



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DIVERSIDAD DE LINAJES DE BACTERIAS CULTIVABLES EN
DOS COMUNIDADES CONTRASTANTES EN CUATRO
CIÉNEGAS COAHUILA, MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VÍCTOR MANUEL SOSA JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. VALERIA FCA. EUGA. LEOPA. DE MA. GPE. SOUZA
SALDIVAR**

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Sosa

Jiménez

Víctor Manuel

57743486

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

302142235

2. Datos del tutor

Doctora

Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María Guadalupe

Souza

Saldívar

3. Datos del sinodal 1

Doctora

Gloria

Soberón

Chávez

4. Datos del sinodal 2

Doctor

Arturo Carlos II

Becerra

Bracho

5. Datos del sinodal 3

Doctor

René

Cerritos

Flores

6. Datos del sinodal 4

Maestra en I.B.B.

Laura

Espinosa

Asuar

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Objetivo.....	10
Hipótesis.....	10
Métos.....	11
Área de estudio.....	11
Medios de cultivo.....	14
Muestreo.....	15
Extracción de DNA.....	16
Amplificación del gen 16S rRNA.....	19
Curación de secuencias.....	20
Análisis estadístico.....	21
Resultados.....	28
Efecto de los medio de cultivo en los aislados recuperados.....	28
Caracterización de los medios de cultivo.....	29
Taxonomía de los aislados.....	32
Correlación grupo taxonómico – morfotipo colonial.....	33
Análisis de diversidad.....	35
Discusión.....	38
MMM y Ag lograron recuperar mayor número de aislados y presentan más morfotipos, en específico de PG.....	38
Los aislados presentan gran versatilidad morfotípica y dominancia numérica de pocos morfotipos compartiendo caracteres dentro de los grupos.....	40
Mayor riqueza de especies en PG cuya comunidad está dominada por una OTU en un tercio de la comunidad, la comunidad de PE es más equitativa..	44
Parámetros ambientales y la diversidad.....	45
Estudio de comunidades dependiente de cultivos y metagenómica, dos enfoques complementarios.....	46
Referencias.....	52
Apéndice.....	56

Diversidad de linajes de bacterias cultivables en dos comunidades contrastantes en Cuatro Ciénegas Coahuila, México

Resumen

Actualmente el estudio de comunidades microbianas en Cuatro Ciénegas se lleva a cabo bajo con dos enfoques, el dependiente de cultivo, que implica la elaboración de medios de cultivo, aislamiento bacteriano y caracterización morfológica y taxonómica de las colonias; y el independiente de cultivo que mediante el advenimiento de nuevas técnicas moleculares hace posible la extracción de DNA total de la comunidad a partir de muestras ambientales. En este estudio se colectaron dos muestras de tapete microbiano de pozas distintas [Poza Germán(PG) y Poza Eguiarte(PE)] en noviembre de 2008 a partir de las cuales se aislaron bacterias en varios medios de cultivo. Se recuperaron 638 aislados en total donde caracterizaron 74 morfotipos coloniales distintos, siendo algunos exclusivos para cada medio de cultivo y poza. De esta colección se tomaron 100 aislados de PG y 77 de PE, se aisló su DNA y se amplificó el marcador taxonómico 16S rDNA. Las colonias secuenciadas presentaron 54 genotipos [operational taxonomic units (OTUs)] distintos de 24 géneros bacterianos. No se encontró correspondencia entre la morfología colonial y la taxonomía de los aislados. Los índices de diversidad sugieren que PG es la más diversa y posee mayor riqueza de especies que PE, sin embargo, las curvas de rarefacción muestran que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para representar el total de las comunidades. Por otro lado, a pesar de ser muy diversa, PG tiene una fuerte dominancia, pues un tercio de la

comunidad está dominada por *Aeromonas*, mientras que en PE no hay una dominancia clara. Si contrastamos nuestros resultados con la diversidad descrita en el metagenoma en PG, encontramos que la porción de la diversidad cultivada es muy pequeña sin embargo, en este estudio recuperamos en los cultivos numerosos linajes de heterótrofos aerobios que permitirán en un futuro hacer estudios finos sobre genética de poblaciones, genómica y fisiología molecular de linajes interesantes de la comunidad.

Introducción

Determinación de la diversidad microbiana

Los microorganismos a pesar de ser pequeños, son el componente esencial de la biota en la Tierra, además de tomar parte primordial en los ciclos biogeoquímicos, liberan componentes importantes de la atmósfera y representan una gran porción de la diversidad de la vida. La mayoría de los procariontes podemos encontrarlos en todos lados principalmente en agua de mar, suelo y subsuperficie de sedimentos, siendo los suelos el mayor reservorio de éstos organismos. (Whitman et al., 1998).

Tener un buen estimado del número de estos microorganismos no es una tarea fácil, tomando en cuenta que no son evidentes a simple vista ni tan diferentes morfológicamente para poder ser censados; se ha calculado que hay alrededor de 10^{30} individuos bacterianos en todo el mundo (Whitman et al., 1998). Sin embargo, la tarea se complica aún mas ya que la fracción de microorganismos que pueden ser cultivados es pequeña, se estima en a penas un 1% del total (Schloss et al., 2004), y se sugiere que más del 99% de las especies bacterianas no pueden crecer en condiciones de laboratorio (Rappé et al., 2003; Keller et al., 1994; Jansen, 2006).

En años recientes, con el advenimiento de técnicas moleculares independientes de cultivo y el empleo del gen 16S rRNA como gen marcador de la diversidad taxonómica de las comunidades, el problema del cultivo fue aparentemente resuelto. En efecto, estas técnicas han permitido conocer una mayor fracción de microorganismos para tener mejor conocimiento de la estructura y composición de las comunidades microbianas. El gen 16S rRNA es

un gen bien conservado entre los procariontes, y se ha utilizado como reloj molecular, codifica para la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (Madigan et al., 2004), además es una herramienta filogenética para describir relaciones evolutivas (Wose y Fox, 1977) que permite asignar taxonomía a los microorganismos, cultivables y no cultivables (Peace et al., 1985). La base de datos de Ribosomal Database Project (RDP) contiene 33 082 secuencias de 16S rRNA arqueobacterianas y 643 196 bacterianas de las cuales 142 511 son de organismos cultivados y 534 487 de no cultivados (Cole et al., 2009). En el sitio web de RDP se puede acceder a la base de datos y comparar las secuencias de estudio con las aquí depositadas y alineadas. En la actualidad se han descrito alrededor de 50 *Phylum* bacterianos y la mitad de ellos se componen en su totalidad de bacterias no cultivables (Harris et al., 2004; Hugenholtz et al., 1998; Rappe et al., 2003), de modo que no se ha muestreado suficientemente bien la diversidad de bacterias y hace falta mucho por explorar de ésta basta mayoría de la biota de organismos desconocida. Se sabe de su existencia gracias a la secuencias del gen 16S rRNA en muestras ambientales (Stott et al., 2008), aunque sólo una porción de los microorganismos puede ser cultivada, la ventaja obvia de las técnicas de cultivo es que las cepas de nuevos taxones pueden ser preservadas para análisis taxonómicos detallados, caracterización fisiológica, así como la búsqueda de aplicaciones potenciales, tales como la búsqueda de enzimas adaptadas al frío, pigmentos, antibióticos y otros compuestos bioactivos.

Es por esto que se han llevado a cabo esfuerzos en la última década por mejorar las técnicas de cultivo para poder conocer más acerca de aquellos microorganismos desconocidos aun no cultivados, y entender como crecen

para ampliar la panorámica de la diversidad taxonómica y metabólica de las bacterias (Stott et al., 2008). Los medios de cultivo se han suplementado con una variedad de nutrientes (Nold et al., 1996; Burns et al., 2004; Simbaham et al., 2005), incluso enriqueciendo muestras de agua y suelo (Marteinsson et al., 2001; Habbel et al., 2004). Los medios de cultivo en placa y líquidos implementados en estudios previos se han modificado variando el uso de agentes gelificantes, composición de los medios y fuentes de energía optimizándolos para ambientes particulares (Stott et al., 2008).

A pesar de las incongruencias de conteo de microorganismos empleando cultivos y técnicas moleculares (Brambilla et al., 2001), ambos enfoques de estudio son complementarios y presentan información que no se sobrelapa (Van Trappen et al., 2002, Albrecht et al., 2009).

Algunos ejemplos de comunidades microbianas son los estromatolitos y tapetes microbianos. Los estromatolitos son estructuras organosedimentarias laminadas, considerados como una de las primeras formas de vida sobre la Tierra (Awramink, 1992). Los estromatolitos y los tapetes microbianos están compuestos de varias capas con capacidades metabólicas distintas que se caracterizan por presentar un fuerte gradiente de oxígeno y en la capa más superficial esta dominada por organismos fotosintéticos como las cianobacterias (Madigan et al., 2004), mientras que las otras capas contienen bacterias del metabolismo del azufre (fotótrofas anoxigénicas por debajo de la primer capa, hasta donde llegue suficiente luz, y bacterias quimioorganótrofas, especialmente sulfato reductoras en la capa siguiente y metanógenas en la parte inferior (Madigan et al., 2004).. Los estromatolitos a diferencia de los

tapetes microbianos poseen una consistencia dura como roca gracias a la precipitación y captura de carbonatos (Baumgartner et al., 2009).

Los tapetes microbianos y los estromatolitos se encuentran en una amplia diversidad de ambientes en el mundo incluyendo sitios hipersalinos como Guerrero Negro, fuentes geotérmicas en Yellowstone, en los fríos valles de la Antártica y manantiales alcalinos sulfídicos en Rusia. Las comunidades de tapete pueden, por si solas, controlar el ciclo de nutrientes ya que tienen una fuerte diferenciación de nicho y regulación homeostática. Ésta regulación del microambiente se ve afectada directa o indirectamente por el tipo de sedimento y minerales precipitados y atrapados. Geomorfológicamente resulta en una gran variedad de formas, desde capas sueltas mucilaginosas, estructuras uniformemente laminadas e incluso estructuras de mayor dureza. Como resultado de la acumulación de actividad del tapete y la captura de minerales los tapetes podrían litificarse resultando en estromatolitos (Allen et al., 2009; Golubic, 1976).

Cuatro Ciénegas Coahuila

En el valle de Cuatro Ciénegas, hay abundantes estromatolitos y tapetes microbianos (fig. 1, Minckley, 1969). Se piensa que dadas las condiciones de aislamiento, el sitio ha evolucionado a un ritmo diferente que si estuviera en terreno abierto y los microorganismos que se encuentran en las pozas son los mismos que habitaban el lugar hace miles de millones de años.

El valle de cuatro Ciénegas es un laboratorio de evolución que mantiene en aislamiento geográfico a microorganismos que se creó habitan los cuerpos de agua de éste sitio desde hace miles de millones de años y podría ser considerado una ventana al pasado para entender las condiciones primitivas que dieron lugar a la vida y a su vez la diversificación de los primeros seres vivos sobre el planeta; además los microbios del sitio se pueden encontrar tanto en la columna de agua como parte de consorcios microbianos en estromatolitos y tapetes microbianos (Souza et al., 2006).

Dentro del valle de Cuatro Ciénegas se encuentra una gran diversidad de cuerpos de agua, incluidos ríos, manantiales, lagunas y pozas (permanentes y de desecación), charcos, estanques, entre otros. Las aguas convergen en la característica de ser oligotróficas, es decir, con escasos nutrientes, sin embargo, las condiciones microambientales de cada sitio varían entre sí.

En el presente estudio, con el fin de aislar un número elevado de especies bacterianas, se muestrearon dos localidades dentro del valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, y bajo el enfoque clásico mediante el uso de dos medios de cultivo diferentes y dos gelificantes se caracterizaron morfológica y taxonómicamente aislados a partir de muestras de tapete microbiano de Poza Germán y Poza Eguiarte.

Los sitios muestreados para llevar a cabo esta investigación fueron Poza Germán (PG), perteneciente a un conjunto de pozas permanentes llamado Pozas Azules; y Poza Eguiarte (PE), de la localidad de Los Hundidos, conformada por pozas de desecación, las cuales presentan fluctuaciones de nivel de agua a lo largo del año con respecto a la temporada de lluvias y de

sequía. Los microambientes de cada poza son contrastantes ya que en las pozas permanentes al mantenerse más estable el nivel de agua, la concentración de iones disueltos se mantiene con menos cambios que en las pozas de desecación, incluso en éstas últimas gran parte de los tapetes están expuestos al aire.

Souza et al. (2006) encontró que dentro del valle hay una gran diversidad de microorganismos, teniendo 38 filotipos únicos de 10 linajes procarióticos lo cual fue sorprendente dadas las condiciones de oligotrofia del lugar. La diversidad reportada fue comparable incluso con la encontrada en rizósfera y muestras de suelo. Al parecer, la microbiota y agua del lugar provienen del Mesozoico. Las bacterias asociadas a organismos provenientes del Golfo de México se sugiere poseen capacidades dispersivas. Además se asume hay interconexión entre los cuerpos de agua del valle en base a los estudios de T-RFLP, sugiriendo los linajes derivaron de una fuente en común o que hay migración través de los mantos acuíferos. Se resaltó la importancia de conservar el sitio ante la amenaza constante que el agua de Cuatro Ciénegas sufre por el uso desmedido.

Escalante (2008) realizó un estudio muestreando cuatro puntos principales de Cuatro Ciénegas y determinó la diversidad bacteriana de columna de agua mediante el análisis de fragmentos de polimorfismos terminales de restricción (T-RFLP) del gen 16S rRNA. Encontró que hay heterogeneidad espacial entre los diferentes hábitats muestreados por los bajos valores de diversidad α y altos de β ; además aisló *Pseudomonas caenicarum* sp. nov. Por otra parte, Cerritos (2008) realizó un proyecto con bacterias cultivables termoresistente en el sistema Churince dentro del valle de Cuatro Ciénegas, muestreando 10 sitios

desde el manantial hasta la laguna de desecación. Empleó tres medios de cultivo diferentes e identificó taxonómicamente los aislados mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Aisló una especie nueva, *Bacillus coahuilensis*. Además, realizó la toma de datos de parámetros ambientales tales como la salinidad, pH, conductividad y temperatura, habiendo sido propuestos estos parámetros como aquellos que determinan la diversidad de organismos como bacterias (Kaartokalillo et al., 2005; Lüdemann et al., 2000; Princic et al., 1998; Sievert et al., 1999), siendo en este estudio la conductividad la que mejor explica la diversidad de especies entre los sitios de muestreo a lo largo del sistema Churince.

Dentro del valle de Cuatro Ciénegas se encuentra una gran diversidad de cuerpos de agua, incluidos ríos, manantiales, lagunas y pozas (permanentes y de desecación), charcos, estanques, entre otros. Las aguas convergen en la característica de ser oligotróficas, es decir, con escasos nutrientes, sin embargo, las condiciones microambientales de cada sitio varían entre sí.

En el presente estudio, con el fin de aislar un número elevado de especies bacterianas, se muestrearon dos localidades dentro del valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, y bajo el enfoque clásico mediante el uso de dos medios de cultivo diferentes y dos gelificantes se caracterizaron morfológica y taxonómicamente aislados a partir de muestras de tapete microbiano de Poza Germán y Poza Eguiarte.

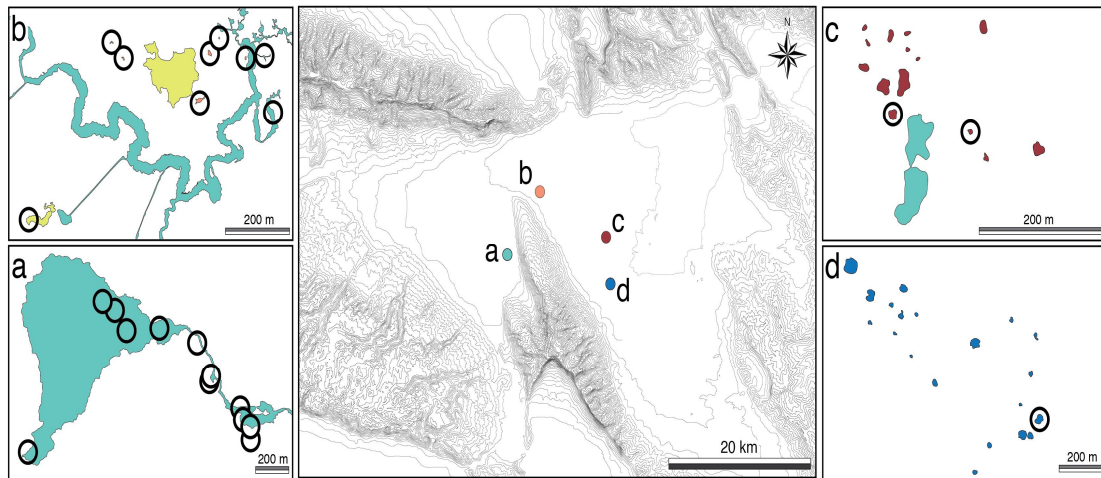


Figura 1. Mapa del Valle de Cuatro Ciénegas y las cuatro localidades muestreadas como parte de las líneas de investigación del grupo de trabajo comarcados los principales puntos de muestreo dentro de cada localidad. a) Sistema Churince. b) Río Mezquites. c) Los Hundidos (lugar donde se encuentra Poza Eguiarte). d) Pozas Azules (lugar donde se encuentra Poza Germán).

Objetivo

Analizar la diversidad de bacterias cultivables de tapete microbiano de Poza Germán y Poza Eguiarte en Cuatro Ciénegas.

Hipótesis

Si lo que podemos capturar en medios de cultivo es solo una muy pequeña parte de lo que hay en un sitio, pero esa parte es equivalente en varias muestras. Entonces, esa pequeña parte va a reflejar la riqueza y diversidad real de cada sitio, por lo que las técnicas de cultivo nos puedes indicar de manera relativa si un sitio es más diverso que otro.

Métodos

Área de estudio

Ubicación geográfica

Localizado en el centro del estado de Coahuila, México, el valle de Cuatro Ciénegas forma parte del desierto Chihuahuense (26° 59' N, 102° 04'W) extendiéndose aproximadamente 40Km de este a oeste y 30 Km de norte a sur a una altitud de 740 msnm (Minckley, 1969). Se encuentra entre dos de los más grandes macizos montañosos de México, la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental. La humedad proveniente del Golfo de México y del Pacífico no le es posible llegar al valle por dicha barrera montañosa. Lo que en parte explica las condiciones áridas del lugar. Las montañas que circundan el valle se elevan hasta 3000 msnm, éstas son la Sierra de San Marcos, Sierra de Pinos, Sierra la Fragua, Sierra Menchaca, Sierra Purísima y Sierra de la Madera.

Clima

Cuatro Ciénegas posee clima árido, seco muy cálido con escasas lluvias en el año, algunas en verano y otras en invierno (CONABIO 2010), con precipitación anual de menos de 200mm y más de 2000mm de evaporación potencial (SEMARNAT 2003). Las lluvias ocurren entre mayo y octubre, con la mayor

parte de la precipitación en junio. Las temperaturas pueden llegar al congelamiento en invierno (0° C), acumulándose nieve en las montañas. En verano las temperaturas superan los 44° C (Minckley, 1969).

Hidrología

La escasa precipitación anual reportada en la zona no puede ser generadora de cuerpos de agua en el valle, por lo que la gran cantidad de agua subterránea es la causa de la existencia de los manantiales. La Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) reporta que existen cerca de 300 pozas siendo la mayoría no permanentes (Minckley, 1969). Los resultados de análisis hidrológico indican que la química del agua de Cuatro Ciénegas es debida principalmente a la alta tasa de evaporación de agua, aunque también el flujo subterráneo entre valles y mezcla con agua más profunda e incluso con valles vecinos pueden también estar influyendo (Johannesson et al., 2004; Evans, 2005; Souza et al., 2006). Pocos estudios se han hecho acerca de la hidrogeología de Cuatro Ciénegas, por ello existe la polémica sobre el origen del agua de las pozas que no se ha resuelto de todo hasta hoy en día.

Las pozas varían de manera extrema en temperatura, salinidad, química del agua y descarga a escalas pequeñas y locales (Minckley, 1969). Las características limnológicas de las pozas son muy variadas. Las aguas son duras y contienen gran cantidad de sales de magnesio y calcio. Los cationes más abundantes en orden decreciente son calcio, magnesio, sodio y potasio; y

los aniones están dominados por sulfatos, carbonatos y cloruros. El pH varía mucho, los valores cercanos a la neutralidad se encuentran en los manantiales (7 – 7.02) hasta valores de alcalinidad en las lagunas de desecación (8 – 9.7) (Alcocer et al., 1995; Calegari, 1997). Los cuerpos de agua se caracterizan por ser pobres en fósforo y otros nutrientes por lo que no se permite el crecimiento de algas, por lo que se ha sugerido que las cadenas tróficas del lugar las conforman bacterias (Souza et al., 2006), aunque no hay estudios que den fe de ésta aseveración.

Dentro del Valle los cuerpos de agua se clasifican en lénticos, es decir, que no hay flujo ni corrientes de agua como el caso de pozos artesianos, ciénegas, lagos-playa, pozas y lagos terminales: lagos Los Fresnos, Santa Tecla, Churince o Grande, San Marcos, La Escobeda, El Tío Cándido, Salada, Orozco, Anteojo, Ferriño, Tío Quintero, Chiqueros, Garabatal, San Pablo, Juan Santos, Los Hundidos, El Mojarral y otras (más de 200 pozas); y los cuerpos de agua lóxicos que son lo contrario a los lénticos, como es el caso de ríos Cañón, Garabatal, Puente Chiquito, Salado de Los Nadadores, Polilla, Churince o Pasos Bonitos, Positos, Mezquites, Puente Colorado; manantiales El Mojarral Este, Oeste y de En medio; arroyos de tormentas; canales de Julio, de Anteojo, de Orozco, de Nuevo, de la Angostura, de La Polilla, de Pozos, de la Becerra de Ferriño, de Saca del Fuente, de Escobedo y un complejo sistema de aguas subterráneas (CONABIO, 2011).

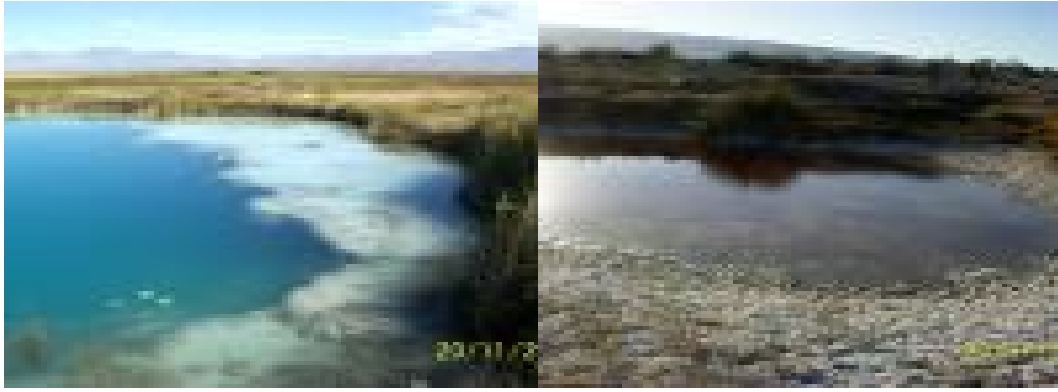


Figura 2. Sitios de muestreo. De izquierda a derecha Pozas Azules y Los Hundidos

Medios de cultivo

Los medios de cultivo son soluciones nutritivas que se usan en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos en laboratorio. En microbiología se emplean dos tipos de medios de cultivo: definidos y complejos. En los medios definidos se conoce la concentración y cantidades exactas de los compuestos orgánicos e inorgánicos añadidos en un volumen de agua destilada. En los medios complejos, el añadir mezclas complejas de nutrientes como el caso del extracto de levadura o peptona de caseína no se sabe que elementos están contenidos y cuáles de ellos intervienen en el crecimiento microbiano y en qué cantidades se encuentran. Algunas bacterias solo crecen en medios de cultivo con componentes a concentraciones específicas. Para tener medios de cultivo sólidos se requiere de algún tipo de gelatina. El agente gelificante que más se emplea para solidificar los medios de cultivo es el agar, que es un extracto de las macroalgas rodoíceas *Gelidium* y *Gracilaria*, el cual contiene una mezcla de dos polisacáridos: agarosa y agarpectina que la mayoría de las bacterias son incapaces de metabolizar permitiendo crecer colonias sobre el gel que

forma en solución acuosa (Fu et al., 2010). Por otra parte, el fitagel es un gelificante que se obtiene de la fermentación de almidones llevada a cabo por *Sphingomonas elodea* (Silva, 2005). Con este sustituto de agar se han logrado cultivar bacterias de suelo previamente no cultivables (Joseph, 2003) e incluso aislados de un Phylum bacteriano previamente no cultivado OP11 (Stott, 2008).

El medio marino es un medio complejo que ha sido empleado en el grupo de trabajo de la Dra. Souza, ya que ha demostrado ser eficaz en la recuperación de diversos grupos bacterianos, además por las altas cantidades de sal que presenta se intenta reproducir las condiciones de alta salinidad de los cuerpos de agua de donde se obtuvieron los tapetes microbianos. Por otra parte, el medio mínimo es un medio definido del que se conocen las cantidades exactas de cada uno de sus componentes. Contiene los elementos mínimos necesarios para que las bacterias puedan llevar a cabo su crecimiento. Al presentar escasez de nutrientes se intenta reproducir las condiciones de oligotrofia de las pozas.

Por otro lado, las interacciones entre algas y bacterias en ocasiones son de exclusión competitiva, y aunque en Cuatro Ciénegas no hay algas, las bacterias podrían presentar sensibilidad, y el agar al ser de origen algal, en su extracto podría estar conteniendo sustancias químicas que podrían inhibir el crecimiento de grupos bacterianos susceptibles a dichas sustancias. Se empleó el fitagel en un intento por recuperar a la posible proporción susceptible a agar dada su naturaleza vegetal.

En este trabajo se prepararon dos diferentes medios de cultivo, medio marino (MMM) y medio mínimo (Mmin) en un intento por reproducir las condiciones de alta salinidad y oligotrofia de las pozas respectivamente. MMM es un medio de propagación indefinido que cuenta con sales diversas, levadura y peptona; Mmin es medio definido con dextrosa como fuente de carbono, sales de potasio, sulfato y amonio.

Para preparar 1l de MMM se añadieron en 860mL DE H₂O, 5g de peptona de caseína, 1g de extracto de levadura, NaCl 5g, KBr 0.08g, SrCl₂ 0.34g, H₃BO₃ 0.022g, NaF 0.024g, (NH₄)₂NO₃ 0.026g, Na₂HPO₄ 0.08g, Na₂SiO₃ 10µl y MgCl₂ 2.2g. A parte se disolvieron Na₂SO₄ 1g, CaCl₂ 0.4g, KCl 0.2g, NaHCO₃ 0.1g y FeC₆H₅O₇ 0.1g en volúmenes de 30ml de H₂O cada uno.

Para preparar 1l de Mmin se añadieron dextrosa (C₆H₁₂O₆) 1g, Na₂HPO₄ 7g, NaH₂PO₄ 2g, C₆H₅O₇Na₃ 0.5g, MgSO₄ 0.1g y (NH₄)₂SO₄.

Se añadió para la gelificación de los medios Agar 15g; de Fitagel 9 g más 2g de MgCl₂ ya que los iones divalentes Mg²⁺ promueven la solidificación de éste gelificante (indicaciones de proveedor).

Se prepararon 50 cajas de Petri para cada sitio de colecta con cada uno de los medios medio marino agar (MMMAg), medio marino fitagel (MMMP), medio mínimo agar (Mmin) y medio mínimo fitagel (MminP).

Muestreo

Se visitó Cuatro Ciénegas de Carranza en 2008. Del 18 al 22 noviembre (de ese mismo año) se visitaron las localidades de Pozas Azules, en específico Poza Germán (PG) (26° 49'N, 102° 0'W), y en Los Hundidos Poza Eguiarte (PE) (26° 52'N, 102° 1'W). En cada una de los sitios se tomó una muestra de tapete microbiano. El tapete se guardó en tubos Falcon con solución fisiológica estéril (NaCl 1%) y se almacenó a 4° C.

Se realizó un corte transversal de tapete microbiano, se tomó una rebanada y se homogenizó el tapete con agua esterilizada. Posteriormente se hicieron diluciones hasta 1/1000. De esta dilución se tomaron 200µL, se esparcieron sobre los medios de cultivo y con ayuda de perlas de vidrio estériles se homogenizó la solución sobre el medio. Se retiraron las perlas y se cerraron y sellaron las cajas con parafilm. Se almacenaron a 4° C hasta regresar al laboratorio. Se incubaron a temperatura ambiente durante una semana. Diario se revisaron las cajas y se seleccionaron colonias para aislar. Se realizaron cultivos séricos para obtener aislados puros. A éstos aislados puros se les picó en medios de cultivo nuevos para determinar su morfotipo. Se tomaron en cuenta cuatro caracteres morfológicos: color, forma, elevación y margen. El color toma toda la amplia gamma de colores posibles que presentan las bacterias por los pigmentos que poseen. La forma pudo ser circular, irregular, filamentosa o rizoidal. La elevación naciente, convexa, plana, umbonada o crateriforme. Y el margen pudo ser entero, ondulado, filiforme, rizado o lobulado (Apéndice 1).

Se seleccionaron aislados en base a su morfología, 100 de PG y 77 de PE. Se tomaron en cuenta aquellos morfotipos más dominantes y los menos representados para extraerles DNA y posteriormente secuenciar el gen 16S rRNA.

Extracción de DNA por microcolumnas

Se crecieron las cepas seleccionadas en cajas de Petri pequeñas con el medio de cultivo en que se aislaron para generar volumen celular. Se tomó una cantidad generosa de las cepas con un asa y se colocaron en tubos eppendorf con 500µL de MgSO₄ 50mM. Se centrifugó a 7500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min en centrifuga refrigerada, al final se retiró el sobrenadante y conservó el pellet. En 180µL de solución de lisis [Buffer de lisis (20mM Tris-HCl pH8; 2mM EDTA), Triton 1.2% y Lizosima 20mg/ml] se resuspendió el pellet e incubó 30 minutos a 37° C. Una vez finalizada la incubación se añadió del kit de extracción DNAeasy Blood & Tissue Kit Qiagen 20µl de proteinasa K y 200µl de buffer AL. Se incubó la mezcla a 70° C durante 30 min y al término se añadió 200µl de etanol 100% y se llevó al vortex. Toda la muestra se pipeteó y colocó en la minicolumna (incluidas en el kit), se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto, al final se recuperó la columna y se descartó el sobrenadante. Se colocó la columna en un tubo de 2ml (tubos de 2ml incluidos en el kit), se le añadió buffer AW1 500µl, se centrifugó a 8000rpm 1 min. Se repitió el paso anterior recuperando la columna que se colocó en otro tubo de 2ml y se le añadió buffer AW2 500µl y se centrifugó a 14 000 rpm durante tres

minutos. Se recuperó una vez más la columna y se colocó en tubos de 1.5ml (no incluidos en el kit), se agregó buffer AE, se incubó a temperatura ambiente 1 minuto y después se centrifugó a 8000 rpm 1 minuto. Sin descartar nada se repitió el paso anterior pero agregando agua ultra pura (Sigma®) 50µl. Al finalizar se desechó la columna y se recuperó el volumen obteniendo así 250µl de solución de DNA purificado.

Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA

Para preparar reacción de PCR 1x y poder amplificar el gen 16S rRNA se mezcló Taq polimerasa 0.2µl, buffer 5µl, MgCl₂ 3.25µl, dNTPs 2.5µl, primer 27 F (forward) 3µl, primer 1429 R (reverse) 3µl y H₂O ultra pura (Sigma®) 31.05µl, al final se añadió 2µl de DNA purificado para tener un volumen final de 50µl.

Los tubos con la reacción para las muestras se sometieron a 4 etapas de ciclos de elevación y descenso de temperatura para poder llevar a cabo la reacción de PCR en el termociclador. En la primera etapa se elevó la temperatura a 94° C. En la segunda etapa, como primer paso se mantuvo la temperatura a 94° C por 1 minuto; en el segundo paso desciende la temperatura a 52° C por 2 minutos; el tercer paso es subir la temperatura a 72° C por 3 minutos. La segunda etapa se repite 30 veces a manera de ciclos. La tercera etapa se mantuvo la temperatura a 72° C por 20 min. Finalmente la cuarta etapa (refrigeración) se baja la temperatura a 4° C hasta por 9h. Al término, los productos se almacenaron a -20° C hasta su secuenciación.

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a FinchLab con un solo primer (27 F) para obtener la secuencia parcial del gen. La secuencia se revisó en el sitio web de FinchLab (<http://uwhtseq.finchlab.com/Finch>).

Curación de secuencias

Las secuencias se descargaron del sitio web de FinchLab, se guardaron en formato fasta múltiple. En el sitio web de Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), en la opción Align se subió el archivo fasta múltiple con las secuencias para alinearlas con respecto a la base de datos Greengenes y entre ellas mismas, con longitud mínima de 500 bases y porcentaje de identidad mínimo de 10%. A cambio el sitio envió de vuelta un archivo fasta múltiple con las secuencias alineadas, con las bases y gaps; además archivos fasta múltiple con secuencias de organismos cultivables y de no cultivados alineados. Por un lado, las secuencias alineadas se subieron en el mismo sitio en la opción Compare para determinar la taxonomía de los aislados en base a la comparación de sus secuencias con las bases de datos que hay en Greengenes como opciones de taxonomía, a cambio el sitio envió la taxonomía de los aislados (Taxonomía de Hugenholtz) hasta nivel de género. Por otra parte ese archivo de secuencias alineadas se revisó manualmente en el programa BioEdit para refinar la alineación y detectar errores de alineación a los que los sistemas computacionales no pudieron ser sensibles. Una vez revisada la alineación, las secuencias se realinearon con el programa HMMER para mejorar la alineación y crear un perfil de alineación de secuencias de

aislados de Cuatro Ciénegas. Se revisó por última vez manualmente en BioEdit la alineación antes de calcular las matrices para estimar la diversidad de las localidades de muestreo.

Análisis estadísticos

Índices de Diversidad

La diversidad de una comunidad, como se mencionó antes, se compone de dos atributos, la riqueza y abundancia que describen la composición y estructura respectivamente.

Para describir la diversidad es necesario tener una referencia numérica que nos de un idea de que tan diversa es una comunidad e incluso poder hacer comparaciones. Las medidas de diversidad de especies se dividen en tres categorías. Primero se encuentran los índices de riqueza de especies que son una medida del número de especies en una unidad de muestreo definida. En segundo lugar tenemos los modelos de abundancia de especies, los cuales describen la distribución de abundancia de especies. Y por último los modelos de abundancia proporcional de especies que intentan integrar la riqueza y equidad en una sola expresión. En ésta última categoría se encuentran los índices de Shannon y Simpson (Magurran, 1988). Para fines de éste estudio se describen solo los índices de riqueza y abundancia relativas de especies.

Índices de riqueza de especies

Si el área de estudio puede ser bien definida en espacio y tiempo y las especies numeradas e identificadas, la riqueza de especies provee una medida de la diversidad con frecuencia empleada. Si en vez de obtener un catálogo de especies completo se tiene una muestra de la comunidad, es necesario distinguir entre riqueza numérica de especies, la cual es definida como el número de especies definidas en un número de individuos dado (Kempton, 1978), y la densidad de especies, la cual es el número de especies por área de colecta especificada (Hulbert, 1971).

Por supuesto no siempre es posible tener muestras del mismo tamaño por lo que el número de especies incrementará con el tamaño de la muestra y el esfuerzo de muestreo. Para atacar éste problema, Sanders desarrollo una técnica llamada rarefacción para calcular el número de especies esperado en las muestras si las muestras fueran de tamaño estandarizado (Magurran, 1988), mediante ésta técnica se puede comparar la diversidad entre sitios, tratamientos o hábitats que no han sido muestreados equitativamente. Para llevar a cabo esta aproximación, se toman submuestras de la muestra más grande y se calcula la riqueza esperada de especies en las submuestras basándose en la distribución de abundancias de la muestra mayor. El proceso se repite para submuestras de diferentes tamaños. Una curva de rarefacción muestra el cambio en el valor esperado de riqueza de especies de acuerdo al tamaño de la muestra (Gráfica 3).

En una comunidad muy diversa, la probabilidad de que las especies sean observadas más de una vez es baja y la mayoría de las especies son representadas por un individuo. El estimador de Chao usa la relación de marcaje captura-recaptura para estimar la diversidad como riqueza total de especies al agregar un factor de corrección al número observado de especies (Chao 1984). El estimador de Chao se calcula con la ecuación:

$$S_{\text{chao}} = S_{\text{obs}} + (n_1^2 / 2n_2)$$

donde S_{chao} es la riqueza total de especies (esperada), S_{obs} es el número total de especies observadas, n_1 es el número de especies observadas una vez y n_2 el número de especies observadas dos veces. Chao (1984) hace notar que este índice es particularmente útil para series de datos con poca abundancia en sus clases, como es el caso de los microbios (Eguiarte et al., 2007)

Índices de abundancia proporcional de especies

A pesar de la gran cantidad de información provista por los modelos de abundancia de especies, éstos se enfrentan a problemas de cálculo y requerir de computadoras para su rápida calculación y en ocasiones ser comparado con un índice de diversidad.

Los índices de abundancia relativa ofrecen un enfoque alternativo para la medición de la diversidad. Éstos índices toman en cuenta la equidad y la riqueza de especies; además, al no poder hacer suposiciones acerca de la manera en que subyace la distribución de abundancia de especies, se les llegó

a considerar medidas no paramétricas de la diversidad (Southwood, 1978). Los hay de dos tipos, aquellos basados en la teoría de la información, y los índices de dominancia.

Índices de información

Estos índices se basan en el razonamiento de que tanto la diversidad como la información pueden ser medidas en un sistema natural de igual manera que la información puede ser leída en un mensaje codificado. El índice de Shannon es uno de ellos, éste mide la entropía del sistema analizado.

El índice de Shannon es la entropía de la información de la distribución, tratando a las especies como símbolos y al tamaño relativo de sus poblaciones como probabilidades. Asume que los individuos muestreados son pertenecientes a una población infinitamente grande y muestreados de manera aleatoria, y que todas las especies están representadas en la muestra. Los valores de Shannon usualmente caen dentro del intervalo de 1.5 a 3.5 y rara vez sobrepasa 4.5 y es calculado a partir de la ecuación:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

donde p_i es la abundancia relativa en la i ésima especie.

Mediciones de dominancia

Éste tipo de índices está dirigido a hacia la abundancia de la especie más común. El más estudiado es el índice de Simpson el cual es la probabilidad que al tomar dos individuos al azar de una población infinitamente grande pertenezcan a la misma especie. Toma valores de 1 – D, o de 1 – 0, tomando en cuenta que 1 se refiere a que la comunidad se representa por solo una especie y 0 se refiere a que la comunidad tiene especies igualmente abundantes y la probabilidad de que al tomar dos individuos sean de la misma especie es nula dada la equilibrada abundancia de especies. Se calcula a partir de la fórmula:

$$D = \sum p_i^2$$

donde p_i es la abundancia relativa en la i ésima especie.

También se puede obtener una medición intuitiva de la dominancia con el índice de Berger-Parker el cual es fácil de calcular. Expresa la importancia proporcional de la especie más abundante. Si el valor de éste índice aumenta acercándose a 1 la comunidad poseerá menos equidad ya que una especie es la que domina y por consiguiente la comunidad es menos diversa a pesar de la riqueza de especies que posee. Se calcula con la fórmula:

$$d = N_{\max}/N$$

donde N_{\max} es el número de individuos de la especie más abundante y N es el número total de individuos de la comunidad.

Herramientas computacionales como apoyo en el estudio de comunidades

Las herramientas computacionales son de gran ayuda en el estudio de comunidades. Para fines de este proyecto se utilizó el programa mothur (Schloss et al., 2009), que es un software que describe y compara comunidades microbianas, posee una gran cantidad de funciones para llevar a cabo prueba de hipótesis ecológicas, sobre todo enfocándose en métodos que consideran unidades taxonómicas operacionales (OTUs) por sus siglas en inglés (operational taxonomic unit), además incorpora y mejora funciones de software previos como Unifrac, TreeClimber entre otros.

Dicho programa hace matrices basadas en el modelo oculto de Markov de las secuencias de 16S rRNA y a partir de ahí se efectúan cálculos de OTUs a diferentes valores de corte. Se tomó el valor de 0.030 ya que dicho valor de corte asigna géneros. Ya con el número de OTUs y secuencias incluidas por cluster se puede efectuar el cálculo de índices de diversidad (Simpson, Shannon, Chaos y Berger -Parker) y puntos para construir curvas de rarefacción.

Para editar secuencias de DNA y su manejo, BioEdit se ofrece como una herramienta que permite revisar grupos de secuencias alineadas por programas que cuentan con algoritmos de alineación como las herramientas ofrecidas por el sitio www.greenengenes.com que además de alinear, las secuencias de estudio se comparan con la base de datos del sitio web de secuencias alineadas y se puede asignar taxonomía y arrojar resultados de

búsqueda de secuencias de organismos cultivables y no cultivables que tengan un valor de similitud que el usuario puede predeterminar en la búsqueda.

Tomando en cuenta la complejidad del manejo de formulas y cifras, es necesario el uso de la computadora como herramienta de apoyo tanto para el manejo como para la visualización de los datos, y permite la descripción y comparación de la diversidad.

Estimación de diversidad

Las secuencias alineadas en archivo fasta se cargaron en el programa mothur para realizar el cálculo de las matrices de distancia para secuencias de cada una de las pozas. Una vez calculadas las matrices, éstas se cargaron en este mismo programa para obtener OTUs de clusters de secuencias con un valor de corte de 0.030 de divergencia. Con la lista de los OTUs calculados para ambas pozas, se cargaron estos datos en mothur para estimar los índices de diversidad de Shannon, Simpson, Chao y Berger - Parker, y se usaron para construir las gráficas de rarefacción

Construcción de filogenia

El archivo de las secuencias alineadas se cargó en el programa Arb junto con los archivos de secuencias de aislados y clonas que envió el sitio Greengenes

como los best hits de búsqueda en la base de datos y archivos con secuencias de librería de clonas de grupos abundantes bacterianos en Cuatro Ciénegas. La filogenia se construyó con el método de neighborjoining (bootstrap= 100). El programa Arb permitió crear una base de datos de las secuencias con datos relevantes como fecha de colecta, colector, origen de la secuencia, sitio de colecta, nombre de las cepas de las que provienen las secuencias y el morfotipo de los aislados que sirvió después para comparar los OTUs en una filogenia con solo las secuencia de los aislados de este estudio y los morfotipos presentados en cada uno de ellos.

Resultados

Efecto de los medios de cultivo en los aislados recuperados

En total se recuperaron 638 aislados con los medios de cultivo y gelificantes empleados. El mejor medio de cultivo resultó ser Medio marino (MMM) con agar como gelificante (Ag) en muestras provenientes de Poza Germán (PG). Aun con fitagel (P) solidificando los medios el número de colonias aisladas de la muestra de PG fue mayor al de la proveniente de Poza Eguiarte (PE). El número de colonias aisladas empleando Medio mínimo (Mmin) fue menor al conseguido con MMM. De PG con MMMAg se recuperaron 184 colonias, 113 con MMMP, 1 con MminAg y con MminP 29. De PE fueron 175 empleando MMMAg, 57 con MMMP, 41 con MminAg y con MminP 38 (tabla 1).



Figura 3. Tapetes microbianos y colonias en medios de cultivo

Colonias aisladas recuperadas en cada medio				
Gelificante	Poza Germán		Poza Eguiarte	
	Medio marino	Medio mínimo	Medio marino	Medio mínimo
Agar	184	1	175	41
Fitagel	113	29	57	38

Tabla 1. Número de aislados obtenidos por procedencia de la muestra y medio de cultivo y gelificante empleados. El número de colonias aisladas de PG es mayor al de EG. Se aislaron más colonias utilizando MMM y Ag como gelificante.

Caracterización de morfotipos coloniales

Se caracterizaron en base a color, forma, elevación y margen 74 morfotipos coloniales de los 638 aislados recuperados (apéndice 2). Se presentaron morfotipos abundantes y raros en aislados provenientes de ambas muestras y se clasificaron y numeraron (tabla 2), dentro de éstos, los más abundantes fueron M9 y M24 y también M1, M3, M4, M7, M8 y M27 estuvieron representados en un buen número de aislados (tabla 2). Estos morfotipos los presentaron en mayor número de cepas provenientes de muestras de ambas pozas. La mayoría de los morfotipos estuvieron representados en los aislados

crecidos en MMM, fueron 68 los caracterizados en este medio. En Mmin el número fue menor pues se representaron 31 de los 74 morfotipos caracterizados.

Hubo morfotipos que solo se lograron caracterizar en colonias cultivadas de muestras de solo una de las pozas y en un medio de cultivo y un gelificante en específico. Fueron 29 los morfotipos únicos descritos de aislados provenientes de PG y 16 los de PE; 42 morfotipos se caracterizaron para las cepas crecidas en MMM y 6 en Mmin; y 33 morfotipos se presentaron empleando Ag como gelificante y 8 con P (tabla 3).

Morfotipos representados en las pozas por medio de cultivo y gelificante									Total
Morfos	MMM				Mmin				
	Agar		Fitagel		Agar		Fitagel		
	PA	PR	PA	PR	PA	PR	PA	PR	
M1	4	15	15	3		1			38
M2		2		1		2			5
M3	13	11	5	1			1		31
M4	7	14	8	6		8		2	45
M5		1	1			3			5
M6	5	2							7
M7	5	19	15					7	46
M8	4	6	6	1			2	1	20
M9	11	15	7	31		11	1	9	85

Tabla2. Aislados representados por morfotipo en medios de cultivo gelificante y poza de procedencia.

Morfortipos representados en las pozas por medio de cultivo y gelificante									Total
Morfos	MMM				Mmin				
	Agar		Fitagel		Agar		Fitagel		
	PA	PR	PA	PR	PA	PR	PA	PR	
M10		1	1					1	3
M11		2						1	3
M12	3	2	12			1		1	19
M13	2	1	4	1		3		5	16
M14	1					3	7		11
M15		1	1			1	1		4
M16			1			1			2
M17						2			2
M18						1			1
M19	1					2			3
M20	2	1		2					5
M21	2	1		2					5
M22				1					1
M23	2	5		1				1	9
M24	35	23	13	3		2	5	4	85
M25			1					2	3
M26	13	3	1					1	18
M27	14	14	1	1			1	2	33
M28							1		1
M29							1		1
M30		3	1				1		5
M31	4	3							7
M32	5	8	4					1	18
M33	9	4	2						15
M34		1	3				3		7
M35	4	1					1		6
M36	1	1					1		3
M37		1							1
M38		4							4
M39		1							1
M40			2						2
M41			1						1
M42	5	1	1						7
M43	3		5						8
M44	1								1
M45	1								1

Tabla2. (continuación)

Morfotipos representados en las pozas por medio de cultivo y gelificante									Total
Morfos	MMM				Mmin				
	Agar		Fitigel		Agar		Fitigel		
	PA	PR	PA	PR	PA	PR	PA	PR	
M46	2								2
M47	1		1						2
M48	1								1
M49	2								2
M50	1								1
M51	1								1
M52	2								2
M53	1								1
M54	3	1							4
M55	3								3
M56	1								1
M57							3		3
M58	1								1
M59	1								1
M60	1								1
M61	1								1
M62	1								1
M63		1							1
M64	1								1
M65	1								1
M66		1							1
M67		1		3					4
M68		1							1
M69			1						1
M70		1							1
M71		1							1
M72	2								2
M73					1				1
M74		1							1
Total	184	175	113	57	1	41	29	38	638

Tabla2. (continuación)

Con respecto a la poza, los morfotipos únicos caracterizados para PG representan el 39.18% y los de PE el 21.62%. En cuanto al medio de cultivo

empleado, los morfotipos que presentaron aquellas colonias crecidas en MMM son 56.75% y los de Mmin 8.1%. El 44.59% de morfotipos únicos se lograron describir empleando Ag como gelificante y 10.81% usando P. Se describió mayor variedad de morfotipos en colonias provenientes de la muestra de tapete microbiano de PG y mediante el uso de MMM para cultivarlas y usando Ag como gelificante del medio. A pesar de ser menos los morfotipos únicos caracterizados usando Mmin y P, se logró recuperar un porcentaje considerable de cepas que solo crecen en ese medio y empleando solo ese gelificante.

Morfotipos que se presentan en cada poza, medio de cultivo y gelificante						
	PG	PE	MMM	Mmin	Ag	P
# Morfotipos	29	16	42	6	33	8

Tabla 3. Número de morfotipos caracterizados en aislados según su procedencia, medio y gelificante empleados en su cultivo

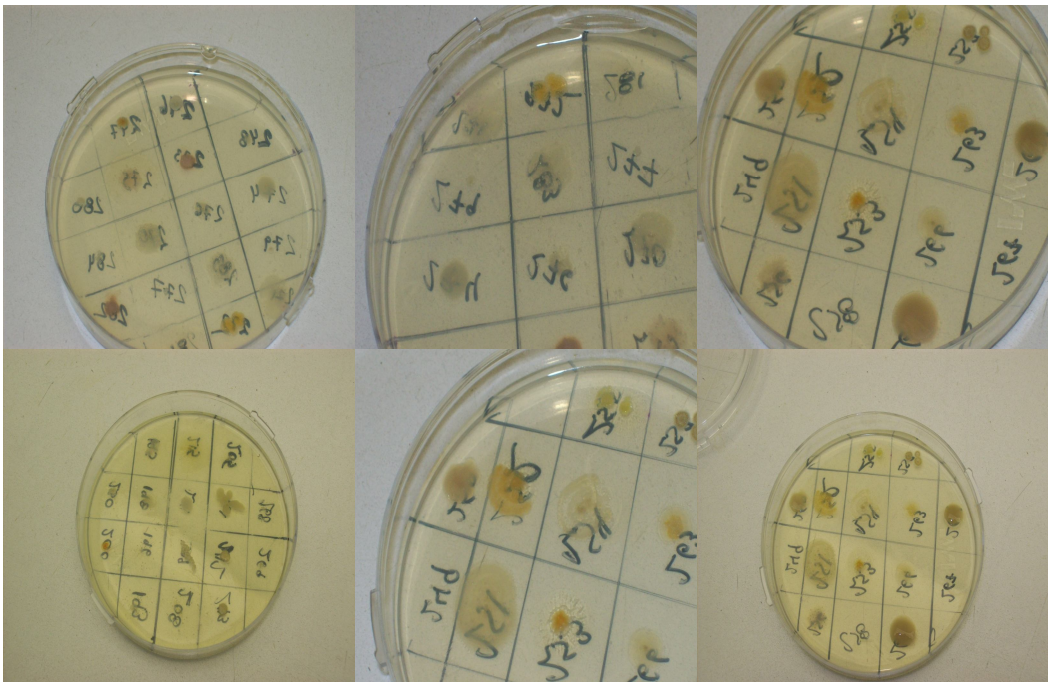


Figura 4. Morfotipos coloniales más abundantes

Taxonomía de los aislados

Se caracterizaron genéticamente utilizando al gen 16S rDNA a 177 aislados en total, 100 de PG y 77 de PE de las 638 cepas aisladas. Los aislados pertenecieron a cinco Phylum bacterianos Firmicutes, γ -Proteobacteria, Actinobacteria, α -Proteobacteria y Bacteroidetes. Los primeros cuatro se presentaron en ambas pozas y solo Bacteroidetes se encontró exclusivamente en PE.

En PG 44 de los 100 aislados pertenecieron a γ -Proteobacteria, 32 a Firmicutes, 16 fueron Actinobacteria y 8 a α -Proteobacteria. De los 77 aislados de PE, 39 fueron Firmicutes, 25 γ -Proteobacteria, 9 α -Proteobacteria, 2 Actinobacteria y 2 Bacteroidetes.

Las γ -Proteobacteria de PG se compusieron de 32 *Aeromonas*, 9 *Pseudomonas*, 2 *Rheihheimeria* y 1 *Shewanella*. Firmicutes se compuso de 30 *Bacillus*, 1 *Planomicrobium* y 1 *Planococcus*. Actinobacteria se representó por 6 *Arthrobacter*, 3 *Kocuria*, 2 *Corynebacterium*, 2 *Agrococcus*, 1 *Microbacterium*, 1 *Knoelia* y 1 *Nocardodides*. Las α -Proteobacteria que se caracterizaron son 3 *Agrobacterium*, 3 *Rhodobacter*, 1 *Roseomonas* y 1 *Sphingomonas*.

Los Firmicutes en PE se trataron de 33 *Bacillus*, 5 *Planococcus* y 1 *Paenibacillus*. Las γ -Proteobacteria fueron 13 *Pseudomonas*, 6 *Rheinheimeria*, 3 *Aeromonas*, 2 *Vibrio* y 1 *Idiomarina* y 1 *Halomonas*. Las α -Proteobacteria se integraron por 4 *Rhodobacter*, 2 *Agrobacterium* y 2 *Devosia*. En cuanto a las Actinobacterias se integró por 1 *Brachybacterium* y 1 *Microbacterium*. Bacteroidetes presentó 2 *Algoriphagus*.

De las secuencias de 16S rRNA de los 177 aislados de ambas pozas se tuvieron 54 clusters de 24 géneros diferentes de bacterias, de los cuales 26 fueron exclusivos de PG, 20 de PE y 8 compartidos entre las pozas (gráficas 1 y 2).

Correlación Grupo taxonómico – Morfotipo colonial

Se caracterizó gran número de morfotipos coloniales para las cepas recuperadas. En la mayoría de los aislados no se encontró una correspondencia clara entre la taxonomía determinada a través de la secuencia del gen 16S rRNA y el morfotipo que presentaron. Los grupos taxonómicos más abundantes demostraron ser morfológicamente versátiles ya que presentan más de un morfotipo colonial como es el caso de *Bacillus* y *Aeromonas*. Casos excepcionales como el de *Algoriphagus* y *Devosia* en los cuales los aislados presentaron un solo morfotipo para su grupo taxonómico.

De los 100 aislados caracterizados de Poza Germán se determinaron 18 géneros bacterianos, siendo los más abundantes *Bacillus*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Éstos grupos no solo fueron los más abundantes sino quienes mayor versatilidad morfológica presentaron. De los 77 aislados caracterizados de Poza Eguiarte se determinaron 15 géneros bacterianos, siendo los más abundantes *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Reinheimera* y *Aeromonas*. Estos grupos fueron morfológicamente versátiles (tabla 4).

Taxonomía y número de morfotipos por OTU			
Taxón	OTU	#Morfotipos	Morf. Compartidos
<i>Aeromonas</i>	PG1	13	0
	PE1	2	
<i>Agrobacterium</i>	PG1	3	0
	PE1	1	
<i>Agrococcus</i>	PG1	1	0
<i>Algoriphagus</i>	PE1	1	0
<i>Arthrobacter</i>	PG1	3	0
	PG2	1	
<i>Bacillus</i>	PG1	1	12
	PG2	3	
	PG3	1	
	PG4	1	
	PG5	1	
	PG6	1	
	PE1	3	
	PE2	2	
	PE3	1	
	PE4	2	
	PC1	7	
	PC2	12	
	PC3	4	
	PC4	2	
PC5	5		
<i>Brachybacterium</i>	PE1	1	0
<i>Corynebacterium</i>	PG1	2	0
<i>Devosia</i>	PE1	1	0
<i>Halomonas</i>	PE1	1	0
<i>Idiomarina</i>	PE1	1	0

Tabla 4. Los 54OTUS en 24 géneros clasificados (cut off = 0.030). PG= Poza Germán
PE= Poza Eguiarte. PC= Compartidos

Taxonomía y número de morfotipos por OTU			
Taxón	OTU	#Morfotipos	Morf. Compartidos
<i>Knoelia</i>	PG1	1	0
<i>Kocuria</i>	PG1	2	0
	PG2	1	
<i>Microbacterium</i>	PG1	1	0
	PE1	1	
<i>Nocardioides</i>	PG1	1	0
<i>Paenibacillus</i>	PE1	1	0
<i>Planococcus</i>	PG1	1	2
	PE1	1	
	PE2	2	
	PC1	2	
<i>Pseudomonas</i>	PG1	3	3
	PG2	1	
	PC1	4	
	PC2	2	
	PC3	2	
<i>Rheinheimera</i>	PG1	2	0
	PE1	4	
<i>Rhodobacter</i>	PG1	1	1
	PG2	1	
	PE1	2	
	PE2	1	
<i>Roseomonas</i>	PG1	1	0
<i>Shewanella</i>	PG1	1	0
<i>Sphingomonas</i>	PG1	1	0
<i>Vibrio</i>	PE1	2	0

Tabla 4. Continuación

Análisis de Diversidad

Con los perfiles de alineación de secuencias se determinaron 54 clusters a un valor de corte de 0.030 de divergencia entre secuencias; cada cluster se consideró como un OTU. En PG se encontraron 26 OTUs, en PE 20 OTUs, y 8 OTUs se presentaron tanto en PG como en PE. A partir de los 54 OTUs determinados, se calcularon los puntos para construir las curvas de rarefacción

de PG y PE (gráfica 3). Se espera un mayor número de OTUs en PG que en PE. Según las curvas de rarefacción se espera encontrar 35 OTUs si se hiciera un muestreo aleatorio con una muestra del mismo tamaño de la tomada en este estudio y 29 para PE. Las curvas no hicieron asíntota lo que sugiere que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para caracterizar el total de especies de las comunidades muestreadas.

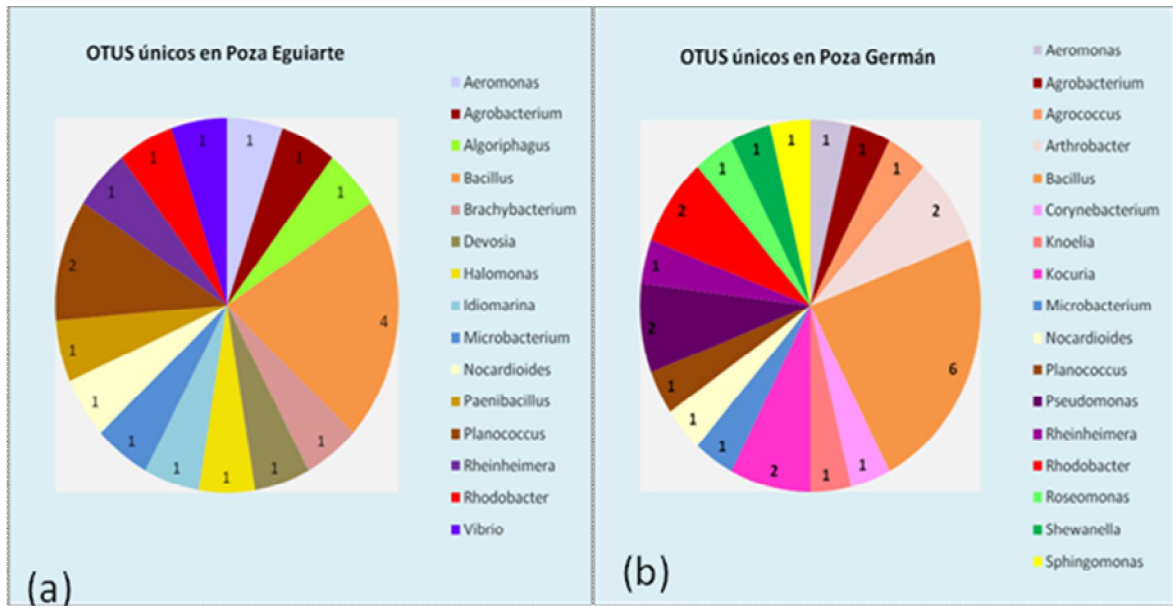
También se calcularon los índices de diversidad para PG y PE. Éstos fueron Chao, Shannon, Simpson y Bergerparker, con un valor de corte de secuencia de 0.030 (tabla 5).

Índices de Diversidad				
	chao	shannon	simpson	bergerparker
PG	70	2.8391	0.1168	0.3200
PE	34.5	3.0875	0.0458	0.1169

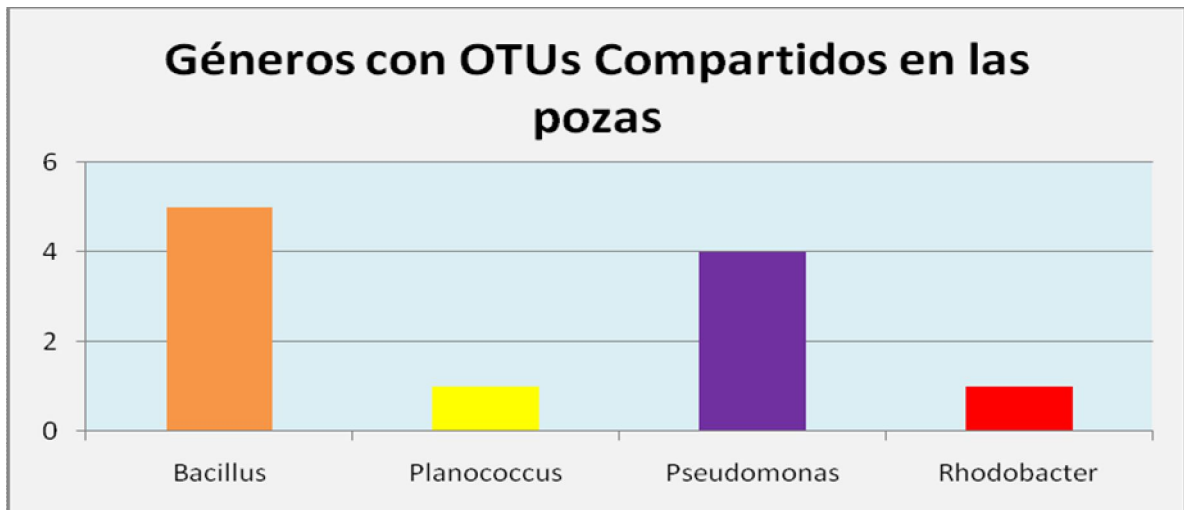
Tabla 5. Índices de diversidad calculados a partir de la matriz construida con el programa Mothur (valor de corte 0.030).

Al igual que con las gráficas de rarefacción, se espera mayor riqueza de OTUs en PG que en PE según el índice de Chao. En PG el índice de Chao fue $Chao_{PG0.010} = 109.00$ y en PE el índice de Chao fue $Chao_{PE0.010} = 56.27$. La riqueza de OTUs es mayor en PG que en PE, sin embargo, una tercera parte de la comunidad de PG está dominada por el OTU más abundante repartiéndose las abundancias relativas de los OTUs de manera menos equilibrada. PE presenta un mayor equilibrio en la distribución relativa de abundancia de los OTUs, el más abundante representa poco más de una décima parte del total de la comunidad, siendo esta abundancia relativa muy similar al de otros OTUs de esa comunidad que representan también un décimo de la totalidad de la comunidad y el resto de los OTUs presentan

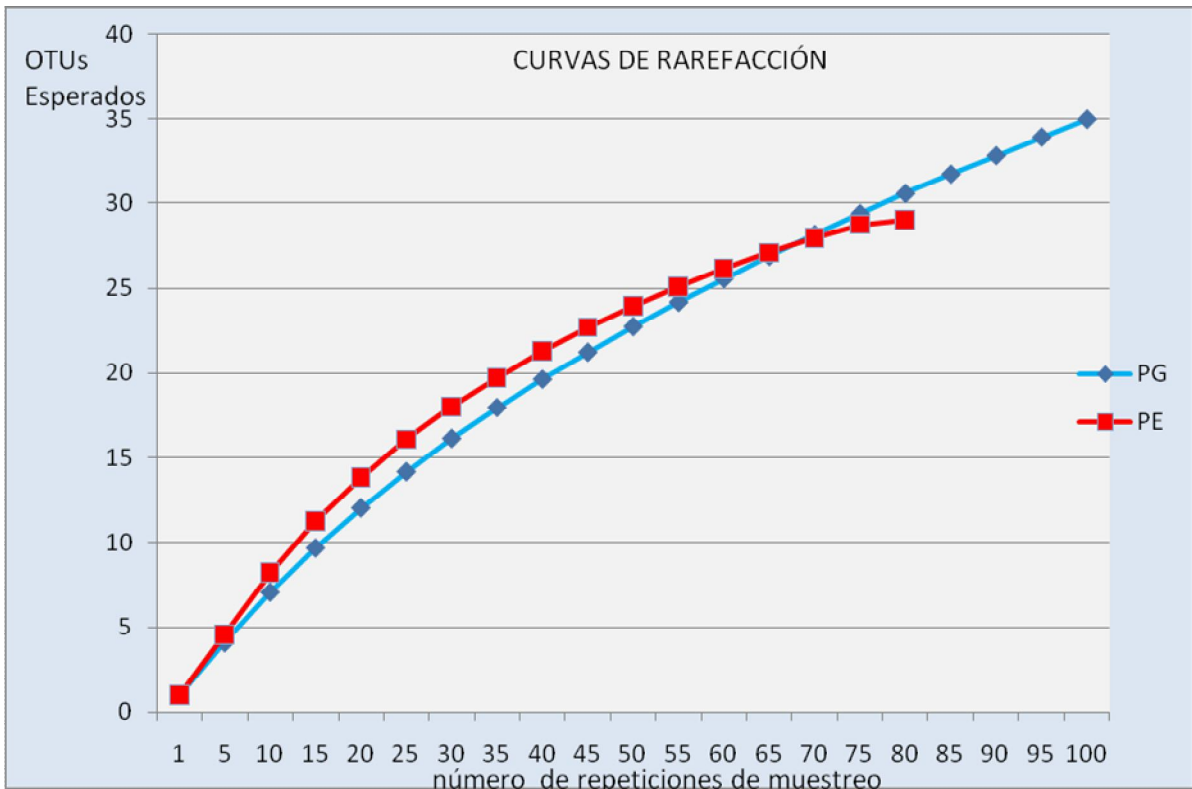
abundancias muy semejantes entre si sin tener una clara dominancia lo cual aumenta la entropia de esa comunidad.



Gráfica 1. OTUs únicos en cada una de las pozas (a) Poza Eguiarte (b) Poza Germán



Gráfica 2. Géneros bacterianos cuyos OTUs se componen de secuencias de 16S rRNA de aislados provenientes de ambas pozas.



Gráfica 3. Curvas de rarefacción para Poza Germán (PG, azul) y Poza Eguiarte (PE, rojo). Valor de corte 0.030; se espera mayor riqueza de especies en Poza Germán. Las curvas no hacen asíntota por lo que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para describir el total de la comunidad.

Discusión

MMM y Ag lograron recuperar mayor número de aislados y presentan más morfotipos en especial de PG.

El crecimiento microbiano en gran medida está dado por los nutrientes disponibles. El MMM es un medio enriquecido indefinido, posee gran cantidad de fuentes alimenticias y energéticas disponibles para el crecimiento de células microbianas. A diferencia de MMM el Mmin es un medio definido, el cual posee solo dextrosa como fuente de carbono y sales inorgánicas; la disponibilidad de

nutrientes es poca, lo cual hace difícil el crecimiento de mayor número de colonias y es por ello que se presentó mejor crecimiento microbiano en MMM.

Las bacterias de tapete de PG muestran cierta versatilidad al aprovechar las fuentes nutricionales de los medios con respecto a las de PE, algún componente indeterminado en la peptona y el extracto de levadura podría estar favoreciendo el crecimiento de las bacterias de una u otra poza.

En un inicio se pensaba que usando P como gelificante por su origen vegetal crecerían más bacterias o al menos cosas diferentes a las recuperadas en Ag. A pesar de los metabolitos secundarios inhibidores de crecimiento bacteriano contenidos en el extracto de Ag, éste gelificante en combinación con los componentes del MMM funcionaron bien en la obtención de aislados bacterianos. En cambio P en medio FS1 se mezcla con sales de iones divalentes que favorece la solidificación del medio y soluciones vitamínicas y de minerales, además de extracto de levadura (Stott et al., 2008). Ésta combinación podría estar optimizando la recuperación de aislados sobre superficie de P de tal manera que los componentes de MMM y Mmin enmascaran su desempeño.

Hay mayor cantidad de fuentes nutricionales en MMM que pueden ser aprovechadas de diferentes maneras dada la versatilidad fisiológica de los aislados y así modificar el medio en más de una forma para presentar esos patrones de crecimiento colonial. El menor número de morfotipos caracterizados en Mmin quizá está determinado por la limitación de fuentes energéticas y nutricionales, al ser escasos los recursos menos bacterias son capaces aprovecharlos para su crecimiento.

Probabilísticamente, en un número mayor de aislados se presentan mayor número de morfotipos que es lo que pasa en el caso de las cepas aisladas de tapete de PG, al ser mayor el número de ellas, por azar es más probable que aquellas bacterias menos abundantes con cierta plasticidad morfológica puedan crecer y ser caracterizadas. De manera intrínseca los miembros de la comunidad de PG poseen mayor plasticidad fenotípica pues presentan gran variedad de formas de crecer sobre los medios de cultivo en comparación con los provenientes de PE.

Los aislados presentan gran versatilidad morfológica y dominancia numérica de pocos morfotipos, compartiendo caracteres dentro de los grupos.

La gran versatilidad morfológica se debe a que los patrones morfológicos de las colonias están dados por las condiciones de los medios de cultivo, así como la variación genética y fisiológica de las bacterias. La variedad de colores y formas de las colonias bacterianas tal vez están representando metabolismos o modos de llevar a cabo las funciones biológicas de las bacterias dependiendo las condiciones de los medios de cultivo y de incubación. Además las bacterias modifican el medio de cultivo en tanto van desarrollándose como colonia, determinando así las características morfológicas de sus colonias a manera de patrones (Tcherpakov et al., 1999).

Los morfotipos coloniales son el reflejo de la plasticidad fenotípica y diversidad genotípica de las células bacterianas. El que un morfotipo esté mejor representado que aquellos menos abundantes en los aislados no quiere decir

que sea una forma de adaptación de las bacterias de la comunidad ya que en su medioambiente las bacterias viven como células libres en columna de agua o en agregados laminados dentro del tapete microbiano y no formando colonias coloridas en una gamma amplia de formas perceptibles a nuestra vista.

Las unidades formadoras de colonias al entrar en contacto con la superficie del medio de cultivo crecen en las formas posibles que su genética les permita. Además la presencia de estructuras celulares de movimiento como los flagelos y la secreción de sustancias les permiten a las bacterias desplazarse sobre la superficie del medio y experimentar diversas formas de crecimiento colonial.

Los aislados de determinados cluster filogenéticos comparten caracteres morfológicos, es decir, en algunas ramas de la filogenia, los morfotipos de los aislados, por ejemplo en forma y color son muy parecidos, en lo que varían es en los márgenes o la elevación. Se sabe que las bacterias no crecen a la misma velocidad, aun siendo la misma especie por lo que diferentes aislados con morfotipos semejantes podrían poseer un mismo patrón de crecimiento y solo se estaría describiendo el mismo morfotipo en diferentes estados de desarrollo de la colonia. La variación morfotípica de los aislados está dada de manera intrínseca por la genética y la fisiología así también por la plasticidad fenotípica, por otro lado las condiciones del medio de cultivo y la interacción con colonias vecinas. Además la caracterización de las colonias depende como se mencionó antes de su estado de desarrollo. No obstante la estandarización de escalas para asignar color a las colonias, la elevación, margen y forma de la colonia carecen de estandarización por lo que la caracterización morfotípica de las colonias es subjetiva y se sesga por la percepción del observador.

La morfología no es representante ecotaxonómico de los grupos bacterianos. Los caracteres morfológicos de grupos taxonómicos que se caracterizaron no hacen ningún sentido con su ecología. Muchas veces las condiciones del sitio donde viven las bacterias no son parecidas a la de los medios de cultivo empleados para aislarlas. Crecen de determinadas formas dependiendo el medio de cultivo y la condiciones de incubación, sin embargo no sabemos de que manera se desempeña en su medioambiente pues como se mencionó antes, en su ambiente son células que viven en laminaciones organosedimentarias de tapete microbiano y no tendría que ver si al establecerse en la caja Petri crece en agregados circulares o si son planos y filiformes.

Al parecer, los resultados sugieren que los medios de cultivo empleados son buenos para crecer heterótrofos, especialmente aquellas bacterias que se sabe se han aislado de sitios con concentraciones altas de sal. Con anterioridad en otras líneas de investigación dentro del grupo de trabajo se han utilizado éstos y otros medios de cultivo y, grupos dominantes como las *Bacillus* y no abundantes como las Actinobacteria resultaron ser abundantes en los sitios muestreados en el valle de Cuatro Ciénegas (Souza et al, 2004; Souza et al., 2006 en Cerritos 2008); y géneros de bacterias marinas como *Rheinheimera*, *Rhodobacter* y halófilas y halotolerantes como *Halomonas* y *Vibrio* también han sido aisladas de los cuerpos de agua del valle. *Pseudomonas* es otro de los géneros que se ha encontrado con cierta abundancia en Cuatro Ciénegas, es un microorganismo capaz de vivir en un amplio espectro de sitios; y *Aeromonas* que es común en todos los cuerpos de agua en el mundo, tanto de ambientes salinos como dulceacuícolas, en ocasiones están asociados a enfermedades

de peces (Janda et al. 2010) fue de los OTUs representados por gran número de aislados. Las secuencias de 16S rRNA asocian a las cepas de *Aeromonas* con secuencias ambientales obtenidas en el proyecto de metagenómica de PG y a secuencias de organismos no cultivables patógenos de peces, éste dato es de relevante resultando de interés, a futuro, determinar si en realidad éstas bacterias son patógenas de peces.

Géneros tales como *Bacillus* y *Planococcus* son organismos capaces de generar esporas. Además de ser estructuras de resistencia las esporas sirven para llevar a cabo la dispersión. OTUs de secuencias de aislados pertenecientes a éstos géneros se presentaron tanto en PG como PE. La capacidad dispersiva de estas bacterias les permite habitar en ambos sitios. Las pozas compartieron OTUs de *Pseudomonas*. Éste género bacteriano se ha aislado de una gran variedad de ambientes, incluso en el aire. No sería extraño que estas bacterias se dispersaran de una poza a otra y por eso les encontremos en ambos sitios.

A pesar de las diferencias en la química del agua de las pozas podemos encontrar mismos OTUS en ambos sitios. Los esporuladores *Bacillus* y *Planococcus* si no les favorecieran del todo las condiciones de las pozas podrían mantenerse latentes como esporas que una vez en el medio de cultivo se liberan y proliferan. *Pseudomonas* son microorganismos metabólicamente versátiles que pueden habitar gran cantidad de ambientes e incluso explotar diversas fuentes energéticas por lo que no es de sorprenderse que se encuentren OTUs en las dos localidades de muestreo.

A pesar de la gran versatilidad morfológica de *Bacillus*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*, no se encontró una relación entre el número de OTUs y los aislados que presentan los morfotipos. Ya se ha mencionado anteriormente que esta versatilidad morfológica son formas de crecer sobre los medios de cultivo utilizados y no refleja adaptaciones ni la ecología de las bacterias, solo son grupos con gran plasticidad fenotípica.

Por otro lado, el gran número de aislados representados en estos géneros de manera azarosa eleva la probabilidad de muestrear bacterias pertenecientes al mismo OTU con cierto grado de plasticidad fenotípica, de tal manera que al estar contenidos más aislados en un OTU se tendrá mejor representada la variedad de formas en las que un linaje de bacterias puede crecer.

Mayor riqueza de especies en Poza Germán cuya comunidad está dominada por una OTU en un tercio de la comunidad, la comunidad de Poza Eguiarte es más equitativa.

Las comunidades de tapete microbiano de PG y PE poseen riqueza diferente de OTUs. Para dos muestras de tamaño diferente las curvas de rarefacción permitieron calcular el número esperado de OTUs para cada comunidad. Efectivamente el número de OTUs de PG fue mayor al de PE lo cual fue consistente con el número esperado de OTUs en la gráfica de rarefacción y también con el índice de Chao.

Ambas comunidades según sus índices, son muy diversas, sin embargo, se necesita mayor esfuerzo de muestreo para lograr representar mejor a los

integrantes de la comunidad debido al mayor número de OTUs esperado que el que se ha observado.

La diversidad es mayor en PE en términos de uniformidad de abundancia de los OTUS. En PG la probabilidad de que al tomar de manera aleatoria dos organismos pertenezcan al mismo OTU es más alta que en PE por lo que las frecuencias de cada OTU están repartidas de manera más desigual, ya que una tercera parte de la comunidad está dominada por *Aeromonas* que es el OTU más abundante y otra proporción menor por algunos *Bacillus* y *Pseudomonas*, y el resto por los demás grupos taxonómicos caracterizados con pocos aislados representando sus OTUs. En PE alrededor del 11% de la comunidad está dominada por un OTU de *Bacillus* que es el más abundante, y otros OTUs de *Bacillus* y *Pseudomonas* presentan alrededor del 10% de la comunidad. El resto de la comunidad se reparten las frecuencias en grupos menos abundantes de manera más equitativa ya que las frecuencias de cada OTU son muy parecidas y la probabilidad de tomar dos organismos y pertenezcan al misma OTU es muy baja dada la alta entropía que está caracterizando esa localidad.

Los parámetros ambientales y la diversidad.

Debe tomarse en consideración las variables ambientales de ambas localidades, ya que éstas podrían estar determinando la diversidad de organismos. La temperatura promedio para PG y PE fue de 30.06 y 38.40 respectivamente; el pH 6.46 y 7.4; y la conductividad 2.55 y 82.68 (datos no

mostrados). La diferencia más grande entre valores de cada una de las pozas se presentó en la conductividad, quizá este parámetro ambiental, al igual que en el trabajo llevado a cabo por Cerritos en 2008 sea la variable determinante de la diversidad de organismos en las comunidades muestreadas. Si bien el objetivo del presente trabajo no fue buscar la correlación de componentes ambientales y la diversidad de linajes bacterianos encontrados, pero vale la pena resaltar esta observación y de ser posible tomar mediciones posteriores y llevar a cabo pruebas de correlación de variables y diversidad bacteriana e intentar resolver la incógnita de si solo la conductividad afecta de manera directa la diversidad biológica encontrada en un determinado sitio o si la temperatura, pH y oxígeno disuelto afectan del mismo modo que la conductividad.

Estudio de comunidades dependiente de cultivos y metagenómica, dos enfoques complementarios

El enfoque independiente de cultivo abre una nueva puerta para el entendimiento de la estructura y composición de comunidades. Como sabemos, el porcentaje de microorganismos que se puede cultivar en condiciones de laboratorio es muy bajo en comparación con la cantidad de bacterias que habitan un sitio. Ambos enfoques tienen ventajas y limitaciones a los que se enfrentan y en ocasiones la información conjunta de éstos se complementa dando una panorámica más completa de la composición y funcionalidad de las comunidades microbianas.

El enfoque dependiente de cultivos nos permite conocer atributos de las bacterias tales como la morfología, fisiología y genética, además de su potencial ecológico y biotecnológico. Con los aislados se puede tener una idea más certera de la funcionalidad de la comunidad a través de estudios bioquímicos con las cepas. También de los requerimientos nutricionales para el crecimiento de ellas y poder inferir los requerimientos de grupos cercanos al de las cepas aisladas.

El metagenoma nos da información taxonómica de toda esa diversidad no cultivable y además, se puede saber que rutas metabólicas se llevan a cabo en una comunidad y de que manera intervienen en los ciclos biogeoquímicos, sin embargo la limitante es que no se sabe con certeza que organismos llevan a cabo las funciones. Con el enfoque dependiente de cultivos si podemos saber esos detalles y no quedar solo en inferencias especulativas. Por ejemplo, con el enfoque clásico se determina si algún microorganismo de interés es cultivable.

Un problema frecuente en la metodología metagenómica es la contaminación con compuestos polifenólicos de DNA purificado que interfieren con las modificaciones enzimáticas del DNA (Streit et al., 2004). Se carece de estandarización de métodos para la obtención de datos. Los protocolos de obtención de DNA son muchos y varían en sesgo y eficiencia dada las diferentes cantidades de muestra empleada en cada uno de ellos. Al igual que con la extracción de DNA de cepas aisladas, los protocolos de extracción de muestras ambientales son más eficientes para obtener el DNA de ciertos tipos de células, desde la lisis celular, cierto porcentaje de la muestra no responde a

los reactivos del protocolo. Además los protocolos se enfocan en lisis de células y no se toman en cuenta la presencia de quistes y esporas.

La sensibilidad de los métodos de secuenciación como el *shotgun* a la abundancia relativa de las especies de una comunidad también representa una inconsistencia ecológica ya que se podría estar sobre representando DNA de especies que en número son muy abundantes pero no necesariamente claves dentro de la comunidad. El ensamble de las secuencias en ocasiones no es de todo confiable dada la variabilidad intraespecífica tomando en cuenta los elementos móviles y polimorfismos dentro de las secuencias, e incluso la corta longitud de fragmentos de DNA obtenidos. Esta fragmentación de datos hace difícil la reconstrucción del rompecabezas de DNA de la comunidad y queden huecos informativos.

Es gran cantidad de información la que aporta la metagenómica, los costos de secuenciación de DNA disminuye en tanto se desarrollan nuevas tecnologías de secuenciación. Se genera más información de la que se puede hacer análisis, pues no se tiene la capacidad de cómputo ni recursos humanos para llevar a cabo el ensamble de la gran cantidad de fragmentos de DNA (Bonilla et al., 2008). Como era de esperarse, las bacterias de PG que se lograron cultivar fue un porcentaje pequeño en comparación de lo que se tiene en cuenta en el metagenoma Mientras que un metagenoma de una poza vecina a PE (Poza Valeria) tiene mucho menos diversidad que PG (Bonilla et al., en preparación), con una representación muy alta de heterótrofos aerobios (*Pseudomonas*) por lo que es posible que las muestras cultivadas representen mejor a este metagenoma. Lo que es interesante es que tanto en los cultivos como en el metagenoma, PG es muy diversa. Mientras que en PE, los OTUs de

Pseudomonas fueron de los más abundantes, siendo de alguna forma consistente con librerías de clonas realizadas en esa misma localidad (Peimbert datos no publicados), aunque dichos datos determinaron a *Pseudomonas* como los más abundantes, los medios de cultivo empleados captaron solo una parte de esa diversidad existente de *Pseudomonas*, y resulta atractiva la idea de emplear medios de cultivo específicos para éstos microorganismos como lo hizo Escalante en 2008.

Clusters pertenecientes a *Pseudomonas*, filogenéticamente están relacionados a linajes previamente encontrados en otros sistemas acuáticos en el valle de Cuatro Ciénegas como es el caso de los reportados por Escalante en 2008. Uno de los clusters, con cepas aisladas de PG y PE, crecidas solo en MMMP y a su vez es grupo hermano de un cluster relacionado con *Pseudomonas mendocina* cuyo aislado proviene de PG y creció en MMMP; y otro grupo relacionado con *P. cuatrocieneguensis*, con aislados de PG y PE y crecidos en MMMAg. Si se desea aislar *Pseudomonas* preferencialmente se debe emplear MMM y no Mmin, y podemos ver que dos de estos linajes previamente reportados se pueden aislar mediante el uso de P como gelificante.

La gran abundancia de heterótrofos de los aislados de PG no es consistente con el metagenoma de tapete microbiano, pues según la base de datos metagenómica la comunidad está dominada por fotótrofos aerobios y en menor proporción por heterótrofos. Ese pequeño porcentaje de la diversidad se está recuperando en los medios de cultivo. Se sabe que esa pequeña porción está dominada por *Aeromonas*, *Bacillus* y *Pseudomonas* y diversos géneros de Actinobacteria y α – Proteobacteria y filogenéticamente hay OTUs compartidos de los grupos más abundantes entre las pozas.

El refinamiento y búsqueda de nuevas técnicas de cultivo sería de gran ayuda en el entendimiento de la estructura, composición y funcionalidad de las comunidades dentro de Cuatro Ciénegas. La búsqueda de formas de enriquecer medios de cultivo a partir de los datos metagenómicos de genes presentes en la comunidad nos da una idea de los requerimientos nutricionales de los organismos, aunque un porcentaje grande de los genes dentro de los genomas no se les conozca función (Nichols D., 2007). Podría ser una oportunidad de poner a prueba el conocimiento teórico de la comunidad y tratar de crecer mayor número de grupos bacterianos para poder disipar las dudas que quedan sobre la funcionalidad de las comunidades. Una forma sería el empleo de medios de cultivo para el crecimiento de gremios funcionales como reductores de azufre y fijadores de nitrógeno, fotótrofos e incluso las técnicas de cultivo *in vivo*. El uso de gelificantes diferentes al agar podría abrir nuevas puertas en la recuperación de cepas cultivadas en medios semilíquidos. Se ha logrado cultivar miembros de un *Phylum* candidato previamente no cultivable OP11 y miembros de grupos ya caracterizados con algunos integrantes no cultivados antes como Actinobacteria (Stott et al., 2008) lo que nos dice el valor de explorar nuevas fronteras en las técnicas de cultivación y descubrir esa microbiota rara de la cual poco se sabe a pesar de los enfoques alternos al de los cultivos.

Si bien el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para conocer el total de OTUs de ambas localidades como lo sugieren las gráficas de rarefacción, al menos sabemos que aumentando el número de aislados para determinar su taxonomía habrá mayor riqueza en PG que en PE con esta misma

metodología, así que se puede incluir nuevos métodos para listar un mayor número de grupos taxonómicos de bacterias cultivables.

En perspectiva, la realización de pruebas bioquímicas y la comparación de éstos datos con los del metagenoma nos permitirán entender mejor la funcionalidad de los tapetes microbianos y de que manera intervienen las bacterias en el funcionamiento del ecosistema al que pertenecen. Ambos enfoques se complementan y es importante mejorar las metodologías de ambos para conocer mejor las comunidades de tapetes microbianos de Cuatro Ciénegas.

Referencias

1. Whilliam B. Withman, David C. Coleman, and William J. Wiebe. *Prokaryotes: The unseen majority*. PNAS June 9, 1998 vol. 95 no. 12: 6578-6583
2. Christian S. Riesenfeld, Patrick D. Schloss, and Jo Handelsman. *Metagenomics: Genomic Analysis of microbial communities*. Annual review of genetics, December, 2004 vol. 38: 525 - 552
3. Michael S. Rappé and Stephen J. Giovannoni. *The uncultured microbial majority*. Annual review of Microbiology, July 30, 2003 Vol. 57: 369-394
4. Karsten Zengler, Marion Walcher, Greg Clark, Imke Haller, Gerardo Toledo, Trevin Holland, Eric J. Mathur, Gary Woodnutt, Jay M. Short and Martin Keller. *High-throughput cultivation of microorganism using microcapsules*. Methods in enzymology, October, 2005, vol. 397 124-130
5. Janssen Peter. *Identifying the dominant soil bacteria taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes*. Applied and environmental microbiology, March 2006, Vol. 72, No. 3: 1719-1728
6. Madigan Michael, Martinko Jhon., and Parker Jack. *Brock. Biología de los microorganismos*. 2004, Pearson-Prentice Hall, Madrid, España. 1022 pag. Ills.
7. Woese C. R., and Fox G. E. *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. PNAS November 1, 1977 vol. 74 no. 11: 5088-5090
8. Pace Norman, Olsen Gary, and Woese Carl. *Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent*. Cell may, 1986, vol. 45: 325-326.
9. Cole J., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R., Kulam-Syed-Mohideen A., McGarrell D., Marsh T., Garrity G., and Tiedje J. *The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNS analysis*. Nucleic acids research, October, 2008, vol. 37: D141-D145.
10. Harris J., Kelley S., and Pace N. *New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11*. Applied and environmental microbiology, 2004, vol. 70: 845-849.
11. Hugenholtz P., Goebel B., and Pace N. *Impact of cultured-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*. Journal of bacteriology, September, 1998, vol. 180 no. 18: 4765-4774
12. Stott M., Crowe M., Mountain B., Smirnova A., Hou S., Alam M., and Dunfield P. *Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand*. Environmental microbiology, 2008, vol. 10 no. 8: 2030-2041.
13. Nold S., Kopczynski E, and Ward D. *Cultivation of chemoorganotrophic proteobacteria and gram-positive bacteria from a hot spring microbial mat*. Applied and environmental microbiology, November 1996, Vol 62 No. 11: 3917-3921
14. Burns D., Camakarlis H., Janssen P., and Dyall-Smith M. *Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarcheal groups in Australian Crystalizer pond*

- are cultivable. *Applied and environmental microbiology*, September, 2004, vol. 70 no. 9: 5258-5265.
15. Sinbahan J., Kurth E. *Community analysis of a mercury hot spring supports occurrence of domain-specific forms of mercuric reductase*. *Applied and environmental microbiology*, December 2005, vol. 71 no. 12: 8836-8845.
 16. Marteinson V., Hauksdóttir S., Hobel C., Kristmannsdóttir H., Hreggvidsson G., and Kristjánsson J. *Applied and environmental microbiology*, September, 2001, vol. 67, no.9: 4242-4248.
 17. Brambilla E., Hippe H., Hagelstein A., Tindall B., and Stackerbrandt E. *16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo dry valleys, Antarctica*. Springer-Verlag, 2001, vol.5 no.1: 23-33.
 18. Van Trappen S., Margaret J., Van Eygen S., Dawynt P., Cnockaert M., and Swings J. *Diversity of 746 heterotrophic bacteria isolated from microbial mats from ten Antarctic lakes*. *Systematic and applied microbiology*, 2002, vol. 25 no.4: 603-610.
 19. Albrecht R., Joffre R., Le Petit J., Terrom G., and Périssol C. *Calibration of chemical and biological changes in cocomposting of biowastes using near-infrared spectroscopy*. *Environmental science and technology*, 2009, vol. 43: 804-811.
 20. Awramink S., Schidlowski M., Golubic S., and Kimberly M. *The history and significance of stromatolites. In early organic evolution for mineral and energy resources*. Springer-Verlag, 1992: 435-449.
 21. Baumgartner L., Spear J., Buckley D., Pace N., Reid R., Dupraz C., and Visscher P. *Microbial diversity in modern microbial stromatolites, Highborn Cay, Bahamas*. *Environmental microbiology*, 2009, vol. 11 no.10: 2710-2719.
 22. Allen M., Goh F., Burns B., and Neilan B. *Bacterial, archeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark-Bay*. *Geobiology*, January 2009, vol. 7 no.1: 82-96.
 23. Golubic S. *Organisms that built stromatolites. Stromatolites: development in sedimentology*. Elsevier-Amsterdam: 113-126.
 24. Minckley W. *Environment of the bolson of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México, with special reference to the aquatic biota*. Univ. Texas El Paso, Sci Series 2: 1-65.
 25. Souza V., Espinoza L., Escalante A., et al. *An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, vol.103: 6565-6570.
 26. Escalante A. *Ecología evolutiva de procariontes en Cuatro Ciénegas Coahuila, México*. Tesis Doctoral. México D.F., 2008. Universidad Nacional Autónoma de México.
 27. Cerritos R. *Análisis del concepto biológico, cohesivo, ecológico y filogenético de especie en bacterias halófilas del valle de Cuatro Ciénegas Coahuila*. Tesis Doctoral. México D.F., 2008. Universidad Nacional Autónoma de México.
 28. Johansson K., Cortés A., and Kilroy K., *Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Cienegas groundwater, Coahuila, Mexico. South and earth*. *Science*, 2004, vol. 17: 171-180.

29. Evans S. *Using chemical data to define flow systems in Cuatro Ciénegas, Coahuila Mexico*. The University of Texas – Austin Dissertation, 2005, 114p.
30. Alcocer J., and Kato E. *Cuerpos acuáticos de Cuatro Ciénegas, Coahuila*. Centro de ecología y desarrollo, A.C. México, 1995 pp. 177-193.
31. Calegari V. *Environmental perceptions and local conservation efforts in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México*. The University of Texas-Austin Dissertation, 1997.
32. Fu X., and Kim S. *Agarase: Resource of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications*. Marine Drugs, 2010, vol. 8 no. 1: 200 – 218.
33. Silva E., Marques A., Fialho A., Granja A., and Sa-Correira I. *Proteins encoded by Sphingomonas elodea ATCC 31461 rmlA and upgG genes, involved in gellan gum biosynthesis, exhibit both dTDP- and uUDP-glucosa pyrophosphorylase activities*. Applied and environmental microbiology, August, 2005, vol. 71 no.8 4703-47012.
34. Joseph S., Hugenholtz P., Sagwan P., Osborn C., and Janssen P. *Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated dilution culture from anoxic rice paddy soil*. Applied and environmental microbiology, 2003, vol. 69: 7210 – 7215.
35. Magurran A. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University press, New Jersey, 1988. 179 pags.
36. Kempton R., and Taylor R. *The Q statistic and the diversity of flora*. Nature, 1978 vol. 275: 253-253.
37. Hurlbert S. *the non concept of species diversity: a critique and alternative parameters*. Ecology, 1971, vol. 52: 577-586.
38. Chao A. *Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population*. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, vol. 11 :265–270.
39. Eguiarte L., Souza V., and Aguirre X. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México, 2007. 594 pags. Ills.
40. Southwood T., *Ecological methods*. Chapman and Hall, London, 1978.
41. Tcherpakov M., Ben-Jacob E., and Gutnick D. *Paenibacillus dendritiformis, sp. nov. proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster*. International journal of systematic bacteriology, 1999, vol. 49 no.1: 239-246.
42. Souza V., Escalante A., Espinoza L., Valera A., Cruz A., Eguiarte L., García F., and Elser J. *Cuatro Ciénegas, un laboratorio de Astrobiología*. Ciencias, Julio –Septiembre, 2004, vol. 75.
43. Janda M., and Abbott S. *The Genus Aeromonas: Taxonomy, Pathogenicity and infection*. Clinical microbiology reviews, 2010, January 2010, Vol. 23, No. 1: 35-73.
44. Streit W., and Schmitz R. *Metagenomics – the key to the uncultured microbes*. Current opinion in microbiology, 2004, vol. 7: 492-498.
45. Bonilla G., Souza V., and Eguiarte L. *Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin*. TIP - Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2008, vol. 11 no.1: 41-51.
46. Nichols D. *Cultivation gives context for the microbial ecologist*. FEMS microbiology ecology, May 2007, vol. 60 no. 3: 351-357.

47. Kaartokallio H., Laamanen M., and Sivonen K. *Responses of Baltic sea ice and open-water natural bacterial communities to salinity change.* Applied and Environmental Microbiology, 2005 vol. 71: 4364-4371.
48. Lüdemann H., Arth I., and Liesack W. *Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores.* Applied and Environmental Microbiology, 2000, vol. 66: 754-762.
49. Princic A., Mahne I., Megusar F., Paul E., and Tiedje J. *Effects of pH and oxygen and ammonium concentration on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater.* Applied and Environmental Microbiology, 1998, vol. 64: 548-572.
50. Sievert S., Brinkhoff T., Muyzer G., Ziebis W., and Kuever J. *Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece).* Applied and Environmental Microbiology, 1999, vol. 65: 3834-3842.

Apéndice 1

Caracterización de la morfología colonial

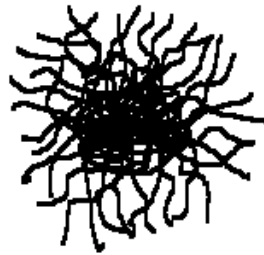
Form



Circular



Irregular



Filamentous



Rhizoid

Elevation



Raised

Convex

Flat

Umbonate

Crateriform

Margin



Entire



Undulate



Filiform



Curled



Lobate

A1. Caracterización morfológica de colonias bacterianas a partir de forma, elevación y margen. El color varia dependiendo de los pigmentos que las bacterias poseen. Imagen extraída de http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/MicroBio_Interpreting_Plates.shtml

Apéndice 2

Descripción de los 74 morfotipos coloniales caracterizados

Morfotipos caracterizados	
Morfo	Descripción
1	Amarillo, Irregular, Elevado, Ondulado
2	Amarillo, Irregular, Aplanado, Lobulado
3	Naranja, Irregular, Elevado, Ondulado
4	Amarillo, Irregular, Aplanado, Ondulado
5	Café, Irregular, Elevado, Ondulado
6	Amarillo, Circular, Elevado, Completo
7	Blanco, Irregular, Aplanado, Completo
8	Blanco, Irregular, Aplanado, Lobulado
9	Blanco, Irregular, Elevado, Ondulado
10	Café, Irregular, Aplanado, Ondulado
11	Naranja, Circular, Aplanado, Completo
12	Naranja, irregular, Aplanada, ondulada
13	Blanco, Irregular, Elevado, Lobulado
14	Blanco, Filamentoso, Aplanado, Filiforme
15	Blanco, Circular, Aplanado, Completo
16	Transparente, Irregular, Aplanado, Ondulado
17	Crema, Irregular, Aplanado, Ondulado
18	Crema, Irregular, Aplanado, Completo
19	Amarillo, Irregular, Elevado, Lobulado
20	Naranja, Irregular, Elevado, Rizado
21	Blanco, Irregular, Elevado, Rizado
22	Amarillo, Irregular, Elevado, Rizado
23	Amarillo, Irregular, Aplanado, Rizado
24	Blanco, Irregular, Aplanado, Ondulado
25	Transparente, Irregular, Elevado, Ondulado
26	Blanco, Irregular, Elevado, Completo
27	Blanco, Irregular, Aplanado, Rizado
28	Blanco, Filamentoso, Aplanado, Lobulado
29	Blanco, Filamentoso, Aplanado, Ondulado
30	Naranja, Irregular, Aplanado, Lobulado
31	Naranja, Irregular, Elevado, Completo
32	Amarillo, Irregular, Aplanado, Completo
33	Amarillo, Irregular, Elevado, Completo
34	Rosa, Filamentosa, Aplanada, Filiforme
35	Rosa, Irregular, Aplanada, Ondulada
36	Rojo, Irregular, Elevado, Completo
37	Rojo, Irregular, Elevado, Rizado

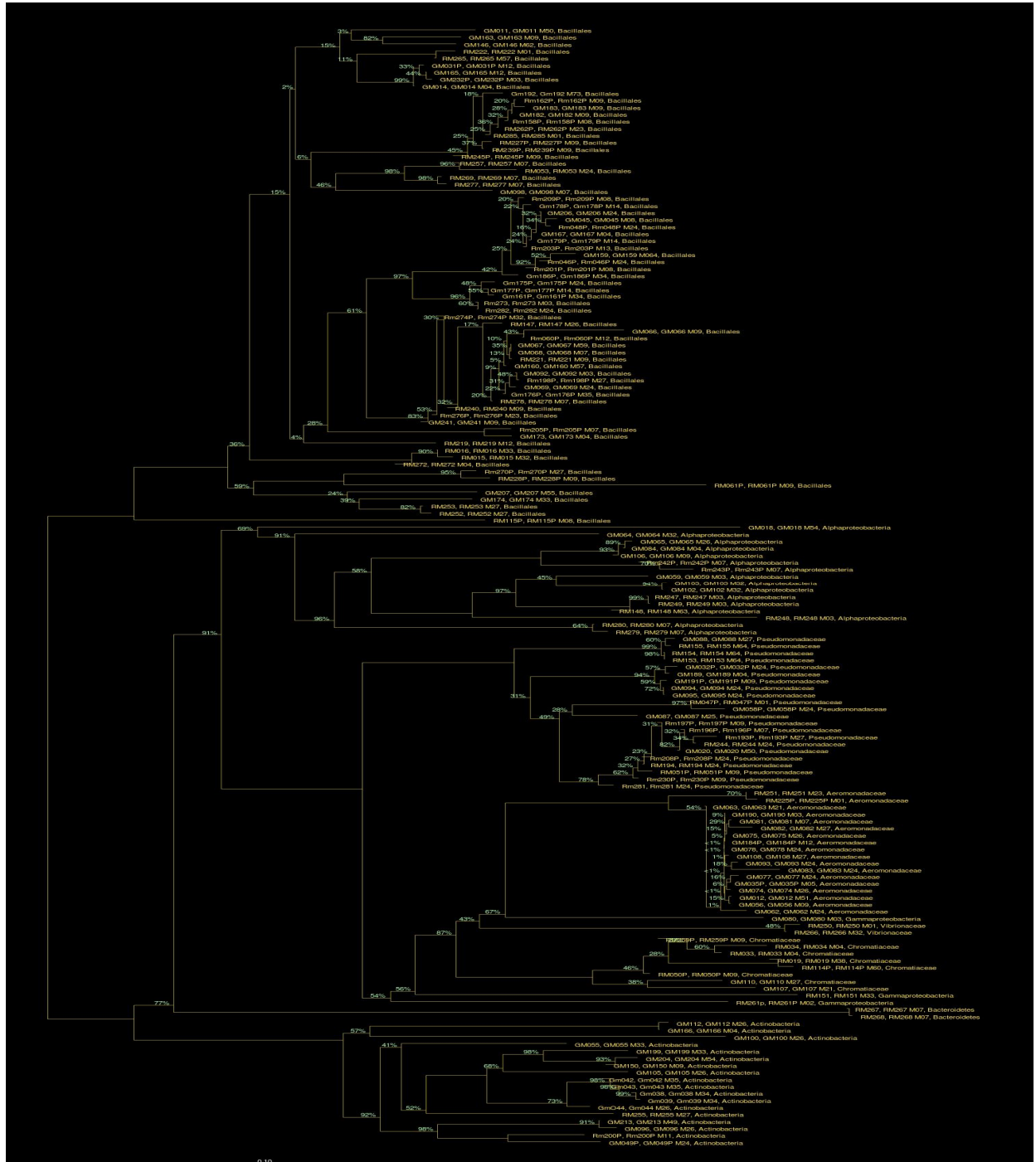
A2.Morfotipos caracterizados

Morfotipos caracterizados	
Morfo	Descripción
38	Rojo, Irregular, Elevado, ondulado
39	Rojo, Irregular, Elevado, lobulado
40	Blanco, Irregular, Crateriforme, ondulado
41	Transparente, Irregular, Aplanado, Lobulado
42	Blanco, Circular, Elevado, Completo
43	Naranja, Filamentoso, Aplanado, Filiforme
44	Transparente, Filamentoso, Aplanado, Filiforme
45	Blanco, Irregular, Aplanado, Completo
46	Rojo, Irregular, Aplanado, Filiforme
47	Naranja, Circular, Umbonado, Completo
48	Rojo, Filamentoso, Aplanado, Filiforme
49	Naranja, Circular, Elevado, Completo
50	Blanco, Rizoide, Aplanado, Filiforme
51	Naranja, Circular, Crateriforme, Completo
52	Rojo, Irregular, Aplanado, Lobulado
53	Naranja, Irregular, Aplanado, Completo
54	Rosa, Irregular, Aplanado, Completo
55	Naranja, Irregular, Crateriforme, Completo
56	Amarillo, Filamentoso, Aplanado, Filiforme
57	Rosa, Irregular, Aplanada, Lobulada
58	Rosa, Irregular, Aplanado Ondulado
59	Café, Irregular, Aplanado, Rizado
60	Naranja, Irregular, Elevado, Lobulado
61	Naranja, Irregular, Umbonado, Rizado
62	Blanco, Circular, Crateriforme, Completo
63	Amarillo, Irregular, Elevado Completo
64	Blanco, Irregular, Aplanado, Rizado
65	Salmón, Irregular, Elevado, Completo
66	Naranja, Irregular, Elevado, Lobulado
67	Café, Irregular, Elevado, Lobulado
68	Rosa, Irregular, Aplanado, Rizado
69	Rosa, Circular, Convexo, Completo
70	Amarillo, Irregular, Crateriforme, Completo
71	Rojo, Circular, Convexo, Completo
72	Salmón, Irregular, Convexo, Completo
73	Blanco, Rizoide, Elevado, Filiforme
74	Naranja, Irregular, Aplanado, Lobulado

A2 (continuación).

Apéndice 3

Filogenia

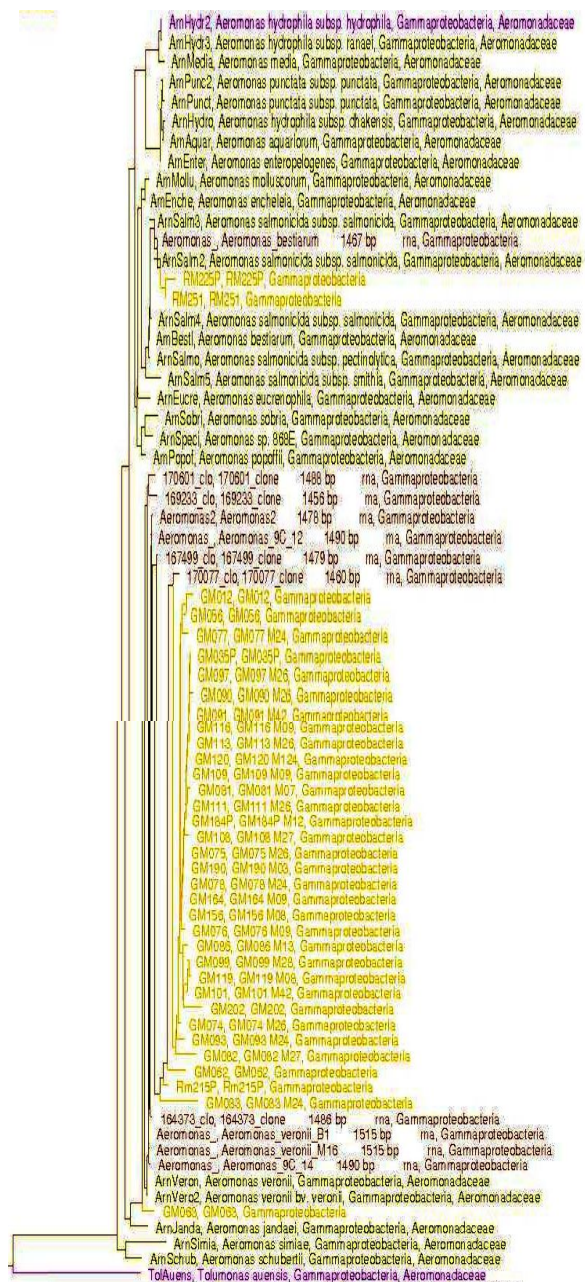


A3. Filogenia de aislados construida con el programa Arb (neighbor joining, 1000 bootstraps). En la nomenclatura de los aislados G=Poza Germán, R=Poza Eguarte; M= medio marino, m= medio mínimo; Ag= agar, P = fitigel. El número indica el número de aislado caracterizado. M01... Mn= morfotipo#. Al final la clasificación (Hugenholtz).

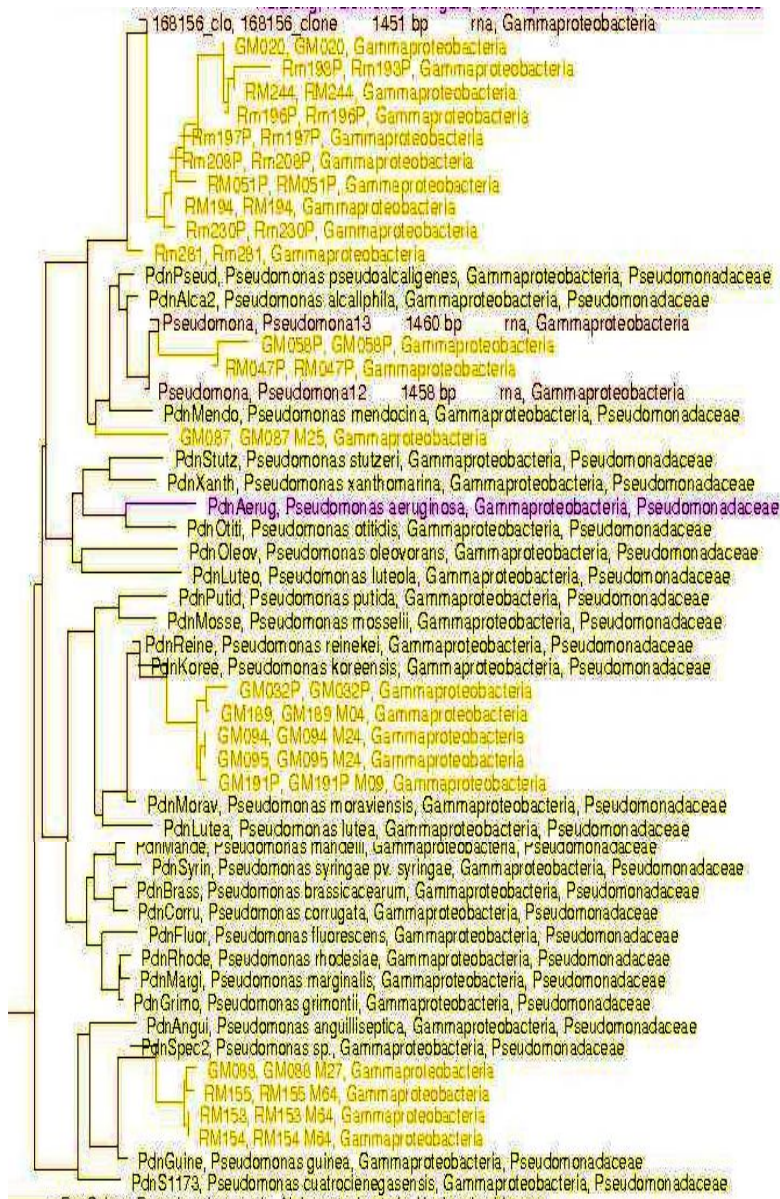
Apéndice 4

Viendo de cerca las ramas de la filogenia

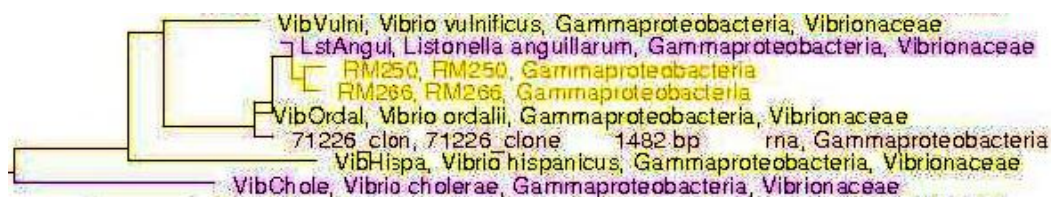
Filogenia de aislados (amarillo) con secuencias de referencia en www.greenengenes.com y secuencias de organismos provenientes de Cuatro Ciénegas. Filogenias construidas en Arb (neighbor joining, 1000 bootstraps).



A4-II. Ramas del grupo de *Aeromonas*.



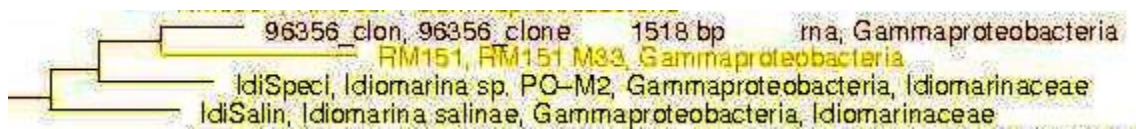
A4-III. Ramas del grupo de *Pseudomonas*.



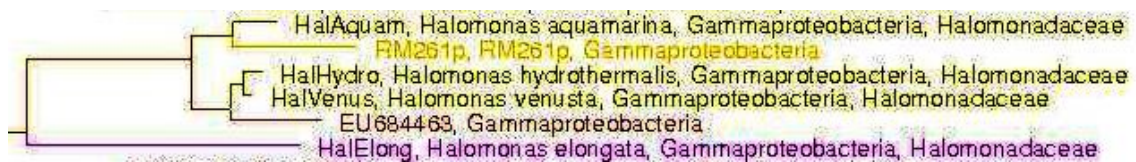
A4-IV. Rama del grupo de *Vibrio*.



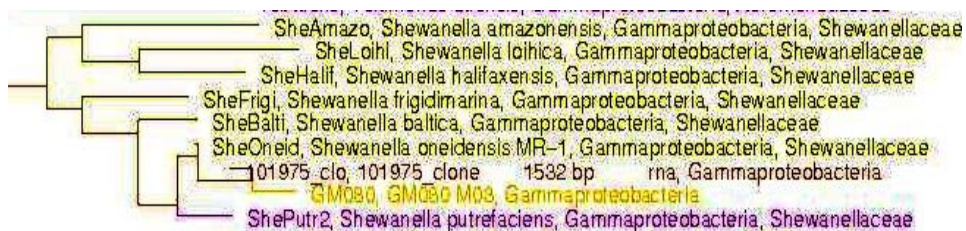
A4-V. Ramas del grupo de *Rheinheimera*.



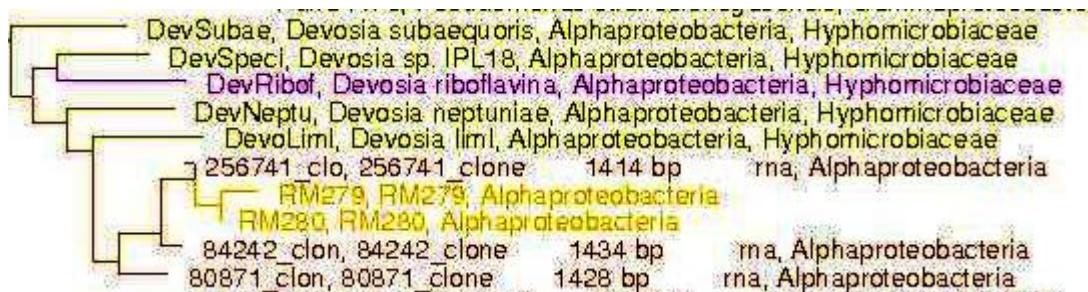
A4-VI. Rama del grupo de *Idiogramma*.



A4-VII. Rama del grupo de *Halomonas*.



A4-VIII. Rama del grupo de *Shewanella*.



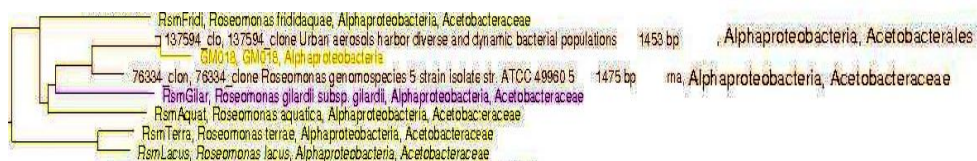
A4-IX. Rama del grupo de *Devosia*.



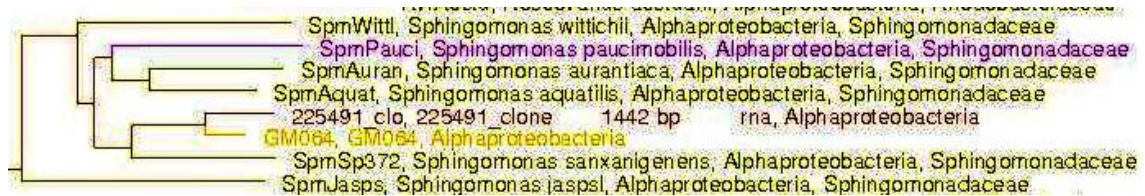
A4-X. Ramas del grupo de *Agrobacterium*.



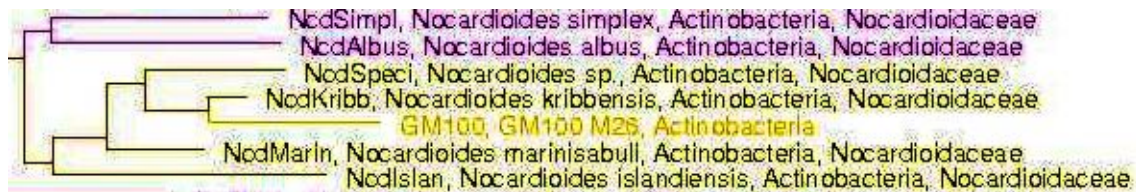
A4-XI. Ramas del grupo de *Paracoccus*.



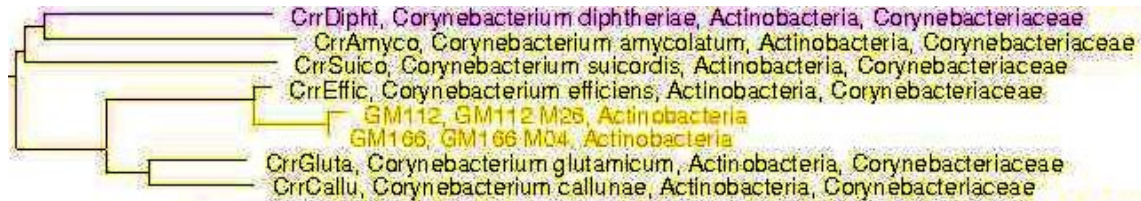
A4-XII. Ramas del grupo de *Roseomonas*.



A4-XIII. Rama del grupo de *Sphingomonas*.



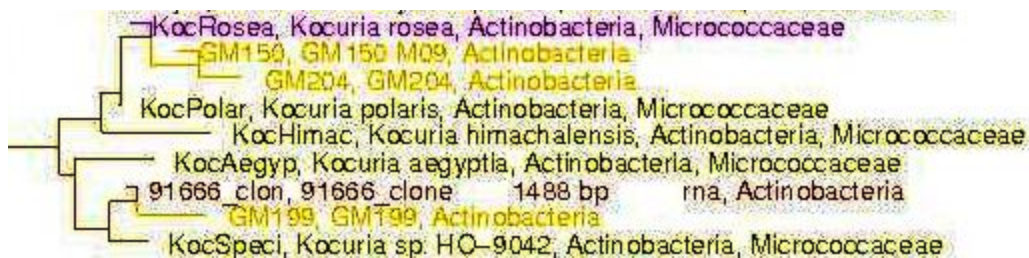
A4-XIV. Rama del grupo de *Nocardioides*.



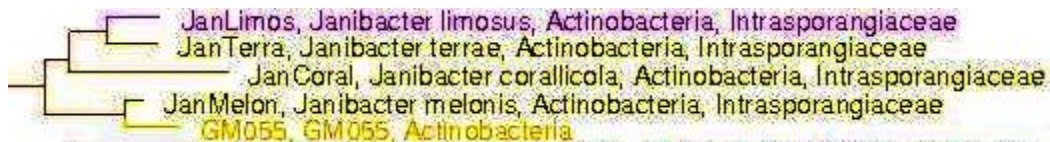
A4-XV. Rama del grupo de *Corynebacterium*.



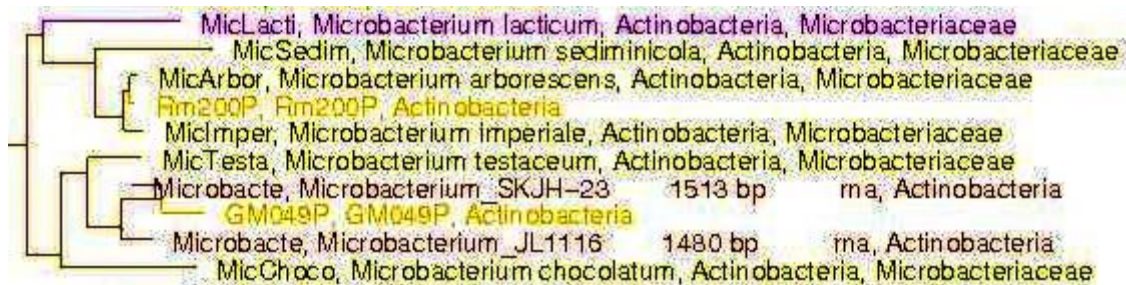
A4-XVI. Ramas del grupo de *Arthrobacter*.



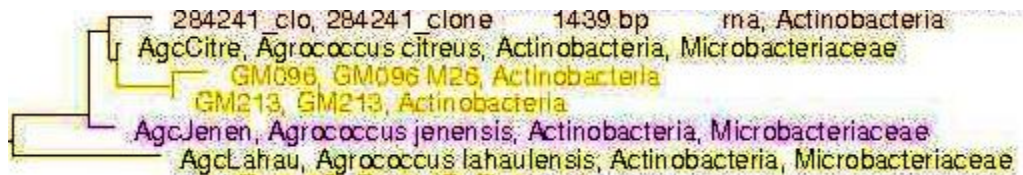
A4-XVII. Ramas del grupo de *Kocuria*.



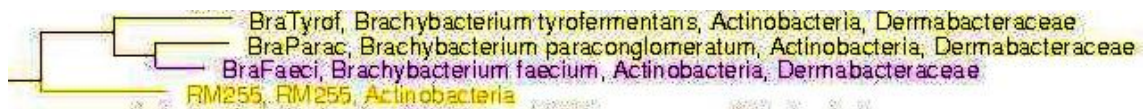
A4-XVIII. Rama del grupo de *Janibacter*.



A4-XIX. Ramas del grupo de *Microbacterium*.



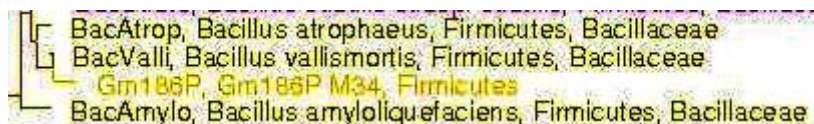
A4-XX. Rama del grupo de *Agrococcus*.



A4-XXI. Rama de *Brachybacterium*.



A4-XXII. Ramas del grupo de *Bacillus1*.



A4-XXIII. Rama del grupo de *Bacillus2*.



A4-XXIV. Rama del grupo de *Bacillus3*.



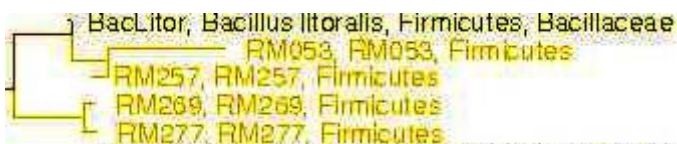
A4-XXV. Rama del grupo de *Bacillus*4.



A4-XXVI. Rama del grupo de *Bacillus*5.



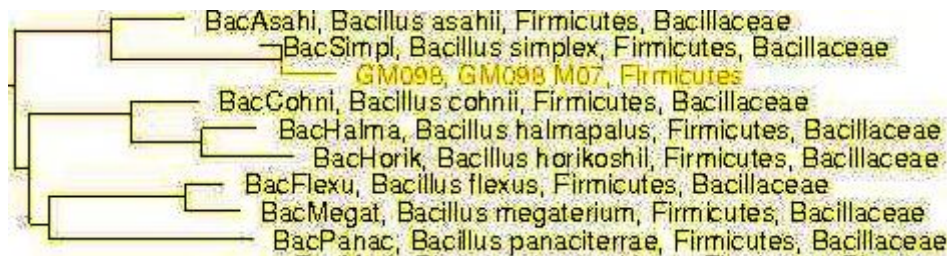
A4-XXVII. Ramas del grupo de *Bacillus*6.



A4-XXVIII. Rama del grupo de *Bacillus*7.



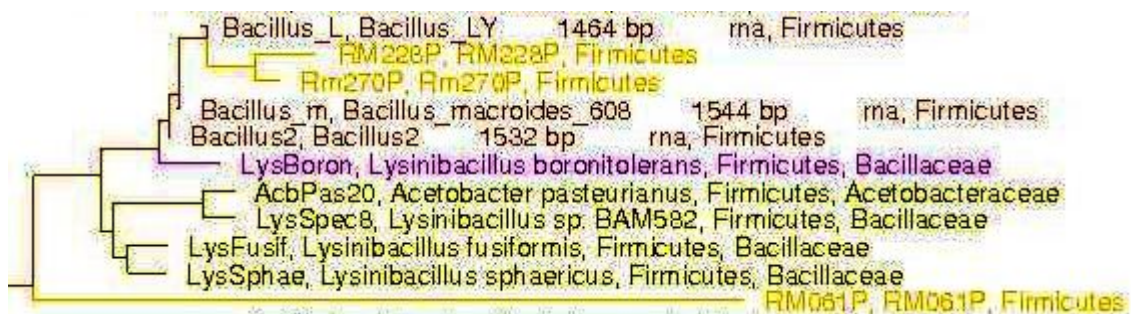
A4-XXIX. Rama del grupo de *Bacillus*8.



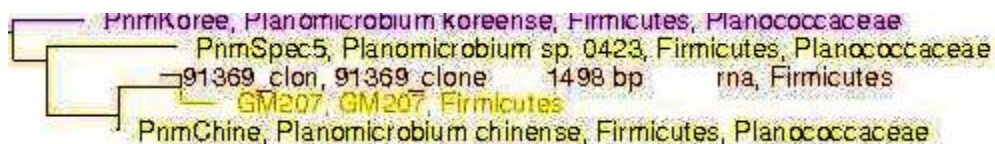
A4-XXX. Rama del grupo de *Bacillus*9.



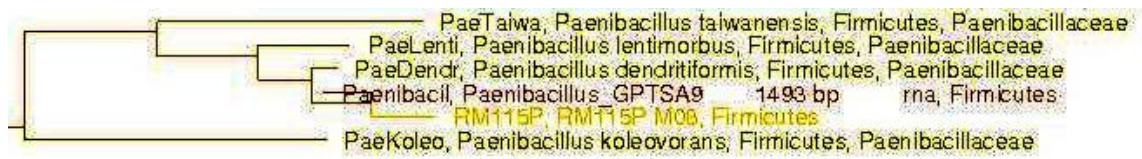
A4-XXXI. Ramas del grupo de *Bacillus*10.



A4-XXXII. Ramas del grupo de *Bacillus*11.



A4-XXXIII. Rama del grupo de *Planomicrobium*



A4-XXXIV. Rama del grupo de *Paenibacillus*.

Apéndice 5

Clasificación de aislados

Clasificación de aislados				
Cepa	Morfofoto	Clasificación		
		Hughenoltz	RDP	GenBank
GM011	M50	Bacilli	Bacillus	Bacillus
GM012	M51	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM014	M4	Bacilli	Bacillus	Bacillus
GM018	M54	Roseomonas	Roseomonas	Roseomonas
GM020	M50	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM031P	M12	Bacilli	Bacillus	Unclassified
GM032P	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM035P	M7	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM045	M8	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM049P	M24	Actinobacteridae	Microbacterium	Microbacterium
GM055	M33	Intrasporangiaceae	Knoellia	Knoellia
GM056	M9	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM058P	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM059	M3	Rhodobacter	Paracoccus	Paracoccus
GM062	M24	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM063	M21	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM064	M32	Sphingomonas asaccharolytica	Sphingomonas	Sphingomonas
GM065	M26	Agrobacterium	Rhizobiaceae	Agrobacterium
GM066	M9	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM067	M59	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM068	M7	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM069	M24	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM074	M26	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM075	M26	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM076	M9	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM077	M24	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM078	M24	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM080	M3	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella
GM081	M7	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM082	M27	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM083	M24	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM084	M4	Agrobacterium	Rhizobiaceae	Agrobacterium
GM086	M13	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM087	M25	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM088	M27	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas

A5. Clasificación de aislados (Hughenoltz, Ribosomal Database Project y GenBank).

Clasificación de aislados				
Cepa	Morfortipo	Clasificación		
		Hughenoltz	RDP	GenBank
GM090	M26	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM091	M42	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM092	M3	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM093	M24	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM094	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM095	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM096	M26	Actinobacteridae	Agrococcus	Agrococcus
GM097	M26	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM098	M7	Bacilli	Bacillus	Bacillus
GM099	M28	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM100	M26	Propionibacterineae	Nocardioides	Nocardioides
GM101	M42	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM102	M32	Rhodobacter	Paracoccus	Paracoccus
GM103	M32	Rhodobacter	Paracoccus	Paracoccus
GM105	M26	Arthrobacter	Arthrobacter	Arthrobacter
GM106	M9	Agrobacterium	Rhizobiaceae	Agrobacterium
GM107	M21	Rheinheimera	Rheinheimera	Rheinheimera
GM108	M27	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM109	M9	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM110	M27	Rheinheimera	Rheinheimera	Rheinheimera
GM111	M26	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM112	M26	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium
GM113	M26	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM116	M9	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM119	M8	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM120	M24	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM146	M62	Bacilli	Bacillus	Bacillus
GM150	M9	Actinobacteridae	Kocuria	Kocuria
GM156	M8	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM159	M64	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM160	M57	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM163	M9	Bacilli	Bacillus	Bacillus
GM164	M9	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM165	M12	Bacilli	Bacillus	Bacillus
GM166	M4	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium

A5. Continuación.

Clasificación de aislados				
Cepa	Morfortipo	Clasificación		
		Hughenoltz	RDP	GenBank
GM167	M4	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM173	M4	Bacilli	Bacillus	Bacillus
GM174	M33	Planococcaceae	Planococcus	Planococcus
GM182	M9	Bacillus	Bacillus	Bacillus cereus group
GM183	M9	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
GM184P	M12	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM189	M4	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM190	M3	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM191P	M9	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
GM199	M33	Actinobacteridae	Kocuria	Kocuria
GM202	M44	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
GM204	M54	Actinobacteridae	Kocuria	Kocuria
GM206	M24	Bacillus	Bacillus	Bacillus
GM207	M55	Planococcaceae	Planomicrobium	Planococcaceae
GM213	M49	Actinobacteridae	Agrococcus	Agrococcus
GM232P	M3	Bacilli	Bacillus	Unclassified
GM241	M9	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Gm038	M34	Arthrobacter	Arthrobacter	Arthrobacter
Gm039	M34	Arthrobacter	Arthrobacter	Arthrobacter
Gm042	M35	Arthrobacter	Arthrobacter	Arthrobacter
Gm043	M35	Arthrobacter	Arthrobacter	Arthrobacter
Gm161P	M34	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Gm175P	M24	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Gm176P	M35	Bacillus;	Bacillus	Bacillus
Gm177P	M14	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Gm178P	M14	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Gm179P	M14	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Gm186P	M34	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Gm192	M73	Bacilli	Bacillus	Bacillus cereus group
Gm044	M26	Arthrobacter	Arthrobacter	Arthrobacter
RM015	M32	Bacilli	Jeotgalibacillus	Bacillus
RM016	M33	Bacilli	Jeotgalibacillus	Bacillus
RM019	M38	Rheinheimera	Rheinheimera	Enterobacteriaceae
RM033	M4	Rheinheimera	Rheinheimera	Enterobacteriaceae
RM034	M4	Rheinheimera	Rheinheimera	Enterobacteriaceae

A5. Continuación.

Clasificación de aislados				
Cepa	Morfortipo	Clasificación		
		Hugenholtz	RDP	GenBank
RM047P	M1	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
RM050P	M9	Rheinheimera	Rheinheimera	Enterobacteriaceae
RM051P	M9	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
RM053	M24	Bacilli	Bacillus	Bacillus
RM061P	M9	Planococcaceae	Pasteuriaceae	Bacillus
RM114P	M60	Rheinheimera	Rheinheimera	Enterobacteriaceae
RM115P	M8	Paenibacillaceae	Paenibacillus	Paenibacillus
RM147	M26	Bacillus	Bacillus	Bacillus
RM148	M63	Rhodobacter	Rhodobacteraceae	ncbi:Bacteria; Antarctic
RM151	M33	Alteromonadales	Idiomarina	Pseudidiomarina
RM153	M27	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
RM154	M27	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
RM155	M27	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
RM194	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
RM219	M12	Bacilli	Bacillus	Bacillus
RM221	M9	Bacillus	Bacillus	Unclassified
RM222	M1	Bacilli	Bacillus	Bacillus
RM225P	M1	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
RM227P	M9	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
RM228P	M9	Planococcaceae	Pasteuriaceae	Bacillus
RM239P	M9	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
RM240	M9	Bacillus	Bacillus	Bacillus
RM244	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
RM245P	M9	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
RM247	M3	Rhodobacter	Rhodobacter	Unclassified
RM248	M3	Rhodobacter	Rhodobacteraceae	Roseobacter
RM249	M3	Rhodobacter	Rhodobacter	Unclassified
RM250	M1	Vibrionaceae	Vibrionaceae	Vibrio
RM251	M23	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
RM252	M27	Planococcaceae	Planococcus	Planococcus
RM253	M27	Planococcaceae	Planococcus	Planococcus
RM255	M27	Brachybacterium	Brachybacterium	Brachybacterium
RM257	M7	Bacilli	Bacillus	Bacillus
RM259P	M9	Rheinheimera	Rheinheimera	Enterobacteriaceae
RM261p	M2	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas

A5. Continuación.

Clasificación de aislados				
Cepa	Morfotipo	Clasificación		
		Hugenholtz	RDP	GenBank
RM262P	M23	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
RM265	M54	Bacilli	Bacillus	Bacillus
RM266	M32	Vibrionaceae	Vibrio	Vibrio
RM267	M7	Algoriphagus	Algoriphagus	Algoriphagus
RM268	M7	Algoriphagus	Algoriphagus	Algoriphagus
RM269	M7	Bacilli	Bacillus	Unclassified
RM272	M4	Bacilli	Marinibacillus	Bacillus
RM277	M7	Bacilli	Bacillus	Unclassified
RM278	M7	Bacillus	Bacillus	Bacillus
RM279	M7	Devosia	Devosia	Antarctic
RM280	M7	Devosia	Devosia	Antarctic
RM285	M1	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
Rm046P	M24	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm048P	M24	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm060P	M12	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm158P	M8	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
Rm162P	M9	Bacillus cereus	Bacillus	Bacillus cereus group
Rm193P	M27	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
Rm196P	M7	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
Rm197P	M9	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
Rm198P	M27	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm200P	M11	Actinobacteridae	Microbacterium	Microbacterium
Rm201P	M8	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm203P	M13	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm205P	M7	Bacilli	Bacillus	Bacillus
Rm208P	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
Rm209P	M8	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm215P	M24	Aeromonas	Aeromonas	Aeromonas
Rm230P	M9	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
Rm242P	M7	Agrobacterium	Rhizobium	Agrobacterium
Rm243P	M7	Agrobacterium	Rhizobium	Agrobacterium
Rm270P	M27	Planococcaceae	Pasteuriaceae	Bacillus
Rm273	M3	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm274P	M32	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm276P	M23	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Rm281	M24	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas
Rm282	M24	Bacillus	Bacillus	Bacillus

A5. Continuación.