerarquía, se realizó un análisis para calcular la contribución de cada nivel en la diversidad total de *E. coli* asociada a murciélagos. El análisis de Rst, calcula los índices de diferenciación genética (Souza *et al.*, 1994) Los índices de Rst se calcularon a partir de las cepas de *E. coli* de todas las especies de murciélagos muestreados como la diversidad total, mientras que las demás jerarquías (un individuo, varios individuos de *A. jamaicensis*, en una cueva, varias especies en una sola cueva, *A. jamaicensis* en diferentes cuevas y todas las especies de muestreados excepto *A. jamaicensis*.) es la diversidad parcial. La fórmula para el análisis de Rst es la siguiente:

$$Rst = (H_T - H_P) / H_T$$

Donde H_T es la diversidad total y H_P es la diversidad de cada jerarquía.

6.-RESULTADOS

6.1.- ELABORACION DE JERARQUIAS

Para el análisis de datos se consideraron 6 jerarquías, a partir de las cepas encontradas en las distintas localidades. Para todas las jerarquías se realizó el mismo análisis:

- 1) Las cepas de *E. coli* dentro de un individuo de *A. jamaicensis*.
- 2) Las cepas de varios individuos de *A. jamaicensis* en una sola cueva.
- 3) Las cepas de *E. coli* asociadas a varias especies de una sola cueva (cueva Yucatan).
- 4) Las cepas de varios individuos de *A. jamaicensis* en diferentes cuevas de la República Mexicana.
- 5) Las cepas de *E. coli* de todas las especies de muestreados.
- 6) Todas las cepas de *E. coli* colectadas exceptuando a las cepas asociadas a *A. jamaicensis*

En la tabla 3 se muestran las jerarquías de cepas de *E. coli*, por localidad, especie, individuo y número de cepas.

Tabla 3: Jerarquías de cepas de *Escherichia coli* en murciélagos

JERARQUIA	LOCALIDAD	ESPECIE	INDIVIDUOS	# de CEPAS
1-Un individuo	Cueva Murciélagos	<i>A. jamaicensis</i>	1	45
2-Varios individuos	Cueva Murciélagos	<i>A. jamaicensis</i>	5*	1:45,2:11,3:10, 4:10,5:10= 86
3-Varias especies	Cueva Murciélagos	<i>A. jamaicensis</i>	5*	86
		<i>P. macrotis</i>	2	1:12,2:7=19
		<i>N. stramineus</i>	1	1:8 113
4-Todos los individuos	Murciélagos	<i>A. jamaicensis</i>	5*	86
	ActunHuach		3	1:22,2:5,3:5=32
	Salitre		1	1:13
	Omitelmi		1	1:7 138

Tabla 3: Continuación

5-Todas las especies	Murciélagos	<i>A. jamaicensis</i>	12	113	
	ActunHuach	<i>D. rotundus</i>	1	32	
	Salitre	<i>L. nivalis</i>	1	13	
	Loltum	<i>S. lilium</i>	2	4	
	Omitelmi	<i>G. soricina</i>	1	17	
	Del diablo	<i>T. brasiliensis</i>	2	34	
	Mapimi	<i>P. macrotis</i>	2	11	
	Sayul	<i>M. musculus</i>	1	1	
	Murciélagos	<i>N. stramineus</i>	2	22	
		<i>C. mexicana</i>	1		247
<i>A. pallidus</i>		1			
6-Todas las especies menos <i>Artibeus jamaicensis</i>	Murciélagos	<i>D. rotundus</i>	1	17	
	Loltum	<i>L. nivalis</i>	1	4	
	Omitelmi	<i>S. lilium</i>	2	10	
	Del diablo	<i>G. soricina</i>	1	34	
	Mapimi	<i>T. brasiliensis</i>	2	11	
	Sayul	<i>P. macrotis</i>	2	1	
		<i>M. musculus</i>	1		87
		<i>N. stramineus</i>	2		
		<i>C. mexicana</i>	1		
		<i>A. pallidus</i>	1		

6.2.-ANALISIS DE LOS DATOS POR JERARQUIA

En la tabla 4 se muestra que la diversidad genética de *E. coli* dentro de un individuo es alta (0.44) existiendo un promedio de 2.4 alelos por loci. De las 10 enzimas analizadas 9 fueron polimórficas y solo una (G6PDH) resulto ser monomórfica. De igual manera como se muestra en la tabla 5 se observa una alta proporción de electrotipos en relación al número de cepas analizadas (0.71).

Tabla 4: Diversidad genética por locus de *E. coli* en un individuo de *Artibeus jamaicensis*. de la cueva Murciélagos en el estado de Yucatán (mayo de 1995).

LOCUS	ALELOS	h
G6PDH	1	0.000
ARK	3	0.718
MDH	3	0.331
MPI	2	0.567
PGM	2	0.315
ME	3	0.502
PEP	3	0.546
IDH	2	0.325
ADH	2	0.554
XDH	3	0.587
PROMEDIO	2.4	0.440

Tabla 5: Índices de diversidad genética total de *E. coli* en un individuo de *A. jamaicensis*.

n cepas	ETs	ETs/n cepas
45	32	0.71

En la tabla 6 se observa que la diversidad genética de *E. coli* en varios individuos de *A. jamaicensis* es alta (0.44), existiendo en promedio 2.9 alelos por loci. De las 10 enzimas analizadas 9 fueron polimórficas y sólo una (G6PDH) fue monomórfica. Los valores de diversidad genética encontrados en esta jerarquía y en donde se analizó un solo individuo resulto ser idéntica. En la tabla 7 se muestra una proporción de ETs alta (0.534). Los índices de Rst muestran que la contribución de esta jerarquía en el total de la cepas de *E. coli* es significativa.

Tabla 6: Diversidad genética por locus de *E. coli* en varios individuos de *A. jamaicensis*. en la cueva Murciélagos en Yucatan (mayo 1995).

LOCUS	ALELOS	h
G6PDH	1	0.000
ARK	3	0.693
MDH	2	0.240
MPI	2	0.549
PGM	2	0.232
ME	3	0.389
PEP	3	0.513
IDH	3	0.506
ADH	5	0.617
XDH	4	0.660
PROMEDIO	2.9	0.440

Tabla 7: Índices de diversidad genética de *E. coli* en varios individuos de *A. jamaicensis*. en la cueva murciélagos

n cepas	ETs	ETs/n cepas	Rst
86	46	0.534	0.120

En la tabla 8 se observa que la diversidad genética de *E. coli* en varias especies de dentro de una cueva es la más alta en comparación a las otras jerarquías (0.538), existiendo en promedio 3.9 alelos por loci. Todas las enzimas analizadas fueron polimórficas. En la tabla 9 se muestra que la proporción de ETS se mantiene en comparación a la jerarquía anterior (0.566). El índice de Rst muestra un valor negativo (-0.076), lo cual indica que la diversidad en esta cueva es mayor que cuando se analiza el total de cepas de *E. coli* asociada a murciélagos.

Tabla 8: Diversidad genética por locus de *E. coli* en varias especies de quirópteros dentro de la cueva Murciélagos en Yucatán (mayo 1995).

LOCUS	ALELOS	h
G6PDH	4	0.255
ARK	4	0.724
MDH	3	0.408
MPI	4	0.645
PGM	3	0.372
ME	3	0.422
PEP	4	0.547
IDH	4	0.609
ADH	5	0.661
XDH	5	0.732
PROMEDIO	3.9	0.538

Tabla 9: Índices de diversidad genética total de *E. coli* en varias especies de quirópteros dentro de la cueva murciélagos.

n cepas	ETs	ETs/n cepas	Rst
113	64	0.566	-0.076

En la tabla 10 se observa que la diversidad genética de *E. coli* en individuos de *A. jamaicensis* en cuatro cuevas de la República Mexicana es alta (0.434) existiendo en promedio 3.2 alelos por loci. Todas las enzimas analizadas fueron polimórficas, la enzima G6PDH tuvo un solo alelo. Esta jerarquía se comporta de manera similar al analizar a un individuo y a varios individuos en una sola cueva de la misma especie. En la tabla 11 se muestra una proporción de ETs menor en relación a las otras jerarquías (0.442), así mismo el índice de Rst de esta jerarquía es el que menos contribuye a la diversidad total.

Tabla 10: Diversidad genética por locus de *E. coli* en individuos de *A. jamaicensis* en cuatro cuevas de la República Mexicana: cueva Murciélagos en Yucatán (mayo 1995), cueva Actun Huach en Yucatán (enero 1996), cueva Salitre en Morelos (octubre 1995), y localidad de Omitelmi en Guerrero (agosto 1994)

LOCUS	ALELOS	h
G6PDH	1	0.000
ARK	4	0.706
MDH	3	0.212
MPI	3	0.529
PGM	2	0.207
ME	3	0.357
PEP	4	0.529
IDH	3	0.544
ADH	5	0.579
XDH	4	0.674
PROMEDIO	3.2	0.434

Tabla 11: Índices de diversidad genética de *E. coli* en individuos de *A. jamaicensis* en cuatro cuevas de la República Mexicana

n cepas	ETs	ETs/n cepas	Rst
138	61	0.442	0.132

En la tabla 12 se observa que la diversidad genética de *E. coli* en el total de colectados es alta (0.500), existiendo en promedio 4.1 alelos por loci (el promedio más alto para todas las jerarquías). Todas las enzimas que se analizaron resultaron ser polimórficas. En la tabla 13 se muestra una proporción de ETs de 0.477, la cual resulta ser alta para el tamaño de muestra de esta jerarquía.

Tabla 12: Diversidad genética por locus de *E. coli* en el total de cepas del orden Chiroptera.

LOCUS	ALELOS	h
G6PDH	4	0.173
ARK	4	0.693
MDH	3	0.417
MPI	4	0.622
PGM	3	0.283
ME	4	0.384
PEP	4	0.482
IDH	5	0.633
ADH	5	0.625
XDH	5	0.687
PROMEDIO	4.1	0.500

Tabla 13: Índices de diversidad genética de *E. coli* en el total de cepas del orden Chiroptera.

n cepas	ETs	ETs/n cepas
249	119	0.477

En la tabla 14 se muestra que la diversidad genética de *E. coli* de colectados excepto *A. jamaicensis* es alta (0.534), existiendo en promedio 3.8 alelos por loci. Todas las enzimas analizadas fueron polimórficas. En la tabla 15 se observa una proporción alta de electrotipos (0.563), en relación al tamaño de muestra. Los índices de Rst por segunda ocasión fue negativo, lo cual indica que la diversidad genética de esta jerarquía es más alta que la población total de cepas de *E. coli* en murciélagos.

Tabla 14: Diversidad genética por locus de *E. coli* en todas las cepas del orden Chiroptera excepto *A. jamaicensis*.

LOCUS	ALELOS	h
G6PDH	4	0.378
ARK	3	0.662
MDH	3	0.503
MPI	4	0.536
PGM	3	0.395
ME	4	0.326
PEP	3	0.456
IDH	5	0.760
ADH	6	0.646
XDH	4	0.667
PROMEDIO	3.8	0.534

Tabla 15: Índices de diversidad genética de *E. coli* en todas las cepas del orden Chiroptera excepto *A. Jamaicensis*.

n cepas	ETs	ETs/n cepas	Rst
87	49	0.563	-0.068

6.3.-RELACIONES DE PARENTESCO

Utilizando el programa ETCLUS se obtuvo el árbol de distancias UPGMA, a partir de la población total de *E. coli* en murciélagos. El análisis del árbol se realizó tomando en cuenta las especies de murciélagos y la ubicación geográfica por cuevas en el árbol UPGMA (figura 2).

Se distinguen cinco grupos principales: el grupo A consta de dos electrotipos y dos aislados de la cueva murciélagos de la especie *P. macrotis*; el grupo B consta de seis electrotipos y seis aislados de los cuales cinco pertenecen a la cueva murciélagos, especie *Natalus stramineus*, y uno pertenece a la cueva del Diablo en Morelos, especie *Glossophaga soricina*; en el grupo C están agrupados cuatro electrotipos y cuatro aislados, de los cuales tres pertenecen a la cueva murciélagos, especie *Natalus stramineus*, y un electrotipo pertenece a la localidad de Omitelmi en Guerrero, especie *Sturnira liliium*; el grupo D consta de 16 electrotipos con 26 aislados, en el subgrupo D₁ se agrupan cepas de la localidad de Omitelmi, especie *S. liliium*, en el subgrupo D₂ se observan cepas de la cueva del Diablo, especie *Choeronycteris mexicana* y una cepa de la cueva Actun Huach en Yucatán, especie *A. jamaicensis*, en el subgrupo D₃ se muestran cepas de la cueva Loltum en Yucatan en la especie *Mus musculus* (ratón), además se agrupan cepas de la cueva murciélagos, especie *P. macrotis* y una cepa de la cueva Sayul en Chiapas de la especie *S. liliium*; en el grupo E hay en su mayoría cepas de la cueva murciélagos de la especie *A. jamaicensis* con 6 electrotipos y 7 aislados y una más de la especie *P. macrotis*, otro electrotipo corresponde a la cueva del Diablo especie *G. soricina*; finalmente el grupo F que es el más grande consta de 83 electrotipos y 201 aislados dividido en 6 subgrupos, en los subgrupos F₁ F₂ y F₆ se observan principalmente cepas de la cueva murciélagos y de la cueva Actun huach especie *A. jamaicensis*, mientras que en los tres subgrupos restantes se observan cepas de 6 diferentes cuevas y 7 distintas especies.

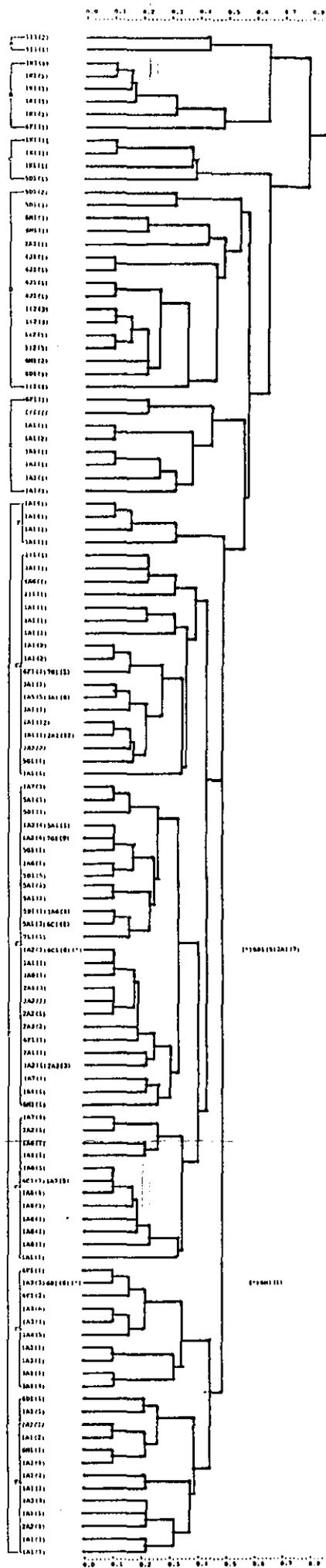


Figura 2: Fenograma obtenido a partir del programa etclus que muestra las distancias genéticas en el número total de cepas de *Orden Chiroptera*. Las distancias genéticas se muestran en la parte superior e inferior y van de 0.0 a 0.9. Se formaron 7 grandes grupos tomando en cuenta las divergencias existentes entre 0.5 y 0.7. Se utilizaron claves para poder diferenciar las especies. Las localidades y los individuos. El primer número que aparece señala las distintas localidades, las cuales son: cueva Murcielagos en Yucatán (1), cueva Actun Huch en Yucatán (2), cueva Salitre en Morelos (3), cueva Toxue en Yucatán (4), localidad de Dzitzeim en Durango (5), cueva Del Diablo en Morelos (6), localidad de Napiel en Durango (7), y Localidad de Seyul en Chiapas (8). Las letras que se observan corresponden a las especies de murcielagos encontrados en las distintas localidades, las cuales son: *Artibeus jamaicensis* (A), *Desmodus rotundus* (B), *Leptonycteris nivalis* (C), *Sturnira lilium* (D), *Glossophaga soricina* (E), *Tadarida brasiliensis* (G), *Peropteryx macrotis* (I), *Mus musculus* (raton) (J), *Myotis stramineus* (K), *Antrozous pallidus* (L), y *Choeronycteris mexicana* (H). Los numeros siguientes corresponden a los individuos de la misma especie encontrados en una misma localidad. El numero entre parentesis corresponde al numero de cepas que presenta el mismo electrotipo.

7.-DISCUSION

7.1.- DIVERSIDAD GENETICA

En un estudio previo sobre diversidad genética de *E. coli* asociada a mamíferos silvestres (13 órdenes) realizado en este laboratorio se obtuvo una diversidad genética total (H) de 0.73, la cual es la más alta reportada para cualquier especie (Rocha, 1996). Realizar un estudio más minucioso de un solo orden de mamíferos dará un mayor conocimiento de la dinámica poblacional de esta bacteria dentro de sus hospederos.

Los resultados aquí obtenidos demuestran una vez más, que la diversidad genética en poblaciones naturales de *E. coli* utilizando la técnica de electroforesis de isoenzimas es muy alta. La diversidad en esta bacteria es dos o tres veces mayor que en especies eucariontes (Whittam, 1983). La relación entre H y la proporción de loci que son polimórficos (P) es semejante a lo pronosticado por la teoría neutral de evolución molecular (Whittam *et al.*, 1983).

La diversidad genética obtenida para un solo individuo de *A. jamaicensis* resulta ser mas alta que la reportada cuando se estudia a un solo individuo en humanos. En 1981 Caugant *et al.* realizando un estudio en un individuo durante 11 meses obtuvo que la diversidad era de 0.39, que de 550 clonas se identificaron 53 electrotipos diferentes y que de 15 enzimas estudiadas 2 fueron monomorficas. Para el caso de *A. jamaicensis* se encontró una diversidad (H) de 0.440, así mismo de 45 cepas obtenidas se identificaron 32 electrotipos y de 10 enzimas estudiadas una fue monomorfica.

Cuando se estudian varios individuos de una misma especie en una sola cueva la diversidad genética se mantiene idéntica. En el caso de hospederos de *E. coli* en humanos, Selander y Levin (1980) encontraron que para clones de infantes obtenidos en una sola región la H fue de 0.442, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo, donde la H es igual a 0.440.

Así mismo, cuando se estudian varios individuos de *A. jamaicensis* de diferentes cuevas de la República Mexicana la H no varía substancialmente en relación a las anteriores, incluso disminuye a 0.434. En diversos estudios donde se tomo a distintos hospederos de humanos de distintas regiones (Whittam *et al.*; Selander y Levin, 1980) la diversidad se acerca a los valores aquí encontrados

Parece ser que un solo individuo de *A. jamaicensis* es suficiente para conocer la diversidad genética de esta especie, ya que al trabajar con un individuo y con varios individuos de diferentes regiones el valor de H se mantiene estable. De igual forma, la relación entre el número de electrotipos y el número de cepas analizadas decrece cuando se incluyen más cepas, es decir, cuando se estudio a un solo individuo esta relación fue de 0.71, al estudiar varios individuos de una misma cueva y de varias ésta relación fue de 0.53 y 0.44 respectivamente. Tal vez ésta especie solo es capaz de hospedar a un número constante de clonas, intercambiando regularmente estas cepas debido a distintos factores. *A. jamaicensis* cambia sus hábitos alimenticios, en relación a las estaciones del año. Estudios sobre cambios temporales en haplotipos en humanos suponen que los cambios en las frecuencias alelicas a través de estaciones tiene mas relación con la dieta que con algún otro factor (Pupo y Richardson 1995).

En las jerarquías donde se analizaron conjuntamente varias especies de murciélagos, la diversidad aumenta (0.500-0.538). Relacionando este análisis con los realizados por Whittam (1982) Selander y Levin (1981) , donde analizaron no solo *E. coli* de humanos sino también de animales de zoológico y de Norteamérica, la diversidad se encuentra muy cercana a los valores aquí encontrados. Es interesante mencionar que la diversidad mas alta se encontró cuando se analizó a varias especies en una sola cueva, mientras que una de las diversidades más bajas se encontró en esa misma cueva pero cuando se analizó tanto a varios individuos de una sola especie como a un solo individuo. Como en una cueva normalmente habitan distintas especies de murciélagos se podría decir a partir de esto que:

Una sola cueva aporta la diversidad total del orden y que aunque las especies estén en contacto hay ciertas cepas que seleccionan ciertos hábitos dados por los hospederos.

7.2.-DIFERENCIACION GENETICA

Los índices de diferenciación genética señalan que hay una menor diferenciación al analizar individuos de una sola especie (*A. jamaicensis*). Los índices de Rst no varían drásticamente cuando se analizan individuos de la especie *A. jamaicensis* a nivel de un individuo, de una sola cueva o entre cuevas, lo que indica que la localidad (distribución geográfica) no es relevante en la distribución y diversidad de *E. coli* en esta especie. Por otro lado, los análisis de Gst cuando se involucran varias especies dentro de una cueva son mucho menores, obteniendo incluso valores negativos (-0.076), también el índice de Rst al analizar a todas las cepas de las especies colectadas de murciélagos excepto *A. jamaicensis* se obtiene un valor negativo (-0.068), estos dos resultados indican que la diversidad genética aportada por estas jerarquías es mayor que la diversidad total. Lo anterior se explica porque la cantidad de cepas de *E. coli* asociadas a *A. jamaicensis* que se colectaron es mucho mayor que cualquier otra especie de murciélago muestreado (160 cepas de *A. jamaicensis* por 87 cepas de las 10 especies restantes) y posiblemente porque las cepas de *E. coli* asociadas a *A. jamaicensis* tienen una estructura básicamente clonal.

7.3.-RELACIONES DE PARENTESCO

A partir del árbol de distancias se puede inferir que tipo de factores es el que tiene relevancia en la distribución de las poblaciones de *E. coli*. Se observan algunos electrotipos muy comunes, los cuales fueron obtenidos de distintas especies de hospedero y en distintas cuevas, mientras que hay otras cepas con un patrón electroforético muy raro y que solo se presenta en una sola especie y en regiones específicas. Selander y Caugant señalan que algunas líneas clonales se distribuyen por casi todo el mundo y otras se restringen a una sola región (Selander et al., 1980; Caugant et al., 1984).

En cuanto a los hábitos alimenticios de los hospederos se observa que hay una significancia en relación a la distribución de las cepas. En el grupo A B y C solo se encuentran cepas de hospederos con hábitos alimenticios insectívoros (*Peropteryx macotis* y *Natalus stramineus*), excepto por una cepa de hospederos con hábitos alimenticios nectarívoros (*Glossophaga soricina*) y una más de un individuo frugívoro (*Sturnira lilium*). En el grupo D aun se observan cepas de *P. macotis* y de *Mus musculus* (ratón), aunque ya se encuentra una mayor abundancia de cepas de hospederos frugívoros y nectarívoros. En el grupo E ocho de nueve cepas corresponden a *A. jamaicensis*, especie frugívora. Finalmente en el grupo F se encuentran cepas de hospederos colectados de todos los hábitos alimenticios. Se observan agrupaciones muy marcadas, como es el caso del subgrupo F₁ y F₂ donde en su mayoría se observan cepas del individuo analizado en la jerarquía 1 (*A. jamaicensis*), por otro lado, en el caso de *Desmodus rotundus* que es un murciélago hematófago sus cepas comparten el mismo electrotipo con murciélagos frugívoros (*A. jamaicensis*) y nectarívoros (*Leptonycteris nivalis*). Posiblemente este tipo electroforetico sea muy común en especies de murciélagos, adaptándose a los cambios de dieta y a los cambios de hospedero.

En el caso de *A. jamaicensis*, que puede cambiar su dieta alimenticia dependiendo de la temporada del año, alimentándose no solo de frutos si no también de insectos, pólen, néctar y hojas (Fleming *et al.*, 1972; Kunz y Diaz, 1995), también podría cambiar la composición de su flora intestinal aportando nuevas cepas de *E. coli* y eliminando otras. Estudios sobre *E. coli* en humanos demuestran que los cambios observados en estas poblaciones pueden deberse a cambios en la dieta de los hospederos por un cambio en los nichos de la flora intestinal (Reeves, 1992). Como los muestreos en las cuevas no se realizaron en la misma temporada de año, los patrones electroforéticos varían y esto puede deberse en gran parte a los cambios de dieta en los individuos.

En un estudio anterior realizado en este laboratorio con poblaciones naturales de *E. coli* en trece ordenes de mamíferos, demuestra que la dieta y la filogenia tienen más relación con la distribución de las cepas que la localidad en donde se recolectó esa cepa (Rocha, 1996) Teniendo en cuenta que la migración es relevante, no habría especificidad por alguna región en poblaciones de *E. coli* en cambio la dieta, no tanto el orden, podría ser un factor relevante ya que se cambiarían algunos factores del tracto digestivo, originando un recambio de la flora intestinal. Algunas pocas cepas estarían adaptadas a un cambio en la dieta del hospedero, otras tendrían especificidad por algún tipo de dieta por lo que al haber un cambio en ella, su población disminuiría y habría un recambio, algunas más solo serían transitorias debido a la alta migración de las poblaciones. El intercambio de cepas se podría dilucidar como un ciclo a lo largo de un año, ya que la alimentación varía por estaciones.

8.- CONCLUSIONES

Del presente trabajo se obtienen las siguientes conclusiones, repartidas básicamente en dos puntos importantes, los cuales son: diversidad genética, y factores que afectan la distribución y diversidad de las poblaciones de *E. coli* asociada a murciélagos.

1) La diversidad genética expresada por H, es menor en las jerarquías donde se analiza una sola especie, mientras que cuando se analizan varias especies de una localidad y de varias localidades la H aumenta, aunque no considerablemente. De igual manera al analizar el número total de cepas de *E. coli* asociada a murciélagos la H encontrada es de 0.500, este valor junto con los otros aquí encontrados, corresponden a los observados en análisis de *E. coli* asociada a humanos.

2) Parece ser que en el caso de las cepas de *E. coli* asociada a murciélagos, la dieta es el factor determinante en la distribución y diversidad de estas. En murciélagos con hábitos alimenticios distintos se encuentran electrotipos específicos. Estudios en cepas de humanos demuestran que la dieta es un factor relevante, en tanto, la distribución geográfica no es determinante ya que las poblaciones de *E. coli* tienen altos índices de migración.

Además de lo anterior, se puede concluir que las poblaciones de *E. coli* asociadas a murciélagos presentan una dinámica similar a las poblaciones de esta especie asociada a humanos, en lo referente a diversidad genética, estructura clonal y factores que determinan la distribución y diversidad. Análisis posteriores realizando un seguimiento de los hospederos a través del tiempo nos dará más información sobre niveles de migración e intercambio de cepas.

Otro análisis de suma importancia sería el de analizar el medio secundario de las poblaciones de *E. coli* asociadas a murciélagos, ya que se tienen indicios que la recombinación se da más frecuentemente fuera del hospedero.

9.- REFERENCIAS

- Achtman, M., M. Heuzenroeder, B. Kusecek, H. Ochman, D. Caugant, R. Selander, V. Valsanen-Rhen, T. K. Korhonen, S. Stuart, F. Orskov, y Orskov. 1986. Clonal analysis of O2:K1 *Escherichia coli* isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* 51:268-276
- Atlas, R.M. 1990. Microbiología. Fundamentos y aplicaciones. CECSA, México. 870pp.
- Atwood, K.C., L.K.Schneider y F.J.Ryan. 1951. Periodic selection in *Escherichia coli*. *Genetics* 37:146-155.
- August, P. V. 1981. Fig fruit consumption by *Artibeus jamaicensis* in the llanos of Venezuela. *Biotropica*, 13:70-76.
- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman Hall, New York.
- Berlin, K.B., Brooks, L.K. y Ruop, E.K. 1996. Linkage Map of *Escherichia coli*: k-12. En: F.C.Neidhardt, J.L.Ingraham, K.B.Low, B.Magasanik, M.Schaechter, y H.E.Umbarger (eds.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA.
- Bisercic, M., J.Y.Feutrier y P.R.Reeves. 1991. Nucleotide sequences of the *gnd* genes from nine natural isolates of *Escherichia coli*: evidence of intragenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic *gnd* locus. *J.Bacteriol.* 173(12):3894-3900.
- Boyd, E.F., K.Nelson, F.Wang, T.S.Whittam y R.K.Selander. 1994. Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate

- dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 91:1280-1284.
- Brock, T.D. y M.T.Madigan. 1991. Biology of microorganisms. Prentice Hall, EUA. 874pp.
- Brown, A.H.D. y M.W.Feldman. 1981. Population structure of multilocus associations. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 78(9):5913-5916.
- Campbell, R. 1983. Microbial ecology. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Caugant, D.A., B.R.Levin y R.K.Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. Genetics 98:467-490.
- Caugant, D.A., B.R.Levin, G.Lidin-Janson, T.S.Whittam, C.Svanborg Eden y R.K.Selander 1983. Genetic diversity and relationships among strains of *Escherichia coli* in the intestine and those causing urinary tract infections. Prog.Allergy. 33:203-227.
- Caugant, D.A., L.F.Mocca, C.E.Frasch, L.O.Frøholm, W.D.Zollinger y R.K.Selander. 1987. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. J.Bacteriol. 169(6): 2781-2792.
- Dalquest, W. W., H. J. Werner, y J. H. Robert. 1952. The facial glands of fruit-eating bat, *Artibeus jamaicensis* Leach. Journal of Mammalogy, 33:102-103.
- Dalquest, W. W. 1953. Mexican bats of the genus *Artibeus*. Proc. Biol. Soc. Washington, 66:61-66.
- DIFCO manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for Microbiology. DIFCO Laboratories, Detroit, EUA. 1155 pp.

- Donnenberg, M.S. y J.B.Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect.Immun. 60(10):3953-3961.
- Drasar, B.S., y M.J.Hill. 1974. Human intestinal flora. Academic Press, New York.
- DuBose, R.F., D.E.Dykhuisen y D.L.Hartl. 1988. Genetic exchange among natural isolates of bacteria:Recombination within the *phoA* gene of *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 85:7036-7040.
- Dykhuisen, D.E y L.Green.1991.Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. J.Bacteriol. 173:7257-7268.
- Ewing, W.H.·1986. Identification of Enterobacteriaceae. 4a. edición. Elsevier, EUA. 536pp.
- Fleming, T. H., E. R. Heithaus y W. B. Sawyer. 1977. An experimental analysis of the food location behavior of frugivorous bats. Ecology, 58:619-627.
- Futuyma, D.J. 1986. Evolutionary biology. Sinauer, EUA. 600pp.
- Handley, C. O., Jr. 1976. Mammals of the Smithsonian Venezuelan project. Brigham Young Univ. Sci. Bull., Biol. Ser. 20:1-90.
- Handley, C. O., Jr. 1987 New species of mammals from Northern South America: Fruit-eating bats, Genus *Artibeus* Leach. Pp 163-172. In Studies in Neotropical Mammalogy. Chicago Field Museum of Natural History, 506 pp.
- Hartl, D.L., y D.E.Dykhuisen. 1984. The population structure of *Escherichia coli*. Annu.Rev.Genet. 18:31-68.
- Hartl, D.L., y A.G.Clark. 1989. Principles of population genetics. Sinauer, Suderland, Mass, EUA.

- Hebert, P.D.N. y M.J.Beaton.1993. Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratories. EUA. 31pp.
- Hedrick, P.W. 1983. Genetics of populations. Science books International, Boston, EUA.
- Hedrick, P. W. y G. Thomson. 1986. A two-locus neutrality test: applications to humans, *E. coli* and lodgepole pine. *Genetics* 112:135-156.
- Hill, E. J., y D. J. Smith. 1992. Bats A natural history. University of Texas press Austin USA. 243 pp.
- Hodgson, D.A. 1989 . Bacterial diversity: the range of interesting things that bacteria do. En: Hopwood.D.A. y K.E.Chater. *Genetics of Bacterial Diversity*. Academic Press, Oxford. p.3-22.
- Hopwood,D.A. y K.E.Chater. 1989. *Genetics of Bacterial Diversity*. Academic Press, Oxford. 449pp.
- Istock,C.A., K.E.Duncan, N.Ferguson y X.Zhou. 1992. Sexuality in a natural population of bacteria -*Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol.Ecol.* 1:95-103.
- Jacquard, A. 1974. The genetic structure of populations. Springer-verlag. New York.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Nueva York. 367pp.
- Kunz, T. H., P. V. August y C. D. Burnett. 1983. Harem social organization in cave roosting *Artibeus jamaicensis*. *Biotropica*, 15:133-138.
- Kunz, T. H. y C. A. diaz. 1995. Folivory in fruit-eating bats, with new evidence from *Artibeus jamaicensis* . *Biotropicxa*, 27: 106-120.

- Lehninger, L. A. 1986. Principios de Bioquímica. Omega, Barcelona. 1113 pp.
- Lenski, R. 1993. Assessing the genetic structure of microbial populations. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 90:4334-4336.
- Kornberg, A. 1980 DNA Replication, Freeman, San Francisco.
- Levin, B.R. 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *E. coli* populations. Genetics 99:1-23.
- Levine, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J.Infect.Dis. 155:377-389.
- Lewin, B. 1990. Genes IV. Oxford cell press, Oxford.
- Lewontin, R.C. 1991. Twenty-five years ago in Genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: Milestone or Millstone?. Genetics 128:657-662.
- Ludwig, W. y K.H.Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16s and 23s rRNA sequence analysis. Microbiol.Rev.15:155-173.
- Margulis, L y K.V.Schwartz. 1985. Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra. Labor, Barcelona. 335pp.
- Maynard-Smith,J. 1989. Evolutionary genetics. Oxford University Press, EUA. 325pp.
- Maynard-Smith,J. 1991. The population genetics of bacteria. Proc.R.Soc.London. 245:37-41.
- Maynard-Smith,J., N.H.Smith, M.O` Rourke y B.G.Spratt. 1993. How clonal are bacteria? Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 90:4384-4388.

- Milkman, R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* 182:1024-1026.
- Milkman, R. y I.P.Crawford. 1983. Clustered third-base substitutions among wild strains of *Escherichia coli*. *Science* 221:378-380.
- Milkman, R. y M.McKane. 1990. Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III:Clonal Frames. *Genetics* 126:505-517.
- Musser, J.M., V.J.Rapp y R.K.Selander. 1987a. Clonal diversity in *Haemophilus pleuroneumoniae*. *Infect.Immun.* 55(5):1207-1215.
- Musser, J.M., D.A.Bemis, H.Ishikawa y R.K.Selander. 1987b. Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. *J.Bacteriol.* 163:1021-1031.
- Musser, J.M., J.S.Kroll, E.R.Moxon y R.K.Selander. 1988. Evolutionary genetics of the encapsulated strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 85:7758-7762.
- Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations: Patterns and Theory. *Theor.Pop.Biol.* 13:121-171.
- Ochman, H., T.S.Whittam, D.A.Caugant, y R.K.Selander. 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J.Gen.Microbiol.* 129:2715-2726.
- Ochman, H., y R.K.Selander. 1984a. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J.Bacteriol.* 157:690-693.

- Ochman, H., y R.K.Selander. 1984b. Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81:198-201.
- Olsen, G.J., C.Woese, y R.Overbeek. 1994. The winds of (evolutionary change): breathing new life into Microbiology. J.Bacteriol. 176(1):1-6.
- Ørskov, F. y I. Ørskov. 1983. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other bacteria. J.Infect.Dis. 148:346-357.
- Postgate, J. 1992. Microbes and man. Cambridge University Press, Cambridge. 297pp.
- Pupo, G.M y B.J.Richardson. 1995. Biochemical genetics of a natural population of *Escherichia coli*: seasonal changes in alleles and haplotypes. Microbiology. 141:1037-1044.
- Rocha, M.M. 1996. Estructura genetica de poblaciones naturales de *E. coli* en mamíferos silvestres. UNAM. Mexico 75 pp.
- Savageau, M.A. 1974. Genetic regulatory mechanisms and the ecological niche of *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71:2453-2455.
- Savageau, M.A. 1983. *Escherichia coli* habitats. cell types. and molecular mechanisms of gene control. Am.Nat.122(6):732-744.
- Schaechter, M. 1992. *Escherichia coli*, general biology. Encyclopedia of Microbiology, Volumen 2. Academic Press, EUA. p.115-124.
- Schopf, W.J. 1978. La evolución de las células primitivas. Investigación y Ciencia 26:58-75.

- Seaward, M.R.D. 1977. Lichen ecology. Academic Press Londres.
- Selander, R.K. 1980. Variación genética en las poblaciones naturales. en: Ayala. F.J.(ed.). Evolución Molecular. Omega, Barcelona.
- Selander, R.K. y B.R.Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. Science 210:545-547.
- Selander, R.K. 1985. Protein polymorphisms and the genetic structure of natural populations of bacteria. En: Population genetics and molecular evolution. Ohta, T. y K.Aoki. (eds). Japan Sci. Soc. Press, Japón. p.85-106.
- Selander, R.K., R.M.McKinney, T.S.Whittam, W.F.Bibb, D.J.Brenner, F.S.Nolte y P.E.Pattison. 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. J.Bacteriol. 163(3):1021-1037.
- Selander, R.K., D.A.Caugant, H.Ochman, J.M.Muser y T.S.Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl.Environ.Microbiol. 51:873-884.
- Selander, R.K., D.A.Caugant, y T.S.Whittam. 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. En: F.C.Neidhardt. J.L.Ingraham. K.B.Low. B.Magasanik. M.Schaechter. y H.E.Umbarger (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA. p.1625-1648.
- Silva-T. 1979 Los murcielagos en Cuba. Académia de ciencias de Cuba, La Habana, Cuba, 423 pp.
- Singer, M. y P.Berg. 1991. Genes and Genomes. University Science Books, EUA. 929pp

- Sonea, S. y M.Panisset. 1983. A new bacteriology. Janes and Bartlett Pub. Inc. USA. 140pp.
- Souza, V., T.T.Nguyen, R.R.Hudson, D.Piñero y R.Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex?. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:8389-8393.
- Stainer, R.Y., J.L.Ingraham, M.L.Wheelis, y P.R.Painter. 1986. The microbial world. Prentice Hall, Nueva York.
- Stansfield, D.W. 1992. Genetica. Schaum- McGraw-Hill. Mexico. 575pp.
- To, L.P., L.Margulis, D.Chase y W.L.Nutting. 1980. The symbiotic microbial community of the sonoran desert termite: *Pterotermes occidentis*. Biosystems.
- Watson, J.D. 1976. Molecular Biology of the gene. Benjaming Cummings, EUA.
- Whittam, T.S., H.Ochman, y R.K.Selander.1983a. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80:1751-1755.
- Whittam, T.S., H.Ochman, y R.K.Selander. 1983b. Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. Mol.Biol.Evol.1:67-83.
- Whittam, T.S. 1989. Clonal dynamics of *Escherichia coli* in its natural habitat. Ant.v.Leeuw. 55:23-32.
- Whittam, T.S., M.L.Wolfe, y R.A.Wilson.1989.Genetic relationships among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections in humans and animals. Epidem.Inf. 102:37-46.

- Whittam, T.S., y S.E.Ake. 1993. Genetic polimorphisms and Recombination in natural populations of *Escherichia coli*. En:Mechanisms of molecular evolution. Sinauer, EUA. p.223-246.
- Whittam, T.S., M.L.Wolfe, K.Wachsmuth, F.Ørskov, I.Ørskov y R.A.Wilson.1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect.Immun. 61(5):1619-1629.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. Microbiol.Rev. 51:221-271.
- Young, J.P.W. 1989. The population genetics of bacteria. En: Hopwood.D.A. & K.E.Chater. Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, Oxford. p.417-438.

10.-ANEXO 1: Electrotipos obtenidos del total de cepas de murciélagos.

	G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH
24/6B1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
25/6B1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
26./6B1	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
27/6B1	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
28/6B1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
29./6C1	3	3	4	3	3	3	3	4	3	4
30./6C1	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
31/6C1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
32/6C1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
33/6C1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
34/6C1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
35/6C1.	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
36/6C1.	3	1	3	3	3	3	3	4	3	4
37/8D1.	3	1	3	3	3	3	3	4	2	3
98/5A1.	3	1	3	3	3	3	3	5	4	4
99/5A1.	3	1	3	3	3	3	3	4	3	4
100/5A1.	3	1	3	3	3	3	3	5	3	4
101/5A1.	3	1	3	3	3	3	3	4	3	4
102/5A1.	3	1	3	3	3	3	3	4	3	4
103/5A1.	3	2	3	3	3	3	3	5	3	4
104/5A1.	3	3	3	3	3	3	3	5	3	4
248/5D2.	4	3	3	3	3	4	3	5	3	4
249/5D2.	3	2	2	2	3	1	3	6	3	3
251/5D2.	3	2	3	2	3	3	3	4	3	4
253/5D2.	3	2	3	2	3	3	3	4	3	4
254/5D2.	3	2	3	2	3	2	3	6	3	4
255/5D2.	3	2	3	2	3	2	3	6	3	4
256/5D2.	3	3	3	2	3	3	3	5	3	4
257/5D2.	3	1	3	2	3	3	3	4	3	4
266/5G1.	3	2	3	3	3	3	2	6	3	4
267/5G1.	3	2	3	3	3	3	3	6	3	4
275/7L1.	3	1	3	2	3	3	3	3	3	4

ANEXO 1:Continuación

	G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH
276/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
277/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
278/7G1	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
279/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
280/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
281/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
282/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
283/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
284/7G1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
285/7G1	3	2	3	3	3	3	3	4	3	0
1670/6F1.	3	2	3	3	3	3	3	4	3	0
1671/6F1.	3	3	3	2	2	3	2	4	1	3
1672/6F1.	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
1673/6F1.	3	2	3	3	4	3	3	4	3	2
1674/6F1.	3	3	3	4	3	3	3	5	4	4
1675/6F1.	3	3	3	4	3	3	3	5	5	4
1676/6F1.	3	3	3	4	3	3	3	5	5	4
1677/6D1.	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1678/6D1.	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1679/6D1.	3	0	3	4	3	3	3	0	4	5
1680/6D1.	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1681/6D1.	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1682/6D1.	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1683/6D1.	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1684/6M1	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1685/6M1	3	2	3	4	3	3	3	4	4	5
1686/6M1	3	1	3	4	3	3	3	4	3	3
1687/6M1	3	2	3	3	3	3	3	4	2	5
1688/6M1	3	2	3	3	3	3	3	4	2	5
1689/6M1	4	2	3	3	3	3	2	5	0	3
1690/6M1	3	2	3	3	3	3	2	5	2	3
1810/4J1.	3	1	2	2	2	3	3	6	2	3
1811/4J1.	3	2	2	3	3	3	3	6	2	3
1812/4J1.	3	2	2	2	2	3	3	6	2	3

ANEXO 1: Continuación

	G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH
1813/4J1.	3	2	4	3	3	3	3	6	2	3
1814/1A2	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3
1815/1A2	3	3	3	3	3	3	3	4	0	0
1816/1A2	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
1817/1A2	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
1818/1A2	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
1819/1A2	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
1820/1A2	3	2	3	3	3	3	3	5	3	4
1821/1A2	3	2	3	3	3	3	3	5	3	4
1822/1A2	3	2	3	3	3	3	3	5	3	4
1823/1A2	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
1824/1A3	3	2	3	3	3	3	3	5	5	6
1825/1A3	3	2	3	4	3	3	3	5	5	6
1826/1A3	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1827/1A3	3	3	3	4	3	3	3	5	4	5
1828/1A3	3	3	3	4	3	3	3	5	3	0
1829/1A3	3	3	3	4	3	3	2	5	3	5
1830/1A3	3	3	3	4	3	3	2	5	3	5
1831/1A3	3	3	3	4	3	3	2	5	3	5
1832/1A3	3	3	3	4	3	3	2	5	2	0
1833/1A3	3	3	3	4	3	3	3	5	2	0
1834/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	0
1835/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	0
1836/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	0
1837/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	0
1838/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	0
1839/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	6
1840/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	6
1841/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	6
1842/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	6
1843/1A4	3	3	3	4	3	3	3	5	2	6
1844/1A4	3	3	3	4	3	3	3	4	1	4
1845/1A1	3	0	3	4	3	3	2	4	0	0
1846/1A1	3	2	3	0	3	3	2	4	0	4

ANEXO 1: Continuación

	G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH
1847/1A1	3	2	3	4	3	3	2	4	3	5
1848/1A1	3	0	3	4	3	3	2	4	4	6
1849/1A1	3	3	3	4	3	3	2	4	4	4
1850/1A1	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
1851/1A1	3	3	4	3	3	3	2	4	3	0
1852/1A1	3	0	3	3	3	3	2	0	3	4
1853/1A1	3	3	2	4	3	3	2	4	3	4
1854/1A1	3	0	2	3	3	3	2	0	3	0
1855/1A1	3	3	3	3	3	2	2	0	3	4
1856/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1857/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1858/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1859/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1860/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	0
1861/1A1	3	2	3	3	3	3	2	0	3	0
1862/1A1	3	2	3	3	3	3	2	0	3	0
1863/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	0
1864/1A1	3	2	4	3	3	3	3	0	3	0
1865/1A1	3	2	3	3	4	4	3	4	0	0
1866/1A1	3	2	3	3	4	4	3	4	3	4
1867/1A1	3	0	3	3	4	4	3	4	0	0
1868/1A1	3	2	3	3	4	4	2	4	0	0
1869/1A1	3	2	3	3	4	4	2	4	3	4
1870/1A1	3	0	3	3	4	4	2	4	3	4
1871/1A1	3	2	3	3	4	3	2	4	3	4
1872/1A1	3	2	3	3	4	3	2	4	3	4
1873/1A1	3	0	3	3	3	3	3	4	4	5
1874/1A1	3	0	4	3	3	3	3	4	0	4
1875/1A1	3	2	3	3	3	4	3	3	3	4
1876/1A1	3	3	3	4	3	3	3	4	4	5
1877/1A1	3	3	3	4	3	3	3	4	4	5
1878/1A1	3	3	3	4	3	3	3	4	4	5
1879/1A1	3	0	3	4	3	4	3	4	4	4
1880/1A1	3	2	3	4	3	3	3	4	4	4

ANEXO 1: Continuación

	G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH
1881/1A1	3	3	3	4	3	3	3	4	3	4
1882/1A1	3	0	3	4	3	4	3	4	3	4
1883/1A1	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
1884/1A1	3	4	4	4	3	2	3	4	3	4
1885/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1886/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1887/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1888/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1889/1A1	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1890/1A5	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1891/1A5	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1892/1A5	3	2	3	3	3	3	2	4	3	4
1893/1A5	3	2	3	3	3	3	3	4	3	4
1894/1A5	3	2	3	3	3	3	3	5	3	4
1895/1A5	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
1896/1A5	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
1897/1A5	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
1898/1A5	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
1899/1A5	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
1900/1I1.	3	1	3	1	2	3	3	0	2	2
1901/1I1.	4	2	4	3	3	4	3	4	2	3
1902/1I1.	3	2	2	3	3	3	3	0	3	4
1903/1I1.	3	2	2	3	4	3	2	4	3	2
1904/1I1.	1	1	3	1	2	2	2	0	3	2
1905/1I1.	3	2	4	2	3	3	2	0	3	4
1906/1I1.	1	1	3	1	2	2	2	0	3	2
1907/1K1.	4	3	2	3	3	2	2	4	3	4
1908/1K1.	4	3	4	3	3	4	2	3	3	4
1909/1K1	5	3	4	3	3	4	2	3	3	4
1910/1K1.	3	1	4	2	2	3	1	2	2	3
1911/1K1.	4	1	3	2	2	3	1	2	2	3
1912/1K1.	5	1	3	2	2	3	2	2	2	3
1913/1K1.	4	1	3	2	2	3	2	2	2	3
1914/1K1.	4	1	3	2	2	4	2	2	2	3

ANEXO 1: Continuación

	G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH
1915/1I2.	3	2	3	3	3	3	3	4	2	3
1916/1I2.	3	2	4	3	3	3	3	4	2	3
1917/1I2.	3	2	4	3	3	3	3	4	2	3
1918/1I2.	3	2	4	2	3	3	3	4	2	3
1919/1I2.	3	2	4	2	3	3	3	4	2	3
1920/1I2.	3	2	3	2	3	3	3	4	2	3
1921/1I2.	3	2	4	2	3	3	3	4	2	3
1922/1I2.	3	2	4	2	3	3	3	4	2	3
1923/1I2.	3	2	4	2	3	3	3	4	2	3
1924/1I2.	3	2	4	3	3	3	3	4	2	3
1925/1I2.	3	2	3	3	3	3	3	4	2	3
1926/1I2.	3	2	3	3	3	3	3	4	2	3
3464/3A1	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
3465/3A1	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
3466/3A1	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
3467/3A1	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
3468/3A1	3	1	3	3	3	3	2	5	3	4
3469/3A1	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
3470/3A1	3	2	3	3	3	3	2	5	3	4
3471/3A1	3	2	3	3	3	3	2	5	4	4
3472/3A1	3	2	3	4	3	3	3	5	3	3
3473/3A1	3	2	3	4	4	3	3	5	3	3
3474/3A1	3	2	3	4	3	3	3	5	3	3
3475/3A1	3	2	3	4	3	3	3	5	3	3
3476/3A1	3	2	3	4	3	3	3	5	3	3
3775/1A6	3	3	4	3	3	1	3	4	2	4
3776/1A6	3	3	4	3	3	3	3	4	3	4
3777/1A6	3	3	4	3	3	2	3	4	3	4
3778/1A6	3	3	4	3	3	1	3	4	3	4
3779/1A6	3	3	4	3	3	3	2	4	2	4
3780/1A6	3	3	3	2	3	3	3	4	3	4
3780/1A6	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3782/1A6	3	3	4	3	3	3	3	4	3	4
3783/1A6	3	3	3	3	3	1	3	4	3	4

ANEXO 1: Continuación

G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH	
3784/1A6	3	3	4	3	3	3	4	3	4	
3785/1A6	3	3	3	3	3	3	4	3	4	
3786/1A6	3	3	4	3	3	3	4	3	4	
3787/1A6	3	3	4	2	3	3	4	3	4	
3788/1A6	3	3	4	4	3	1	3	4	3	4
3789/1A6	3	1	3	2	3	3	3	4	3	4
3790/1A6	3	2	4	3	3	3	3	4	3	4
3791/1A6	3	2	3	2	3	3	3	5	3	4
3792/1A6	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3793/1A6	3	3	3	3	3	3	3	5	3	4
3794/1A6	3	3	4	3	3	3	3	4	3	4
3795/1A6	3	3	3	4	3	3	3	4	0	3
3796/1A6	3	3	4	2	3	3	3	4	2	0
3797/1A6	3	3	3	3	3	3	3	4	3	0
3798/1A6	3	3	3	3	3	3	3	4	0	0
3799/1A6	3	3	3	3	3	3	3	4	3	0
3800/2A1	3	3	3	3	3	4	3	4	3	0
3801/2A1	3	3	3	3	3	3	3	4	3	0
3802/2A2	3	3	3	3	3	3	3	4	0	0
3803/2A2	3	3	4	3	3	3	3	4	2	0
3804/2A2	3	3	3	3	3	3	3	4	0	0
3805/2A2	3	3	3	3	3	3	2	4	3	5
3806/2A2	3	3	3	3	3	3	2	4	3	5
3807/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3808/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3809/2A3	3	3	3	3	3	3	1	4	3	4
3810/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3811/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3812/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3813/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3814/2A.	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3815/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3816/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3817/2A3	3	3	3	3	3	3	1	4	3	4

ANEXO1:Continuación

	G6PDH	ARK	MDH	MPI	PGM	ME	PEP	IDH	ADH	XDH
3818/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3819/2A3	3	3	3	3	3	3	2	4	3	4
3820/2A3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3821/2A3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3822/2A3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3823/2A3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3824/2A3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3825/2A3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3826/2A3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3827/2A3	3	2	3	2	3	2	2	3	2	3
3828/2A3	3	2	3	2	3	2	2	3	2	3

11.-APENDICE

A.- MEDIOS DE CULTIVO

Medio UL

Peptona 10 gr.
Glicerol 150 ml
Agua 850 ml

Medio de Urea

Base de úrea 29 gr.
Agar 15 gr.
Agua 1t

Medio LB liquido

Triptona 10 gr.
Extracto de levadura 5 gr.
NaCl 10 gr.
Agua 1 lt

Medio TSI (Triple

azúcar y Hierro)
TSI 32.5gr
Agua 500ml

Medio M (mínimo)

Fosfato dibásico de
Potasio 7gr
Fosfato monobásico de
Potasio 2gr
Sulfato de amonio 1gr
Citrato de Sodio 0.5gr
Antifoam al 5% 0.5ml
Agar 8gr
Agua 250ml

Medio de soya

tripticaseina
Soya tripticaseina 20gr
Agua 500ml

Medio ML (mínimo de lactosa)

Agregar al medio mínimo
4gr de
lactosa

Medio McConkey

McConkey 25gr
Agua 500ml

B.- TINCION DE ENZIMAS

IDH (Isocitrato deshidrogenasa)

1.0ml Tris HCl, pH=7.0
1.5ml NADP
15 gotas DL-Isocitric acid
8 gotas MgCl₂
5 gotas MTT
5 gotas de PMS*
2ml de agar

PGM (Fosfoglucomutasa)

1ml Tris HCl, pH= 8.0
1.5ml NADP
5 gotas Glucosa-1-fosfato
5 gotas MgCl₂
5 gotas MTT
5 gotas PMS*
2ml agar

G6PDH (Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa)

0.6ml Tris HCl, pH=8
1.5ml NADP
12 gotas D-Glucosa-6-
fosfato
6 gotas MgCl₂
5 gotas MTT
5 gotas PMS*
2ml agar

MDH (Malato deshidrogenasa)

1.0ml Tris HCl, pH=8.0
1.5ml NAD
13 gotas Substrato malico
5 gotas MTT
5 gotas PMS*
2ml agar

PEP (Peptidasa)

2ml 0.02M Na₂HPO₄,
pH=7.5
4 gotas Peroxidasa
8 gotas o-Dianisidina
2 gotas MgCl₂
8 gotas dipeptido
4 gotas L-amino acid
oxidase
2ml agar

ME (Malato deshidrogenasa NADP.

0.6ml Tris HCl, pH=8.0
1.5ml NADP
12 gotas Substrato malico
2 gotas MgCl₂
5 gotas MTT
5 gotas PMS*
2 ml agar

ARK (Arginina Kinasa)

0.5ml Tris HCl, pH=8.0
1.5ml NAD
5 gotas MgCl₂
5 gotas Phospho-L-arginine
5 gotas ADP+D-glucosa
5 gotas MTT
5 gotas PMS*
10µl Hexokinasa*
10µl G6PDH*
2ml agar

**ADH (Alcohol
deshidrogenasa)**

0.6ml Tris HCl, pH=7.0
1.5ml NAD
5 gotas MTT
3 gotas Ethanol
5 gotas PMS*
2ml agar

**MPI (Manosa-6-
fosfato isomerasa)**

1.0ml Tris HCl, pH= 8.0
1.5ml NAD
5 gotas D-manosa-6-
fostato
5 gotas MTT
5gotas PMS*
5µl PGI*
20µl G6PDH
2ml agar

**XDH (Xantina
deshidrogenasa)**

1.0 ml Tris HCl, pH=8.0
1.5ml NAD
20 gotas Hypoxanthine
5 gotas MTT
5 gotas PMS*
2ml agar

* Reactivos fotosensibles o lábiles, deben agregarse inmediatamente a la mezcla.

C.- BUFFERS EMPLEADOS

TG (Tris Glicina)
30gr de Trizma base
144gr de Glicina
1lt de Agua
Diluir 1:9 TG:agua

0.09M Tris HCl
pH=7.0
44.4gr de Trizma base
350ml 1M HCl
Aforar a 4 litros

0.09M Tris HCl pH=8.0
44.4gr de Trizma base
248ml 1M HCl
Aforar a 4 litros

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a mi directora de tesis y al esposo de la citada, la Doctora Valeria Souza y el Doctor Luis Eguiarte por introducirme al estudio de la genética de poblaciones y sobre todo por aguantarme en mi conducta tan dispersa. A Juan Nuñez por revisar mi tesis, al murcierólogo Jorge Ortega y a mi compañera y amiga Martha Rocha. Es mi deber agradecer a los profesores que me ayudaron a hacer de la Biología un hábito y un placer; gracias maestra Leonor peralta, gracias Saul Cano, gracias maestro Latournier, gracias maestra Zamudio y gracias a los que ahora no recuerdo. También es mi deber agradecer a la gran cantidad de profesores que con su mal ejemplo me enseñaron a distinguir el bien del mal.

Y DESPUES DEL EXAMEN

Pues si ya te digo, la fiesta estuvo muy buena, fueron todos los coates, la primera que llego fue mi coachara Consuelo, si a la que le pusimos el caldo de los chiles en vinagre en el vaso en el que se lavaba los dientes, poco mas tarde llegaron juntos el Catalán con su playerita sexy y Gaby, que me extraño porque siempre llega tarde, inmediatamente se pusieron a bailar "como te quiero como te extraño". Yolanda y José Juan llegaron casi al mismo tiempo que Yuli, la que lloró cuando el rafa le quería dar un beso. La Xochitl llegó tan despistada como siempre preguntando que a que hora bautizaban al niño. El que realmente hizo su entrada triunfal como siempre fue mi hermano Jair, acabando de librar la puerta que nos ponen el rap de "I can moved mountains" y que nos echamos una rapeadita, ya cansados por el esfuerzo nos tomamos un pulquito porque has de saber que el Jair siempre carga su pulquilindro desde la primaria, aunque no estoy diciendo que el sea borracho yo jamás lo he visto en esa situación, como tú, te acuerdas cuando te tomaste las caribes en la práctica de Paleontología, si, fue la misma noche que me bañaron con cerveza porque no quise tomar, o como mi supercoacharo Daniel que una vez en Acapulco que no precisamente fuimos a competir, se puso una jarra de aquellas, yo solamente me acuerdo de su gran frase celebre "on ta el maurice para

guacarearlo", y hablando de frases celebres te acuerdas de esta: "no los perdí lo que pasa es que no me acuerdo donde están" o "cuando yo llegue ya estaba así" o la de "cerros vete a cambiaaar" en fin muchas frases de la que por el momento no me puedo acordar, Carlos? no, Carlos no dijo ninguna de estas, el decía que sus lonjas le servían para equilibrar su peso y así correr mejor, yo mas bien pienso que sus lonjas le servían para equilibrar el peso pero de su familia, las que llegaron a desequilibrar la fiesta con sus gritos y risas fue el grupo de comadres comandado por Jaina, Maritza, Alejandra, Elia, etc., etc., parecía un gallinero en todo su apogeo. Adrianagonida y Lylianapigida vinieron todas zarrapastrosas según ellas acababan de llegar de su práctica de campo de Zoología III, me contaron que se la habían pasado muy bien, que había sido la mejor práctica de su carrera y que querían que todas las practicas fueran como esta, yo en lo personal me acuerdo mucho de la practica de Zoología IV, en donde junto con mi chalan la rata fuimos al rescate de un grupo de inexpertos que se habían perdido en el campo, de regreso al ir a una cueva, nos tuvimos que enfrentar a muchos peligros entre ellos una manada de ranas salvajes nos atacaron , un sin número de moscos vámpiros sedientos de sangre nos invadieron pero el principal problema que enfrente fue, el de evitar que el Emilio me abrazara ya que con cualquier ruido se asustaba, yo hasta pensaba que era medio raro pero después me di cuenta que no, también el que pensaba que era homosexual era el Roger pero después me di cuenta que no era cierto, mas bien eran unos perros, cuando nos poníamos a platicar en el puente y pasaba una chava que estaba más o menos, incluso menos que más, babeaban a tal grado que el puente quedaba totalmente inundado. Las que se la pasaron bailando toda la noche sin descanso fue Maru (ella bailaba con su gato), la Chucha alias Belén de Jesús y la Chayo mejor conocida en el bajo mundo como la chacala, solamente paraban de bailar para tomarse algo, al final las tres acabaron todas cansadas y ademas bien ebrias, llorando y diciendo "no es que yo te quiero un chingo", Tony por su parte trataba de calmarlas pero también fue absorbida por ese vicio, acabando ella, toda cansada por el baile toda ebria por el rompopo tomado y además empapada de sangre, sudor y lágrimas, la sangre fue porque bajando las escaleras se cayó y se cortó con un vidrio (Tony te acuerdas de lo de hongos). Como

ya teníamos mucha hambre y no había nada de comer el Polo empezó a devorarse las croquetas del perro sin saberlo, ya que nosotros las pusimos como si fueran botanas. Lo que realmente me sorprendió fue cuando el equipo representativo de table dance de la UNAM se puso a entrenar en plena fiesta, realmente fueron la sensación, principalmente la campeona Ivette y la subcampeona Jazmín, por su parte el campeón nacional de entrenamientos y el Leonis hicieron también lo suyo, Angeles no pudo entrenar con ellos porque se tuvo que ir temprano, lástima que no tome una foto para la posteridad. Mi coacharísima Marcia se quedo callada todo el tiempo, pense que tal vez era por las cervezas que se había hechado pero después me acorde que ella es muy introvertida y casi no se ríe, tal vez por eso me cae bien, solo me acuerdo de una vez que se rió, esa vez estabas tu, la niña lucero y Ale, te acuerdas?, conte el chiste de la ranita, ¡ya te lo sabes!, ¡para que quieres que te lo vuelva a contar!, esta bien ahí te va: pues resulta que iban dos compadres medios diarreicos por el camino ya de regreso a su casa y en ese momento que les dan ganas de ir al baño, ósea ir a obrar, dicho de otra manera a tirar unos lodos o también ir a zurranchos, bueno pues resulta que uno de los compadres dice: "mire compadre para evitar malentendidos y sobre todo malos olores usted vayase a la izquierda cerca del lago y yo me voy a la derecha" y así cuando regresaron los compadres de desenlodarse, uno le dice al otro: "como le fue compadre" y este le responde: "pues muy mal compadre, me limpie con una piedra bien rasposa y estoy todo rozado. ¡y a usted que tal, todo salió bien?" y el otro responde: "pues si compadre me fue muy bien, yo me limpie con algo muy suave pero no supe que era" y el otro agrega: "no puede ser, haber vamos a ver", al llegar al lago estaba una pobre ranita escupiendo y limpiándose la cara con sus patitas diciendo: "¡son Chingaderas!, ¡se pasan de lanza!, ¡así les voy hacer yo!, cada que lo cuento más me gusta aunque este un poco baboso. La Libertad llegó justo en el momento en que yo más la esperaba, un rato mas de demora y me ponía a beber, por fortuna esto no sucedió. Yo en realidad me la pase casi todo el tiempo con Sandra y junto con la chupis tratábamos de hacerla comer al menos un poco, algo de atún, insectos o aguacate. Por mi casa hay muchos chapulines y algunas veces capturo algunos para comer, así que cuando se los llevó a Sandra, esta en vez de comérselos los mete en alcohol para

anexarlos a su colección entomológica, para la siguiente ocasión se los voy a dar a la señora Soledad para que se los ponga en el licuado sin que se de cuenta. Pues ya te digo, conforme iba evolucionando la fiesta empezaron a llegar otras poblaciones fiesteras genéticamente diferentes a las que habían llegado antes. Martha fue la primera que vi entrar, llevaba su bicicleta y no se quedo mucho tiempo porque dijo que todavía le faltaban 5 kilómetros, la que si se quedo mucho tiempo aunque solo sentada y comiendo Cheetos fue Valerie, solo me acuerdo que se paro una vez para bailar la canción de "Walking in my shoes", Claudia por su parte me decía "la verda yo me quiero dedicar al sexo las drogas y el Rock and Roll" y yo tratando de guiarla al buen camino le decía: "es mejor dedicarse al sexo la Biología y el Rock and Roll". Ericka Marquez quien sabe porque no llego a la fiesta, seguramente le paso algo en el camino. Arturo se la paso comiendo, incluso cuando iba al baño se llevaba un entremés que más bien parecía un entreaño, no, Lulú casi no comió. Aldo tampoco pudo llegar debido a que sufrió una intoxicación con el humo de su cigarro, afortunadamente Toño venía con él y le dio un poco de café con piquete, lo peor es que después sufrió una dependencia hacia Toño ya que solo él sabia preparar los medios para satisfacer los sucios vicios de Aldo.

Y bueno eso es básicamente lo más importante, seguramente pasaron cosas de las que no vi o de las que ahora no recuerdo. Por último, antes de irme te recomiendo que no demores mucho tu fiesta y que vayas a ver la película de la Ciudad de los niños perdidos y Los olvidados. Ya me voy porque ahora si, mañana tengo muchas cosas que hacer.