



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de la distribución y diversidad de las  
comunidades bacterianas de Pozas Azules, Cuatro  
Ciénegas, usando el gen que codifica el 16S ARNr.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JAZMÍN ITZEL BLAZ SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS:

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

2014



1. Datos del alumno

Blaz  
Sánchez  
Jazmín Itzel  
56229006  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306099849

2. Datos del tutor

M. en I. B. B.  
Laura  
Espinosa  
Asuar

3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Luis Enrique  
Eguiarte  
Fruñs

4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Javier  
Carmona  
Jiménez

5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Luis David  
Alcaraz  
Peraza

6. Datos del sinodal 4

Dra.  
Ana Elena  
Escalante  
Hernández

7. Datos del trabajo escrito.

Análisis de la distribución y diversidad de las comunidades bacterianas de Pozas Azules,  
Cuatro Ciénegas, usando el gen que codifica el 16S ARNr.

74 p  
2014

*A mis padres, Violeta y Emmanuel*

*que sembraron mi amor por la ciencia.*

*A mis hermanas Rubí y Nayeli, y a la pequeña Eria,*

*que alimentan mi amor por la vida.*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental (LEMyE) del Instituto de Ecología de la UNAM, como parte de los proyectos del taller *Sistemática molecular y genética de la conservación de vertebrados y plantas* de la Facultad de Ciencias y del programa de servicio social *Conocimiento y Conservación de la Biodiversidad del Churince, Cuatro Ciénegas, Coahuila*, con clave 2012-12/110-68. Su realización fue posible gracias a los apoyos 0237A1 de SEP-CONACyT y de ECOIE410 WWF-Alianza Carlos Slim.

Quiero hacer un agradecimiento especial a la M. en I. B. B. Laura Espinosa Asuar, quien dirigió mi tesis y de quien he aprendido más de lo que soy capaz de decir. Por el tiempo, la guía, la paciencia, el entusiasmo y, sobre todo, por creer en mí, ¡mil gracias Lau!

Al excelente comité de sinodales que evaluó esta tesis, Dr. Luis Eguiarte, Dra. Ana Escalante, Dr. Javier Carmona, y Dr. Luis David Alcaraz, por su revisión cuidadosa y los valiosos comentarios que enriquecen este trabajo.

A la Dra. Valeria Souza y al Dr. Luis Eguiarte, por la oportunidad de trabajar en el LEMyE. A la Dra. Erika Aguirre Planter y al M.V.Z. Manuel Rosas por su asesoría técnica y a Silvia Barrientos cuya labor es esencial para el funcionamiento del laboratorio.

Al Dr. Felipe García Oliva del Laboratorio de Biogeoquímica de Suelos (Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Morelia), por el análisis de nutrientes de las muestras de este trabajo, como una generosa colaboración con el LEMyE.

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

Al Biól. Jaime Gasca por su ayuda para los análisis filogenéticos de esta tesis y a la Dra. Silvia Pajares por su ayuda con las técnicas de laboratorio.

A la Biól. Valerie De Anda por la lectura y las sugerencias para el manuscrito.

A la P. de B. Lorena Peña, mi compañera de aprendizaje y amiga, por los momentos de acierto y de desastre y por todo el tiempo que pasamos juntas talacheando ¡gracias Lore!

A Valerie, Mirna, Pao, Gabriel, Nati y todas las personas que hicieron más asombrosos los viajes a Cuatro Ciénegas y más amena mi estancia en el laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos del lab, personas maravillosas que aman lo que hacen.

A Josué, por la risa, la ternura y el tiempo, haces que los días sean mejores.

Gracias a mis padres, mis hermanas y a toda mi familia y amigos, por el amor y el inestimable apoyo que me dan todos los días, sin ustedes no lo habría logrado.

Por último quiero dar las gracias a la Universidad, mi segunda casa, a la Facultad de Ciencias, al Instituto de Ecología y a los excelentes profesores que tuve a lo largo de mi formación.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 El estudio de la diversidad biológica y su distribución.</b>	<b>10</b>
1.1.1 Componentes de la diversidad: de las especies a los paisajes.	10
1.1.2 Estudiar la diversidad bacteriana.	11
<b>1.2 Biogeografía de microorganismos.</b>	<b>13</b>
1.2.1 Patrones de distribución.	14
1.2.2 Procesos que generan y mantienen los patrones.	15
1.2.3 Marcos teóricos principales.	16
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
<b>2.1 El sistema Pozas Azules del valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Diversidad bacteriana en el valle de Cuatro Ciénegas.</b>	<b>21</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>4.1 Área de estudio y muestreo.</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Construcción de librerías de clonas del gen 16S de ADN ribosomal.</b>	<b>25</b>
(Extracción de ADN, PCR, clonación y análisis de secuencias)	
<b>4.3 Caracterización de clonas y construcción de filogenias.</b>	<b>26</b>
<b>4.4 Análisis estadísticos.</b>	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	
<b>5.1 Variación ambiental de Pozas Azules.</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Diversidad y Biogeografía de las bacterias de Pozas Azules.</b>	<b>32</b>
5.2.1 Composición y estructura de los ensamblajes bacterianos.	33
5.2.2 Diversidad alfa.	38

## ÍNDICE

5.2.3	Diversidad beta.	39
5.2.4	Pruebas de Mantel: correlación ambiente, geografía y diversidad.	40
<b>6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>		
6.1	<b>Variación ambiental.</b>	<b>41</b>
6.2	<b>Diversidad.</b>	<b>42</b>
6.2.1	Composición y estructura del ensamble bacteriano: Distribución y estilos de vida.	43
6.3	<b>Biogeografía bacteriana de Pozas Azules: ambiente, geografía y sus relaciones con la diversidad.</b>	<b>46</b>
6.3.1	Patrones de distribución. El efecto del ambiente. El efecto de la geografía.	46 47 44
6.4	<b>Aplicabilidad de las teorías.</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>		<b>51</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>		<b>52</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		<b>54</b>
<b>10. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>		
1.	<b>Análisis de Componentes Principales.</b>	<b>63</b>
2.	<b>Descripción de OTUs.</b>	<b>64</b>
3.	<b>Árbol de Máxima Verosimilitud.</b>	<b>66</b>
<b>APÉNDICES</b>		
I.	<b>Colecta y filtrado de muestras de agua.</b>	<b>67</b>
II.	<b>Determinación de nutrientes.</b>	<b>67</b>
III.	<b>Extracción de ADN.</b>	<b>68</b>
IV.	<b>PCR.</b>	<b>69</b>
V.	<b>Clonación.</b>	<b>70</b>
VI.	<b>Purificación de plásmidos.</b>	<b>72</b>
VII.	<b>Restricción de plásmidos.</b>	<b>73</b>
VIII.	<b>Scripts para análisis en R</b>	<b>74</b>

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ARDRA</b>	Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (del inglés Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)
<b>ARISA</b>	Análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (del inglés Automated Ribosomal Intergenic Spaces Analysis)
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina (del inglés Bovine Serum Albumin)
<b>CCC</b>	Cuatro Ciénegas Coahuila
<b>DGGE</b>	Gel de electroforesis de gradiente desnaturalizante (del inglés Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato (del inglés deoxynucleotide triphosphates)
<b>ITSR</b>	región espaciadora transcrita interna (del inglés Internal transcribed spacer regions)
<b>µs</b>	Micro sims (unidad utilizada para medir conductividad)
<b>NCBI</b>	National Center of Biotechnological Information
<b>OTU</b>	Unidad Taxonómica Operativa (del inglés Operational Taxonomic Unit)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>RAPDs</b>	ADN polimórfico amplificado al azar (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA)
<b>RDB</b>	Ribosomal Database Project
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>T-RFLPs</b>	Fragmentos finales y polimórficos por el tamaño de restricción (del inglés Terminal Restriction Fragments Length Polimorfism)



## RESUMEN

Uno de los desafíos más importantes de la ecología microbiana es entender la distribución y extensión de la diversidad. Las exploraciones recientes han mostrado que la hipótesis clásica de la ubicuidad microbiana no corresponde a todos los sistemas, y que en algunos grupos hay patrones de distribución claramente reconocibles. El endemismo, la variación temporal de las comunidades, y el decaimiento de la similitud biológica a través de la distancia geográfica, forman parte de las evidencias documentadas en la última década dentro de este campo y se ha propuesto que estos patrones están determinados por las condiciones ambientales, la distancia geográfica y la especialización de nicho. Las condiciones extremas de oligotrofia del sistema Pozas Azules, en el valle de Cuatro Ciénegas, en México, y su estructura similar a islas, nos permiten examinar el efecto de los factores históricos y ecológicos en la composición y estructura de las comunidades bacterianas y probar las hipótesis propuestas sobre biogeografía de microorganismos. Con este fin, se construyeron librerías de clones del gen que codifica el 16S de ARN ribosomal para cuatro pozas, cada una compuesta por  $80 \pm 10$  secuencias. Las secuencias fueron caracterizadas taxonómicamente en las bases de datos Greengenes, RDP y NCBI. Se utilizaron pruebas de Mantel como método de correlación multivariada para examinar el impacto de la distancia geográfica y las condiciones ambientales locales en las diferencias entre las comunidades del ensamblaje bacteriano regional en términos de diversidad beta. En primer lugar, encontramos diferencias entre la composición de los sitios, dominado cada uno por un grupo taxonómico particular (Actinobacteria, Proteobacteria, Cyanobacteria y Verrucomicrobia). La mayor parte de los OTUs (60%) resultaron únicos y se encontraron pocos compartidos entre las pozas, como en cualquier conjunto de especies de macroorganismos. En segundo lugar, nuestros resultados, muestran que tanto la conductividad como la distancia geográfica influyen en la composición de las comunidades bacterianas. Por último, es posible que el efecto de estos factores sea diferente para los grupos que conforman a las comunidades, siendo algunos más o menos sensibles a la distancia o al ambiente dadas sus características de historia de vida. De este modo las evidencias reunidas en este trabajo apoya las ideas recientes de que no "todo está en todos lados" y que los sistemas microbianos pueden entenderse con los principios de la ecología clásica.

## ABSTRACT

One of the most important challenges of microbial ecology is to understand the distribution and extent of diversity. Recent explorations have shown that the classical hypothesis of microbial ubiquity does not apply to all systems, and there are clearly recognizable distribution patterns in some groups. Endemism, the temporal variation of communities, and the decay of biological similarity across geographical distance, are part of the evidence documented in the last decade in this field, and it has been proposed that these patterns are controlled by environmental conditions, geographic distance and niche specialization. The extreme oligotrophy conditions of the system Pozas Azules, in the valley of Cuatro Ciénegas, Mexico and their islands-like structure, allow us to examine the effect of historical and ecological factors in the composition and structure of bacterial communities and test the hypotheses proposed on biogeography of microorganisms. For this, 16S rRNA gene clone libraries were constructed for four pools of this system, each one consisting of  $80 \pm 10$  sequences. Sequences were characterized in the Greengenes, RDBP and NCBI databases. Mantel tests as a method of multivariate correlation was used to examine the impact of geographic distance and the local environmental conditions on the differences between the bacterial communities of the regional assembly in terms of beta diversity. First, we find differences between the composition of sites, each dominated by a particular taxonomic group (Actinobacteria, Proteobacteria, Cyanobacteria and Verrucomicrobia). Most of the OTUs were unique and there were few shared between the pools, as any macroorganisms set of species. Second, our results show that both conductivity and geographical distance influence the composition of bacterial communities. Finally, it is possible that the effect of these factors is different for the groups that make up the communities, some being more or less sensitive to the distance or the environment due to their life history characteristics. Thus the evidence gathered in this study supports recent ideas that not "everything is everywhere" and that microbial systems can be understood with the principles of classical ecology.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 El estudio de la diversidad biológica y su distribución.

La diversidad biológica, en su sentido más amplio, se refiere a la gran variedad comprendida dentro de los sistemas de organización biológica que pueden ir desde los genes y las especies, hasta los ecosistemas (Cullen, 1995).

Una de las características más conspicuas de la diversidad biológica es que no se distribuye de manera homogénea en el espacio. Entender la distribución espacial de la diversidad y los procesos asociados a ella han sido objetivos centrales de la ecología y biología evolutiva. La biogeografía, es una ciencia interdisciplinaria que involucra a estas dos ramas y consiste en el estudio de la distribución de los organismos, la historia de cómo se forma un arreglo espacial particular y el análisis de sus posibles causas (Simberloff 1983).

Dentro de la biogeografía existen aproximaciones históricas y ecológicas que interpretan las distribuciones espaciales basándose en eventos históricos del pasado (aproximación histórica) o en las condiciones y factores contemporáneos actuales que inciden sobre los ensamblajes respectivamente (aproximación ecológica) (Wiley 1981). Hay una gran variedad de factores y escalas espaciales y temporales involucrados en el entendimiento de la diversidad y su distribución, por lo tanto su estimación y análisis se realiza de un modo jerárquico, que a continuación se detalla.

### 1.1.1 Componentes de la diversidad: de las especies a los paisajes.

Una comunidad biológica, se define como un conjunto de especies que interactúan y cohabitan en un espacio y tiempo determinados (Magurran 2003), por otro por otro lado, un ensamblaje puede definirse como un grupo de organismos filogenéticamente definido que cohabitan en tiempo y espacio (Fauth *et al.* 1996).

Al cuantificar y comparar la diversidad de las comunidades y ensambles de modo jerárquico en el espacio, podemos examinar desde el punto de vista de la biogeografía procesos que ocurren a escalas temporales distintas, es decir en tiempo ecológico (escalas locales) y tiempo evolutivo (escalas regionales) (Escalante 2008).

Uno de los enfoques más usados para estudiar los ensambles de especies, concibe la diversidad en tres componentes: local ( $\alpha$ ), regional ( $\gamma$ ) y la diferencia entre comunidades locales ( $\beta$ ) (Whittaker 1972). Esta última aproximación es particularmente útil en biogeografía porque nos permite conocer la diversidad de un paisaje o región, compuesta por diferentes localidades, habitadas por comunidades biológicas con distintas especies.

*Diversidad alfa.* Se refiere a la diversidad dentro de una localidad, que se define como un área homogénea determinada. La diversidad alfa puede medirse tomando en cuenta la *Riqueza*, es decir número de especies presentes como el índice Chao1, (Chao 1984) y la *Equitatividad*, que expresa como se distribuyen las abundancias relativas, es decir la proporción que representan los individuos de una especie particular respecto al total de individuos de la comunidad (como el índice de Shannon) (Krebs 1999).

*Diversidad beta.* Representa el recambio de especies entre las localidades, es decir las diferencias de composición en un gradiente espacial. Hay diversos coeficientes de similitud, disimilitud o distancia que describen estas diferencias basándose en la *composición* (número e identidad de OTUs) o en la *estructura* (la distribución de la abundancia entre estos OTUs) de las comunidades como los índices de Jaccard y Morisita Horn respectivamente (Magurran 2003).

*Diversidad gamma.* Representa la diversidad biológica en una región amplia que incluye varias localidades. Su estimación expresa la diversidad en función de la riqueza local (alfa) y el recambio (beta) de manera aditiva:  $\gamma = \alpha + \beta$  (Whittaker 1972).

### **1.1.2 Estudiar la diversidad bacteriana**

Los procariontes son los organismos más diversos y abundantes del planeta. Además juegan importantes papeles en el funcionamiento de los ecosistemas, siendo los principales agentes de transformación y flujo de materia y energía en los ciclos biogeoquímicos (Whitman *et al.* 1998); sin embargo, durante mucho tiempo la biogeografía y la ecología

fueron territorio exclusivo de la biología de organismos superiores (plantas y animales) y en la actualidad carecemos de una amplia comprensión acerca de su diversidad en ambientes naturales (Kolter y Maloy 2012).

El primer problema al que se enfrenta el ecólogo microbiano es a su limitada capacidad de observación de un mundo diminuto. Hasta hace unas décadas la única herramienta para estudiar a las bacterias eran los cultivos, pero ahora sabemos que la mayor parte de la diversidad de una comunidad no es posible de cultivar (DeLong y Pace 2001).

Dos de los desarrollos científicos más importantes que cambiaron toda nuestra apreciación sobre la diversidad biológica fueron el uso del gen que codifica el 16S del ARNr como marcador universal - propuesto por Carl Woese (Woese *et al.* 1990) –y el aislamiento y secuenciación de genes contenidos en una comunidad microbiana completa extraídos directamente del ambiente por Norm Pace y su grupo en la década de los 90 (DeLong y Pace 2001). Esto nos permitió conocer la diversidad más allá de lo que es posible cultivar por medio de la estimación cuantitativa de sus componentes utilizando un gen (16S ARNr) como una unidad de diversidad equivalente para todas las especies bacterianas de una comunidad.

El segundo problema, es la discusión que existe alrededor del concepto de especie en bacterias y los lineamientos necesarios para establecerlas (Stakebrand 2011). La ecología molecular plantea un enfoque no basado en especies, sino en unidades de diversidad estimadas a partir de distintos métodos (Escalas *et al.* 2013).

Una de las aproximaciones más comunes utilizadas en este nuevo campo consiste en la amplificación por PCR de genes marcadores y su posterior aislamiento mediante clonación, obteniendo secuencias de diferentes organismos de la comunidad y agrupando las secuencias con una similitud mínima del 97% en filotipos u OTUs (Suenaga 2012). El gen 16S se elige en gran parte porque está universalmente presente, posee regiones altamente conservadas y otras altamente variables, no está sujeto a transferencia horizontal y mantiene relaciones filogenéticas robustas (Vos *et al.* 2012). De este modo, al reconocer las variantes de genes ribosomales presentes en una muestra ambiental de ADN podemos estimar y comparar la diversidad de las comunidades microbianas.

Por último existe un problema en cuanto al planteamiento de las escalas (temporales y espaciales) que deben utilizarse para estudiar los sistemas bacterianos y definir a una comunidad, que generalmente se realiza de manera arbitraria y dificulta la comparación

entre diferentes estudios. Por esto se plantea la importancia de llevar a cabo muestreos que abarquen unidades geográficas uniformes y sean representativos (Hanson et al. 2012).

En este trabajo se decidió utilizar el concepto de ensamble por su simplicidad y flexibilidad para referirnos a la diversidad bacteriana (descrita a partir de OTUs de las secuencias de 16S) de un sitio de muestreo en un momento determinado.

Así, el estudio de la diversidad mejora nuestra capacidad de describir la composición, la estructura y las relaciones filogenéticas entre los miembros de los sistemas bacterianos (DeLong y Pace 2001; Escalas et al. 2013), facilitando el estudio de los procesos que los modelan y que podrían tener consecuencias en el funcionamiento de los ecosistemas.

## **1.1 Biogeografía microbiana**

El primer paradigma que abordó el problema de la distribución de los microorganismos fue planteado en 1934 por el microbiólogo holandés L. Baas-Becking, quien propuso que “todo está en todos lados, pero el ambiente selecciona” (O'Malley 2007) basado principalmente en la hipótesis de que el pequeño tamaño de los microorganismos les confiere una capacidad de dispersión prácticamente ilimitada, por lo cual, no habría barreras que pudieran definirles una estructura biogeográfica. En este sentido, el único modulador de la distribución de los microorganismos sería el ambiente que dadas sus características, permitiría o no el establecimiento de algunos grupos de acuerdo a sus atributos metabólicos.

Este argumento es actualmente reforzado principalmente por Finlay (Finlay y Clark 1999, Finlay 2002) cuyos trabajos en protistas, exponen que dados los grandes tamaños poblacionales de los microorganismos, la probabilidad de dispersión es muy grande, suponiendo su ubicuidad y la ausencia de cualquier patrón comparable a los estudiados en plantas y animales.

A pesar de la relativa popularidad de las ideas anteriores, la información documentada durante la última década señala la existencia de claros patrones de distribución biogeográfica de microorganismos que se han estudiado en varios niveles de organización (como se revisa en Martiny *et al.* 2006). Las propuestas y discusiones más importantes a propósito de estos patrones se han centrado en los factores que determinan

la estructura espacial de las comunidades de microorganismos, las escalas (taxonómicas y espaciales) que se deben utilizar para su estudio y el contexto teórico (ecológico o evolutivo) dentro del cual deben ser abordados (Martiny *et al.* 2006; Hanson *et al.* 2012; Lindström y Langenheder 2012).

### 1.2.1 Patrones de distribución en microorganismos

Existe un gran número de estudios que han reportado patrones de distribución biogeográfica en microorganismos que se detallarán a continuación:

#### Espaciales

*Distribución cosmopolita:* Son organismos globalmente distribuidos, cuya única limitante para su establecimiento son las restricciones ambientales. Este tipo de distribución es congruente con la hipótesis de Baas-Becking sobre la ubicuidad de los microorganismos. Finlay (2002) describe una distribución global de protozoarios en diferentes lagos del mundo y concluye que esta distribución es únicamente modelada por el ambiente. Por otro lado hay otros estudios que utilizan el gen 16S ADNr y documentan distribuciones cosmopolitas en bacterias oceánicas (Yanarell *et al.* 2004, Selje *et al.* 2004).

*Endemismo:* Se refiere a la distribución restringida de un organismo. Puede estar asociado a hábitats específicos como es el caso de termófilos y cianobacterias específicos de manantiales termales (Whitaker *et al.* 2003; Papke *et al.* 2003). El endemismo también se ha relacionado a la distancia geográfica como por ejemplo un estudio con aislados de *Pseudomonas fluorescencis* cuyos filotipos únicos se asocian a la región de donde provienen (Cho y Tedje 2000).

*Relación taxa- área:* Generalmente, el número de especies detectado se incrementa con el área de muestreo (Connor y McCoy 1979). Esta relación se expresa en una curva de especies-área, y se ha encontrado que la pendiente de esta curva (que se conoce como el valor  $z$ ) permanece constante y cuyo valor depende de la homogeneidad biótica debida a la migración: si todas las especies se encuentran en todos lados, entonces la pendiente sería cero. Este patrón ha sido estudiado y reportado en bacterias (Horner-Devine *et al.* 2004, Bell *et al.* 2005, Noguez *et al.* 2005).

## De similitud genética

*Decaimiento por distancia:* Cuando la similitud en la composición de especies entre comunidades ecológicas decrece a través de la distancia. Contradice la hipótesis de ubicuidad en microorganismos y ha sido ampliamente reportada en estudios que utilizan diferente resolución taxonómica (Cho & Tedje 2000, Green *et al.* 2004, Takacs-Vesbach *et al.* 2008).

*Patrones de variación temporal:* Se refiere a los cambios en la composición de comunidades través del tiempo. Se ha observado en sistemas marinos y se relaciona a gradientes temporales de salinidad, temperatura y conductividad (Caporaso *et al.* 2011, Fuhrman *et al.* 2006, Gilbert *et al.* 2012)

*Biogeografía de islas:* La diversidad de las comunidades va a depender del tamaño de las islas o parches y la distancia entre ellas - las ideas y posibles causas de este fenómeno fueron escritas en el libro clásico de Mac Arthur y Wilson (1967)-. La riqueza específica es proporcional al área de la isla, mientras que la similitud entre las islas es inversamente proporcional a su distancia. Lepère y colaboradores (2013) reportan una estructura biogeográfica semejante para protozoarios en diferentes lagos de Francia.

### 1.2.2 Los procesos que generan y mantienen los patrones

Existen cuatro procesos fundamentales que operan dentro y a través de las especies cambiando su presencia y abundancia relativa en las comunidades y ensambles: la diversificación, la deriva, la selección y la dispersión. Estos procesos interactúan de maneras distintas propiciando cambios en la diversidad (Hanson *et al.* 2012, Nemergut *et al.* 2013). A continuación se hace una descripción detallada de los cuatro procesos.

**Selección:** Propicia un cambio en la abundancia relativa de las especies, seleccionando aquellas que están mejor adaptadas a las condiciones específicas de la localidad. Los factores selectivos pueden ser bióticos o abióticos y pueden estar espacialmente correlacionados generando un patrón de decaimiento por distancia y algunos autores proponen que la selección es la principal fuerza que promueve la adaptación y diversificación de la diversidad en bacterias a escalas locales (Shapiro *et al.* 2009; Vos 2010).



**Diversificación:** Se refiere a la generación de diversidad. La diversificación puede ocurrir a través de especiación (Whitaker 2006) y a través de migración a una comunidad. Los mecanismos de diversificación en comunidades bacterianas se conocen muy poco (ver Rebolgar 2012).

**Deriva:** Consiste en cambios estocásticos en la abundancia relativa de las especies a través del tiempo y depende de eventos históricos como una separación geográfica, o una perturbación. Interaccionando con la dispersión y las colonizaciones, la deriva creará una distribución disyunta o en parches cuya similitud en la composición de los parches depende directamente de la distancia entre ellos, generando un patrón de decaimiento por distancia (Vellend 2010).

**Dispersión:** es el movimiento de organismos a través del espacio y entre las comunidades locales (Vellend 2010). La dispersión depende de la capacidad diferencial de cada especie para dispersarse y colonizar con éxito (Bisset *et al.* 2010) y de acuerdo a algunos autores (Hanson *et al.* 2012; Lindström y Langenheder 2012) otros factores que afectan la dispersión son la distancia entre localidades y estructura del paisaje y las dificultades a la dispersión que cada uno representa (por ejemplo si es un ambiente continuo: sustratos sólidos y líquidos, o discreto; islas o parches).

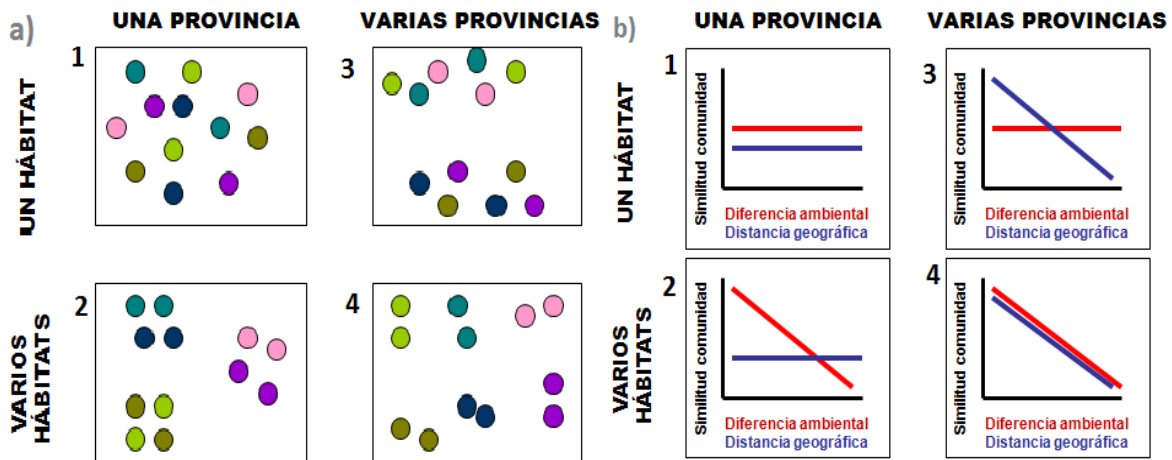
### 1.2.3 Marcos teóricos principales

Consideremos las características que hacen únicos a los microorganismos como su pequeño tamaño, la dispersión pasiva, la formación de estados de latencia, la plasticidad fenotípica (por ejemplo uso de diferentes donadores de electrones para realizar fotosíntesis) y especialmente los tiempos generacionales potencialmente cortos. Estas características de historia de vida, ecología y fisiología afectan el impacto de los procesos biogeográficos antes descritos –selección, deriva, diversificación y migración–, cambiando la dinámica de ensamblaje de las comunidades (Nemergut *et al.* 2013). Por esta razón se han generado diferentes hipótesis para explicar cómo es esta dinámica en el caso particular de los microorganismos (Hanson *et al.* 2012; Nemergut *et al.* 2013). Estos marcos teóricos con sus coincidencias y diferencias respectivas han debatido la aplicabilidad de las teorías macroecológicas estándar a los sistemas microbianos, y se han centrado en la división de

los factores históricos o regionales y los factores ambientales o locales (como se revisa en Hanson *et al.* 2012; y Nemergut *et al.* 2013).

Los primeros, son los factores históricos que ocurren a escala regional y que implican procesos como aislamiento y deriva, la manera más común de estudiarlos es a través de la distancia geográfica entre dos localidades (Martiny *et al.* 2006; Lindström & Langenheder 2012). Los segundos consisten en el conjunto de condiciones abióticas y bióticas que definen el hábitat de una comunidad (es decir a escala local) y son normalmente estudiados a partir de un conjunto de parámetros ambientales de los sitios de muestreo (Martiny *et al.* 2006; Lindström & Langenheder 2012).

Martiny y colaboradores (2006) proponen al menos cuatro hipótesis alternativas clásicas sobre la distribución microbiana (Figura 1): la distribución de la diversidad en hábitats (definidos por homogeneidad ambiental) o provincias (una región cuya composición biótica refleja eventos históricos de su origen).



**Figura 1.** Cuatro hipótesis sobre la distribución microbiológica que debaten la importancia de la distancia geográfica, como un componente histórico y los efectos ambientales sobre la estructuración de las comunidades. **a)** Las cuatro hipótesis representadas en tipos de hábitats: azules, púrpuras, verdes y provincias o localidades: claro y oscuro o **b)** correlación de la similitud ambiental/distancia geográfica vs similitud biológica en cada una de las hipótesis. Hipótesis 1: no hay patrones, la distribución es al azar, Hipótesis 2: no hay estructura geográfica pero el ambiente selecciona, Hipótesis 3: no hay diferencias ambientales pero la distancia geográfica define las comunidades. Hipótesis 4: la distancia geográfica y las diferencias ambientales definen la estructura biogeográfica (modificado de Martiny *et al.* 2006).

La primera hipótesis plantea que los organismos se distribuyen al azar, y la similitud entre las comunidades será independiente de la distancia entre ellas y las diferencias ambientales. La segunda hipótesis plantea que la similitud entre comunidades depende directamente de la similitud de los hábitats en los que habitan, y es independiente de la distancia, asumiendo que no existen límites de dispersión y lo único que los limita son las condiciones ambientales locales. La tercera hipótesis es que la composición de las comunidades depende únicamente de la distancia geográfica entre ellas y es independiente del ambiente. Por último, en el cuarto escenario ambos factores, tanto los ecológicos como los históricos, afectan la composición de las comunidades. En la Tabla 1 se detallan algunos estudios que examinan el efecto de la distancia geográfica y las condiciones ambientales en la estructuración de patrones utilizando métodos estadísticos de correlación.

Otros marcos se basan en el campo de la ecología clásica, utilizando el concepto de metacomunidad y la teoría neutral de la biodiversidad para interpretar los patrones espaciales microbianos. La teoría neutral (Hubbell 2001) plantea que todas las especies son ecológicamente equivalentes y la colonización de una localidad se da completamente al azar, seguida de una sucesión ecológica que dará la estructura final de la comunidad. Este fenómeno sugiere que puede haber sitios con características ambientales similares con grupos distintos dado que los colonizadores llegaron al azar y su presencia y abundancia depende de procesos estocásticos. Esta teoría predice que el decaimiento por distancia se debe solamente a la limitación de dispersión y al aislamiento, independientemente de las diferencias ambientales entre las localidades (Curtis & Sloan 2004).

El panorama actual de la diversidad y biogeografía microbiana, derivado de varios enfoques, ofrece puntos de vista complementarios aunque a menudo difíciles de comparar (Hanson *et al.* 2012; Escalas *et al.* 2013; Nemergut *et al.* 2013). Siendo los procariontes los organismos más abundantes del planeta y los reguladores más importantes de los procesos biogeoquímicos, es fundamental probar las hipótesis y generar información que contribuya a construir teorías y modelos que describan y expliquen su distribución. Los conocimientos generados serían valiosos desde el punto de vista teórico, biotecnológico y de la conservación.

**Tabla 1.** Estudios biogeográficos en microorganismos

Hábitat	Organismo	EA (Km)	Método de análisis	Asociación	Referencia
Suelo	<i>Pseudomonas</i>	20 000	ARDRA ITS-RFLP y BOX-PCR de 16S-23S	Distancia geográfica (>192 Km)	Cho & Tedje 2000
Sedim. Manantiales geotermiales	<i>Sulfolobus islandicus</i>	12 000	Secuenciación de seis loci codificantes	Distancia geográfica	Whitaker <i>et al.</i> 2003
Manantiales geotermiales	<i>g. Synerococcus</i>	20 000	Clonación y secuenciación de 16S e ITSR de la región 16S-23S	Distancia geográfica	Papke <i>et al.</i> 2003
Lacustre	Bacteria	10	DGGE de 16S	Distancia geográfica	Reche <i>et al.</i> 2005
Marino	Bacterioplancton	1	ARISA región intergénica 16S- 23S	Variables ambientales Estacionalidad	Fuhrman <i>et al.</i> 2006
Manantiales geotermiales	<i>g. Sulfurihydrogenibium</i>	5-79	Clonación de 16S	Variables Ambientales	Takacs-Vesbach <i>et al.</i> 2008
Suelo	<i>Myxococcus xantus</i>	4445	Secuenciación de cinco loci codificantes	Distancia geográfica > 2000 Km	Vos & Velicer 2008
Marino	<i>Vibrio cholerae</i>	5	PCR de la región intergénica 16S- 23S	Variables ambientales y distancia	Keymer & Boehm 2009
Lacustre	Bacterias y cianobacterias	8	PCR de la región intergénica 16S- 23S	Procesos estocásticos y variables ambientales	Drakare & Liess 2010
Sedimento estuarino	<i>g. Desulfolobus</i>	10-20	DGGE y clonación del gen <i>dsr</i>	Variables ambientales y distancia	Oakley <i>et al.</i> 2010
Churince CCC	Termorresistentes cultivables	0.1-3	Aislados y secuenciación de 16S	Variables ambientales	Cerritos <i>et al.</i> 2011
Lacustre	Bacterioplancton y Zooplancton	700	TRFLPs del 16S	Distancia geográfica	Soininen <i>et al.</i> 2011
Marino	Microorganismos	2	Región HV del 16S	Variables ambientales Estacionalidad	Caporaso <i>et al.</i> 2011
Marino	Microorganismos	0.1	Pirosecuenciación de 16S	Estacionalidad	Gilbert <i>et al.</i> 2012
Manantiales geotermiales	Bacteria	1m	Clonas y TRFLPs de 16S	Variables ambientales (Temperatura)	Everroad <i>et al.</i> 2012
Lacustre	Protistas	100-400 Km	TRFLP y pirosecuenciación de 18S	Distancia geográfica y diámetro del lago	Lepère <i>et al.</i> 2013

EA: Escala Aproximada

## 2. ANTECEDENTES

---

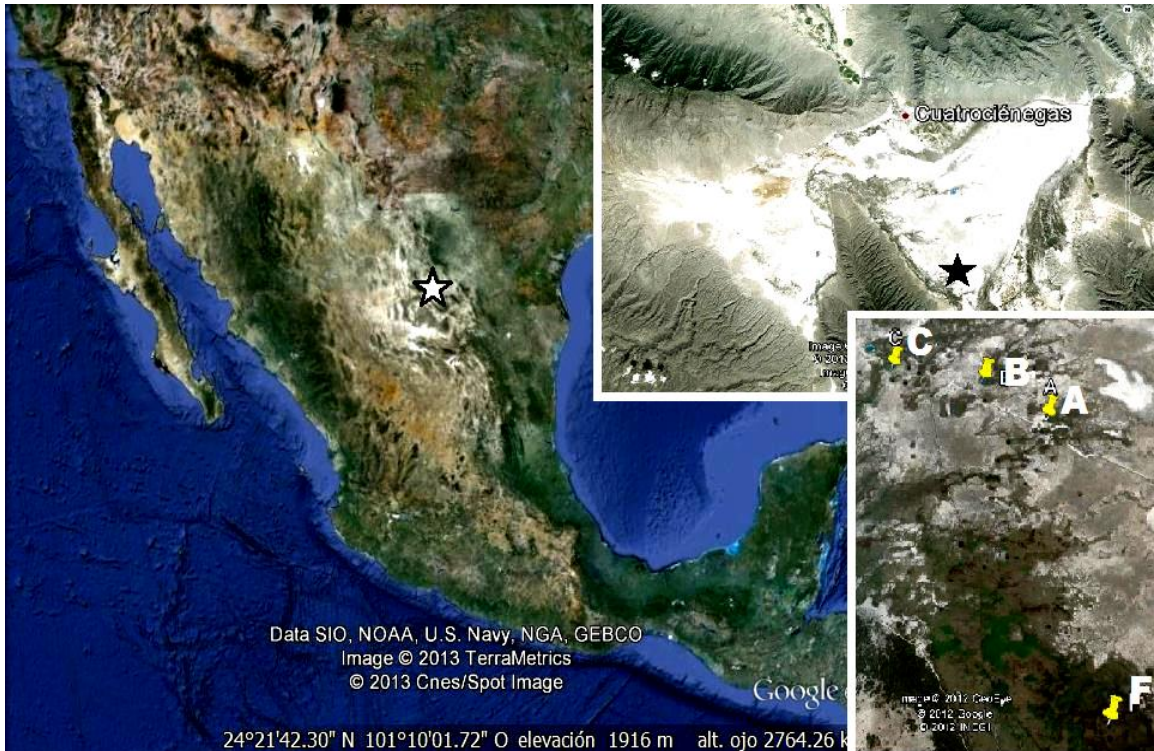
### 2.1 Cuatro Ciénegas y Pozas Azules

El valle de Cuatro Ciénegas, situado en el centro del estado de Coahuila, México (26° 59' N, 102° 04' W) forma parte del Desierto chihuahuense. Es una llanura semidesértica rodeada por varios sistemas montañosos cuyas temperaturas oscilan entre 0°C en invierno y 44°C en verano, con menos de 200mm de precipitación anual (Minckley 1969). Este sitio fue decretado desde 1994 como Área Natural Protegida y es también sitio prioritario para la conservación (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO).

El valle contiene un arreglo complejo de sistemas hidrológicos que incluye ríos, pozas y lagunas de cuyo origen se han planteado varias hipótesis. Algunos estudios hidrológicos proponen que el agua de los sistemas de Cuatro Ciénegas, (siendo esta una zona cárstica donde la circulación ocurre principalmente al interior de las montañas constituidas predominantemente por roca calcárea) proviene principalmente de un acuífero rico en carbonatos con flujo subterráneo entre valles y mezcla de agua subterránea profunda (Minckley 1992, Johannesson *et al.* 2004; Souza *et al.* 2006, Wolaver *et al.* 2013).

Los sistemas acuáticos de valle, se caracterizan por poseer agua principalmente salada, ser altamente oligotróficos y presentar los niveles más bajos de fósforo reportados para aguas continentales ( $[P] < 0.1 \mu\text{g/ml}$ ) García-Oliva, F. datos no publicados, Elser *et al.* 2005).

El sistema Pozas Azules fue descrito por primera vez en 1920 (Adkins 1920), se encuentra en el sur valle de Cuatro Ciénegas, al oriente de la Sierra de San Marcos (Figura 2) y constituye un archipiélago de pozas de agua sin conexiones naturales superficiales. Este se caracteriza por la presencia de estromatolitos vivos, la mayoría de sus pozas son permanentes y presentan formas cónicas con profundidades máximas de 10m.



**Figura 2.** Ubicación del área de estudio Pozas azules ★ dentro valle de Cuatro Ciénegas al norte de México ☆ Sitios de muestreo para este estudio: **A** (Poza Germán), **B**, **C** (Poza azul 2) y **F**.

En estas pozas el agua es rica en carbonato de calcio, tiene pH entre 7.5 y 8.1 y mantiene una temperatura más o menos estable (entre 20 y 25°C) debido al flujo constante en su interior (Breitbart *et al.* 2009; Pajares *et al.* 2012). Además se ha reportado que la proporción de nitrógeno es muy baja, así como las concentraciones de magnesio, sodio, potasio y sulfatos (Peimbert *et al.* 2012; Bonilla-Rosso *et al.* 2012, Wolaver *et al.* 2013).

## 2.2 Diversidad microbiana en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Cuatro Ciénegas es un gran reservorio de biodiversidad en muchos sentidos. Además de las amplias exploraciones botánicas y zoológicas (Bandino *et al.* 2004), las particularidades de sus sistemas han atraído el interés de los microbiólogos y se ha convertido en un interesante modelo para los recientes campos de la ecología y evolución microbiana, ya que sus ecosistemas acuáticos únicos en el mundo constituyen sitios extremos dominados por procariontes que sirven como modelo para probar hipótesis sobre evolución y ecología bacteriana (Souza *et al.* 2012)

Las aproximaciones más generales nos dicen que la diversidad procarionte en Cuatro Ciénegas es muy grande no sólo en términos de linajes (Souza *et al.* 2006, Escalante *et al.* 2008) sino también de funciones metabólicas (Breitbart *et al.* 2009; Peimbert *et al.* 2012; Bonilla-Rosso *et al.* 2012;). Las comunidades bacterianas son muy abundantes y poseen un gran número de especies endémicas (Souza *et al.* 2006; Escalante *et al.* 2008). Por otro lado, se ha reportado un gran número de grupos endémicos y con afinidad a bacterias de sistemas marinos, por lo que se propone que estas comunidades hayan divergido de sus ancestros marinos en el Jurásico cuando el valle se encontraba bajo el océano (Espinosa-Asuar 2006, Souza *et al.* 2006). Por otro lado, se plantea que las bajas concentraciones de fósforo, aunadas al aislamiento geográfico y poca reproducción sexual podría tener gran importancia en la diversificación de linajes microbianos y la emergencia de endemismos en las comunidades acuáticas del valle (Souza *et al.* 2008).

Existen varios estudios que analizan la diversidad microbiana a nivel de poblaciones y a nivel de comunidades en CCC. Escalante y colaboradores (2008) describen en un estudio a nivel de comunidades de diferentes sistemas del valle, una alta diversidad beta, compuesta de pocos OTUs comunes y muchos particulares. Por otro lado, los hallazgos de Cerritos y colaboradores (2011) revelaron que la distribución de la diversidad de bacterias termorresistentes cultivables en el sistema Churince se explica principalmente por la conductividad, que es una medida indirecta de la salinidad del agua.

Otros estudios a niveles taxonómicos más finos han reportado la variación estacional de la diversidad de bacterias del género *Pseudomonas* en el sistema Churince (Rodríguez-Verdugo *et al.* 2012). Asimismo, Rebollar y colaboradores (2012) encontraron un patrón de diferenciación genética de linajes del género *Exiguobacterium* asociado al tipo de hábitat (sedimento o agua) del que procedían, arrojando luz sobre los procesos asociados a hábitat y diferenciación de nicho que originan y estructuran la diversidad de estos organismos.

### 3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

---

Los estudios previos sobre la diversidad procarionte de CCC han examinado los posibles efectos de la distancia y del ambiente sobre la diversidad tanto de comunidades como de poblaciones, sin embargo no han detectado evidencia del efecto distancia como factor histórico sobre la distribución de esta diversidad (Escalante et al. 2008; Cerritos et al. 2011; Rebollar et al. 2012; López-Lozano et al. 2012, 2013). Es posible que el diseño de muestreo de estos estudios (que incluyen sitios contrastantes) interfiera con la capacidad estadística de detectar esta asociación geográfica (Bisset *et al.* 2010; Espinosa-Asuar *en preparación*).

Hanson y colaboradores (2012), han sugerido una estrategia de muestreo que consiste en estudiar sitios con condiciones ambientales similares, en razón de distinguir la influencia de los factores regionales (geográficos) de los ambientales, por lo tanto en esta tesis se estudió la diversidad bacteriana, con una aproximación molecular e independiente de cultivos, utilizando esta estrategia. El sistema acuático Pozas Azules constituye un interesante modelo de estudio dadas sus características. De este modo y utilizando el marco teórico de Martiny y colaboradores (2006) previamente descrito, buscamos evidencias que soporten la existencia de patrones biogeográficos de los ensamblajes bacterianos asociados a la distancia geográfica como componente histórico.

Los objetivos de esta tesis son:

1. Describir y caracterizar la diversidad de las comunidades bacterianas en Pozas Azules, CCC.
2. Determinar si existen patrones biogeográficos en las bacterias acuáticas de Pozas Azules a partir de la descripción los componentes alfa y beta de la diversidad.
3. Investigar la relación entre factores ambientales, estructura geográfica y diversidad genética bacteriana en estas Pozas.



# 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 4.1 Muestreo

En febrero de 2007 se realizó un muestreo en cuatro pozas permanentes del sistema hidrológico Pozas Azules. Este sistema se encuentra en la parte sureste del Valle Cuatro Ciénegas ubicado en el estado de Coahuila (Figura 2). Las pozas fueron elegidas para el análisis, debido a que eran similares entre sí, en términos de pH y conductividad (variando en rangos de 7.5 a 8 y 1,940-2,800  $\mu\text{S}$  respectivamente). Además las pozas elegidas constituyen localidades discretas sin una conexión aparente.

Cada sitio de muestreo fue georreferenciado (Tabla 2) y estos datos se utilizaron para calcular las distancias geográficas entre ellos. Se midió el diámetro de cada poza y, en cada una, el agua fue analizada con un equipo Hydrolab YSI600QS en cinco puntos de cada una de ellas, para explorar las posibles diferencias entre las condiciones ambientales entre los sitios muestreados y obtener datos de sólidos totales disueltos, salinidad, conductividad y pH.

Se colectaron 2.5 L de agua en cinco puntos de cada poza, cuatro de ellos en las orillas (2 a 4m de distancia) y una muestra al centro, a medio metro de profundidad. Todas las muestras de cada sitio, fueron mezcladas en garrafrones limpios de 20 L, para formar una muestra compuesta por poza. Cada muestra compuesta se dividió en tres porciones iguales (4L) que fueron posteriormente filtradas (ver Apéndice 1) y utilizadas para extracción de ADN (como se resume en el Apéndice 3) y otras tres porciones (de 100 mL) para la determinación de nutrientes (que se describe en el Apéndice 2).

**Tabla 2.** Características de los sitios de colecta en el rancho Pozas Azules, CCC

Sitio de colecta	Nombre local	Latitud °N	Longitud °W	Diámetro (m)
A	Poza Germán	26.49'24.4''	102.00'53.2''	10
B	---	26.49'31.8''	102.01'5''	30
C	Poza Azul II	26.49'34.7''	102 01'22.8''	40
F	---	26.48'37.08''	102.00'47.64''	14

## **4.2 Construcción de Librerías de clonas del gen 16S del ADN ribosomal**

### ***Extracción de ADN***

Se extrajo ADN genómico de los filtros (3 por cada poza) con el kit “Ultraclean water DNA” Marca MoBio de acuerdo al protocolo de manufactura con algunas modificaciones y posteriormente el ADN fue purificado con fenol (Apéndice 3).

### ***PCR***

Para cada una de las muestras de ADN obtenidas, se amplificó el gen que codifica para la fracción 16S del ARNr mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los oligonucleótidos universales 27F (5´AGA GTT AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3´) y 1492R (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') reportados por Lane *et al* 1991 (ver Apéndice 4).

### ***Clonación***

Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1%, y las tres reacciones de cada sitio se mezclaron en partes proporcionales de acuerdo a la cantidad de amplificado observada por la intensidad de las bandas. Posteriormente, los productos se ligaron al vector de clonación *pCR2.1* del kit “*TOPO TA Cloning*” de *Invitrogen* (Apéndice 5).

Los productos de las reacciones de ligación se usaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* TOP10 de *Invitrogen* siguiendo el protocolo de manufactura con algunas modificaciones (véase Apéndice 5). Las clonas con inserto fueron seleccionadas y sembradas en placas de 96 pozos con medio LB2X con 50mg/mL de Kanamicina para extraer los plásmidos con el Kit *Montage Plasmid Miniprep* (de *Millipore*) de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor (Apéndice 6). Posteriormente se llevó a cabo una reacción de restricción con la enzima *EcoR1* para corroborar la presencia del inserto en los plásmidos (Apéndice 7).

### ***Análisis de secuencias***

Los plásmidos aislados fueron enviados a la Universidad de Washington (Seattle, USA) para su secuenciación con el oligonucleótido 27F. Se generaron cuatro librerías de 80±10 secuencias parciales del gen 16s del ADN ribosomal. Las secuencias fueron alineadas en el programa *Mothur* versión 1.30.1 (Schloss, 2009) contra la base de datos de SILVA con

el algoritmo NAST (*Near Alignment Space Termination* por DeSantis, 2006). Los archivos alineados fueron también analizados y corregidos manualmente en el programa Bioedit versión 7.1.3.0 (Hall 1999) y las secuencias que fueron identificadas como quimeras en los softwares en línea Bellerophon (Huber *et al.* 2004), UCHIME (Edgar *et al.* 2011), y DECIPHER (Wright *et al.* 2013) fueron descartadas del análisis.

### **4.3 Caracterización de las clonas y construcción de filogenia.**

La caracterización de clonas se llevó a cabo por medio de la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar las secuencias contra las bases de datos de Ribosomal Data Base Project (Altschul *et al.* 1990), National Center of Biotechnology Information (Wang *et al.* 2007) y la base de datos de Greengenes (DeSantis *et al.* 2006) con la finalidad de determinar la identidad filogenética aproximada de cada clona.

Con las secuencias representantes de los OTUs obtenidos, se construyeron dos árboles filogenéticos empleando los métodos de distancia (*Neighbor-Joining*) y Máxima Verosimilitud. El árbol de *Neighbor-Joining* se construyó en el programa Mega, versión 5 (Tamura *et al.* 2011) con un *Bootstrap* de 1000 réplicas. La filogenia de Máxima Verosimilitud, se construyó en el programa PhyML v3.0 (Guindon y Gascuel 2003) con un *Bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica: TIM3+I+G, calculado en JModel test (Posada 2008)

### **4.4 Análisis estadísticos**

#### ***Índices de diversidad***

Se utilizó el programa Mothur (Schloss 2009) para identificar los OTUs representativos de cada una de las librerías de clonas, con umbral de identidad de 97% para definir cada OTU.

Para evaluar el esfuerzo de muestreo y comparar entre las muestras con tamaños diferentes, se elaboraron curvas de rarefacción, y se calcularon índices de cobertura para cada muestra con la ecuación 1.

$$C = (1 - n/N) \times 100 \quad [1]$$

Donde  $C$  es el porcentaje de cobertura de la librería,  $n$  el número de *singletons* (el número de OTUs con solo una secuencia) y  $N$  el número total de clonas analizadas (Good 1953, Ragon *et al.* 2012).

Con Mothur (Schloss 2009), se elaboraron matrices de presencia, ausencia y abundancia para cada sitio y se estimaron los componentes alfa y beta de la diversidad de las comunidades microbianas de las pozas muestreadas.

#### Componentes alfa

Se estimó la diversidad (con el índice de Shannon) y la riqueza específica (Chao1) de cada sitio. Chao1 (Chao 1984; Colwell y Coddington 1994) es un estimador no paramétrico que calcula la riqueza a partir de las especies observadas tomando en cuenta a los OTUs de distribución restringida (que aparecen una o dos veces) y asumiendo la presencia de especies raras o poco frecuentes (Ecuación 2).

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

Donde:  $S_{chao1}$  = riqueza específica estimada

$S_{obs}$  = el número de especies observadas

$n_1$  = El número de OTUs con solo una secuencia (i.e. "*singletons*")

$n_2$  = El número OTUs con solo dos secuencias (i.e. "*doubletons*")

El índice de Shannon (Ecuación 3) refleja el grado de incertidumbre asociado al hecho de predecir la especie de un individuo tomado al azar de la comunidad (Krebs 1999). Toma en cuenta la riqueza y la abundancia relativa de cada especie al interior de la comunidad.

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad [3]$$

Donde:  $S_{obs}$  = el número de OTUs observados

$n_i$  = el número de individuos en el OTU  $i$

$N$  = el número total de individuos en la comunidad

## Componentes beta

El índice de diversidad beta de Jaccard (Jaccard 1901), basado en pertenencia de OTUs, se utilizó para estimar la similitud entre los sitios en términos de composición. , Por otro lado se calculó el índice de diversidad de Morisita Horn (Horn 1966), que está basado en la abundancia de los OTUs para comparar la similitud en estructura.

El índice de Jaccard (Ecuación 4) estima la similitud entre localidades tomando en cuenta la presencia, ausencia, y el número de OTUs compartidos entre éstas.

$$D_{Jaccard} = \frac{S_{AB}}{S_A + S_B - S_{AB}} \quad [4]$$

Donde:  $S_{AB}$  = el número de OTUs compartidos entre las comunidades A y B

$S_A$  = el número de OTUs en A

$S_B$  = el número de OTUs en B

Por otro lado el índice de Morisita Horn (Ecuación 5) describe la similitud en estructura, incorporando valores de abundancia proporcional (Horn 1966).

$$D_{Morisita-Horn} = 1 - 2 \frac{\sum \frac{S_{A,i}}{n} \frac{S_{B,i}}{m}}{\sum \left(\frac{S_{A,i}}{n}\right)^2 + \sum \left(\frac{S_{B,i}}{m}\right)^2} \quad [5]$$

Donde:  $S_{A,i}$  el número de individuos de la comunidad A en el OUT i

$S_{B,i}$  = el número de individuos de la comunidad B en el OTU i

$n$  = en número de individuos en A

$m$  = en número de individuos en B

Estos índices de diversidad beta, reflejan la disimilitud o distancia que hay entre las comunidades de sitios distintos, estos van de 0 a 1, siendo 0 para comunidades idénticas y 1, completamente distintas.

## **Análisis de componentes principales**

Para caracterizar la variación ambiental de los sitios de muestreo, se realizó un Análisis de Componentes Principales en el programa R (ver material suplementario 1). El primer componente explica el 69.2% de la variación total e involucra al carbono orgánico disuelto (DOC), salinidad, carbono inorgánico (CI), sólidos totales disueltos (TDS) y conductividad. De los cuales estos últimos son medidas derivadas y los siguientes pares de variables resultaron significativamente correlacionados de acuerdo a la prueba de correlación de Pearson: COD y CI ( $r=0.803$ ,  $p=0.046$ ), CI y salinidad ( $r=0.999$ ,  $p=0.041$ ) y salinidad TDS ( $r=0.999$ ,  $p=0.049$ ).

Tomando en cuenta la proporción de la varianza explicada, la correlación entre variables y su relevancia ecológica (ver también Espinosa-Asuar *en preparación*), se eligieron seis de los diez parámetros fisicoquímicos medidos como variables explicativas y no redundantes: pH, conductividad, carbono total, carbono inorgánico, fósforo total y óxido nítrico.

## **Pruebas de Mantel**

Para la búsqueda de correlación entre la diversidad, el ambiente y la distancia geográfica se generaron tres clases de matrices. La primera es la matriz de diversidad beta o de disimilitud entre las comunidades, fue construida a partir del cálculo de los índices Jaccard y Morisita Horn entre cada par de sitios. La segunda matriz es la de distancia geográfica en Km determinada a partir de las coordenadas de los puntos de muestreo.

La tercer clase de matriz es la de distancia ambiental. Martiny y su grupo (2006) proponen utilizar la distancia euclidiana como estimador de la distancia ambiental entre sitios, esta se define como “la suma de las diferencias entre los valores de los atributos de cada entidad comparada” (Moreno 2000) y es muy útil en ecología porque es una medida simple e intuitiva que permite describir la diferencia entre sitios de acuerdo a los parámetros ambientales contemplados.

Para esto se hicieron matrices de distancia euclidiana para cada parámetro ambiental (individuales) y una matriz única de distancia ambiental cuyo cálculo incluye los

valores de las seis variables fisicoquímicas elegidas mediante los criterios antes mencionados.

Los valores de los datos ambientales fueron normalizados ((x-media)/desviación estándar). Para construir las matrices de distancia ambiental individuales, se estimó la distancia euclidiana entre pares de sitios (calculando el valor absoluto de: |Valor normalizado1 – Valor Normalizado2|) para cada una de las variables

Posteriormente se generó una matriz única de distancia euclidiana ambiental (con la Ecuación 6), en el programa R (R Development Core Team, 2008), a partir de la matriz de valores normalizados para las seis variables elegidas. Este estimador calcula la distancia entre dos puntos ( $p$  y  $q$  que en este caso son los sitios o pozas analizadas) en un espacio de  $n$  dimensiones (determinado por el número de variables contempladas).

$$d(p, q) = d(q, p) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2}. \quad [6]$$

Con las tres clases de matrices generadas, se elaboraron pruebas de Mantel en el programa R. se probó la correlación entre: las variables ambientales entre sí, así como la distancia ambiental contra la diversidad beta, la distancia geográfica contra la diversidad beta; y por último la distancia geográfica contra la distancia ambiental (para determinar la existencia de autocorrelación espacial).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características ambientales

Las características principales del agua en los sitios muestreados se presentan en la Tabla 3. Los contenidos de carbono, nitrógeno y fósforo fueron medidos para sus fracciones totales, inorgánicas y orgánicas, estas últimas calculando totales menos inorgánicas. El nitrógeno no logró detectarse y tampoco la fracción inorgánica de fósforo, lo cual sugiere que este se encuentra predominantemente de forma orgánica. Por otro lado, la mayor parte del carbono se encuentra en forma inorgánica en las pozas A, B y C, a diferencia de F, cuya forma dominante de carbono es orgánica.

**Tabla 3.** Nutrientes y parámetros fisicoquímicos ( $\pm$  desviación estándar) del agua en los sitios de colecta en Pozas Azules, Cuatro Ciénegas.

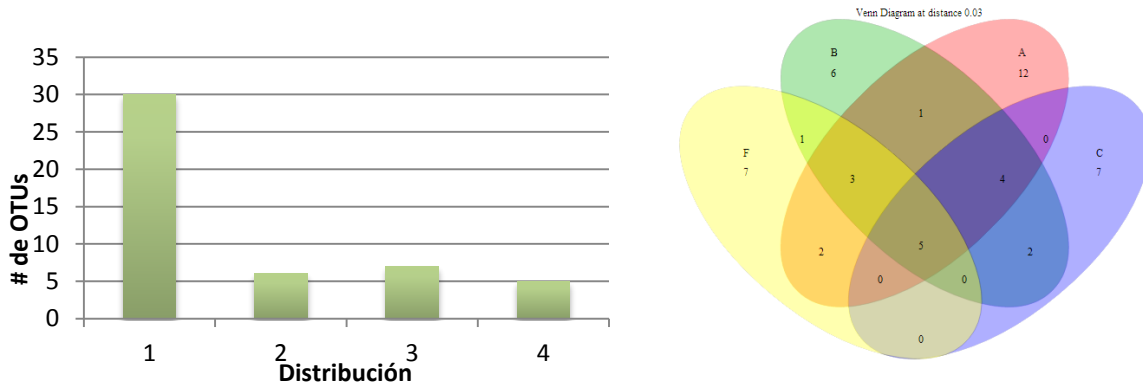
Sitio de muestreo	A	B	C	F
Temperatura (°C)	20.8 (0.04)	21.6 (0)	23.7 (0.05)	----
pH	7.76 (0)	7.53 (0)	7.712 (0.09)	7.81 (0.10)
Conductividad ( $\mu$ S)	2,501.6 (8.73)	2,529 (3.67)	2,883 (3.63)	1,940 (0)
Salinidad (mg/L)	8.70 (0.53)	8.51 (1.24)	7.66 (0.82)	1 (0)
TDS (ppt)	1.3 (0)	1.3 (0)	1.5 (0)	3.18 (0)
CT (mg/L)	120.265 (0.54)	109.22 (14.03)	110.41 (19.36)	102.28 (3.84)
CID (mg/L)	120.265 (0.54)	117.51 (7.13)	111.28 (18.12)	41.87 (1.38)
COD (mg/L)	0	0	0	60.4 (3.54)
NT (mg/L)	0	0	0	0
NID (mg/L)	0	0	0	0
NO <sub>2</sub> (mg/L)	0	0	0.0026 (0.0015)	0
PT (mg/L)	0.83 (0.090)	0.89(0.018)	0.87 (0.051)	0.92 (0.025)
PID (mg/L)	0	0	0	0

TDS: sólidos totales disueltos, CT: carbono total, CID: carbono inorgánico disuelto, COD: carbono orgánico disuelto, NT: nitrógeno total, NID: nitrógeno Inorgánico disuelto, NO<sub>2</sub>: óxido nítrico, PT: fósforo total y PI: fósforo inorgánico disuelto.



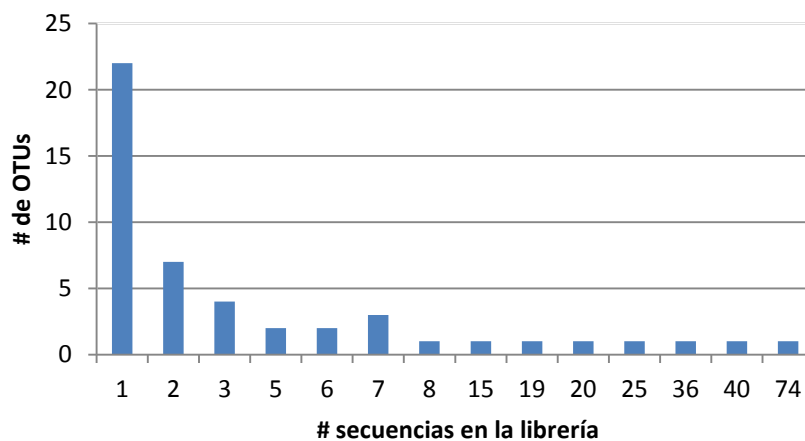
## 5.2 Diversidad bacteriana de Pozas Azules.

Para los cuatro sitios, de las 328 secuencias obtenidas, se definieron 48 OTUs en total y representan a las secuencias que comparten al menos 97% de similitud entre ellas. De estos, 30 constituyen OTUs exclusivos o raros, es decir que están presentes en un solo sitio, por otro lado, la proporción de OTUs comunes, o que se comparten entre dos o más sitios es mucho menor (Figura 3).



**Figura 3. a)** Distribución de los OTUs dentro Pozas Azules. El eje horizontal representa el número de pozas en los que aparece un OTU, y el eje vertical el número de OTUs **b)** Diagrama de Venn representando el número de OTUs únicos de cada poza, así como el número de OTUs compartidos entre estas. Número de OTUs en A: 27, B: 22, C:18, F:18. Riqueza total observada: 48.

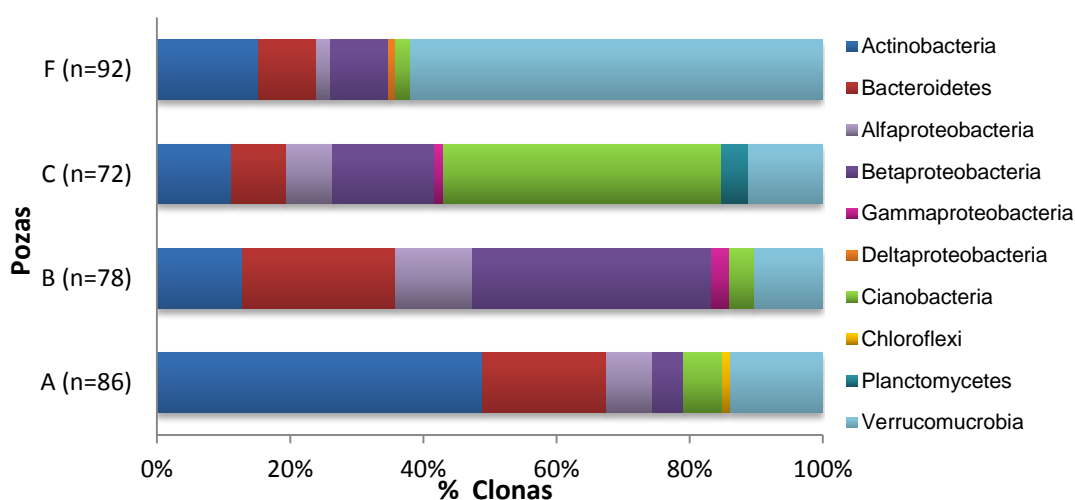
A su vez podemos observar (Figura 4) que 22 OTUs en las librerías estuvieron representados por una sola secuencia, mientras que siete OTUs (las últimas siete barras en la gráfica) tuvieron una mayor abundancia, desde 15 hasta 74 secuencias cada uno. El resto tuvo abundancias intermedias, de 2 a 8 secuencias.



**Figura 4.** Distribución de las abundancias (secuencias asignadas a los OTUs en las librerías).

### 5.2.1 Composición y estructura de los ensambles bacterianos.

Para obtener Información más específica sobre la diversidad de las comunidades bacterianas, se determinó la identidad taxonómica aproximada de las clonas mediante una comparación con bases de datos públicas. Las 328 secuencias obtenidas, fueron agrupadas en siete phyla bacterianos: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*, presentes en proporciones distintas en cada una de las pozas muestreadas (Figura 5). Además se observaron las clases *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, y el phylum *Chloroflexi*, aunque no se encuentran representados en todas las pozas.

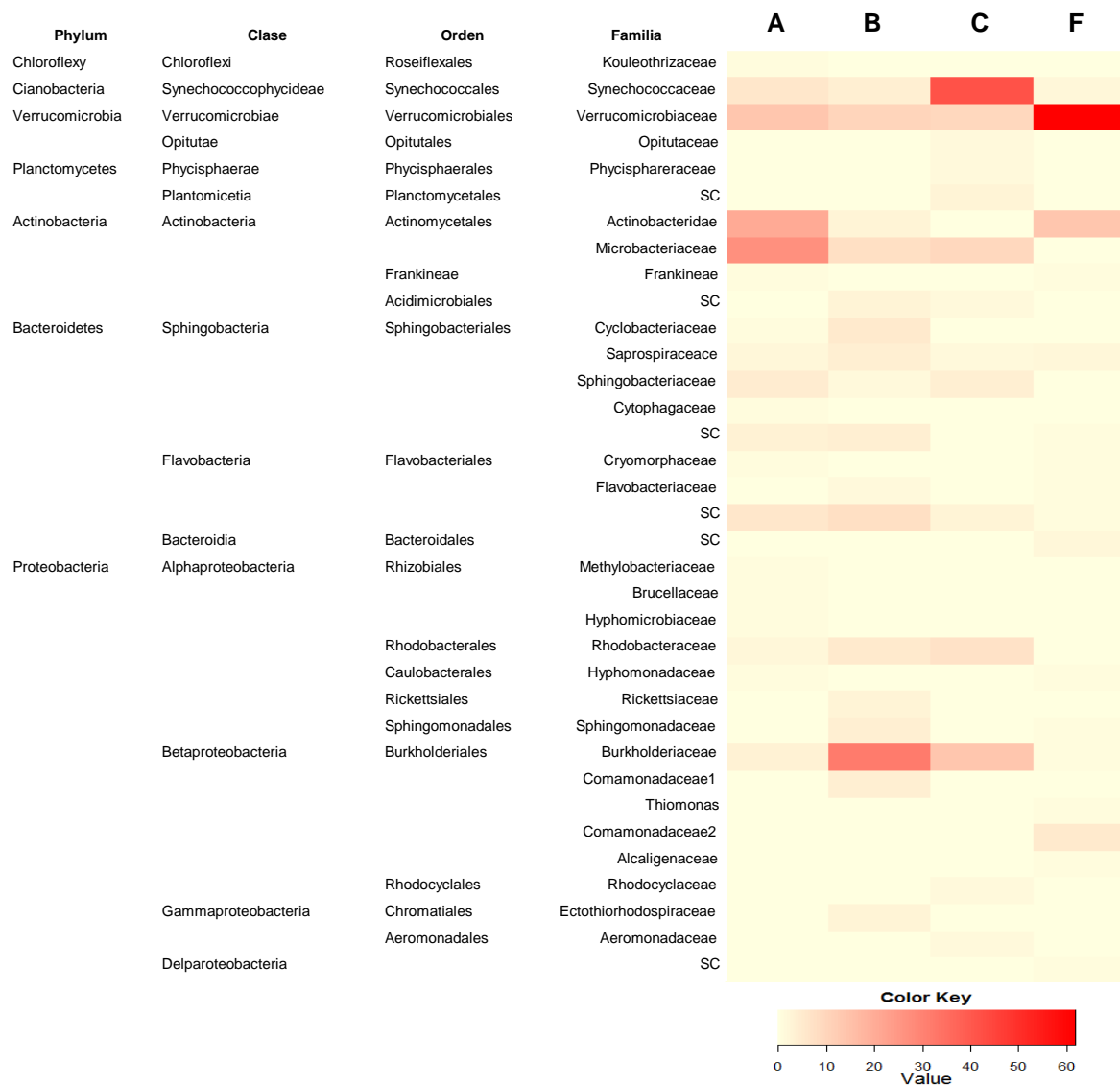


**Figura 5.** Distribución y abundancia relativa de los grupos taxonómicos de las clonas ambientales del gen 16S de ADNr presentes en Pozas Azules (n: número de secuencias por librería).

Las cuatro pozas estudiadas se encuentran dominadas por un Phylum distinto. En la poza A, las Actinobacterias representan casi el 50 % de la diversidad. Las proteobacterias son dominantes en la poza B, y de ellas las Betaproteobacterias, que representan el 35% de la librería. El grupo más abundante en la poza C es un solo OTU clasificado dentro del género *Synechococcus* (del Phylum *Cyanobacteria*) con un 41% de las secuencias. Finalmente la poza F se encuentra dominada por la familia *Verrucomicrobiaceae* (Phylum *Verrucomicrobia*) representando el 61% de la diversidad de este sitio.

Dado que la clasificación de filotipos depende de la presencia de secuencias similares en las bases de datos y de que estas se encuentren clasificadas, en la mayoría de los casos no fue posible garantizar la clasificación de las secuencias dentro de géneros

o especies conocidos, pero sí a niveles taxonómicos más generales. La Figura 6 muestra a detalle la distribución a nivel de familia o linajes dentro de los sitios de muestreo.



**Figura 6.** Distribución y abundancia relativa de las familias y linajes identificados para clonas ambientales del gen 16S de ADNr presentes en Pozas Azules. SC: sin clasificar.

La mayor parte de los filotipos se encontró dentro de las proteobacterias, cuya subdivisión Alfabroteobacteria fue representada por los órdenes Rhizobiales, Rhodobacterales, Caulobacterales, Rickettsiales y Sphingomonadales. Las Betaproteobacteria fueron representadas principalmente por el orden Burkholderiales y un OTU del orden Rhodocyclales.

Dentro de las Actinobacterias, con altos porcentajes de identidad fueron identificados la familia Microbacteriaceae y el linaje ACK-M1 del orden Actinomycetales, y del orden Acidimicrobiales; el género *Ilumatobacter*. Otro grupo abundante fue el Phylum Bacteroidetes, del cual se identificaron los órdenes Sphingobacteriales, Flavobacteriales y Bacteroidales pero con índices de identidad bajos.

De los OTUs raros, o poco abundantes y presentes en un solo sitio, los clasificados como Gammaproteobacterias pertenecen a los órdenes Chromatiales y Areomonadales. Una secuencia identificada como *Kouleothrix* (phylum Chloroflexi), y dos OTUs de las clases Physisphaerae y Planctomycetia. De los OTUs comunes (abundantes y distribuidos en la mayoría de los sitios) del phylum Cianobacteria hay un solo género distribuido en todas las pozas: *Synechococcus*, así como del phylum Verrucomicrobia, una sola familia: Verrucomicrobiaceae.

Por último los OTUs enlistados en la Tabla 4 no se encuentran reportados en las bases de datos consultadas, ya que fueron caracterizadas con índices de similitud menores a 97% a cualquier secuencia o sólo han sido reportadas antes en el valle de CCC.

**Tabla 4.** OTUs con similitud menor a 97% a otras secuencias reportadas.

Secuencia representante	Clasificación aproximada	ID	S	Origen
A_41_verrucomicrobia	c. Verrucomicrobia	JF413545.1	99*	CCC
A_67_actinobacteria	o. Actinomycetales	HM486249.1	96	Humedales
A2_13_bacteroidetes	f. Cryomorphaceae	271550	96	Lagos
A2_25_verrucomicrobia	f. Verrucomicrobiaceae	JX047115.1	93	Marino
A2_37_alfaproteobacteria	o. Rhodobacterales	JF413582.1	100*	CCC
B_2_gammaproteobacteria	c. Gammaproteobacteria	JQ766657.1	96	Aguas hiperalcalinas
B_10_alfaproteobacteria	f. Rhodobacteraceae	JQ701664.1	99*	CCC
F_49_verrucomicrobia	f. Verrucomicrobiaceae	JF413524.1	99*	CCC
F_81_alfaproteobacteria	o. Sphingomonadales	EU580487.1	93	Lagos
F_86_betaproteobacteria	f. Alcanigenaceae	FJ828480.1	94	Agua dulce
F_89_bacteroidetes	f. Flammeovirgaceae	DQ189761.1	97*	Marino
F2_1_deltaproteobacteria	c. Deltaproteobacteria	FM200917.1	93	Biofilm

**ID:** Número de acceso de la secuencia más parecida en el GenBank del NCBI, RDBP o Greengenes. **S:** porcentaje de similitud. **Origen:** lugar de donde procede la secuencia más cercana. Abreviaturas c: clase, o: orden, f: familia. \*Otras secuencias más parecidas tienen valores de similitud menores a 96%

## **Filogenia**

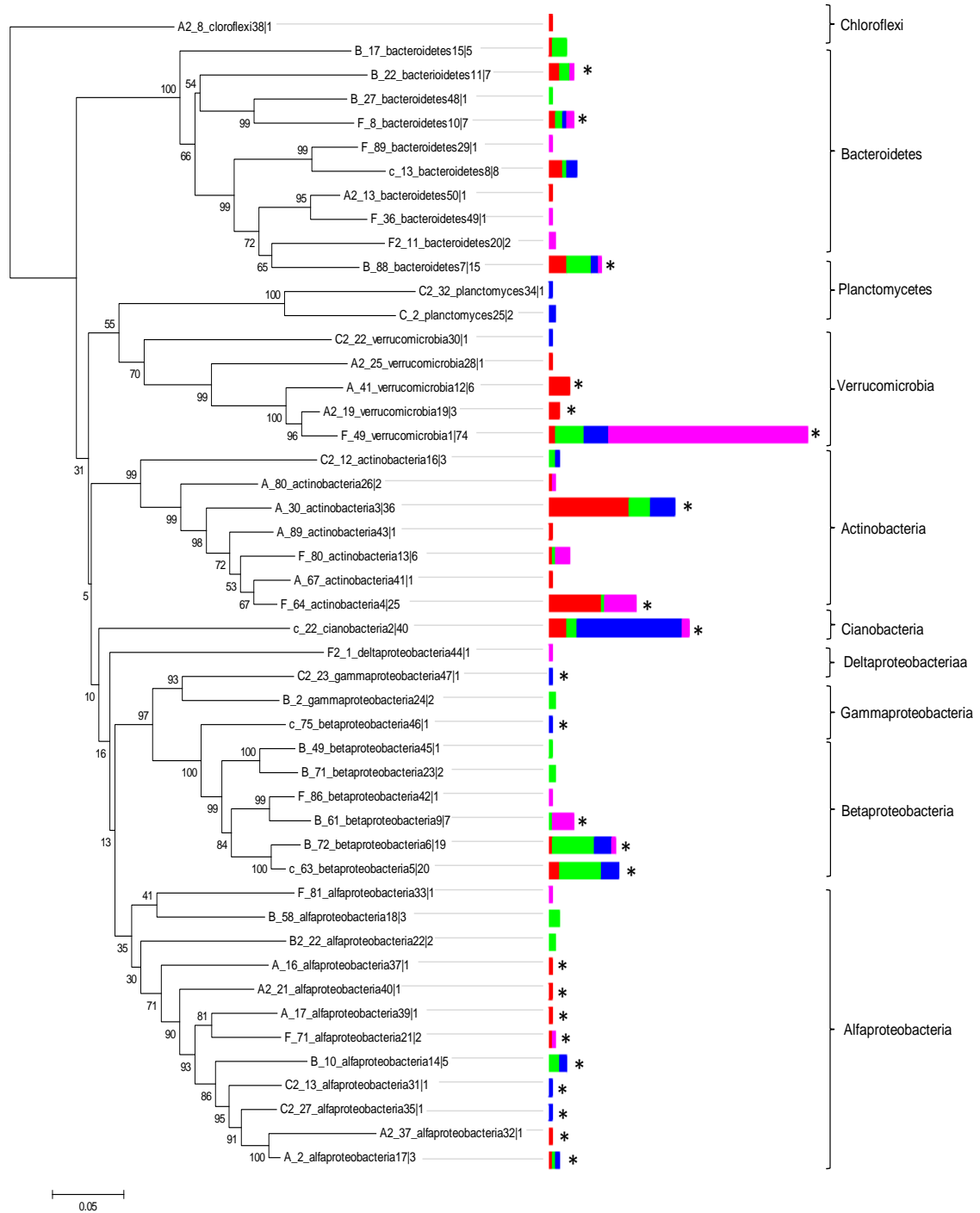
Para conocer la estructura filogenética de las bacterias acuáticas de Pozas Azules, se elaboraron dos árboles con las secuencias representantes del gen 16S. La reconstrucción filogenética utilizando el método de *Neighbor-Joining* muestra una topología congruente con las ya reportadas para bacterias (Figura 7). El análisis de Bootstrap apoya las asociaciones de la mayoría de grupos internos, pero no a nivel de ramas externas, en los que se observan valores de soporte menores a 50. El árbol de Máxima Verosimilitud (ver material suplementario 3) presenta una topología similar para los grupos internos, con algunos cambios en el orden agrupamiento de ciertos phyla, así como valores de bootstrap menores.

En la genealogía quedan bien resueltos los siete Phyla encontrados en las pozas. Las clonas provenientes de diferentes pozas se distribuyen de manera homogénea por todo el árbol, sin que haya alguna asociación aparente entre la estructura filogenética y el sitio de origen. Las barras de abundancia nos reflejan, que entre y dentro de los phylum hay diferencias en la frecuencia y abundancia de los OTUs presentes en las pozas.

Los Phyla Chloroflexi y Planctomycetes son raros y poco abundantes. En el Phylum Verrucomicrobia también encontramos OTUs exclusivos, pero uno de ellos es muy abundante y se encuentra en todas las pozas. La diversidad del Phylum Cyanobacteria está representada por un solo grupo, abundante y ampliamente distribuido.

Los OTUs del clado de los Bacteroidetes, se encuentran más o menos bien distribuidos en las pozas, la mayoría de ellos en dos o tres sitios. En el Phylum de las Actinobacterias también observamos esto, pero además de comunes, vemos que también son abundantes. Finalmente, dentro de las Proteobacterias, se observa algo distinto: el phylum está representado en todas las pozas, pero a nivel de ramas internas observamos que la mayoría de los OTUs son específicos de un sitio.

Aproximadamente 50% de los OTUs (señalados en el árbol) corresponden a secuencias antes reportadas en los mismos sitios de muestreo en los estudios de Pajares y colaboradores (2012)



**Figura 7.** Árbol filogenético de *Neighbor-Joining* de las secuencias representantes del gen 16S de ARNr encontradas en los cuatro sitios de muestreo de Pozas Azules, Cuatro Ciénegas. Los valores en las ramas indican el valor de bootstrap de 1000 réplicas. Escala: distancia de nei. En nombre de la secuencia representante del OTU seguido por el número de secuencias (|n) que pertenecen a dicho OTU. Las barras de la derecha indican la abundancia de cada OTU en la poza A (rojo), B (verde) C (azul). \* Señala a los OTUs que fueron también encontrados en los estudios de Pajares *et al.* 2012.

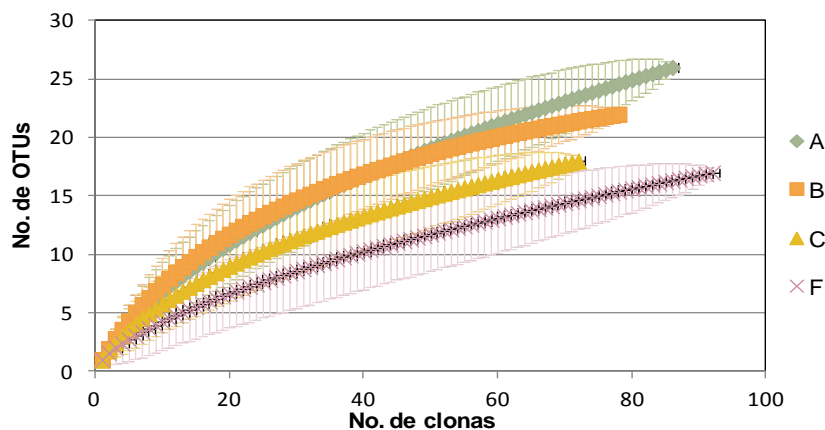
## 5.2.2 Diversidad alfa

La diversidad alfa estimada por el índice de Chao 1 indica que la riqueza específica es más alta en la poza A y más baja en la poza B (Tabla 5). Por otro lado, el índice de Shannon nos indica que en términos de equitabilidad la poza más diversa es la poza B, aunque en general los valores de este índice son bajos con respecto a lo que se ha observado previamente en sistemas del valle (Escalante *et al.* 2008, Lopez-lozano *et al.* 2012) por que los sitios se encuentran dominados por un número limitado de OTUs.

**Tabla 5.** Índices de diversidad alfa dentro de las pozas muestreadas

Poza	OTUs observados	Riqueza específica	Diversidad (abundancia proporcional)	Porcentaje de cobertura
		Chao 1	Shannon	
A	26	61	2.620	82.5
B	22	25.5	2.737	91
C	18	27	2.154	87.5
F	17	28.25	1.579	89

Para evaluar el esfuerzo de muestreo de las librerías de clonas y tener una idea de la diversidad total, se construyeron curvas de rarefacción para cada sitio (Figura 8). La curva generada no llega a una asíntota, indicando que la riqueza no fue totalmente muestreada, en especial para la poza A, que es consistente con los valores del estimador de riqueza no paramétrico Chao 1 (Tabla 2). Sin embargo los porcentajes de cobertura son altos, indicando que el muestreo cubre más del 80% de la diversidad en todos los casos.



**Figura 8.** Curvas de rarefacción de las secuencias del gen 16s de ARNr de cada sitio (A, B, C, F), graficando el número de OTUs detectados contra el número de secuencias analizadas  $\pm$  el intervalo de confianza.

### 5.2.3 Diversidad beta

Se obtuvieron valores altos para la diversidad beta estimada: todos mayores a 0.5, indicando una alta diferenciación entre los ensambles locales.

**Tabla 6.** Matriz de comparaciones pareadas entre las pozas con los índices de diversidad beta de Jaccard (triángulo inferior) y Morisita Horn (triángulo superior). Entre paréntesis el número de OTUs compartidos.

	A	B	C	F
A		0.5829	0.6383	0.8661
B	0.6285 (13)		0.5912	0.7098
C	0.7438 (9)	0.6206 (10)		0.7684
F	0.6969 (11)	0.7000 (9)	0.8333 (5)	

El estimador de disimilitud basado en presencia y ausencia de OTUs (Jaccard) sugiere que las pozas más parecidas entre sí son B y C, y las más diferentes C y F. Por otro lado, el índice Morisita Horn basado en estructura, es decir que toma en cuenta las abundancias relativas de los OTUs dentro de las librerías, indica que las pozas A y F son las más distintas y la A y B las más parecidas (Figura 9).



**Figura 9.** Clustering de las pozas de acuerdo a los índices de diversidad beta Jaccard (verde) y Morisita Horn (naranja).



## 5.2.4 Pruebas de Mantel: Correlación ambiente, geografía y diversidad

La diversidad beta, medida con el índice de Jaccard, tuvo correlación positiva y significativa con la distancia geográfica entre las pozas; es decir que las pozas más cercanas entre sí, comparten mayor número de OTUs que las más alejadas (Tabla 7).

**Tabla 7.** Correlación entre matrices de distancia genética (Con los índices de Jaccard y Morisita Horn) y matrices de distancia ambiental euclidiana y distancia geográfica.

Diversidad $\beta$	Distancia ambiental	Distancia geográfica
Jaccard	$r=0.5305$ $p=0.210$	$r=0.808033$ $p=0.039$
Morisita Horn	$r=0.9643$ $p=0.094$	$r=0.6934$ $p=0.131$

Las pruebas de Mantel realizadas contra la matriz de disimilitud ambiental única no arrojaron ninguna correlación significativa a ninguno de los índices de diversidad beta ni a la distancia geográfica ( $r=0.6934$ ,  $p=0.1316$ ). Sin embargo en las pruebas de Mantel realizadas con las matrices ambientales individuales se obtuvo una correlación significativa entre la diversidad beta medida con el índice de Jaccard y la conductividad ( $r=0.826409$ ,  $p=0.050$ ).

Finalmente no se observó correlación significativa entre la matriz distancia geográfica y ninguna de las matrices de distancia ambiental, en particular la conductividad y la distancia geográfica no resultaron correlacionadas significativamente ( $r= 0.7792$ ,  $p=0.1636$ )

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

*¿Por qué es importante estudiar la biogeografía bacteriana en CCC?*

En el contexto de las investigaciones sobre la diversidad microbiana y los procesos asociados a su composición y estructura, el estudio en sistemas como Pozas Azules CCC, nos proporciona importantes pistas sobre su evolución en el tiempo y el espacio, así como sobre su funcionamiento en el presente. Para explorar las hipótesis propuestas sobre biogeografía de microorganismos, la estrategia de este trabajo consistió en comparar sitios similares, no contrastantes entre sí y que pertenecen al mismo sistema acuático, estimando el impacto de la distancia geográfica y las condiciones ambientales locales sobre la diversidad de cada uno de ellos. Las particularidades de los sistemas hidrológicos en CCC, así como el área estudiada en esta tesis (Pozas Azules), nos dan una oportunidad de examinar desde los enfoques ecológico y evolutivo la diversidad bacteriana.

### 6.1 Variación ambiental

Las Pozas Azules, constituyen unidades geográficas discretas y son ecosistemas dominados por vida bacteriana. La baja concentración de fósforo, nitrógeno y la presencia de carbono en forma principalmente orgánica de las pozas, son factores que caracterizan ambientes oligotróficos extremos. Como sabemos, una de las fuentes hidrológicas más importantes de las pozas es un acuífero carbonatado (Wolaver *et al.* 2013), por lo tanto podemos suponer que la forma principal de carbono inorgánico presente en las pozas son los carbonatos, una mayor concentración de  $\text{HCO}_3$  podría estar directamente relacionada al aumento de la salinidad y la conductividad del agua de las pozas.

El gradiente ambiental de los sitios de muestreo no es muy amplio. La poza más distinta en términos de parámetros ambientales es la poza F (tabla 2), que es también la más alejada, sin embargo los análisis de Mantel entre las variables fisicoquímicas del agua y distancia geográfica, indican que no hay autocorrelación entre la distribución espacial y la distancia ambiental entre las pozas, lo cual quiere decir que las diferencias ambientales son independientes de la distancia geográfica.

## 6.2 Diversidad

El análisis de las librerías de clonas del gen 16S que codifica el ARN ribosomal, nos permitió conocer, desde muchos puntos de vista la diversidad de los ensamblajes bacterianos.

En primer lugar, existen algunos grupos que están ampliamente distribuidos en el sistema, pero el 62.5% de los OTUs que se encontraron en Pozas Azules tienen una distribución restringida y son exclusivos de una sola poza. Este patrón implica que para el ensamblaje regional, muchos OTUs serán raros, generando grandes diferencias en la composición de los sitios muestreados. Lo anterior es parecido a lo que se observa en ensamblajes de macroorganismos (Cox & Moore 2010) y concuerda con lo que otros estudios de la zona han mostrado (Souza *et al.* 2006, Escalante *et al.* 2008).

Por otro lado, dentro de los ensamblajes bacterianos, observamos pocos OTUs muy abundantes, y muchos OTUs que están representados por una sola secuencia. Esta distribución desigual de la abundancia propicia una diferencia en la estructura de las comunidades muy marcada, estando dominadas cada una de ellas por un grupo particular. En las siguientes páginas se describirá y discutirá con más detalle la composición, la estructura de la diversidad y sus relaciones a los factores locales y regionales de Pozas Azules.

### ***OTUs exclusivos del Valle de Cuatro Ciénegas***

Más del 60% de las secuencias generadas no están relacionadas a especies conocidas en las bases de datos (identidad <97%) y han sido reportadas solo dentro del valle (Tabla 2). A pesar de que la resolución del método utilizado en este trabajo no nos permite plantear el estatus de especies para estas secuencias, esto plantea la existencia de una diversidad genética que no se parece a nada que se haya encontrado hasta ahora en ningún otro sitio del mundo y podría representar la presencia de endemismos. Los endemismos, como ya hemos visto, se ha reportado en bacterias, como lo demuestran algunos estudios en sitios extremos (Whitaker *et al.* 2003, Papke *et al.* 2003). Por otro lado se ha propuesto que en el valle de Cuatro Ciénegas, las condiciones bajas de fósforo propician una serie de adaptaciones microbianas que reducen recombinación y transferencia horizontal de genes. Estas adaptaciones, aunadas al aislamiento geográfico están relacionadas a la especiación activa (Souza *et al.* 2008). Por tanto, en este sistema podríamos estar observando este fenómeno que propicia el surgimiento de especies endémicas.

## 8.2.1 Composición y estructura del ensamble bacteriano.

### *Distribución y estilos de vida*

Para obtener información más detallada acerca de la diversidad taxonómica de las comunidades, las secuencias de las librerías de clonas fueron analizadas mediante la herramienta Blast, con la que se obtuvo su correspondencia en las bases de datos conocidas. Además se construyeron árboles filogenéticos (*Neighbor-Joining*, Figura 7; Máxima Verosimilitud, material suplementario 3) para estimar las relaciones filogenéticas entre los OTUs, incluyendo la información de distribución y abundancia en cada una de las ramas.

Los hallazgos encontrados son acordes a reportes previos sobre la diversidad taxonómica bacteriana dentro de este sistema (Breitbart *et al.* 2009, Bonilla-Rosso *et al.* 2012, Pajares *et al.* 2012). En estos se describe la presencia de grupos muy abundantes como las Actinobacterias, Cianobacterias, Proteobacterias y Bacteroidetes, y la presencia de grupos poco abundantes como Chloroflexy, Plancomycetes y Verrucomicrobia. De los OTUs encontrados, observamos organismos heterótrofos, fotótrofos, quimioautótrofos (metanótrofos) y grupos involucrados en la fijación de nitrógeno. Además la similitud entre la composición de los sitios de muestreo de este estudio con respecto a la de los mismos sitios de muestreo del trabajo de Pajares y colaboradores (2012), apoya la idea de que PA es un sistema estable dentro del cual la presencia de los grupos más abundantes no varía en el tiempo.

Al observar cómo se distribuye la diversidad filogenética (Figura 7 y Figura 10), podemos ver que la abundancia y la amplitud de la distribución (es decir, el número de pozas en los que se distribuye) no es equivalente para todos los grupos taxonómicos.

Algunos trabajos señalan que el impacto de los procesos que afectan la distribución biogeográfica de las especies -selección, dispersión, deriva y diversificación- no es el mismo para todas las bacterias y depende en gran parte de las características particulares de historia de vida de los grupos que conforman las comunidades. Los grupos generalistas, tendrán menor influencia de la selección por las condiciones ambientales locales, que aquellos que son especialistas (Bisset *et al.* 2010, Lindstrom & Langenheder 2012, Nemergut *et al.* 2013). Los especialistas quedan restringidos a un hábitat específico definido por un determinado número de variables, mientras que los generalistas conservarán una distribución más amplia dentro del gradiente ambiental. Por otra parte la distancia

geográfica y los factores regionales afectarán más la distribución de grupos con poca movilidad, que la de grupos con capacidades de dispersión alta. La abundancia es otro factor, ya que la probabilidad de establecimiento y colonización en un sitio, es proporcional a la abundancia de una especie (Nemergut *et al.* 2013).

De los OTUs que se encuentran más ampliamente distribuidos, encontramos grupos muy abundantes como una Verrucomicrobia (rama F\_49) solo antes reportada en el valle de CCC (Pajares *et al.* 2012). Se conoce poco acerca de los nichos ecológicos de las subdivisiones dentro de este Phylum, pero se sabe que la clase Verrucomicrobiae (a la que pertenecen los OTUs encontrados en este trabajo), representa el sexto grupo más común encontrado en las comunidades de bacterioplancton marino (Freitas *et al.* 2012).

Otro OTU de gran distribución en este trabajo pertenece al género *Synechococcus* (rama C\_22), que es un género marino muy abundante y con gran capacidad de dispersión (Mazard *et al.* 2012).

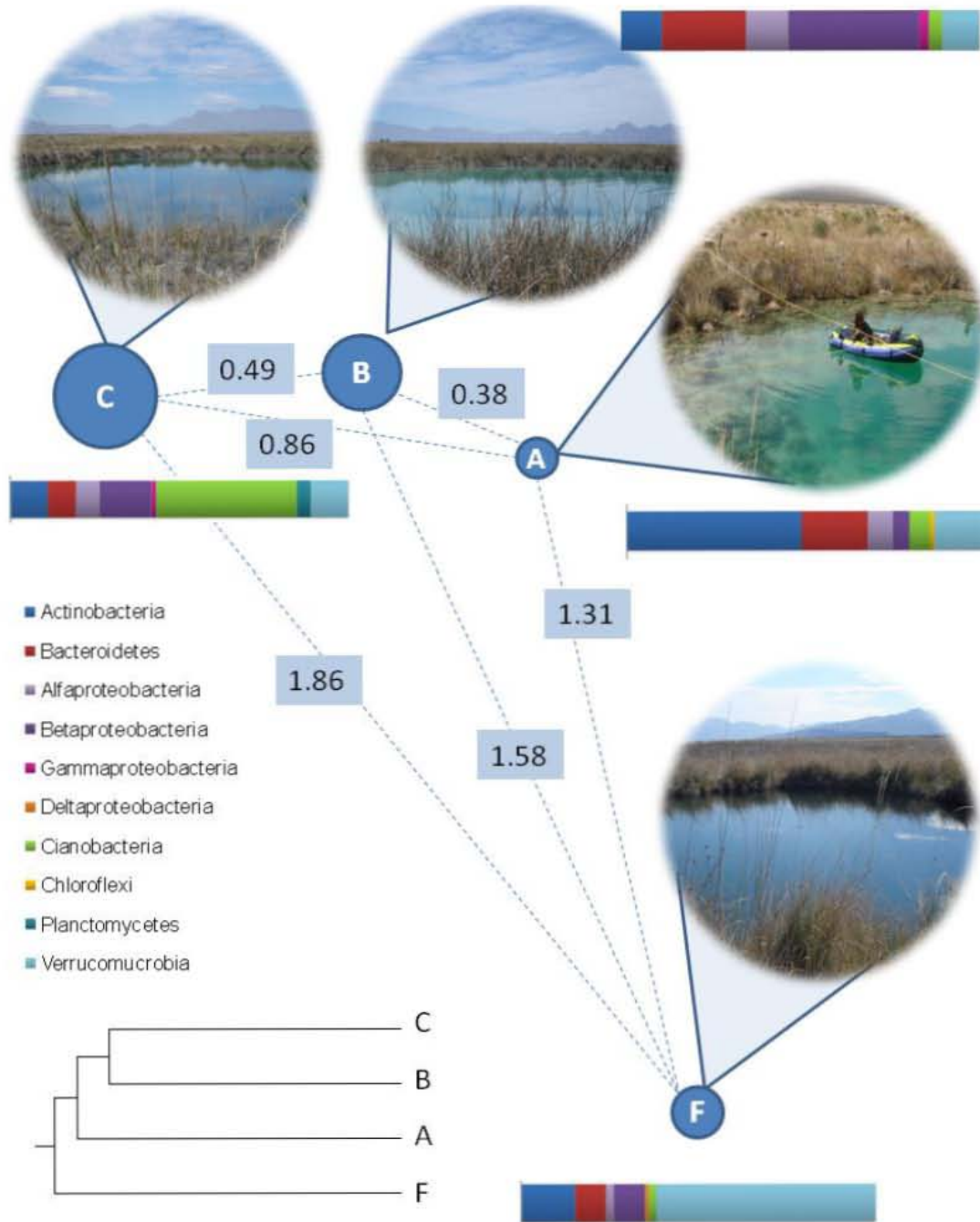
En el clado del phylum Bacteroidetes, la mayoría de los OTUs se encuentran en dos o más sitios, a pesar de que no son muy abundantes. El phylum Bacteroidetes es un grupo muy abundante y ampliamente distribuido en el bacterioplancton marino (y en otros ambientes), su distribución se ha logrado asociar a la profundidad en la columna de agua (Blümel *et al.* 2007).

Por otra parte otros taxa ampliamente distribuidos pertenecen a los Phyla Bacteroidetes Betaproteobacteria y Actinobacteria. Ambas ramas de la clase Betaproteobacteria (ramas B\_72 y C\_63), pertenecen a la familia Burkholderiaceae, que se considera un grupo ubicuo en la naturaleza, ya que podemos encontrarlo en suelos, agua (incluyendo agua de mar) la rizósfera de la plantas y en varias formas patógenas para el ser humano (Coenye & Vandamme 2003).

De los OTUs de Actinobacteria (ramas, A\_30\_ y F\_64), la familia Microbacteriaceae también se encuentra en varios ecosistemas acuáticos y terrestres, mientras que *candidatus Planctóphila* es considerado uno de los taxa más importantes numéricamente en el bacterioplancton de agua dulce (Jezbera *et al.* 2009).

Tomando en cuenta lo anterior, en Pozas Azules, podríamos estar detectando esta dinámica de ensamblaje asociada a las características de historia de vida (Langenhender y Szekely 2011, Logares *et al.* 2013). Podemos suponer, que los grupos generalistas y abundantes en un sistema con poca variación ambiental como este, están sujetos

principalmente a factores regionales, y su presencia y abundancia depende más de procesos estocásticos, como la deriva, la especiación y la migración, generando así diferencias en la estructura y composición de las comunidades.



**Figura 10.** Estructura geográfica (Distancia entre las pozas en Km) del sistema estudiado y la distribución filogenética bacteriana encontrada. Árbol de distancias entre las (pozas de acuerdo al índice de diversidad beta de composición Jaccard).

### **6.3 Biogeografía bacteriana de Pozas Azules: Ambiente, geografía y sus relaciones con la diversidad**

Se estudió la diversidad y su relación con los factores locales (ambiente) y regionales (distancia geográfica) mediante el análisis de sus componentes alfa y beta.

Las curvas de rarefacción indican que la diversidad no fue muestreada de manera exhaustiva y que con un muestreo más amplio podríamos obtener una mejor estimación de la diversidad total. Esto se debe a que la mayor parte de los miembros de la comunidad tienen abundancias bajas, y los métodos moleculares son mejores para obtener a los miembros más abundantes, pero el único modo de evitar este problema es aumentar el número de secuencias. A pesar de lo anterior, los porcentajes de cobertura (A: 82%, B: 91%, C: 87% y F89%) indican que la diversidad muestreada es suficiente para obtener un panorama razonable para realizar nuestros objetivos.

Al interior de cada poza, dados los valores del estimador de riqueza Chao1, se observó que la contribución relativa de la riqueza local de cada sitio a la riqueza total del sistema es diferente, siendo mayor la riqueza estimada para la poza A (Tabla 2). Por otro lado, los índices de Shannon, que van de 1.5 a 2.6, sugieren que las comunidades tienen baja equitabilidad comparada a la de otros sistemas en CCC (Escalante *et al.* 2008, Bonilla-Rosso *et al.* 2012, López-Lozano *et al.* 2012) debido a la dominancia de un número reducido de OTUs muy abundantes.

La diversidad del sistema está principalmente explicada por el componente beta, es decir la heterogeneidad entre las comunidades locales dentro del espacio regional. Observamos que los índices basados tanto en pertenencia (Jaccard) como en estructura (Morisita Horn) describen una alta diferenciación de los ensambles locales (Tabla 3, Figura 4), de la que se discutirá más adelante.

#### **6.3.1 Patrones de distribución**

Dentro del contexto de los debates actuales sobre si los microorganismos exhiben patrones biogeográficos, en este trabajo se estudió la variación espacial de la diversidad bacteriana en términos de diversidad beta para estimar la importancia relativa de los procesos que alteran la presencia y abundancia relativa de las especies en las comunidades. Se utilizaron

pruebas de Mantel como método de correlación multivariada para examinar el impacto de la distancia geográfica y las condiciones ambientales locales en las diferencias entre las comunidades del ensamble bacteriano regional.

Las pozas estudiadas representan sistemas discretos y fueron elegidas lo más parecidas posibles, sin embargo se observaron diferencias ambientales que aparentemente tienen impacto sobre la distribución de la diversidad. Los resultados, indican la existencia de los siguientes patrones:

### ***La influencia del ambiente***

A pesar de que no se encontró una correlación significativa entre la diversidad beta y la matriz de distancia ambiental única, el análisis de Mantel indicó que la diversidad beta, medida a partir del índice de disimilitud de Jaccard, está directamente relacionada a la conductividad, que es una medida indirecta de la salinidad.

Estos resultados sugieren que la salinidad influye en la distribución de ciertos grupos, afectando la composición de las comunidades. La correlación de estructura biogeográfica a gradientes de salinidad ha sido ampliamente reportada en ambientes marinos y lagos salados a diferentes escalas (Benlloch *et al.* 2002, Herlemann *et al.* 2011, Wang *et al.* 2011, entre otros). Se ha propuesto que esto tiene que ver por un lado: con la capacidad de ciertos grupos a tolerar concentraciones de sales específicas y por otro: con el cambio en la disponibilidad de nutrientes a concentraciones diferentes de sales que afecta la productividad y la diversidad de maneras distintas (Wang *et al.* 2011, Lozupone y Knight 2007). Este último fenómeno podría estar ocurriendo en Pozas Azules, ya que observamos que la salinidad está correlacionada a la concentración de carbonatos. Esto sugiere la existencia de grupos adaptados a las condiciones locales de salinidad y disponibilidad de carbono de una poza determinada.

### ***Efecto de la distancia geográfica.***

Los análisis de Mantel también arrojaron una correlación positiva entre la distancia geográfica entre las pozas y la diversidad beta basada en composición (Jaccard). Los ensamblajes más cercanos comparten más OTUs y los más lejanos son los más distintos (Figura 9). Esto supone la existencia procesos históricos de escala regional como la deriva, que aunada a la baja dispersión, propicia las diferencias entre las comunidades dada su



separación geográfica, similar a lo que se ha encontrado antes en otros estudios, aunque a distancias más grandes (ver Tabla 1).

La influencia de los factores regionales o históricos (medidos a través de la distancia geográfica), es a menudo más difícil de probar que la de los factores locales. Esto puede suceder debido a que en la comparación de comunidades de sitios con condiciones ambientales contrastantes el efecto de la distancia queda enmascarado. Bisset y colaboradores (2010) plantean una estrategia para probar más específicamente, la influencia de la distancia, minimizando lo más posible las diferencias ambientales entre sus sitios de muestreo. Este es el caso del sistema estudiado en este trabajo, en el que los sitios no tienen condiciones ambientales contrastantes. Así mismo, como ya se mencionó antes, las pozas muestreadas constituyen localidades aisladas que son una barrera de dispersión, permitiéndonos de este modo observar la influencia de la distancia geográfica en una escala pequeña (1.9 km).

Por último hace falta señalar que a diferencia de los patrones encontrados con el índice de diversidad beta de Jaccard, no se obtuvo ninguna correlación significativa ni a ambiente ni a distancia geográfica con el índice de Morisita Horn (que toma en cuenta las abundancias relativas de los OTUs). Es posible que esto se deba a que las características de historia de vida individuales, afectan la relevancia de procesos como selección y deriva (como ya se discutió en *distribución y estilos de vida*), y por lo tanto los factores que afectan la estructura de las comunidades, no son los mismos que los que afectan su composición.

Finalmente, es necesario reflexionar que en este trabajo se estudiaron cuatro localidades. Por un lado la asociación a la salinidad ha sido ampliamente reportada por otros estudios, y por otro lado la evidencia de aislamiento geográfico es congruente con la presencia de grupos generalistas, sin embargo se recomienda un muestreo más amplio para corroborar que estas asociaciones sean reproducibles y no sean producto del azar.

## 6.4 Aplicabilidad de las teorías

*¿Son las bacterias una excepción a las reglas?*

Retomando la cuestión fundamental sobre los factores que determinan la distribución de la diversidad bacteriana, las asociaciones encontradas en este trabajo nos permiten observar la influencia de la distancia geográfica y las condiciones ambientales en la distribución de la diversidad bacteriana, correspondiendo con la cuarta hipótesis de biogeografía microbiana propuesta por Martiny y colaboradores (2006). Esto quiere decir, que en el ensamble bacteriano estudiado, actúan tanto procesos ecológicos locales que tienen que ver con la salinidad de las pozas, como procesos regionales o históricos de deriva y diversificación por aislamiento geográfico. Dichos procesos determinan la presencia y abundancia relativa de las especies, y generan diferenciación entre las comunidades locales, que se refleja en una gran diversidad del ensamble regional.

Es importante discutir las características de este sistema que hacen posible observar estos patrones. Souza y colaboradores (2008) plantea que las bajas concentraciones de fósforo en los sistemas del valle propician una serie de adaptaciones como la baja transferencia horizontal de genes que están relacionadas con la diversificación y el endemismo, el reconocimiento de genes específicos a través de análisis metagenómicos y la falta de reconocimiento de especies permiten hacer estas conclusiones.

Por otro lado nuestros datos apoyan la idea de que los lagos y pozas pueden ser considerados como islas, y que la estructura del ensamble bacteriano depende del grado de aislamiento del medio que las rodea. En estudios previos en Pozas Azules, con TRFLPs (Espinosa-Asuar *com. per.*) se observa que las pozas que están conectadas entre sí, tienen perfiles de diversidad muy similares. En el caso del ensamble estudiado en este trabajo, al observar grandes diferencias entre las comunidades, podemos suponer con bastante certeza que no hay conexiones subterráneas entre las pozas estudiadas y que por lo tanto la distancia geográfica superficial representa este aislamiento y es inversamente proporcional a la dispersión entre las comunidades. De esta forma, proponemos que debido a los altos niveles de diversificación, así como al aislamiento geográfico antes mencionado, es posible observar los patrones de estructuración biogeográfica tanto ecológica como histórica en una escala geográfica pequeña. Esta evidencia respalda las ideas recogidas

en la última década de que no “todo está en todos lados” y que las bacterias están sujetas y responden a procesos ecológicos como lo hacen los macroorganismos, encontrando patrones similares a los que se han descrito para ellos.

Como se ha descrito en este trabajo, los sistemas microbianos pueden situarse en cualquier punto dentro de los extremos teóricos propuestos y la microbiología puede utilizar conceptos pre-existentes en biogeografía y ecología para comprenderlos. Por otro lado la aproximación centrada en especies es particularmente difícil de estudiar en bacterias, dadas sus características únicas y la dificultad para definir especie bacteriana, por lo tanto es posible que estas nociones derivadas en gran parte de los estudios en plantas y animales, no sean directamente aplicables pero son comparables.

Por otro lado existe cierta ambigüedad entre los términos planteados por los marcos teóricos distintos, y las observaciones detalladas y precisas generadas en distintos estudios no pueden por si mismas ofrecer explicaciones integrales sin un marco teórico adecuado que las permita comparar con otros estudios. Por estas razones es necesario unificar las herramientas conceptuales dentro de la ecología microbiana y desarrollar diseños experimentales en razón de medir, detectar e interpretar los procesos y patrones de su distribución, ya que este tipo de estudios nos permiten entender mejor la evolución de los ensamblajes microbianos en el espacio y constituyen un modo de aproximarnos a preguntas fundamentales sobre la naturaleza de la diversidad microbiana en la tierra.

# 7. CONCLUSIONES

---

- 1) Se determinó por medio del análisis de la diversidad y su distribución que las bacterias acuáticas de Pozas Azules se ajustan a patrones de distribución similares a los descritos por la ecología clásica para macroorganismos, ya que el ensamble posee muchos OTUs únicos y pocos ampliamente distribuidos, incrementando la diversidad beta con la distancia muestreada.
- 2) Se demostró el efecto de la distancia geográfica y el ambiente en la composición y estructura de los ensamblajes bacterianos usando el gen que codifica para el 16s de ARNr como marcador.
- 3) El anterior es un resultado importante, ya que existen pocos reportes en los que se pueda probar la influencia de estos dos factores en pequeñas escalas y es el primero en reportarlo en los sistemas bacterianos del valle de CCC.
- 4) Las condiciones extremas del sistema Pozas Azules, y su estructura similar a islas nos permitieron apoyar la hipótesis de distribución microbiana en la que se describe que los microorganismos están sujetos a factores ecológicos que ocurren a escala local, y factores históricos que ocurren a escala regional, y esto genera y mantiene la estructura de la diversidad en los ensamblajes.
- 5) Los procesos que actúan sobre las comunidades son muchos y muy complejos, además de que cambian su impacto dependiendo sobre que especie u componente de la comunidad actúan. Es probable que este impacto se relacione a las características de historia de vida de las especies bacterianas sobre las que operan.
- 6) Las técnicas independientes de cultivos nos permiten generar datos analizables bajo métodos clásicos de biogeografía.
- 7) El estudio nos permitió avanzar en entender el papel de los factores que afectan la estructuración de patrones de distribución bacteriana y así comprender de un modo más integral a los sistemas microbianos y su evolución en el espacio.
- 8) Queda mucho trabajo para llegar a un consenso teórico y metodológico sobre la biogeografía microbiana

## 8. PERSPECTIVAS

---

La ecología microbiana es una ciencia nueva y promete grandes avances con el rápido desarrollo del conocimiento y las nuevas tecnologías moleculares, por lo tanto es fundamental darle un enfoque integrativo, es decir utilizar distintas evidencias que ayuden a producir conocimiento aplicable y a constituir bases teóricas para el futuro en ecología y evolución.

Con base en las conclusiones sobre la diversidad de las comunidades bacterianas derivadas de este trabajo, podemos formularnos muchas nuevas preguntas y proponer varios puntos de partida para estudios futuros. Por ejemplo es posible ampliar las escalas temporales, espaciales y ecológicas del muestreo, y también investigar factores que, además de la distancia geográfica, puedan reflejar aislamientos o cambios históricos, como información geológica o datos sobre las condiciones ambientales del pasado. Otro punto importante sería examinar más a fondo el efecto de la salinidad en la composición de las comunidades. Una estrategia posible sería realizar experimentos de mesocosmos, en los que se observe la respuesta de las comunidades a cambios específicos en la salinidad.

Por otro lado es importante reconocer cuales son las limitaciones de la aproximación molecular en ecología. Algunas de las desventajas de la caracterización de la diversidad con el gen 16S de ARNr son que este no proporciona la resolución necesaria para identificar una especie y para establecer las características funcionales del organismo al que pertenece. Por lo tanto es importante incluir una descripción complementaria en los estudios de esta naturaleza, es decir, tanto el análisis de otros genes, como de datos bioquímicos, morfológicos, etc. que reflejen otras diferencias no explícitas a través del análisis de genes constitutivos e incorporar información sobre las características de historia de vida de los organismos, sus capacidades de dispersión y su rol ecológico. De este modo se podría analizar la biogeografía de diferentes organismos especialistas y generalistas, para confrontar las hipótesis sobre el efecto de las características de historia de vida en su distribución.

Por último, una vez integrado un panorama sobre los mecanismos que regulan la diversidad, el siguiente paso sería diseñar estudios que nos ayuden a entender el papel de la diversidad de las comunidades sobre sus funciones. Una alternativa podría consistir en el análisis de la variación de genes funcionales mediante librerías de clonas o amplicones, para entender si su distribución es comparable a la de genes constitutivos ampliamente utilizados (como el 16S), y estimar de esta manera qué tanto nos puede decir la diversidad taxonómica de un sistema sobre su funcionamiento.

## 9. BIBLIOGRAFÍA CITADA

---

- Adkins, W. S. (1920). Cuatrociénegas, Coahuila—water resources, Walter Scott Adkins Collection. Center for American History. The University of Texas at Austin, Austin, Texas, 19.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Baas-Becking, L.G. (1934), *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*, The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon, 263 p.
- Badino, G., T. Bernabei, A. De Vivo, I. Giulivo & G. Savino. 2004. Under the desert, the mysterious waters of Cuatro Ciénegas. *La Venta Esplorazioni Geografiche y Gobierno Coahuila*. 273 p.
- Bell, T., Ager, D., Song, J. I., Newman, J. A., Thompson, I. P., Lilley, A. K. & Van der Gast, C. J. (2005). Larger islands house more bacterial taxa. *Science* 308(5730), 1884-1884.
- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedrós-Alió, C. & Rodríguez-Valera, F. (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 349-360.
- Bissett, A., Richardson, A. E., Baker, G., Wakelin, S., & Thrall, P. H. (2010). Life history determines biogeographical patterns of soil bacterial communities over multiple spatial scales. *Molecular ecology*, 19(19), 4315-4327.
- Blumel, M., Suling, J., & Imhoff, J. F. (2007). Depth-specific distribution of Bacteroidetes in the oligotrophic Eastern Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 46(3), 209-224.
- Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Hernández, I., Eguiarte, L. E., Olmedo-Alvarez, G., & Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology*, 12(7), 659–73.

- Breitbart, M., Hoare, A., Nitti, A., Siefert, J., Haynes, M., Dinsdale, E., Edwards, R., Souza, V., Rohwer, F. & Hollander, D. (2009). Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental Microbiology*, 11(1), 16–34.
- Caporaso, J. G., Paszkiewicz, K., Field, D., Knight, R., & Gilbert, J. A. (2012). The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *The ISME journal*, 6(6), 1089-1093.
- Cerritos, R., Eguiarte, L. E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A., & Souza, V. (2011). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(2), 303–18.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, 265-270.
- Cho, J. C. & Tiedje, J. M. (2000). Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5448–5456.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5(9), 719-729.
- Colwell, R. K., & Coddington, J. A. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1311), 101-118.
- Connor, E. F., & McCoy, E. D. (1979). The statistics and biology of the species-area relationship. *American Naturalist*, 791-833.
- Cox, C. B., & Moore, P. D. (2010). Biogeography: an ecological and evolutionary approach. John Wiley & Sons. 506 p.
- Cullen, V., (1995). Diversity-nature's insurance policy against catastrophe. *Oceanus*, 38(2): 2-3.
- DeLong, E. F., & Pace, N. R. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic Biology*, 50(4), 470-478.
- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069-72.



- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, K. Keller, E. L. Brodie, N. Larsen, Y. M. Piceno, R. Phan, and G. L. Andersen. (2006). NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 34:W394-9.
- Drakare, S., & Liess, A. (2010). Local factors control the community composition of cyanobacteria in lakes while heterotrophic bacteria follow a neutral model. *Freshwater biology*, 55(12), 2447-2457.
- Edgar, RC, Haas, BJ, Clemente, JC, Quince, C, Knight, R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection, *Bioinformatics*
- Elser, J. J., Schampel, J. H., Garcia-Pichel, F., Wade, B. D., Souza, V., Eguiarte, L., Escalante, A. & Farmer, J. D. (2005). Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1808-1825.
- Escalante Hernández A.E. (2008). Ecología evolutiva de procariontes en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Tesis de Doctorado, Instituto de Ecología, UNAM, México. Dir: Valeria Souza.
- Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L. J., Noguez, A. M., & Souza Saldivar, V. (2008). Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Cienegas basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1), 50–60. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00496.x
- Escalas, A., Bouvier, T., Mouchet, M. a, Leprieur, F., Bouvier, C., Troussellier, M., & Mouillot, D. (2013). A unifying quantitative framework for exploring the multiple facets of microbial biodiversity across diverse scales. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2642–57.
- Everroad, R. C., Otaki, H., Matsuura, K., & Haruta, S. (2011). Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. *Microbes and environments/JSME*, 27(4), 374-381.
- Fauth, J. E., Bernardo, J., Camara, M., Resetarits, W. J., Van Buskirk, J., & McCollum, S. A. (1996). Simplifying the jargon of community ecology: a conceptual approach. *American Naturalist*, 282-286.
- Finlay, B. J., & Clarke, K. J. (1999). Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature*, 400(6747), 828-828.
- Finlay B.J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–1063.

- Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J. A., Huse, S. M., Welch, D. B. M., Sogin, M. L., & Martiny, A. C. (2012). Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *The ISME journal*, 6(8), 1499-1505.
- Fuhrman, J. A., Hewson, I., Schwalbach, M. S., Steele, J. A., Brown, M. V., & Naeem, S. (2006). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13104-13109.
- Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., Joint, I., McHardy, A. C., Knight, R., Somerfield, P., Fuhrman, J. A & Field, D. (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, 6(2), 298-308.
- Green, J. L., Holmes, A. J., Westoby, M., Oliver, I., Briscoe, D., Dangerfield, M., Gillings, M. & Beattie, A. J. (2004). Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature*, 432(7018), 747-750.
- Guindon S, Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003;52:696-704.
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 40, 237–264.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95-98).
- Hanson, C. a, Fuhrman, J. a, Horner-Devine, M. C., & Martiny, J. B. H. (2012). Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(7), 497–506.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal*, 5(10), 1571-1579.
- Horn, H. S. (1966). Measurement of "overlap" in comparative ecological studies. *American naturalist*, 419-424.
- Hubbell, S. P., (2001). *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography* Princeton Univ. Press. 377 p.
- Huber, T., Faulkner, G., & Hugenholtz, P. (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20(14), 2317-2319.

- Jaccard, P. (1901). Distribution de la Flore Alpine: dans le Bassin des dranses et dans quelques régions voisines. Rouge. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37, 241-272.
- Jezbera, J., Sharma, A. K., Brandt, U., Doolittle, W. F., & Hahn, M. W. (2009). 'Candidatus Planktophila limnetica', an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(11), 2864-2869.
- Johannesson, K. H., Cortés, A., & Kilroy, K. C. (2004). Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. *Journal of South American Earth Sciences*, 17(2), 171-180.
- Keymer, D. P., Lam, L. H. & Boehm, A. B. (2009) Biogeographic patterns in genomic diversity among a large collection of *Vibrio cholerae* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1658–1666.
- Kolter, R. , & Maloy, S. (2012). *Microbes and Evolution: The world that Darwin never saw.* (First., p. 299). Washington, DC: American Society for Microbiology Press. 320 p.
- Krebs, C. J. (1999). *Ecological methodology* (Vol. 620). Menlo Park, California: Benjamin/Cummings. 620 p.
- Langenheder, S., & Székely, A. J. (2011). Species sorting and neutral processes are both important during the initial assembly of bacterial communities. *The ISME journal*, 5(7), 1086-1094.
- Lepère, C., Domaizon, I., Taïb, N., Mangot, J. F., Bronner, G., Boucher, D., & Debroas, D. (2013). Geographic distance and ecosystem size determine the distribution of smallest protists in lacustrine ecosystems. *FEMS microbiology ecology*, 85(1), 85-94.
- Lindström, E. S., & Langenheder, S. (2012). Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 1–9.
- Logares, R., Lindström, E. S., Langenheder, S., Logue, J. B., Paterson, H., Laybourn-Parry, J., Rengefors, K., Tranvik, L. & Bertilsson, S. (2012). Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change. *The ISME journal*, 7(5), 937-948
- López-Lozano, N. E., Eguiarte, L. E., Bonilla-Rosso, G., García-Oliva, F., Martínez-Piedragil, C., Rooks, C., & Souza, V. (2012). Bacterial communities and the nitrogen cycle in the gypsum soils of Cuatro Ciénegas Basin, coahuila: a Mars analogue. *Astrobiology*, 12(7), 699–709.

- López-Lozano, N. E., Heidelberg, K. B., Nelson, W. C., García-Oliva, F., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2013). Microbial secondary succession in soil microcosms of a desert oasis in the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico. *PeerJ*, 1, e47.
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440.
- MacArthur, R. H. (1967). The theory of island biogeography (Vol. 1). Princeton University Press. 224 p.
- Magurran A. (2003). Measuring biological diversity. Blackwell, Oxford. 256 p
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. a, Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Adams, J., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Ovreås, L., Reysenbach, A. L., Smith, V. H y Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(2), 102–12.
- Mazard, S., Ostrowski, M., Partensky, F., & Scanlan, D. J. (2012). Multi-locus sequence analysis, taxonomic resolution and biogeography of marine *Synechococcus*. *Environmental microbiology*, 14(2), 372-386.
- Minckley WL (1969) Environments of the Bolson of Cuatrociénegas, Coahuila, Mexico, with special reference to the aquatic biota. Univ Texas El Paso, *Sci Series 2*: 1–65.
- Minckley WL (1994) A bibliography for natural history of the Cuatro Ciénegas basin and environs, Coahuila, Mexico. *Proc Des Fishes Counc* 25: 47–64
- Moreno, A. H. (2000). La clasificación numérica y su aplicación en la ecología. Intec. 88p.
- Noguez, A. M., Arita, H. T., Escalante, A. E., Forney, L. J., García-Oliva, F., & Souza, V. (2005). Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecology and Biogeography*, 14(3), 241-248.
- O'Malley, M. A. (2007). The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 647-651.
- Oakley, B. B., Carbonero, F., van der Gast, C. J., Hawkins, R. J., & Purdy, K. J. (2010). Evolutionary divergence and biogeography of sympatric niche-differentiated bacterial populations. *The ISME journal*, 4(4), 488-497.
- Pajares, S., Bonilla-Rosso, G., Travisano, M., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2012). Mesocosms of aquatic bacterial communities from the Cuatro Ciénegas basin (Mexico):

- a tool to test bacterial community response to environmental stress. *Microbial ecology*, 64(2), 346-358.
- Papke, R. T., Ramsing, N. B., Bateson, M. M. & Ward, D. M., (2003), Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 5, 650–659.
- Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., Eguiarte, L. & Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress. *Astrobiology*, 12(7), 648–58.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Rebollar, E. A., Avitia, M., Eguiarte, L. E., González-González, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G., & Souza, V. (2012). Water–sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Cienegas Basin. *Environmental microbiology*, 14(9), 2323-2333.
- Reche, I., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R., & Casamayor, E. O. (2005). Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness?. *Ecology*, 86(7), 1715-1722.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Selje N., M. Simon y T. Brinkhoff 2004. A newly discovered Roseobacter cluster in temperate and polar oceans. *Nature* 427: 445–448
- Shapiro, B. J., David, L. A., Friedman, J., & Alm, E. J. (2009). Looking for Darwin's footprints in the microbial world. *Trends in microbiology*, 17(5), 196-204.
- Simberloff, D. (1983). biogeography: The unification and maturation of a science, pp. 411-473 in: Brush A. H. y G. H. Clark (eds), perspectives in ornitology: Cambridge University Press, Cambridge. 441- 455,
- Soininen, J., Korhonen, J. J., Karhu, J., & Vetterli, A. (2011). Disentangling the spatial patterns in community composition of prokaryotic and eukaryotic lake plankton. *Limnology and Oceanography*, 56(2), 508-520.a

- Souza, V., Eguiarte, L. E., Siefert, J., & Elser, J. J. (2008). Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation? *Nature Reviews. Microbiology*, 6(7), 559–64.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J. M., Soberón, X., Dirzo, R. y Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6565–70.
- Souza, V., Siefert, J. L., Escalante, A. E., Elser, J. J., & Eguiarte, L. E. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: an astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*, 12(7), 641-647.
- Stackebrant, E. (2011). Molecular taxonomic parameters. *Microbiology Australia*, 32(2), 59-61.
- Suenaga, H. (2012). Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental microbiology*, 14(1), 13-22.
- Takacs-Vesbach, C., Mitchell, K., Jackson-Weaver, O., & Reysenbach, A. L. (2008). Volcanic calderas delineate biogeographic provinces among Yellowstone thermophiles. *Environmental microbiology*, 10(7), 1681-1689.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Vellend, M. (2010). Conceptual synthesis in community ecology. *The Quarterly review of biology*, 85(2), 183-206.
- Vos, M., & Velicer, G. J. (2008). Isolation by Distance in the Spore-Forming Soil Bacterium *Myxococcus xanthus*. *Current Biology*, 18(5), 386-391.
- Vos, A. (2010). Species concept for bacteria based on adaptive divergence. *Trends in Microbiol.* 19(1): 1-7.
- Vos, M., Quince, C., Pijl, A. S., de Hollander, M., & Kowalchuk, G. A. (2012). A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLoS One*, 7(2), e30600.

- Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73(16):5261-7.
- Wang, J., Yang, D., Zhang, Y., Shen, J., van der Gast, C., Hahn, M. W., & Wu, Q. (2011). Do patterns of bacterial diversity along salinity gradients differ from those observed for macroorganisms?. *PLoS one*, 6(11), e27597.
- Wiley, E. O. (1981). *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley and Sons, Nueva York. 439 p.
- Whittaker, R.H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21: 213–251.
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W. & Taylor, J. W., (2003), Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301, 976–978.
- Whitaker, R. J. (2006). Allopatric origins of microbial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475), 1975-1984.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Wolaver, B. D., Crossey, L. J., Karlstrom, K. E., Banner, J. L., Cardenas, M. B., Ojeda, C. G., & Sharp, J. M. (2013). Identifying origins of and pathways for spring waters in a semiarid basin using He, Sr, and C isotopes: Cuatrociénegas Basin, Mexico. *Geosphere*, 9(1), 113-125.
- Wright, E. S., Yilmaz, L. S., & Noguera, D. R. (2012). DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and environmental microbiology*, 78(3), 717-725.
- Yannarell A.C. y E.W. Triplett. (2004). Within an between lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Applied and environmental microbiology*. 70: 214-223.

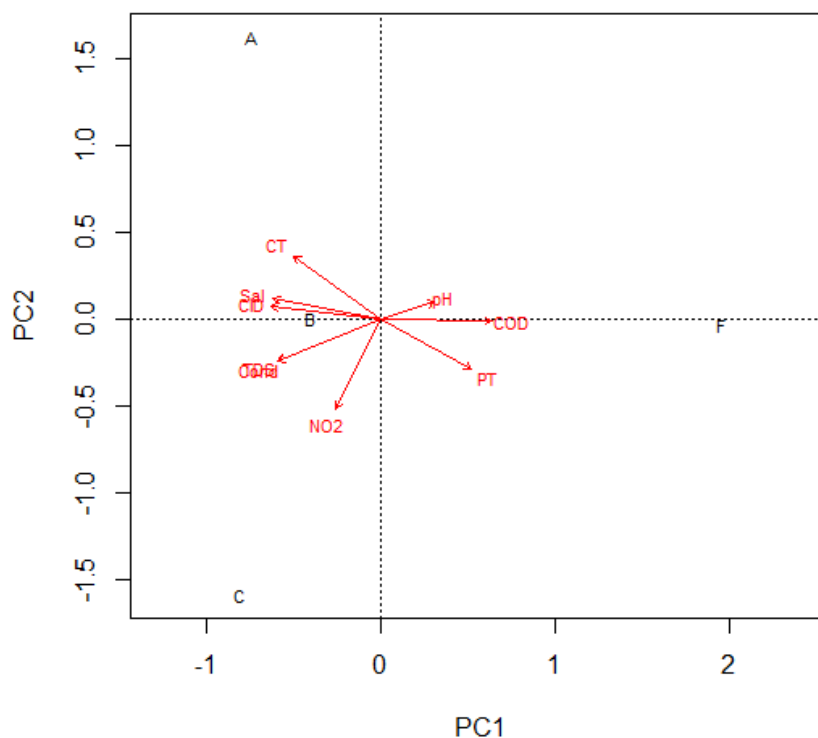
## 10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### I. Análisis de componentes principales

A)

	PC1	PC2	PC3
Eigenvalor	6.2114	1.5258	1.2629
% de la varianza Explicada	0.6902	0.1695	0.1403
% de la varianza acumulada	0.6902	0.8597	1.0000

B)



**Figura suplementaria 1.** A) Eigenvalores y porcentaje de la varianza explicado por cada uno de los componentes. B) Biplot generado a partir de un análisis de componentes principales (PCA) de la estandarización de las variables ambientales (CT = carbono total, CI = carbono inorgánico, NO2 = nitrito, PT = fósforo total, sal = salinidad, COD = carbono orgánico disuelto TDS = sólidos totales disueltos, Cond = conductividad y pH. Las diferentes pozas se muestran en el gráfico (A, B, C y F). Los vectores muestran las variables ambientales escaladas.



Tabla 1. Contribución de las variables a cada componente

	<i>Dim. 1</i>	<i>Dim. 2</i>	<i>Dim. 3</i>
<i>TDS</i>	13.504433	9.51156930	0.9523532
<i>Cond</i>	13.560302	9.66307529	0.4760843
<i>Sal</i>	14.996126	2.13082990	2.7042015
<i>pH</i>	4.071134	1.20959935	59.4889054
<i>CT</i>	9.744904	19.575227	7.3485881
<i>Cl</i>	15.49994	0.85574705	1.7539158
<i>COD</i>	15.794120	0.01867532	1.3162228
<i>TP</i>	10.22211	13.9624789	12.0263695
<i>NO2</i>	2.606932	43.0727979	13.9333595

## II. Caracterización de los OTUs en BLAST

**Tabla suplementaria 2.** Características de los OTUs definidos al 97% del gen 16S de ADN ribosomal de las librerías de clonas de Pozas Azules CCC

Secuencia representante	Clasificación	ID	S	Origen
A_16_alfaproteobacteria	Methylobacteriaceae/ <i>Methylobacterium</i>	AB252202.1	99	Agua dulce
A_2_alfaproteobacteria	Rhodobacteraceae	HQ392507.3	99	Lagos
A_30_actinobacteria	Microbacteriaceae/ <i>Rhodoluna</i>	GU074040.1	99	Marino
A_41_verrucomicrobia*	Verrucomicrobia	JF413545.1	99*	CCC
A_67_actinobacteria *	Actinomycetales	HM486249.1	96	Humedales
A_80_actinobacteria	Actinomycetales	AM690914.1	99	Marino
A_89_actinobacteria	Micrococcineae	HM486182.1	97	Lagos
A2_13_bacteroidetes *	Cryomorphaceae	271550	96	Lagos
A2_19_verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	EU640178.1	97 99	Lagos
A2_21_alfaproteobacteria	Hyphomicrobiaceae	AF408954.1	97	suelo
A2_25_verrucomicrobia *	Verrucomicrobiaceae	JX047115.1	93 *	Marino
A2_37_alfaproteobacteria*	Rhodobacterales	JF413582.1	100	CCC
A2_8_chloroflexi	Chloroflexi	FJ828389.1	99	Lagos
B_10_alfaproteobacteria	Rhodobacteraceae	JX521003.1	99	Manantial sulfuroso
B_17_bacteroidetes	Sphingobacterales	EU642130.1	99	Lagos
B_2_gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	JQ766657.1	97	Manantial hiperalcalino
B_22_bacteroidetes	Sphingobacterales	FJ916090.1	99	lagos
B_27_bacteroidetes	Sphingobacterales	HQ692025.1	98	Laguna estuarina

B_49_betaproteobacteria	Burkholderiales	EU802057.1	99	Agua dulce
B_58_alfaproteobacteria	Sphingomonadaceae	NR_043265.1	99	Agua dulce
B_61_betaproteobacteria	Comamonadaceae/ <i>Thiomonas</i>	JF413462.1	100	CCC
B_71_betaproteobacteria	Comamonadaceae/ <i>Comamonas</i>	GU257797.1	97	Lagos
B_72_betaproteobacteria	Burkholderiaceae/ <i>Burkholderia</i>	JF413429.1	99	CCC
B_88_bacteroidetes	Flavobacteria	EU800535.1	98 98	Laguna estuarina
B2_22_alfaproteobacteria	Rickettsiaceae	JQ072391.1	99	Humedales
c_13_bacteroidetes *	Flavobacteria	JQ327396.1	98	lagos
C_2_planctomyces	Planctomycetales	FR647651.1	98 99	Marino
c_22_cianobacteria	Synechococcaceae	FJ916357.1	99	Lagos
c_63_betaproteobacteria	Burkholderiaceae	KC006321.1	99	Agua dulce
c_75_betaproteobacteria	Betaproteobacteria	KC603204.1	98	Agua dulce
C2_12_actinobacteria	Atinobacteria	JF692297.1	97	Laguna costera
C2_13_alfaproteobacteria	Rhodobacteraceae	AY344379.1	99	Lagos
C2_22_verrucomicrobia	Opitutaes	HQ436975.1	98	Lagos
C2_23_gammaproteobacteria	Aeromonadaceae/ <i>Aeromonas</i>	KF307774.1	96	Hospederos agua dulce
C2_27_alfaproteobacteria	Rhodobacteraceae	EU703370.1	98	Lagos
C2_32_planctomyces	Phycisphaerae	AF445715.1	99	Marino
F_36_bacteroidetes	Cryomorphaceae/ <i>Fluviicola</i>	FN668170.2	98	Lagos
F_49_verrucomicrobia *	Verrucomicrobiaceae	JF413524.1	99 95	CCC
F_64_actinobacteria	ACK-M1; otu_274	JN626861.1	97	lagos
F_71_alfaproteobacteria	Hyphomonadaceae	JN825361.1	98	Lago salado
F_8_bacteroidetes	Saprospiraceae	JF413494.1	99	CCC
F_80_actinobacteria	ACK-M1; otu_274	GU074057.	99 96	Agua dulce
F_81_alfaproteobacteria *	Sphingomonadales	EU580487.1	93	lagos
F_86_betaproteobacteria *	Alcanigenaceae	FJ828480.1	94	Agua dulce
F_89_bacteroidetes	Flammeovirgaceae	DQ189761.1	97	Marino
F2_1_deltaproteobacteria *	Deltaproteobacteria	FM200917.1	93	Biofilm
F2_11_bacteroidetes	Bacteroidetes	AY948069.1	97	Agua dulce

Secuencias representantes de los OTUs determinados con 97% de identidad. **ID:** Número de acceso de la secuencia más parecida en el GenBank del NCBI, RDBP o Greengenes. **S:** porcentaje de similitud. **Origen:** lugar de donde procede la secuencia más cercana. \*Las otras secuencias más parecidas tienen valores de similitud menores a 96%

### III. Filogenia de Máxima Verosimilitud.

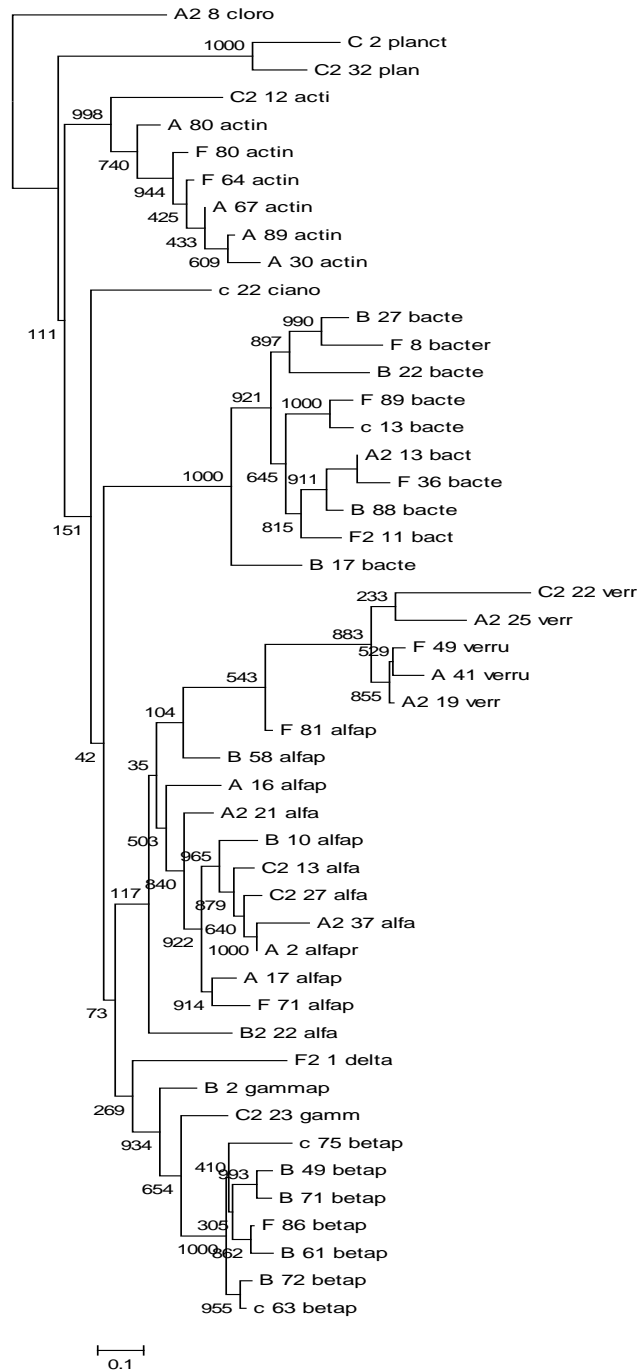


Figura suplementaria. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud de las secuencias representantes del gen 16S de ARNr encontradas en los cuatro sitios de muestreo de Pozas Azules, Cuatro Ciénegas. Las secuencias representantes fueron definidas al 97% de identidad. Los valores de las ramas corresponden a los valores de *Bootstrap* de 1000 réplicas. Construido en el programa PhyML v3.0 (Guindon y Gascuel 2003)

## APÉNDICE 1

### COLECTA Y FILTRADO DE MUESTRAS DE AGUA

Para cada poza, coleccionar 2.5 L de agua en cinco puntos, cuatro a lo largo de la orilla (equidistantes) y uno en el centro a medio metro de profundidad.

Mezclar el agua coleccionada en los cinco puntos para formar una muestra compuesta por sitio, posteriormente dividir 600mL para la determinación de nutrientes (Apéndice 2) y tres porciones de 4L para la extracción de DNA (Apéndice 3).

1. Prefiltrar el agua de cada porción de 4L en filtros isopore polycarbonato de 45mm (marca Millipore) Recuperar el agua y marcar en la botella que el agua ha sido prefiltrada.
2. Filtrar cada muestra en filtros durapore de 0.22  $\mu\text{m}$  (millipore). Guardar los filtros en tubos falcon de 20 mL con tapa, marcados. Si se necesita más de un filtro por muestra guardar máximo 3 filtros juntos en el mismo tubo. Todos los filtros se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

## APÉNDICE 2

### DETERMINACIÓN DE NUTRIENTES

Filtrar en filtros de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  los 600 mL de agua de cada poza, y dividir este volumen de agua en tres botellas de 200 ml limpias y estériles. Guardar las botellas a  $4^{\circ}\text{C}$  en bolsas oscuras.

Las muestras se analizaron en el laboratorio Biogeoquímica de suelos a cargo del doctor Felipe García Oliva del Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la UNAM para determinar Carbono, Nitrógeno y Fósforo: sus concentraciones totales, y en sus fracciones inorgánicas. Se determinaron todas las formas de carbono con un analizador de carbono total (UIC Mod CM5012.; Chicago, IL, EE.UU.) y las formas de nitrógeno (N) y fósforo (P) se determinaron por métodos colorimétricos con el uso de un Bran-Luebbe Auto analizador III (Norderstedt, Alemania) como se reporta en Peimbert *et al.* (2012). Las fracciones orgánicas representan el cálculo de las totales menos las inorgánicas.

### APÉNDICE 3

#### EXTRACCIÓN DE ADN

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

1. Colocar 1 ó 2 filtros en el “bead tube” y agregar 4 ml de “bead solution”, agitar en vortex 1 min. Es posible colocar más de 2 filtros en un mismo tubo, en particular para muestras de agua que utilizaron muchos filtros. Si es necesario, poner 0.5ml más de solución.
2. Agregar 0.5ml de solución WD1 y 5 µL de RNAsa, agitar en vortex 30 s. Colocar los tubos horizontalmente en el agitador y mezclar a toda velocidad por 15 min.
3. Centrifugar los tubos a 5000 rpm por 3 min. Eliminar los filtros con cuidado antes de centrifugar.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 15 ml y agregar 0.6 ml de solución WD2. Agitar en vortex 5 s., incubar a 4° por 30 min.
5. Centrifugar a 5 000 rpm por 6 min. Transferir el sobrenadante con la pipeta a un tubo limpio y agregarle 8 ml de solución WD3. Agitar en vortex 5 s.
6. Poner la mezcla en un “tubo-filtro” y centrifugar a 4000 rpm por 3 min. Eliminar el filtrado.
7. Agregar 3 ml de solución WD4 y centrifugar a 4000rpm por 3 min. Descartar el filtrado.
8. Repetir el paso 7 con WD4 para asegurar que el ADN quede muy limpio.
9. Centrifugar nuevamente a 5000rpm por 5 min.
10. Secar el filtro durante 20 min. a temperatura ambiente.
11. Colocar el filtro en un nuevo tubo y agregar 3 ml de solución WD5.
12. Dejar en reposo por 12 hrs. a 4°C
13. Centrifugar a 5000rpm por 3 min. Ahora el ADN está eluido en el filtrado. Guardar 1ml como backup a -20°C,

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

1. Transferir el ADN a un falcon de 15 ml.
2. Añadir 2 ml de fenol. Mezclar por inversión.
3. Centrifugar a 3,700 rpm por 15 min. en canastilla de columpio.
4. Recuperar sobrenadante en un falcon limpio. Repetir los pasos 3 y 4 hasta que la muestra se vea limpia.

5. Añadir 2 ml de fenol:cloroformo: isoamílico 25:24:1.
6. Centrifugar a 3,700 rpm por 15 min. en canastilla de columpio.
7. Recuperar sobrenadante en un falcon limpio.
8. Añadir acetato de sodio a concentración final de 0.3M.
9. Añadir 4 µl de glicoblue y 2 vols de etanol.
10. Mezclar por inversión.
11. Dejar precipitar 15 min. a -20°.
12. Centrifugar en ángulo fijo a 7,500 rpm por 30 min. a 4°.
13. Quitar el alcohol y limpiar el precipitado con 2 ml de EtOH al 70%.
14. Dejar secar el precipitado.
15. Resuspender en 30 µL de agua ultra pura.
16. Dividir el ADN en dos alícuotas de de 15ul cada una. Si el ADN está en uso guardar una de ellas a 4° C y la otra a -20°C.

#### **APÉNDICE 4**

##### PCR DEL GEN 16S RIBOSOMAL

La reacción de PCR del gen 16S se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

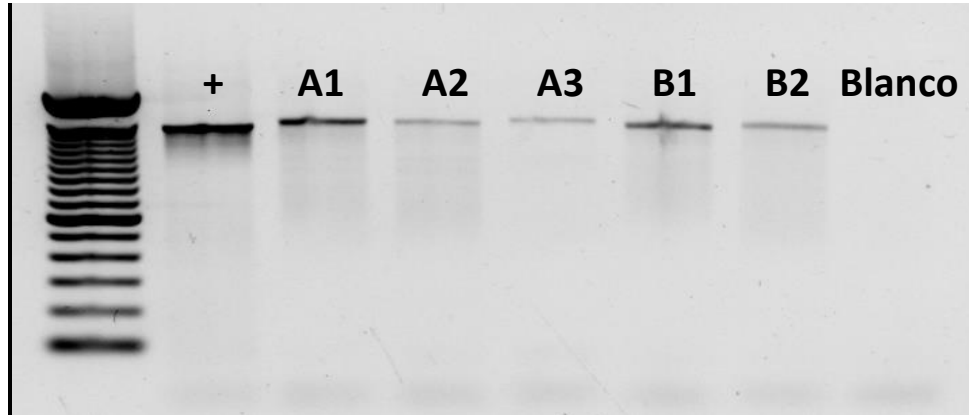
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Cantidad ( µL ) para reacción en 50µL</b>
Buffer 10X	1X	<b>5</b>
MgCl 50mM	2mM	<b>0.5</b>
dNTPs 10mM	0.6mM	<b>3</b>
Oligonucleótidos 10uM	0.3 µM	<b>1.5</b>
Serumalbúmina bovina (BSA)	1 mg /mL	<b>2.5</b>
Dimetilsulfóxido (DMSO)	5%	<b>2.5</b>
Agua	----	<b>32.8</b>
ADN 10 a 100ng	0.2 a 2 ng/µl	<b>2</b>
<b>Taq 5U/µl</b>	<b>1U en 50 µl</b>	<b>0.2</b>

Ciclos de reacción:

94° por 5 min., 30 ciclos de 94° por 1 min, 52° por 1 min y 72° por 1mn 20 segundos.

Extensión final 72° por 30 min.

Las reacciones de PCR se observan por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Ejemplo1), para verificar la presencia del fragmento de interés (para este caso es de 1500 pb aproximadamente).



Ejemplo 1. Reacción de PCR del gen 16S  
(muestras A1-3 y B 1-2).

## APÉNDICE 5

### CLONACIÓN

*TA Cloning kit*, marca Invitrogen. Cat. No. K2040-01

Para ligar el producto (reacción en 10  $\mu$ L):

1. Poner 3  $\mu$ l del producto de PCR a ligar (o aproximadamente 20 ng de producto de PCR)
2. Agregar 1  $\mu$ l de 10X buffer de ligación
3. Añadir 2  $\mu$ l del plásmido (*pCR 2.1 cloning vector*)
4. Añadir agua estéril para completar 9  $\mu$ l
5. Agregar 1  $\mu$ l de T4 ligasa
6. Mezclar suavemente e incubar durante 20 horas a 14 °C
7. Poner la reacción en hielo y empezar a transformar (La reacción puede guardarse a -20°C).

Transformación:

1. Centrifugar la reacción de ligación y añadir 2  $\mu$ l en un vial de bacterias competentes *E. coli* Top 10. Mezclar pipeteando muy suavemente.

2. Incubar en hielo 30 minutos.
3. Poner las bacterias a 42°C durante 60 segundos para inducirles a "Heat-Shock".
4. Transferir el tubo en hielo inmediatamente.
5. Añadir 250 µL de medio SOC a temperatura ambiente.
6. Tapar el tubo y agitarlo horizontalmente a 200 rpm a 37°C durante una hora.
7. Sembrar 100 y 200 µL de cada reacción de transformación en cajas de medio LB con 100mg/mL de Ampicilina y 40 µL de 40 mg/ml de XGal
8. Incubar a 37 grados por 24 horas. Cambiar la caja a 4 grados y dejarlas un par de horas.
9. Una reacción de clonación eficiente producirá cientos de colonias. Las colonias azules indican que no hay inserto clonado en esas bacterias transformadas. Las colonias blancas indican que las células transformadas poseen vectores con inserto de interés. Elegir las colonias blancas.

#### **MEDIO SOC**

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

#### **MEDIO LB (sólido) 1L**

Triptona 10g  
Ext. Levadura 5g  
NaCl 10g  
Agar 15g  
100mg/mL de Ampicilina

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

Triptona 20g  
Ext. Levadura 10g  
NaCl 10g  
50mg/mL de Kanamicina



## APÉNDICE 6

### EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

*Montage Plasmid Miniprep kit , marca Mlilipore Cat. No. LSKP09624*

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

1. Centrifugar la placa de cultivo a 1500xg por 5-7 minutos. Después de la centrifugación, decantar el sobrenadante en un contenedor e invertir la placa de cultivo sobre algunas toallas de papel para remover el sobrenadante residual.
2. Resuspender los pellets de la placa de cultivo agregando 150 µL de solución 1 a cada pozo. Agitar en el vórtex o pipetear para homogeneizar.
3. Agregar 150 µL de solución 2 a cada pozo. Mezclar por agitación (vórtex) durante 1 minuto. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 2 min. sin que el tiempo exceda los 5 min.
4. Agregar 150 µL de la Solución 3 a cada pozo. Mezclar inmediatamente en el vórtex durante 2 min. En este punto el lisado de bacterias está listo para a la placa CLEARING.
5. Colocar la placa PLASMID en el colector de vacío (por debajo de la placa que posee rejillas de metal).
6. Pipetear 200 µL de lisado de cada pozo de la placa de cultivo (mezclando suavemente antes de extraer) y colocarlo en el pozo correspondiente de la placa CLEARING (en orden de filas y columnas ya marcadas)
7. Colocar la placa CLEARING en la parte superior del colector de vacío (encima de las rejillas de metal). Asegurarse de que el colector esté sellado y ajustar el vacío a 8 pulgadas de Hg (para asegurarla obtención del plásmido contenido en el DNA, separándolo de los demás compuestos como proteínas). Aplicar el vacío (con ayuda de una pequeña bomba) durante 3 min aprovechando el lisado a través de la placa CLEARING en la placa PLASMID. Desechar la placa CLEARING
8. Colocar la placa PLASMID en la parte superior del colector de vacío. Aplicar vacío a 24 pulgadas de Hg durante 5-7 min o hasta que los pozos estén vacíos.

9. Agregar 200  $\mu$ L de Solución 4 a cada pozo de la placa PLASMID. Aplicar vacío a 24 pulgadas de Hg durante 5-7 min o hasta que los pozos estén vacíos
10. Recuperar el plásmido agregando 50  $\mu$ L de Solución 5 a cada pozo de la placa PLASMID. Colocar la tapa a la placa y agitar durante 5 min en el Vórtex durante 5 min.

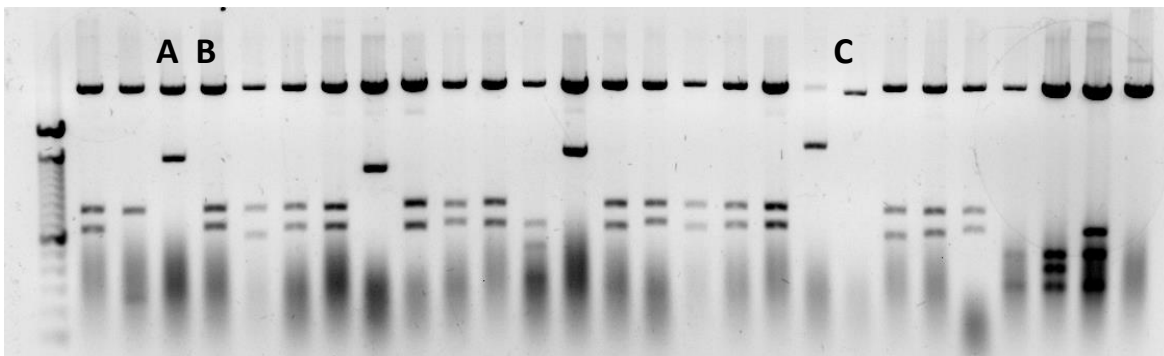
## APÉNDICE 7

### RESTRICCIÓN DE PLÁSMIDOS CON EcoR1

El vector pCR 2.1 (del *TA Clong kit* de *invitrogen*), posee dos sitios de restricción a los lados de la posición donde se liga el inserto. De este modo, una vez purificados los plásmidos, antes de secuenciar se realiza una restricción con la enzima EcoR1 para determinar si el plásmido contiene el fragmento de interés. Para una reacción de 20  $\mu$ l agregar:

- 2  $\mu$ l de plásmido
- 0.2  $\mu$ l de enzima Eco R1
- 2  $\mu$ l de buffer (10x)
- 15.8  $\mu$ l de agua

La reacción se lleva a cabo durante 1 hora a 37°C, posteriormente se visualiza la digestión por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (Ejemplo 2). Una restricción de plásmido con inserto genera dos bandas, una de más de 2000 pb. (plásmido) y una de 1500 pb. (inserto) (Ejemplo 2A). Cuando el inserto posee un sitio de restricción para esta enzima pueden generarse tres bandas, de las que las dos inferiores deben sumar aprox. 1500 pb (Ejemplo 2B). Los plásmidos sin inserto (Ejemplo 2C) deben ser descartados.



Ejemplo 2. Restricción del plásmido con EcoR1.

## APÉNDICE 8

### SCRIPTS PARA LOS ANÁLISIS EN R (*R Development Core Team, 2008*)

```
## Para los análisis se necesita instalar y cargar el paquete vegan  
y factomine
```

```
# Análisis de Componentes principales
```

```
> EnvSMat<- read.table ("env.txt", row.names=1) # Para leer una  
tabla
```

```
> PCArda2 <- rda (EnvSMat, scale=TRUE) # para hacer un PCA con  
las variables estandarizadas
```

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

```
> PCA.1$var$contrib # indica la contribución de las variables
```

```
> biplot (PCArda2) # Hace una gráfica de puntos
```

```
# Estimación de matrices de distancia
```

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

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

```
> AmbDist <- vegdist (EnvSMat2, method="euclidean")
```

```
# Prueba de Mantel
```

```
> Mantel (JacDist, AmbDist, method=pearson, permut= 9999)
```