

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE ECOLOGIA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL SEDIMENTO DE MAR PROFUNDO DE  
*CHAPOPOTE, GOLFO DE MEXICO: UNA ZONA CONTIGUA A UN VOLCÁN DE ASFALTO.***

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA  
PRESENTA

LUCIANA RAGGI HOYOS

DIRECTORAS DE TESIS: DRA. ELVA ESCOBAR BRIONES  
DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

Las muestras del presente estudio fueron tomadas por la Dra. Elva Escobar a bordo del B/O *Sonne* en el marco de un convenio de colaboración científica Geomar-TAMU-UNAM, en el proyecto “Logistic support for joint German-US-Mexican cruise to explore the Gulf of Mexico Outer Continental Slope” y el proyecto a largo plazo “Variación de la estructura comunitaria del bentos abisal en el mar profundo del golfo de México” a cargo de la Dra. Escobar.

El estudio se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Valeria Souza y la Dra. Luisa Falcón.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de los proyectos de investigación de las Dras. Valeria Souza y Elva Escobar: CONACyT-SEP 44673Q, CONACyT –SEMARNAP 0237/A1, PAPIIT IN224503, CONACyT-SEP Clave 40158, OE-NOAA.

A ti Pablo  
A mis padres  
A Paulina, Amanda y Héctor

*“...si de alguna manera se puede ver el universo es por el ojo de la cerradura...es a través de las pequeñas cosas que puede uno asomarse a las cosas grandes.” E.Galeano*

*"Sólo si nos detenemos a pensar en las pequeñas cosas llegaremos a comprender las grandes" J. Saramago*

## Agradecimientos

A Elva y Valeria, de las que he aprendido muchísimo y a las que debo esta tesis, gracias por adoptarme en sus Laboratorios de *Evolución molecular y experimental* y de *Biodiversidad y macroecología*.

A Luisa y Laura, por no dejarme caer en el intento y su apoyo incondicional en el laboratorio.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios: Dr. David Romero, Dra. Elena Alvarez, Dra. Valeria Souza, Dr. Roberto Hernández, Dra. Yolanda Lopez.

A René, Ana y Aldo, por sus incontables respuestas a mis incontables dudas.

A todos en el laboratorio, Luis, Luisa, Lauras, René, Ana, Aldo, Andrea, Rodrigo, Germán, Toño, Sandra, Nuria, Jaime, Manuel, Enrique, Amanda, Yislem y Karla, por dejarme compartir un lugar entre ustedes.

A todos los investigadores y compañeros de los laboratorios que me formaron, Lab. Gonsebatt, Lab. Camarena, Lab. Bermudez-Rattoni, Lab. Recillas, Suttle Lab, Lab. Souza-Eguiarte y Lab. Escobar, de allí surgieron conocimiento y amigos.

A mis senseis a lo largo de la carrera: Wendy, Jorge, Sebastián, Marisela, André y Luisa.

A mi amado Pablo, por tu paciencia, apoyo y amor.

A mis queridos Mamá y Ernesto, por sus consejos, su apoyo, su energía y todo.

A mis queridos Papá y Carmen, por sus consejos, su escucha y su presencia.

A mis hermanitos, por las pláticas y juegos, que ayudan a despabilarse un poco.

A mis familias, las naturales, las adoptadas y las políticas, por ser y estar.

A Ximena, Tania, Andrea, Alejandro, Agustín, Pablo, Checo, Chucho, Ceci, Vale, Daniel, Martín, Rulo y Hugosol por su querer incondicional, pláticas y vida compartida.

A los cuates biomédicos, Octavio, Davides, Hugo, Gilberto, Homero y Ana, por el aguante juntos.

A los cuates biólogos, Martín, Lalo, Fabricio, Ange, Man, Eman y todos los demás.

A todos aquellos que sin su presencia no hubiera podido realizarse esta carrera y esta tesis.

## Índice

Agradecimientos.....	v
Índices de figuras, tablas y apéndices.....	vii
Abreviaturas .....	viii
Resumen .....	1
Abstract .....	2
Introducción	
<i>Diversidad bacteriana.....</i>	3
<i>Gen de la subunidad ribosomal 16S.....</i>	7
<i>Microbiología marina.....</i>	8
<i>Sitio de estudio: Chapopote, Golfo de México.....</i>	11
<i>Comunidad quimiosintética de Chapopote.....</i>	14
Objetivos.....	16
Hipótesis.....	16
Metodología	
<i>Trabajo de campo.....</i>	17
<i>Librería de clonas.....</i>	19
<i>Extracción de ADN.....</i>	20
<i>PCRs.....</i>	22
<i>Clonación, aislamiento de plásmidos y secuenciación.....</i>	23
<i>Edición y análisis de secuencias.....</i>	24
Resultados.....	25
Discusión	
<i>Cuán representativa es una librería de clonas.....</i>	32
<i>Los grupos encontrados.....</i>	33
<i>Comparando riquezas.....</i>	35
Conclusiones.....	37
Perspectivas .....	38
Referencias.....	39
Apéndices.....	47

## Índice de figuras

Figura 1. <i>Árbol filogenético del dominio Bacteria</i> .....	8
Figura 2. <i>Origen del Golfo de México</i> .....	12
Figura 3. <i>Mapa del Golfo de México</i> .....	13
Figura 4. <i>Mapa de Chapopote</i> .....	18
Figura 5. <i>Esquema de la extracción de ADN</i> .....	21
Figura 6. <i>PCRs del ADN extraído</i> .....	23
Figura 7. <i>Gel de ADN extraído</i> .....	25
Figura 8. <i>Gráfica de la distribución sitio 1</i> .....	28
Figura 9. <i>Gráfica de la distribución sitio 2</i> .....	29
Figura 10. <i>Riqueza taxonómica de los dos sitios</i> .....	30
Figura 11. <i>Curvas de rarefacción</i> .....	31
Figura 12. <i>Curva de acumulación de los estudios de la Tabla 1</i> .....	36

## Índice de tablas

Tabla 1. <i>Estudios de diversidad bacteriana con el gen 16S ADNr</i> .....	10
Tabla 2. <i>Muestras utilizadas en este trabajo</i> .....	19
Tabla 3. <i>Clasificación de las secuencias</i> .....	26
Tabla 4. <i>Índices de diversidad</i> .....	31

## Índice de apéndices

Apéndice 1. <i>Condiciones de PCR</i> .....	47
Apéndice 2. <i>Extracción de bandas de gel</i> .....	48
Apéndice 3. <i>Clonación</i> .....	49
Apéndice 4. <i>Extracción y purificación de plásmido</i> .....	51
Apéndice 5. <i>Secuencias utilizadas</i> .....	52



## Abreviaturas

- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ADNr** Ácido desoxirribonucleico ribosomal
- ARNr** Ácido ribonucleico ribosomal
- AVHRR** Radiómetro avanzado de muy alta resolución (del inglés *Advanced Very High Resolution Radiometer*)
- BLAST** Herramienta básica de búsqueda de alineación local (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*)
- BSA** Albúmina Sérica Bovina (del inglés *Bovine Serum Albumine*)
- DGGE** Gel de electroforesis de gradiente desnaturalizante (del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)
- DMF** Dimetilformamida
- GM** Golfo de México
- LB** Medio de cultivo Luria (del inglés *Luria Broth*)
- OFOS** Sistema de observación del suelo oceánico (del inglés *Ocean Floor Observation System*)
- OTUs** Unidad Taxonómica Operativa (del inglés *Operational Taxonomic Unit*)
- pb** Pares de bases
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polimerase Chain Reaction*)
- pH** Potencial de Hidrógeno
- RAPDs** ADN polimórfico amplificado al azar (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*)
- RDB** Ribosomal Data Base Project
- rpm** Revoluciones por minuto
- T-RFLPs** Fragmentos finales y polimórficos por el tamaño de restricción (del inglés *Terminal Restriction Fragments Length Polimorfism*)
- TVG** Draga guiada por imagen de televisión (del inglés *TV-guided*)
- TV-MUC** Multinucleador guiado por imagen de televisión (del inglés *TV-multicorer*)
- u** Unidad

## Resumen

Chapopote es una localidad ubicada en la zona de los montes de Campeche en el sur del Golfo de México (93°25'W, 21°54'N). La presencia de un volcán de asfalto a casi 3 000 m de profundidad y las emanaciones de hidrocarburos y asfalto solidificado en la superficie, proveniente del volcán, hacen de este sitio un lugar único para el estudio de la vida en ecosistemas extremos.

La macrofauna presente en este sitio es altamente abundante en comparación con zonas abisales típicas, tornándose entonces interesante el estudio de las bacterias por ubicarse probablemente en la base de la red trófica a partir de la producción primaria por quimiosíntesis.

Debido a la dificultad de cultivar microorganismos de muestras ambientales, en particular de ambientes marinos, estudios de la diversidad basados en librerías de clonas del gen de la subunidad 16S del ARNr procariótico a partir de la extracción total de ADN son una alternativa.

En este trabajo se crearon dos librerías de clonas procedentes de dos sitios cercanos distintos, uno de ellos con una incipiente presencia de hidrocarburos en un suelo típico marino y el otro con una alta concentración de hidrocarburos líquidos e hidratos de metano. Se obtuvieron 85 secuencias de clonas del primer sitio y 90 del segundo. El análisis de los datos reveló que los sitios son muy diferentes en la composición de filogrupos bacterianos. Las bacterias del sitio sin hidrocarburos pertenecen a las clases  $\alpha$ -,  $\delta$ -, y  $\gamma$ - proteobacterias, y a los phyla *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes*, encontrando en cada grupo una amplia variedad de secuencias; mientras que en el sitio con hidrocarburos los grupos presentes fueron:  $\delta$ -,  $\gamma$ -, y  $\epsilon$ - proteobacterias, *Firmicutes*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes*, con secuencias muy concurridas y por lo tanto poca riqueza. Lo anterior nos indica que aún a poca distancia entre los dos sitios y del volcán de asfalto el ambiente abisal es heterogéneo, mostrando una diversidad microbiana variable de un punto a otro.

La composición microbiana en el fondo marino apenas empieza a ser entendida, siendo estudios como éste uno de los primeros pasos hacia el descubrimiento de nuevos microorganismos y actividades metabólicas aún desconocidos.

## Abstract

Chapopote is a locality in the Campeche Knolls region, Gulf of Mexico (93°25'W, 21°54'N). This site is unique because of the presence of an asphalt volcano at about 3 000 m depth. Extreme life is found surviving in cold hydrocarbon seeps and solidified asphalt coming out from the volcano's crater.

The macrofauna present in this site is widely abundant in comparison with the typical abyssal marine regions. Consequently the study of bacteria is interesting because they are probably the primary producers in this chemosynthetic environment.

Due to the difficulty of culturing microorganism from environmental samples, molecular methods after total DNA extraction are becoming popular, like 16S rDNA clone library analysis.

Marine environments in particular are difficult to analyze principally because most of the microorganisms are unculturable. Instead, several studies about their microbial diversity based in 16S rDNA clone libraries have been already done. In this study two clone libraries were created from two different samples, one with high amount of hydrocarbons and the other without them. Eighty five clones from the first sample and ninety from the other were obtained. The analysis revealed that bacterial composition is different in each sample although the sites are relatively nearby.

The first sample showed the presence of the  $\alpha$ -,  $\delta$ -, and  $\gamma$ - proteobacteria, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* and *Planctomycetes* with a great variability. The second sample presented  $\delta$ -,  $\gamma$ - and  $\epsilon$ - proteobacterias, *Firmicutes*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes*, with very repetitive sequences and so low richness.

This corroborates previous indications about abyssal marine environment as very heterogeneous with great microbial diversity variation from one site to another.

The microbial sediment composition is just getting to be understood, being this type of studies one of the first steps to the discovery of new microorganisms and metabolic activities.

## Introducción

### *Diversidad bacteriana*

Todavía se desconoce cuán diversa es la gran abundancia microbiana, y cuáles son sus límites, sin embargo, su larga historia evolutiva, sus diversas capacidades metabólicas, y la extensión de hábitats en los que se encuentran, hacen pensar en una gran diversidad aun no descrita. De hecho las secuencias de bacterias no cultivables han demostrado que el número de especies procarióticas podría exceder al de todas las formas de vida (Curtis *et al.*, 2002).

La importancia de los microorganismos se ve reflejada en las áreas de la evolución, astrobiología, ecología, medicina y biotecnología, por mencionar algunas; de los 4 600 millones de años que la Tierra tiene de antigüedad, los procariontes tienen 3 800 millones viviendo sobre ésta, siendo así los que crearon en el planeta las condiciones necesarias para hacerlo habitable a todas las otras formas de vida. Son los organismos más antiguos y los más diversos metabólicamente. Las bacterias en particular, tienen una habilidad sobresaliente para habitar todos los ambientes en los que la vida es posible (Staley, 2002). En la astrobiología lo anterior es sumamente relevante, ya que hace pensar en la posibilidad de encontrar formas de vida microbiana que pudieran ser equiparables a posibles formas de vida externas.

Ecológicamente los microorganismos son un eslabón muy importante en la regulación de todos los ciclos biogeoquímicos de la Tierra, incluyendo los del océano. También, son responsables de la degradación de muchas sustancias tóxicas, así como su actividad en aguas residuales y desechos sólidos. Por otro lado su asociación simbiótica con las plantas y animales es causa de nichos diversos y posibles formas de vida (Staley, 2002; Madigan, 2003). Estos estudios basados en los procesos microbiológicos en un contexto evolutivo y ecológico han dado la pauta para conformar una nueva disciplina, la ecología microbiana, que tiene como propósito el describir la diversidad y abundancia de las especies que habitan en un tiempo y espacio definidos.

En la medicina y en la biotecnología se encuentra que los microorganismos benefician a la sociedad proveyendo antibióticos y otros compuestos químicos (productos naturales) que crean mejoras en las condiciones de vida de la población en general y más herramientas para la investigación y la biotecnología (Kuo & Garrity, 2002).

Como ya se mencionó anteriormente las bacterias han logrado conquistar todos los hábitats de la Tierra. El ambiente marino no es la excepción y existen gran variedad de hábitats marinos, desde los mares polares hasta las ventilas hidrotermales.

La diversidad microbiana en el mar se torna increíblemente elevada gracias a que la escala espacio-temporal de los microorganismos es muy pequeña y la del mar enorme,

teniendo una gran heterogeneidad de hábitats. Surgen entonces las preguntas de ¿cuán específico es un sitio para la población de organismos que en él habitan?, y generalizando, si cada hábitat tiene un cierto perfil de organismos entonces, caracterizaciones como la que en este trabajo se realiza ¿podrían darnos un panorama general del hábitat muestreado?, ¿podríamos predecir qué organismos encontraremos con las características de un cierto ambiente a pesar de haber tanta variabilidad? ¿Todos los microorganismos están en todos lados o hay biogeografía? ¿Cada grupo de bacterias tiene un hábitat específico?

A continuación se hace un resumen de los grupos o phyla del dominio *Bacteria* y del *Archaea* que a este trabajo atañen, la clasificación que se utiliza a lo largo de todo el trabajo es la del manual de Bergey (Garrity *et al.*, 2004), a excepción de las divisiones candidatas que el manual no incluye todavía.

**Dominio *Bacteria* - Phylum *Proteobacteria*** Es el grupo más grande y diverso conocido hasta ahora, está dividido en cinco clases:  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria,  $\gamma$ -proteobacteria,  $\delta$ -proteobacteria y  $\epsilon$ -proteobacteria, tan extensa es su gama que su presencia se encuentra dentro de todos los ambientes, desde los más comunes hasta los extremos, de hecho incluyen a la mayoría de las Gram negativas de interés médico, veterinario, industrial y agrícola (Kersters *et al.*, 2003).

**$\alpha$ -proteobacteria** Esta clase es metabólica y morfológicamente diversa, cuenta con 6 órdenes: *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*, *Rhizobiales*, *Caulobacterales*, y *Parvularculales*. La mayoría de las  $\alpha$ -proteobacterias son bacilos aunque se encuentran de todas las formas bacterianas. Algunas son fototrópicas púrpuras no sulfurosas, mientras que otras son quimiolitótrofas o quimiorganótrofas, sin embargo más detalles sobre su caracterización tienen que ser observados bajo la luz de cada orden y quizá cada familia o género (Kersters *et al.*, 2003).

**$\gamma$ -proteobacteria** es la clase más grande del phylum *Proteobacteria*, cuenta con 20 familias. Contiene a las bacterias fotosintéticas púrpuras sulfurosas (*Chromatiaceae* y *Ectothiorhodospiraceae*) y también a los numerosos grupos de quimiorganótrofos como son *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae* y también quimiolitótrofos principalmente oxidadores de azufre y hierro. En esta clase están incluidos patógenos de humanos y animales como *Vibrio* spp. (Kersters *et al.*, 2003). La especie tipo del género *Vibrio* es *V. cholerae*, pero aunque las demás especies están relacionadas a ésta el grupo resulta ser muy heterogéneo y poco caracterizado.

**$\delta$ -proteobacterias** Los principales subgrupos de esta clase son: a) myxobacterias, b) bdellovibrios, c) bacterias disimilatorias de sulfato y sulfuro reductoras y d) bacterias sintróficas que fermentan propionato o benzoato a acetato, CO<sub>2</sub> e hidrógeno, sintróficamente en co-cultivo con consumidoras de hidrógeno. Las bdellovibrios y myxobacterias son

aerobias estrictas, mientras que las sulfato y sulfuro reductoras, y sintróficas son anaerobias (Kersters *et al.*, 2003). *Bdellovibrio spp.* se caracteriza por constar de bacterias móviles y monoflageladas, lo que hace a este género único es su comportamiento de depredación de bacterias Gram negativas (Jurkevitch, 2000).

***ε-proteobacteria*** Es un grupo muy poco estudiado, quizá por su inusual presencia, encontrándose solamente en ambientes asociados a contaminantes y a las subsuperficies (Hugenholtz, 1998), y como enteropatógenos (*Campylobacter* y *Helicobacter*) en animales (Kersters *et al.*, 2003). Son bacterias que crecen anaeróticamente. Algunos estudios muestran que estos organismos son capaces de oxidar azufre y se sugiere tienen un papel importante en el ciclo de éste compuesto (Voordouw *et al.*, 1996T; Wirsén *et al.*, 2002).

**Phylum *Nitrospira*** El género representativo de este phylum es *Nitrospira*, las bacterias de este género se caracterizan por oxidar  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  al igual que las proteobacterias nitrificadoras, sin embargo no cuentan con la misma membrana interna que éstas últimas poseen. Estos dos grupo habitan los mismos ambientes y se sugiere que la capacidad fisiológica de *Nitrospira* fue transferida de las proteobacterias por flujo genético horizontal (Madigan, 2003), se encuentran en distintos ambientes como el suelo, mar, agua dulce y en plantas de tratamiento de aguas residuales (Abeliovich, 2001).

**Phylum *Chloroflexi*** Incluido en algunas clasificaciones dentro de las bacterias verdes no sulfurosas, está conformado por bacterias metabólicamente muy distintas como *Chloroflexus* (bacterias anoxifotótrofas termofilicas), *Thermomicrobium* (quimioheterótrofos hipertermofílicos) y *Herpetosiphon* (mesofílicos quimioheterótrofos); se han encontrado casi siempre en sedimentos marinos o de lagos y se ha demostrado que no es un linaje muy abundante en el océano (Gordon & Giovannoni, 1996).

**Phylum *Bacteroidetes*** Conformado por tres géneros poco relacionados entre sí: *Cytophaga*, *Bacteroides* y *Flavobacterium*, se encuentran en gran abundancia en el mar o en sistemas eutróficos como lagunas costeras, y son poco abundantes en aguas oligotróficas (Jaspers, 2001).

**Phylum *Acidobacteria*** el cual ha pasado sorprendentemente de ser un tipo de bacteria desconocido a ser uno de los más comunes, tras la utilización de los métodos de identificación independientes de cultivo; se ha encontrado en todos los ambientes y con gran abundancia (sobre todo en suelos).

**Phylum *Planctomycetes* y *Chlamydiae*** son los dos únicos phyla que se conocen con paredes celulares que no están compuestas por peptidoglicanos. El phylum *Planctomycetes* está formado por bacterias que son comunes en suelos y sedimentos, así como en agua dulce, el mar y ventilas hidrotermales. Estos dos phyla, junto con *Verrucomicrobia*, tienen características que no son típicas de las eubacterias, por lo que es posible que en un futuro

puedan relacionarse como un solo phylum cuando sus genomas estén disponibles (Madigan, 2003).

**Phylum Verrucomicrobia** Está conformado por bacterias de agua dulce y suelo, casi todas aeróbicas, heterótrofas y tienen una pared celular característica que las protege de factores ambientales (prosteca).

**Phylum Firmicutes** Es un phylum conformado como tal recientemente en el manual de Bergey, incluye tres clases, Mollicutes, Clostridia y Bacilli. La composición de su ADN es de bajo contenido en G+Cs. La clase Clostridia es estrictamente anaeróbica y su principal hábitat bien caracterizado son las cavidades humanas como la flora normal vaginal, oral, del tracto digestivo y la piel (Ezaki *et al.*, 2001). En el ambiente se encuentran en sedimento de lagos y sistemas de tratamiento anóxico de aguas negras. Son organismos saprofitos de suelo y tienen la habilidad de producir endoesporas y son principalmente fermentadores (Madigan *et al.*, 2003).

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

En un principio se pensó que este dominio era exclusivo de ambientes extremos, como ventilas hidrotermales o ambientes con alta salinidad, aunque también se han descubierto arqueas en plancton y sedimentos marinos, en el tracto digestivo de rumiantes e incluso en depósitos de petróleo en el subsuelo (Madigan *et al.*, 2000).

**Crenarchaeota** El dominio de las arqueas se divide en tres phyla, el más amplio es éste y ha sido encontrado en distintos hábitats como suelos y agua de lagos, además de ambientes extremos como ventilas hidrotermales y ambientes muy fríos (de -2°C a 4°C), por ejemplo en el océano Atlántico (DeLong, 1997). Muchas de las crenarchaeotas se especializan en metabolizar azufre, y aunque hasta ahora ha sido muy difícil cultivarlos, las secuencias del gen 16S ARNr que se han podido obtener indican que este grupo podría ser ecológicamente importante en distintos ambientes (Dworkin *et al.*, 2004).

**Divisiones candidatas** Por último tenemos nuevas divisiones de bacterias que se han sugerido a partir de todos estos estudios independientes de cultivo, estas están caracterizadas sólo por secuencias ambientales y por esta razón se determinan “candidate divisions” (para revisión ver Hugenholtz, 1998).

## *Gen de la subunidad ribosomal 16S*

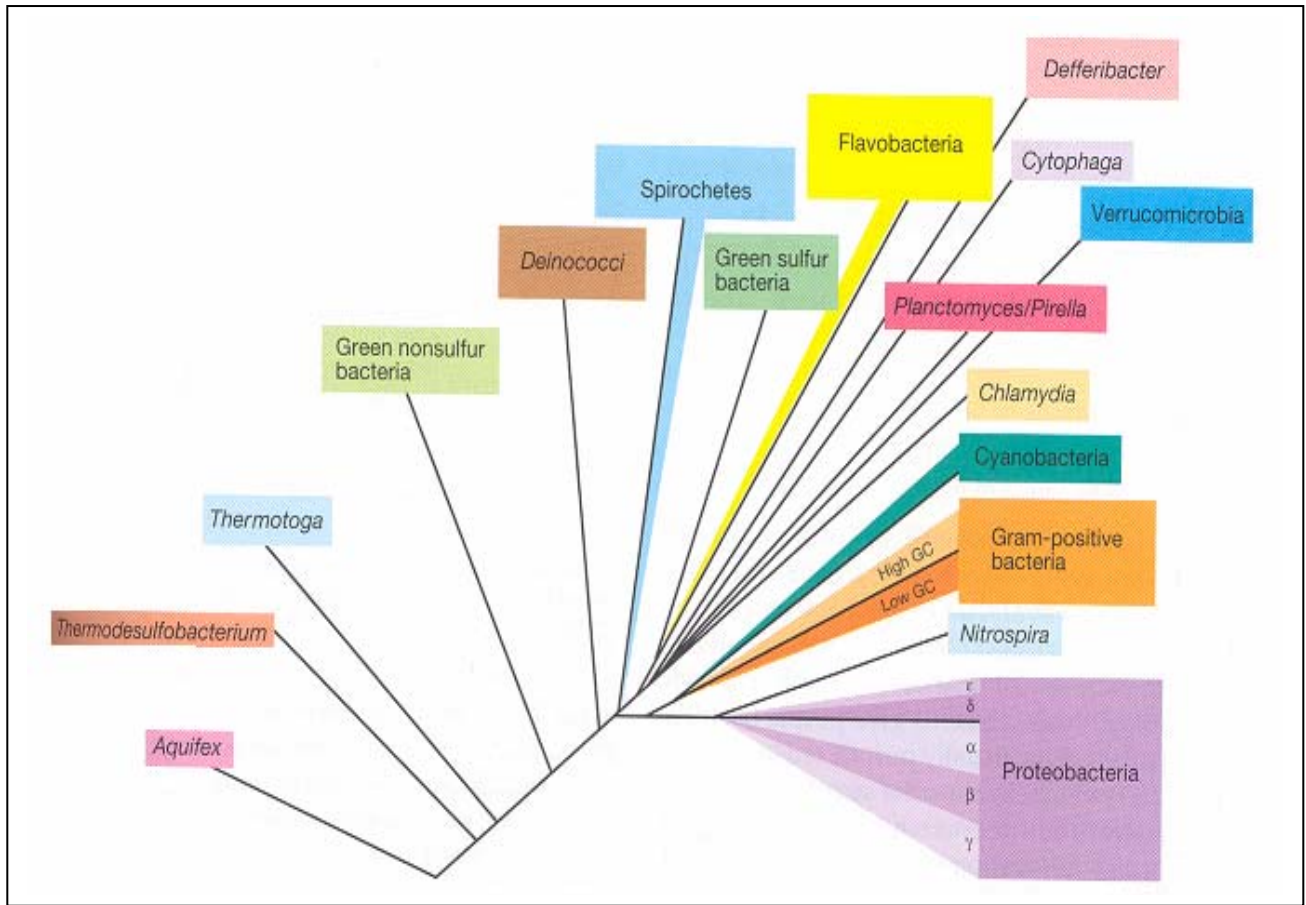
El aislamiento de un microorganismo permite caracterizarlo fisiológicamente, esto se logró realizar a partir de cultivos desde finales del siglo diecinueve por R. Koch (1843–1910), y J. Lister (1827–1912), sin embargo nuevas técnicas de estudio moleculares en estas últimas décadas han logrado descubrir y nombrar gran cantidad de bacterias y arqueas que antes no había sospecha de que estuviesen presentes, ya que sólo del 0.1% al 10% son cultivables (Tiedje y Stein, 1999).

Una de estas técnicas es a partir del estudio del gen 16S ribosomal que codifica para el ARN que constituye, junto con 21 proteínas, la subunidad pequeña (30S) del ribosoma bacteriano (70S). Carl Woese definió a esta molécula como una molécula cronómetro capaz de dar información filogenética y taxonómica (Woese, 1987; Olsen y Woese, 1993).

Es un gen muy antiguo presente en todos los procariontes actuales y encontrándose también un homólogo en los eucariontes, el gen que codifica para la subunidad ribosomal 18S. Su estructura cuenta con regiones conservadas y regiones variables, lo cual hace de esta molécula un buen marcador de eventos evolutivos y también de la relación filogenética entre los procariontes (ver Fig.1) y entre todos los seres vivos. La 16S y en general las SSU (subunidades pequeñas) son componentes esenciales de la maquinaria de síntesis de proteínas y por lo tanto se conservan funcionalmente en todos los organismos. El gen de ARN ribosómico (ARNr) 16S es de un tamaño intermedio (1500 nucleótidos) en comparación con el 5S o 23S (los ARNr de la subunidad 50S) lo cual lo hace de fácil manejo pero suficientemente largo para evitar fluctuaciones estadísticas. Dado que el ADNr 16S resulta relativamente fácil de secuenciar existen bases de datos que se expanden continuamente, como son el Ribosomal Data Base II (RDB II) y el Gen Bank.

Con esta molécula se establecieron entonces los tres dominios de la vida que se conocen actualmente: *Archea*, *Bacteria* y *Eucarya* (Woese, 1990); también se establecieron, y en la actualidad se siguen definiendo, los distintos grupos o phyla de bacterias que originalmente fueron 11 los propuestos por Woese, después 17 por Madigan (Fig.1) y 53 los propuestos recientemente por Rappé y Giovannoni (2003) que toman en cuenta los grupos no cultivables. En el manual de Bergey, que es la guía más oficial de la microbiología se definen actualmente 24 phyla (Garrity *et al.*, 2004).





**Fig. 1** Árbol filogenético del dominio Bacteria. Este árbol se deriva de secuencias de ARN 16S ribosomal, definiendo 17 grupos o phyla (tomado de Madigan *et al.* 2003).

### *Microbiología marina*

Los primeros estudios de microbiología marina se remontan a finales del siglo diecinueve cuando J.C. Certes publicó en 1884 sus observaciones de vida bacteriana en muestras recolectadas durante las expediciones del *Travallier* en 1882 y el *Talismán* en 1883 (Jannasch y Wirsén, 1983).

A mediados del siglo veinte ZoBell y Johnson durante la expedición danesa *Galathea* observan el efecto de la presión hidrostática en la actividad microbiana. En 1986 el programa de perforación oceánica (Ocean Drilling Program, ODP) inicia la búsqueda de vida microbiana en sedimentos de mar profundo.

A partir de esta expedición se han impulsado gran cantidad de proyectos oceanográficos que incluyen estudios microbiológicos. El desarrollo de más de un siglo de la microbiología marina ha logrado el desarrollo de diversos métodos de estudio en esta disciplina que apenas empieza a tener un importante arranque.

Gracias a las nuevas tecnologías el área de estudio de la biología y microbiología marina ha sido ampliada enormemente, ya que sitios que se consideraban inexplorables e inhóspitos, como el bentos del mar profundo, ahora se han vuelto un ambiente relativamente accesible del cuál podemos obtener muestras, fotos y datos. Ávidos por conocer este nuevo ecosistema, cada vez más y más investigadores se han dado la tarea de estudiarlo para descubrir los secretos de la vida en este ambiente con características que desde nuestro punto de vista son extremas.

Un ejemplo de estos grandes avances es el sumergible *Kaiko* del programa DEEP STAR que en 1996 fue enviado a 10 898 m de profundidad, en la localidad más profunda del mundo encontrada hasta ahora: la Fosa de las Marianas. Las imágenes que envió *Kaiko* mostraron la diversidad de la vida que allí había y se tomaron muestras para su análisis.

A mediados del siglo diecinueve Edward Forbes (1815-1854) observaba que a mayor profundidad menor abundancia de vida, concluyendo que muy probablemente no existía vida en el sedimento del mar profundo, a esto sus contemporáneos le llamaron “Teoría azoica”. En la actualidad se sabe que la biodiversidad en la subsuperficie oceánica es sorprendentemente vasta, incluyendo la procariótica. El 70% del total de procariontes se encuentra en la subsuperficie oceánica (Whitman *et al.*, 1998) y aunque se calcula que sólo el 3% se encuentra en sedimentos profundos (más de 2000m de profundidad), la biomasa bacteriana en esta zona se estima equivaldría al 10% del total de carbono orgánico en la superficie de la biósfera (Parkes *et al.* 1994). La biomasa bacteriana varía cuantitativamente dependiendo de la profundidad, las condiciones geoquímicas, y aunque en menor grado, de la porosidad y edad del sedimento (Parkes *et al.* 1994; Deming & Baross, 1993).

Los diversos métodos de estudio de la microbiota de los sedimentos de mar profundo han revelado la presencia de actividad metabólica y diversidad de ésta, así como también densidad celular y productividad bacteriana, sin embargo, al igual que en muchos otros ambientes extremos, se encuentra una tasa muy baja de organismos cultivables.

El mar profundo es un ambiente difícil de estudiar por sus barreras físicas y es por esto que el desarrollo de la tecnología ha marcado el ritmo de avance de estos estudios. Por un lado está la dificultad para la obtención de muestras, y por otro, la presión hidrostática, la temperatura y las demás condiciones en las que habitan los organismos no son fáciles de mantener en superficie. Desde los años cuarentas se empezaron a desarrollar técnicas de presurización y de muestreo del mar profundo y en la actualidad se cuenta con equipos

Referencia	Origen	Prof. (m)	No. Clonas	primers	t	f	s	c	e	Acido bacteria	Firmicutes	Bacteroidetes	Actinobacteria	Microspira	Planctomycetales	Verrucomicrobia	Chloroflexi	Alveola
Bowman & McCuaig, 2003	Sedimento antártico <sup>a</sup>	761	660	519/1492	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Li <i>et al.</i> , 1999a	Canal de Nankai, Japón <sup>b</sup>	3843	24	27/1492	-	-	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-	-	-	-	-
Li <i>et al.</i> , 1999b	Fosa Ryukyu, Japón	2339/3671	37		-	-	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	-	✓	-	-	-
Watanabe <i>et al.</i> , 2002	Depósito artificial de petróleo, Japón		81	341/1491	-	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-
Madrid <i>et al.</i> , 2001b	Guiana francesa <sup>c</sup>	somero	99	530/1494	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	-	✓	-	-	✓
Madrid <i>et al.</i> , 2001a	Golfo de Cariaco, Venezuela	1310	59	530/1494	-	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	-	✓
		500	51	530/1494	-	-	✓	✓	✓	-	✓	✓	-	-	-	✓	-	✓
Gray <i>et al.</i> , 1996	Eagle Harbor, EUA	somero	22	8/1492	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	-	-	✓	-	-	-
Wise <i>et al.</i> , 1997	Rainbow Bay, SC, EUA	somero, AD	35		-	✓	-	✓	-	✓	✓	-	-	-	✓	✓	✓	-
Dhillon <i>et al.</i> , 2003	Cuenca de Guaymas, GC <sup>b</sup>			8/1492	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	✓	✓	-
Mills <i>et al.</i> , 2003	Norte del Golfo de México <sup>d</sup>	550	92	27/1522	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-	-	-	✓	✓
Mills <i>et al.</i> , 2004	Norte del Golfo de México <sup>e</sup>	550	662	27/DXR518	-	-	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓
Lanoil <i>et al.</i> , 2001	Norte del Golfo de México <sup>f</sup>	540-2000	127	8/1492	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	-	-	-	-	✓
Este trabajo	S1 c/h, Chapopote, GM	2929	87	515/1492	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	✓
	S2 s/h, Chapopote, GM	2902	91	515/1492	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓

**Tabla 1** Estudios de diversidad bacteriana con el gen 16S ADNr.

Las celdas vacías indican que el artículo no especifica el dato, somero indica aguas someras, AD agua dulce, SC Carolina del Sur, GC Golfo de California, c/h con hidrocarburos, s/h sin hidrocarburos, GM Golfo de México.

<sup>a</sup> Sedimento antártico de la región del glaciar Mertz Polynya.

<sup>b</sup> Ventila hidrotermal.

<sup>c</sup> Lodos móviles costeros suboxicos o anoxicos.

<sup>d</sup> Sitio con emanaciones de hidrocarburos.

<sup>e</sup> Sitio con hidrocarburos líquidos, hidratos gaseosos y tapetes microbianos.

<sup>f</sup> Bacterias asociadas físicamente con hidratos gaseosos.

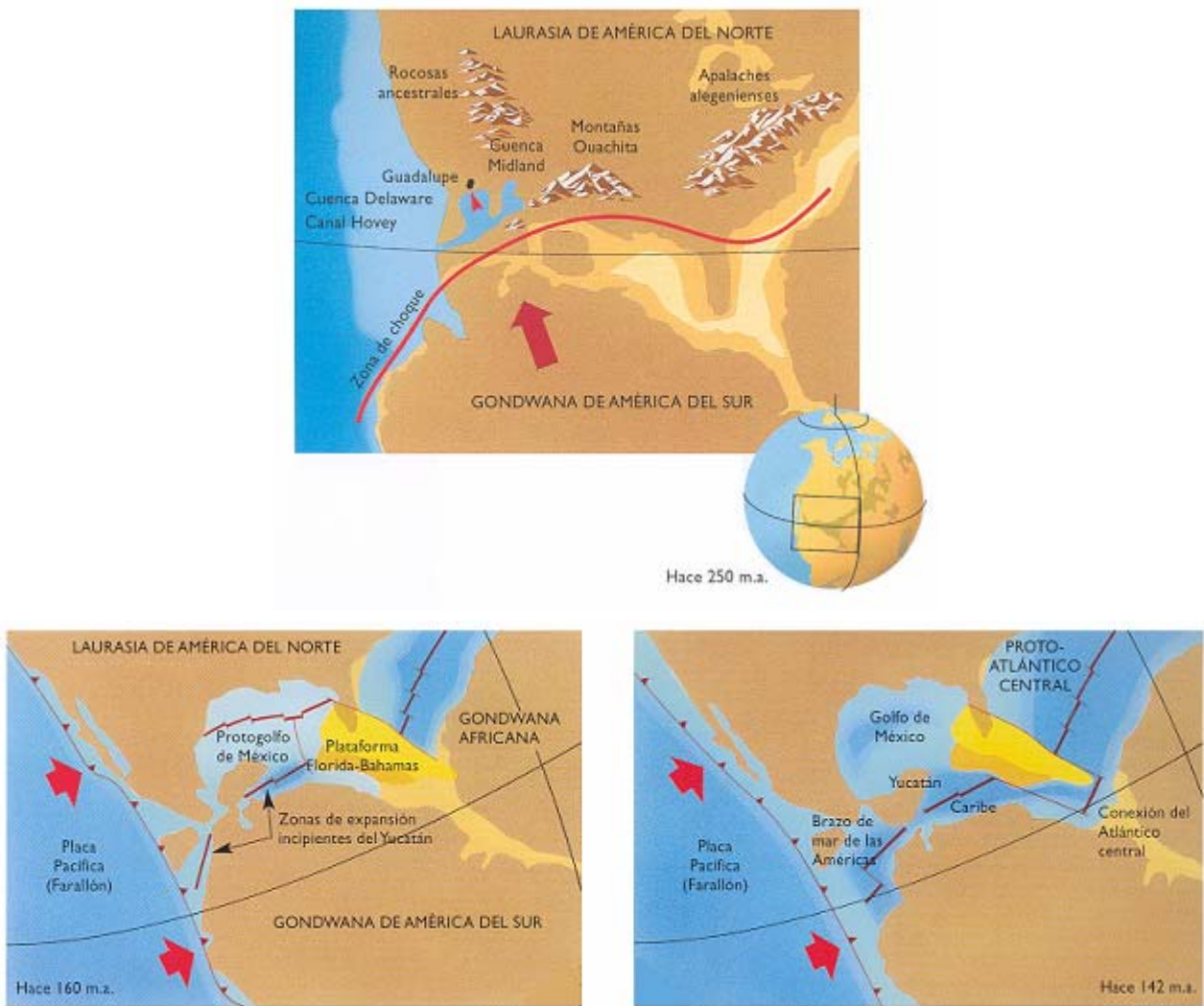
especializados para el estudio de las comunidades del mar profundo, desde cámaras de video hasta envases presurizables (Yayanos, 2003), incluyendo equipos que no se basan en el difícil sustento de la presurización sino en el largo recorrido para alcanzar el fondo marino, utilizando metros y metros de cable.

En este trabajo se hace un análisis molecular de la microbiota de muestras provenientes de sedimento marino del mar profundo del golfo de México, una zona abisal a 3000 m de profundidad, contigua a un volcán de asfalto y con emanaciones de hidrocarburos. Hasta hace unas cuantas décadas obtener este tipo de muestras era casi imposible, ahora ya se han hecho varios estudios semejantes a éste y en localidades igualmente profundas (Li *et al.*, 1999a, 1999b; Bowman & McCuaig, 2003; Madrid *et al.*, 2001a; Lanoil *et al.*, 2001) o con presencia de hidrocarburos (Watanabe *et al.*, 2002; Dhillon *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2003, 2004) (ver Tabla 1).

#### *Sitio de estudio: Chapopote, Golfo de México*

La fase de deslizamiento del Jurásico temprano - medio está asociada a la apertura del golfo de México y Proto-Caribe (Fig.2), a partir de la separación de las placas tectónicas de América del Norte y América del Sur. El desplazamiento del bloque de Yucatán se da a finales del periodo Jurásico y principios del Cretácico, y acompaña la formación de la corteza oceánica del golfo de México (Cantú-Chapa, 2001; Marton & Buffler, 1993); de hecho la edad de la mayoría de los depósitos de petróleo del golfo son de esta época, desde el periodo Oxfordiano hasta el Cretácico temprano, y están asociados con ambientes de carbonatos marinos (Guzman-Vega & Mello, 1999).

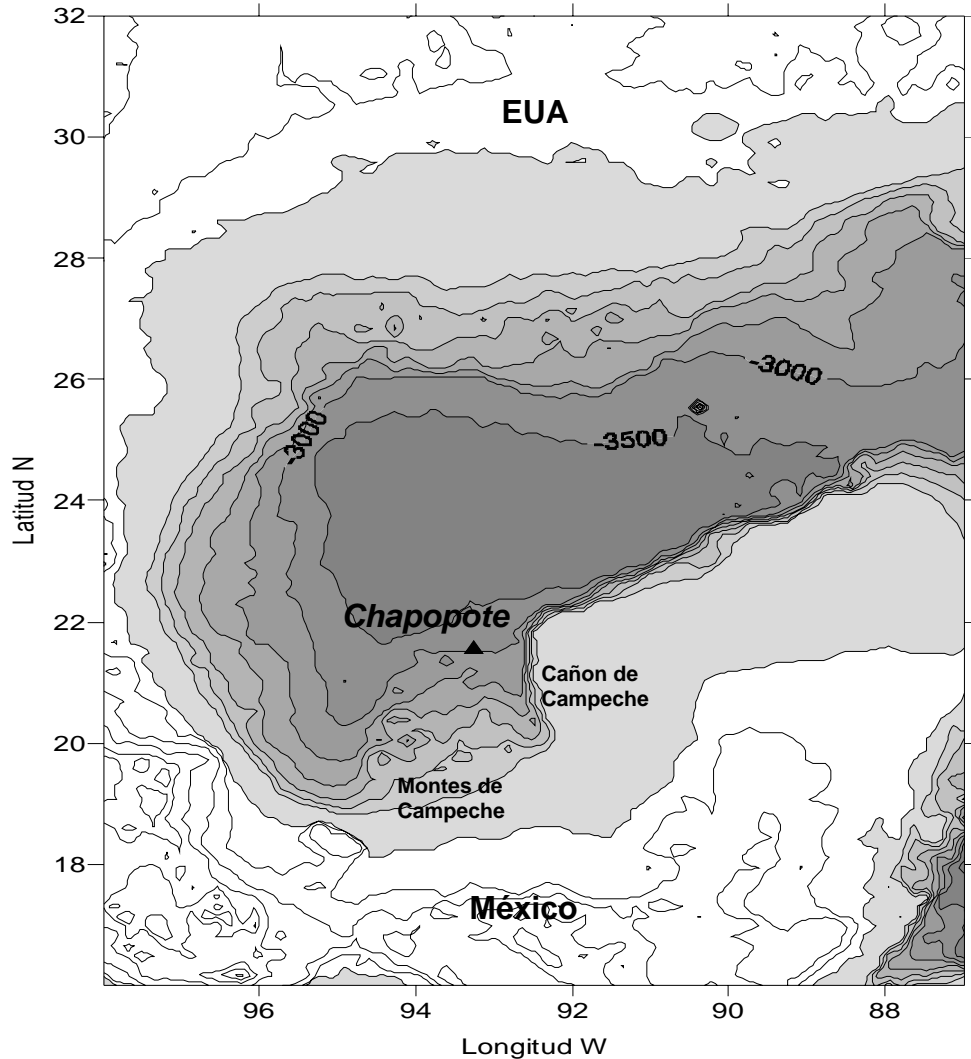
Las distintas áreas del golfo tuvieron una evolución diferente en el cretácico y mientras que en el área de Yucatán y Florida hubo una densa acumulación de carbonatos, en el área central prevaleció una sedimentación de mar profundo. En el Cretácico medio los márgenes de las plataformas se fueron estrechando hacia Yucatán y Florida respectivamente, quedando así toda la zona sureste del golfo de México con sedimentación escasa típica oligotrófica del mar profundo (Marton & Buffler, 1993; Salvador, 1991). La evolución del sedimento profundo del golfo todavía es desconocida; una exploración reciente del norte de Cuba y el sureste del golfo (Latouzey *et al.*, 2003), concluyen que el clímax de la orogenia en el Eoceno medio creó la corteza presente de este sitio, la formación más antigua encontrada es la de la época Calloviano-Oxfordiano. Sin embargo al igual que en el mesozoico, algunas fallas y estructuras de carbonatos se reactivaron en el Neogeno, de esta época datan algunos otros reservorios de petróleo (Guzman-Vega & Mello, 1999).



**Fig. 2** Origen del Golfo de México. Hace 250 millones de años (m.a.) los continentes aún estaban unidos; hace 160 m.a. los megacontinentes Laurasia y Gondwana se separan creando el protogolfo de México, desde este momento hasta hace 142 m.a. es la época en que la Península de Yucatán se desliza y se puede decir que el golfo de México es básicamente el actual (Tomado de Redfern, 2001).

El Golfo de México cubre una superficie de  $1.5 \times 10^6 \text{ km}^2$  y está delimitado geográficamente por las islas del Mar Caribe y el continente de América del Norte, en donde se incluyen México y Estados Unidos.

El sedimento del golfo se compone en general de evaporitas, sedimentos rojos, rocas intrusivas y metamórficas; debajo hay una gran cantidad de depósitos de hidrocarburos que como ya se mencionó arriba, datan del Jurásico superior, y se encuentran casi invariablemente a lo largo de todo el golfo, haciendo de éste una de las mayores provincias de petróleo en el mundo (Nehring, 1991).



**Fig.3** Mapa del Golfo de México (realizado con el programa Surfer 8). La localidad de estudio “Chapopote” se encuentra en el suroeste del golfo.

La zona de los Montes de Campeche es una región del Golfo de México que se localiza en la Bahía de Campeche y tiene una topografía hummocky (llena de montes) que es atribuida al diapirismo salino (cuerpos salinos que se mueven hacia arriba debido a su menor densidad con respecto a las rocas subyacentes y causan deformación); en este sitio los diápiros forman frecuentemente trampas o pasos de hidrocarburos provenientes de las subcapas (Ewing, 1991; Zhao & Lerche, 1993). Así en esta zona se encuentran infiltraciones de hidrocarburos que corresponden directamente con disecciones de estructuras salinas, MacDonald *et al.* (2004) describen que uno de esos montes disectados ( $21^{\circ}54'N$ ,  $93^{\circ}26'W$ ) presenta depósitos de asfalto solidificado en la superficie y por esta razón el sitio es llamado *Chapopote* (Fig. 3 y Fig. 4). El asfalto emana de una especie de cráter encontrado cerca de la

cima de la estructura y hay rastros de su flujo en forma subcircular parecidos a los de flujo de lava basáltica. En los alrededores se encuentran emanaciones frías de hidrocarburos, que son típicas de la cuenca del Golfo de México (MacDonald *et al.*, 2004).

### *Comunidad quimiosintética de Chapopote*

La primera fuente de energía en el mar es el sol, sin embargo el metabolismo sólo puede depender de éste cuando el organismo en cuestión está en los primeros 100 m de profundidad, en la zona eufótica marina, pues la oscuridad es continua desde este punto hasta el fondo. De aquí surge una cuestión interesante: en lugares tan profundos como la fosa de las Marianas, el más profundo del mundo, a 11 033 m de profundidad ¿qué pasa? ¿no hay vida? Y sin alejarse tanto ¿qué sucede en lugares menos profundos?, como en los Montes de Campeche a casi 3 000 m de profundidad, en dónde tampoco hay energía solar.

Muchos estudios sobre comunidades de organismos encontrados en estas profundidades se han realizado quizá desde 1979 cuando se descubren poblaciones de organismos oxidantes de hierro y azufre en las ventilas hidrotermales (Jannasch & Wirsen, 1979). Estos estudios son fascinantes ya que dan como conclusión inicial la presencia de vida sobrellevada por procesos quimiosintéticos.

Así, este nuevo hábitat descrito, Chapopote, cuenta con una diversa y extensa comunidad biológica, semejante a las comunidades ya ampliamente estudiadas del talud continental del golfo de México (Kennicutt *et al.*, 1988; Wade *et al.*, 1989; Sassen, 1993). Las emanaciones de hidrocarburos producen volcanismo de asfalto y lodo, salmueras, hidratos gaseosos, depósitos de minerales autogénicos y sostienen comunidades quimiosintéticas complejas (Canet, *et al.*, in press).

MacDonald *et al.* (2004) mencionan que las concavidades en las rugosidades del asfalto sólido de esta localidad están cubiertas con tapetes bacterianos blancos, los gusanos vestimentíferos (*Lamellibrachia* sp.) son abundantes y las comunidades se confinan cercanas al flujo asfáltico, de hecho algunos gusanos están completamente embebidos en el alquitrán sólido indicando un flujo de éste sobre ellos.

Además se encuentran, bivalvos esparcidos en la superficie, incluyendo las familias quimiosintéticas de los Vesicomidae (*Calyptogena* sp.) y mejillones (*Bathymodiolus* sp. y *Solemya* sp.). También fueron observados en este sitio cangrejos (*Munidopsis* sp.), camarones (*Alvinocais* sp.) y peces de mar profundo no endémicos e invertebrados (*Benthodytes* sp., *Psychropotes* sp. y *Ptesaterias* sp.). Un poco más alejados también se encontraban crinóidos y corales (MacDonald *et al.*, 2004; Bohrman & Schenck, 2004).

El sedimento abisal que rodea las formaciones de asfalto es típico abisal y consiste en depósitos de nanofósiles de grano muy fino y muestran bioturbación fácilmente. Los procariontes del sedimento normalmente habitan entre partícula y partícula del sedimento y el intercambio de compuestos, como oxígeno y materia orgánica se lleva a cabo muy lentamente y dependiendo de los factores ambientales. En sitios como éste, en donde los hidrocarburos emanan de abajo hacia arriba, la presencia de un tapete microbiano, como son los de *Beggiatoa*, está relacionado con el impedimento al intercambio de compuestos entre el sedimento y el agua, promoviendo la litificación (p. ej. de carbonatos) (Canet, *et al.*, in press) e impidiendo quizá la renovación de oxígeno.

Hasta ahora se desconoce la capacidad biogeoquímica, y el potencial médico y biotecnológico de los organismos de sitios como éste. En general se desconocen los límites de las bacterias del mar profundo. La caracterización cualitativa de las comunidades bacterianas de estos sitios es necesaria para iniciar el estudio más detallado de sus capacidades y tener la posibilidad de realizar un modelo comprensivo de la biogeoquímica.



## **Objetivos**

### *General*

Este trabajo pretende describir la diversidad bacteriana de muestras ambientales colectadas en sedimentos abisales de una localidad en el suroeste del golfo de México en donde se encuentra un volcán de asfalto, creando una librería de clonas de genes ribosomales bacterianos codificadores del ARN ribosomal 16S.

### *Particulares*

Obtener las librerías de clonas que permitan hacer una comparación entre dos sitios de muestreo contiguos a un volcán de asfalto, un sitio con hidrocarburos e hidratos de metano y el otro típico abisal con insignificante presencia de estos.

Comparar con estudios de diversidad bacteriana en sedimentos realizados en otras localidades tanto del golfo de México como de otras regiones oceánicas.

## **Hipótesis**

Ho<sub>1</sub>: Los dos sitios estudiados tendrán la misma composición y diversidad bacteriana debido a su cercanía.

Hi<sub>1</sub>: Cada sitio de estudio tendrá una composición y diversidad bacteriana diferente debido a la presencia/ausencia de hidrocarburos. La diversidad bacteriana será mayor en el sitio con presencia de hidrocarburos debido a la alta presencia de una fuente de energía.

Ho<sub>2</sub>: La población bacteriana representada en las librería de clonas es un reflejo de las poblaciones comunes que habitan en cualquier sitio del mar profundo.

Hi<sub>2</sub>: Las poblaciones bacterianas en la localidad de estudio son características de un lugar con una presión alta, zona afótica, temperatura baja y presencia de hidrocarburos, es decir un lugar poco común o quizá único, definido por condiciones extremas.

## Metodología

### *Trabajo de campo*

Las muestras analizadas en este trabajo se colectaron durante la campaña científica SO-174-II en una colaboración UNAM, GEOMAR y TAMU, del 1° de octubre al 12 de noviembre del 2003, a bordo del buque oceanográfico alemán *Sonne*. La localidad de estudio (Fig. 4) fue nombrada *Chapopote* (MacDonald *et al.*, 2004) debido a la gran cantidad de asfalto sólido presente en el sedimento.

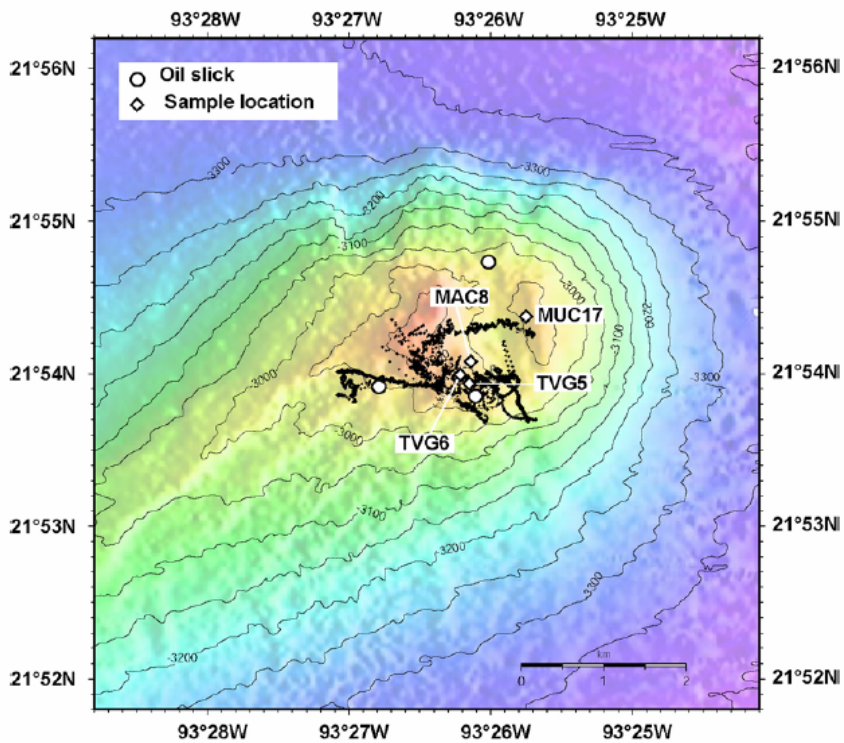
Esta localidad se localiza en la zona abisal de la región de los Montes de Campeche en el suroeste del Golfo de México; es un área que no se había mapeado tan a detalle anteriormente de aproximadamente 7 000 km<sup>2</sup> de extensión y que se encuentra a un promedio de 3 000 m de profundidad. Durante la exploración de la localidad se realizó una batimetría detallada y un reconocimiento fotográfico y de video del fondo marino para obtener una buena caracterización de la geomorfología del sitio.

La localidad de muestreo se estableció con observaciones satelitales AVHRR que permitieron, a partir de diferencias de densidad y reflectividad, identificar y dar seguimiento a manchas aceitosas en la superficie del océano, un método que ha permitido localizar fácilmente sitios con hidrocarburos e hidratos (MacDonald, 1993).

A continuación se hizo un reconocimiento visual del fondo marino con el equipo OFOS y se delimitó la zona de muestreo. En uno de los tres sitios en donde se realizó la caracterización del lugar (círculos en la Fig. 4), las gotas y manchas de aceite que se elevaban a la superficie eran mucho más abundantes, sin embargo provenían de un monte que no tenía una morfología sobresaliente, con un diámetro de aproximadamente 5 km y una altura de 400 m sobre la planicie abisal. La presencia de un cráter en este sitio hizo que se le reconociera como un volcán (MacDonald *et al.*, 2004).

La toma de las muestras se realizó en zonas contiguas a este volcán con una draga (TVG) y un multinucleador (TV MUC) guiados por videocámara.

El sedimento recolectado y traído a superficie se submuestreó con jeringas estériles truncas de la punta y el primer cm superficial se recuperó en viales estériles que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, manteniéndose desde ese momento hasta su análisis a -80°C. El procedimiento evitó todo tipo de contaminación, en especial con material de menor profundidad o de superficie.



**Fig. 4** Mapa de Chapopote. Los puntos negros en línea marcan las zonas exploradas con la cámara, los círculos marcan superficies aceitosas (hidrocarburos) y los diamantes ilustran cuatro sitios de muestreo entre los que se encuentran los de este trabajo, TVG 6 y MUC 17.

El primer dragado guiado por cámara de video extrajo ~75kg de asfalto, gusanos vestimentíferos y sedimento asociado. El segundo dragado apuntó y muestreó tapetes bacterianos sobre hidratos de metano (detalles de muestras en Tabla 2). En la muestra del primer dragado TV-MUC 17 la presencia de gas metano fue muy escasa y no tenía restos de hidrocarburos líquidos. La muestra constaba de pedazos de asfalto y el sedimento que lo acompañaba se componía de una delgada capa café de materia orgánica por encima del barro verde-gris de nanofósiles con arcillas (suelo típico marino). No se detectó  $H_2S$  y la presencia de  $NO_3^-$  en un gradiente de 14 a 4  $\mu M$  en los primeros 10 cm de sedimento indicaban que la superficie estaba oxidada (MacDonald *et al.*, 2004). La submuestra (muestra 1 de este estudio) lucía como una parte del todo.

**Tabla 2.** Muestras utilizadas en este trabajo. La muestra 1 fue tomada del sedimento asociado al dragado de ~75 kg de asfalto. La muestra 2 fue tomada de un dragado apuntado a un tapete bacteriano.

Muestra	ID Sonne	Sitio	Longitud	Latitud	Profundidad (m)	Cantidad (g)	Descripción
1	TVMUC 17-139	CK2155	93°25.749W	21°54.372N	2 929	1.2 a 2.0	Marino típico, un poco sulfuroso.
2	TVG 6-140	CK2155	93°26.236W	21°54.001N	2 902	1.0 a 3.0	Hidratos de metano, muy aceitoso.

El segundo muestreo tuvo como objetivo coleccionar tapetes bacterianos en la superficie, el 20% de la muestra resultaron ser petróleo e hidrocarburos líquidos y viscosos dispersos en hilos y aconglomeraciones dentro del sedimento. No había restos de asfalto sólido y tenía una corteza superficial de carbonatos autigénicos. La submuestra (muestra 2 de este estudio) lucía como una parte característica del todo. Los análisis del sedimento revelaron su carácter anóxico, concentraciones de entre 8 y 13 mM de H<sub>2</sub>S y una alta concentración de CO<sub>2</sub>. El perfil de alcalinidad mostró altos grados indicando oxidación de hidrocarburos por reducción de sulfatos de agua marina. La composición molecular e isotópica del gas hidrato mostró un gas termogénico y moderadamente maduro. Marcadores biológicos alifáticos y aromáticos dataron a los hidrocarburos presentes de la época del Jurásico, con una maduración moderada y aceites ricos en carbonatos, con una compleja composición de hidrocarburos n-C<sub>30</sub>, C<sub>29</sub> y hopanos C<sub>32</sub> (MacDonald *et al.*, 2004).

### *Librería de clonas*

Una “librería” normalmente denota una colección de productos identificados (generalmente genes específicos) de una amplificación de PCR de una muestra ambiental (Kemp & Aller, 2003). La mayoría de estos estudios se realizan clonando estos fragmentos y se denota “clona” a cada producto dentro de un vector que es transformado en bacterias competentes y fáciles de cultivar; como *Escherichia coli*, utilizada en este trabajo.

Una librería de clonas representa la diversidad bacteriana del ambiente de la muestra. Es útil cuando nuevas comunidades microbianas pretenden ser caracterizadas, teniendo la posibilidad de hacer análisis ecológicos de cada organismo.

En este trabajo se realiza un librería de clonas del gen del 16S ARNr que como ya se mencionó es un buen cronómetro molecular.

## *Extracción de ADN*

La extracción de ADN de suelo y sedimento para el estudio de la diversidad se ha llevado a cabo de diferentes maneras desde el primer método publicado, que quizá es el de Ogram *et al.*, en 1987. Después se han publicado otros que varían en el tipo, la complejidad y la eficiencia de la extracción.

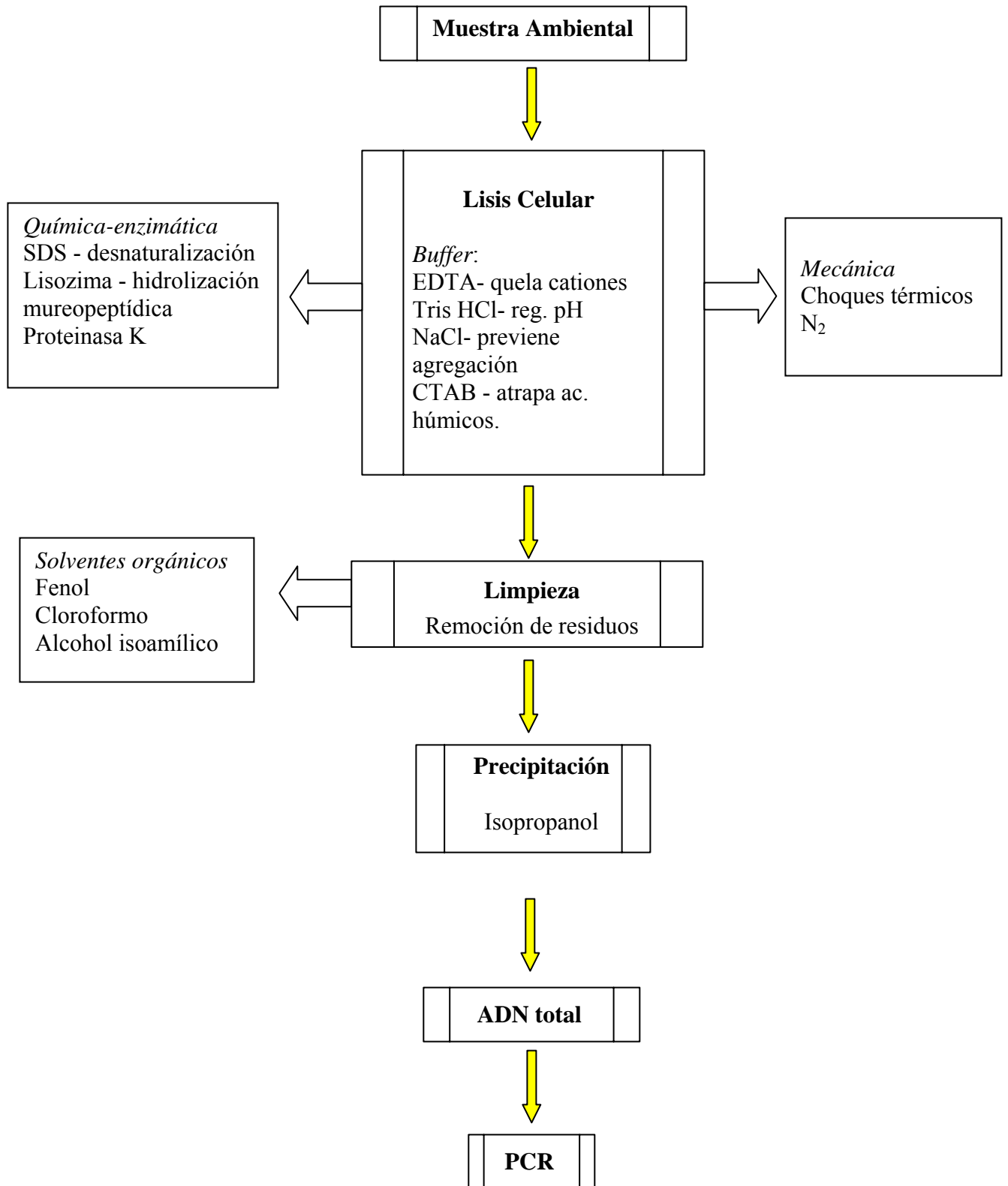
La extracción de ADN se ha hecho un proceso muy amigable y que puede realizarse en pocas horas siguiendo un método sencillo con un kit de extracción rápido y relativamente barato. La extracción de esta molécula universal nos permite su utilización para análisis genéticos y evolutivos de un alto grado de resolución.

El método que se utiliza depende principalmente de la muestra y sus componentes pues cada uno de ellos puede ser un factor de variabilidad en la eficiencia y calidad de la extracción, las muestras ambientales generalmente tienen un mayor grado de dificultad debido a su compleja composición y a la alta variabilidad que se puede encontrar en ellas.

En este trabajo el ADN se obtuvo de un sedimento atípico difícil de tratar por su rica carga de hidrocarburos, implementándose una técnica modificada del protocolo de extracción de ADN de Zhou *et al.* de 1996 (esquema de extracción en Fig. 5) y también se realiza con el kit *Ultraclean soil DNA Isolation*, de Laboratorios MoBio que se basa en una extracción de lisis mecánica con perlas.

Para realizar análisis moleculares de la diversidad microbiana, se requiere de una extracción de ADN de buena calidad, de tal manera que se obtenga un buen molde (templado) para la realización de las reacciones de PCR.

Se realizaron varias extracciones utilizando diferentes métodos, uno de ellos fue con el kit ya mencionado y otro con el método que en este trabajo llamamos “manual” por el hecho de que a comparación de los kits, todas las soluciones necesitan ser preparadas.



**Fig. 5** Esquema de los pasos seguidos en la extracción de ADN en este trabajo.

El método manual seguido para la extracción de ADN de estas muestras fue el siguiente: se agregaron 10 mL de buffer de extracción (100mM TrisHCl pH8, 1.5M NaCl pH8, 100mM EDTA, 100mM NaPhosphate, 1% CTAB) a aproximadamente 2 g de sedimento. Se congeló con N<sub>2</sub> líquido y se derritió a 65°C tres veces. Estos dos pasos inician la disociación de todos los componentes. La tercera vez se dejó equilibrar a 37°C y se añadieron 300 µL de lisozima (30mg/mL de lisozima 17 000 u/mg). Se agitó horizontalmente a 37°C por 30 min. Se agregaron 100 µL proteinasa K (10mg/mL) y 1.5 mL SDS 20%. Se incubó a 60°C durante toda una noche para lisar las células y liberar el ADN. Después de esta incubación se centrifugó a 8 000 rpm 10min. El ADN queda disuelto en la fase acuosa y se separa de la fase sólida con todos los componentes pesados (restos celulares y del sedimento). Se recolectó el sobrenadante y se agregó un volumen de una mezcla de solventes fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1 vol/vol) para limpiar de compuestos orgánicos. Se agitó por inversión con cuidado para no romper el ADN y centrifugó a 11 500 rpm 10 min. Se recuperó la fase acuosa (probando con una gota de agua para asegurarse cuál era la fase acuosa). Se repitió este paso. Se agregó 0.6 vol de isopropanol y 0.1 vol de acetato de sodio 3M para precipitar el ADN. Se incubó a temperatura ambiente por 1 hora y se centrifugó a 11 500 rpm por 25 min para concentrar en el fondo el ADN. Se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet con 10-20 mL de etanol 80% frío. Se centrifugó de nuevo a 11 500 durante 5 min, se decantó sobrenadante y se dejó secar. Se resuspendió en 400 µL de agua Milli-Q.

La muestra 1 como se describió anteriormente lucía característica de suelo marino de color verde oscuro, era inodora. La muestra 2 era aceitosa, olía a petróleo y lucía muy oscura como se predecía con las características de los núcleos. Aceites oscuros flotaron en el buffer de lisis.

### *PCRs*

La *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) es un método que permite llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN. En este caso los primers utilizados fueron oligonucleótidos universales para la amplificación del gen 16S ARNr bacteriano (amplifica sutilmente arqueas):

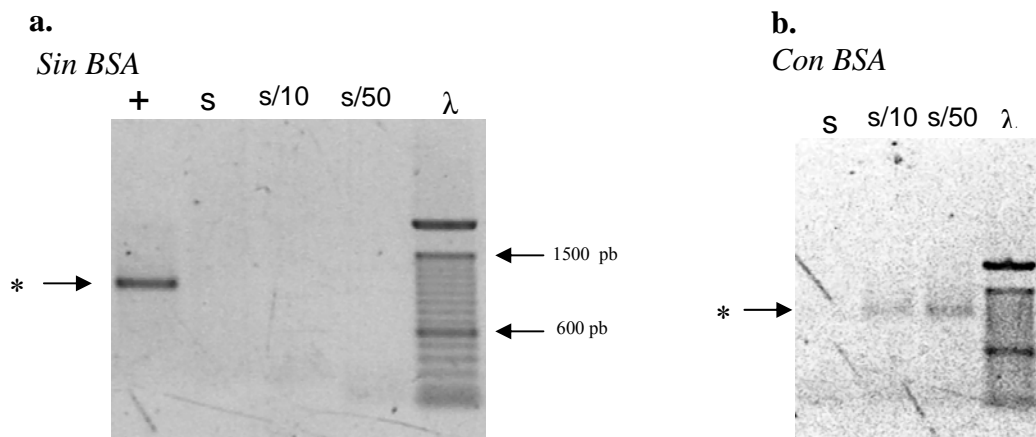
e1 515F (5'-GCGGATCCTCTAGACTGCAGTGCCAGCAGCCGC GGTA-3') y

e1 1492R (5'-GGCTCGAGCGGCCCGCCCGGTTACCTTGTTCACGA CTT-3')

(Angert et al. 1998).

Todas las reacciones de PCR se realizaron bajo las mismas condiciones (ver Apéndice Ia). Las reacciones PCR realizadas sin BSA no mostraron amplificación. En la figura 6a se muestra el gel de una PCR que no amplificó, se incluyen la muestra de sedimento TV MUC 139 (s) y diluciones de esta: 1:10 (s/10) y 1:50 (s/50), más un control positivo (ADN de *E. coli*).

Cuando se añadió BSA (25 µg/ml) a las reacciones de PCR se observó la amplificación del ADN extraído (Fig. 6b). Las propiedades de captura del BSA de compuestos proteicos y ajenos al ADN son efectivas para este ensayo.



**Fig. 6** Geles de PCRs del ADN extraído. Muestra de sedimento TV MUC 139 (s) y diluciones de ésta: 1:10 (s/10) y 1:50 (s/50), más un control positivo de ADN de *E. Coli* (+); en la columna de la derecha el marcador de peso molecular ( $\lambda$ ), en donde se observan los valores de dos de las bandas de  $\lambda$ . a) Sólo se observa la banda de amplificación para el positivo (\*) y no se observan bandas en ningún otro carril. b) Con BSA se observan las bandas de los productos de la amplificación (\*), mostrando el peso esperado de ~1000 pb.

### *Clonación, aislamiento de plásmidos y secuenciación*

Los productos de 3 PCR (150µL) fueron corridos en un gel de agarosa al 0.6% por electroforesis y extraídos del gel con el kit “Qiaquick gel extraction” de Qiagen (ver Apéndice II), para después llevar a cabo la clonación con el kit “TOPO A Cloning de Invitrogene” en el vector pCR TOPO 2.1 (ver Apéndice III). Después de obtener los productos de PCR se llevó a cabo la clonación en donde se obtuvieron ~100 colonias bacterianas por caja de Petri, de las cuales 10 eran azules. Se seleccionaron las clonas positivas (no azules) resuspendiéndolas en LB 2X con kanamicina y se incubaron durante toda la noche. Siguiendo a partir de este punto



el protocolo del kit “Montage plasmid miniprep<sub>96</sub>” para realizar la extracción de 96 plásmidos de cada sitio de manera secuencial (ver Apéndice IV). Se corrió por electroforesis 2  $\mu$ L de cada plásmido para corroborar que estuvieran presentes y de buen tamaño (gel no mostrado).

Se amplificó con los oligonucleótidos específicos de zonas internas al vector M13F y M13R (condiciones de reacción de PCR en Apéndice 1b), y los 380 productos fueron secuenciados. La secuenciación parcial del gen ribosomal 16S se llevó a cabo en un analizador de ácidos nucleicos ABI 3100 de cuatro capilares de la que se obtuvo una lectura de calidad de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, obteniendo así un fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases al ser las secuencias ensambladas.

Algunas secuencias se perdieron ya sea porque las clonas no crecieron o porque no hubo una buena definición de la secuencia.

### *Edición y análisis de secuencias*

Las secuencias se limpiaron y ensamblaron con el programa BioEdit y después se compararon con las bases de datos en línea: el BLAST del GenBank (Atschul *et al.* 1990) y el Sequence\_Match del Ribosomal Data Base II (RDB) versión 9 (Cole *et al.* 2005) que contienen ya una amplísima cantidad de secuencias de 16S rDNA. El GenBank cuenta con todas las secuencias disponibles públicamente incluyendo arqueas, bacterias y eucariontes, la alineación la lleva a cabo con el programa BLAST que alinea por similitudes. El RDB contiene 160, 286 secuencias bacterianas y el modelo de alineación incorpora directamente la información de estructura secundaria para llevar a cabo la alineación (Cole *et al.* 2005). La presencia de quimeras se determinó con el Chimera\_Check del RDB.

Se obtuvieron los índices de diversidad de Shannon (1963) y Simpson (1949) a partir de la riqueza de OTUs (ver Hughes & Bohannan, 2004 para revisión de los índices).

El análisis de rarefacción es un método para comparar la riqueza observada, generalmente entre ambientes que no fueron igualmente muestreados. Fue propuesto por Sanders (1968)T, y corregido por Hurlbert (1971) y Simberloff (1972). Es un análisis por medio del cual se puede reducir la muestra a submuestras hipotéticas y crear una curva de diversidad que muestra el número de especies estimado para cada submuestra. En este trabajo se obtuvo una curva a partir de los datos de las clonas obtenidas y otra que recopila datos de otros 12 artículos. Estas curvas describen en qué muestra hubo una mayor riqueza y también se puede observar la calidad del muestreo.

Se calcularon curvas de rarefacción para examinar la diversidad de las librerías de clonas usando el algoritmo de Hurlbert con el programa EcoSim v 7.71 y BioDiversity Pro v2.

## Resultados

Siguiendo el método manual de extracción se obtuvo el ADN de cada una de las muestras del sedimento del golfo de México. En el gel (Fig. 7) se observa el resultado de una de las extracciones. La muestra 2 mostró una banda semejante a ésta. El kit de extracción (gel no mostrado aquí) no mostró ninguna banda por lo tanto fue descartado.

Después de obtener el ADN se llevó a cabo la amplificación, la clonación y la secuenciación de las clonas obtenidas.

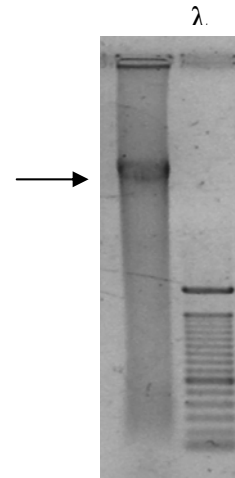
Las clonas obtenidas se nombraron CK1 si

provenían del sitio sin hidrocarburos y CK2 si provenían del sitio con hidrocarburos. En la Tabla 3 se muestran todas las clonas utilizadas para los subsecuentes análisis. Se detectaron 7 posibles quimeras que no fueron tomadas en cuenta para ningún análisis siguiente.

Se obtuvieron 85 secuencias de la muestra 1 y 90 de la muestra 2, de aproximadamente 1000 nucleótidos. Se asignó a cada clona su afiliación taxonómica más específica posible según el GenBank o el RDBII (Tabla 3).

Se agruparon las bacterias de cada sitio en grupos o phyla señalando también los subgrupos genéricos más relevantes y se realizaron gráficas de la distribución taxonómica de cada sitio (Fig. 8 y Fig. 9).

La riqueza taxonómica varía de un sitio a otro, como se observa en las gráficas. Las clonas del sitio uno tuvieron una gran riqueza al compararlas con el sitio dos, ya que de las 85 clonas, hubo 75 secuencias distintas. El 68% pertenece al phylum de las proteobacterias, 37% son de la clase  $\alpha$ -proteobacterias, 17%  $\delta$ -proteobacterias y 5%  $\gamma$ -proteobacterias, el restante son proteobacterias no clasificadas. Los géneros *Bdellovibrio* (perteneciente a la clase  $\delta$ -proteobacteria) y *Parvibaculum* (perteneciente a la  $\alpha$ -proteobacteria) tuvieron una presencia importante, del 4% y del 9% respectivamente, siendo los únicos géneros concurridos de este sitio como se puede ver en la Tabla 3. Las Acidobacteria suman un 5% de la población, las Actinobacteria al igual que las Chloroflexi un 1% y los Planctomycetes un 4%. Un 4% está conformado por bacterias Gram-positivas de divisiones candidatas. El 14% son bacterias desconocidas no clasificadas. Las arqueas estuvieron presentes en un 4%.



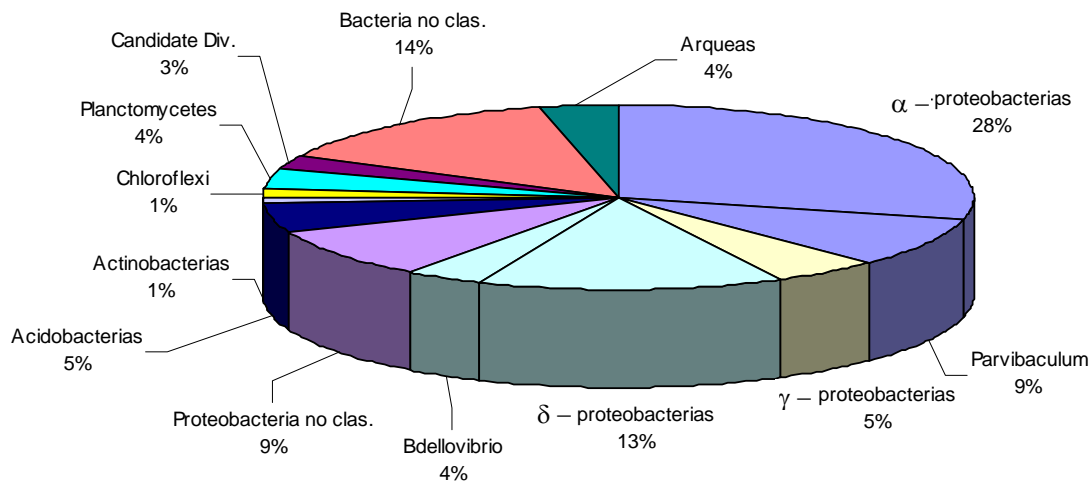
**Fig. 7** Gel de electroforesis mostrando la banda de ADN extraída con el método manual. A un lado el marcador de peso molecular ( $\lambda$ ).

**Tabla 3.** Clasificación de las secuencias de las clonas obtenidas de ambas muestras. N es el número de clonas con la misma secuencia. La *secuencia más parecida* es el número de acceso de la secuencia más cercana encontrada en las bases de datos GenBank o RDB. El taxa asignado es el grupo al que pertenece la secuencia más parecida. IS es el índice de similitud que asignó GenBank o RDB. (ver Apéndice V para más detalles sobre secuencias más parecidas).

Grupo taxonómico	Clona	N	GenBank			RDBII			
			Secuencia más parecida	Taxa asignado	IS	Secuencia más parecida	Taxa asignado	IS	
<i>α proteobacteria</i>	CK1.28	1	AF424272	Alpha	92	AF332350	Alpha	73.2	
	CK1.44	1	AJ567596	Alpha	96	AJ876936	Alpha	81.5	
	CK1.52	2	AY499896	Alpha	89.2	AY226319	Alpha	74.7	
	CK1.94	1	AY499896	Alpha	91	AY226319	Alpha	75.6	
	CK1.51	2	AJ567557	Alpha	88.4	AF544640	fRhodobacteraceae	71.3	
	CK1.81	1	AJ567557	Alpha	97	AJ567557	fRhodobacteraceae	88.6	
	CK1.90	2	AF424286	Alpha	92	AF544640	fRhodobacteraceae	73.6	
	CK1.84	1	AF425762	Alpha	96	AF530152	fSphingomonadaceae	70.8	
	CK1.2	1	AJ567557	Alpha	98	AJ567557	gRhodovulum	91.6	
	CK1.25	1	AF292999	Alpha	92	AF493306	Proteobacteria	77.9	
	CK1.46	1	AJ567572	Alpha	98	AF544066	Proteobacteria	67.4	
	CK1.59	1	AY220715	Alpha	91	AF016740	Proteobacteria	71.1	
	CK1.78	1	AY225603	Alpha	93	AF493306	Proteobacteria	78.3	
	CK1.58	1	AB189345	gParvibaculum	94	AF226227	Alpha	76.8	
	CK1.32	1	AB189345	gParvibaculum	91	AY191888	fAcetobacteraceae	74.7	
	CK1.18	2	AB189345	gParvibaculum	91	AF493306	Proteobacteria	73.3	
	CK1.53	1	AB189345	gParvibaculum	93	AF493306	Proteobacteria	77.4	
	CK1.71	1	AB189345	gParvibaculum	91	AF493306	Proteobacteria	72.4	
	CK1.79	1	AB189345	gParvibaculum	92	AF493306	Proteobacteria	72.4	
	CK1.92	1	AY375070	Bacteria	89.2	AY191888	fAcetobacteraceae	71.6	
	CK1.5	1	AY373412	Bacteria	96	AY373412	fRhodospirillaceae	80.1	
	CK1.21	1	AY373412	Bacteria	93	AY373412	fRhodospirillaceae	70.4	
	CK1.49	2	AY375070	Bacteria	95	AY375070	fRhodospirillaceae	79	
	CK1.75	1	AY373412	Bacteria	87.9	AF332346	fRhodospirillaceae	76.1	
	CK1.83	1	AY373412	Bacteria	95	AY373412	fRhodospirillaceae	79.6	
	<i>γ proteobacteria</i>	CK1.7	1	AB116496	Gamma	95	AY897337	Gamma	89
		CK1.69	1	AF424138	Gamma	96	AF424138	oChromatiales	87
		CK2.85	1	AY643537	Alteromonadaceae	89.4	AF505738	Gamma	59.6
		CK2.2	1	AJ514915	gVibrio	98	AJ514915	gVibrio	96.6
		CK2.39	4	AJ514915	gVibrio	99	D11252	gVibrio	96.3
		CK1.41	1	AY375070	Bacteria	87.8	AF194195	fEctothiorhodospiraceae	75.6
	<i>δ proteobacteria</i>	CK1.73	1	AY133365	Bacteria	90	M79409	gAcidithiobacillus	66.9
		CK1.4	1	AY375087	Bacteria	89	AJ582688	Delta	52.5
CK1.12		2	AY500082	Bacteria	94	AY499840	Delta	77.2	
CK1.16		1	AY869685	Bacteria	93	AY133447	Delta	75	
CK1.68		1	AY375087	Bacteria	92	AY375087	Delta	63.2	
CK1.26		1	AJ567571	Delta	94	AY734406	Bacteria	74	
CK1.60		1	AJ581352	Delta	90	AF332342	Bacteria	71.6	
CK1.23		1	AY499736	Delta	94	AF428809	Bacteria	74.7	
CK1.31		1	AY499730	Delta	96	AY499730	Delta	80.3	
CK1.62		1	AY499730	Delta	95	AY493917	Delta	72.6	
CK1.74		1	AY499739	Delta	97	AY499738	Delta	88.4	
CK2.27		1	AJ535247	Delta	99	AJ535247	gDesulfosarcina	92.8	
CK2.57		1	AF146263	Delta	91	AY161237	gSyntrophus	86.5	
CK2.42		1	AY542210	Delta	99	AY542210	gSyntrophus	95.1	
CK2.55		1	AY542210	Delta	95	AJ888766	gSyntrophus	79.9	
CK2.44		1	AY835388	Delta	86.9	AF016740	Proteobacteria	69.5	
CK2.29		1	AJ301565	Delta	94	AF016735	Delta	67.9	

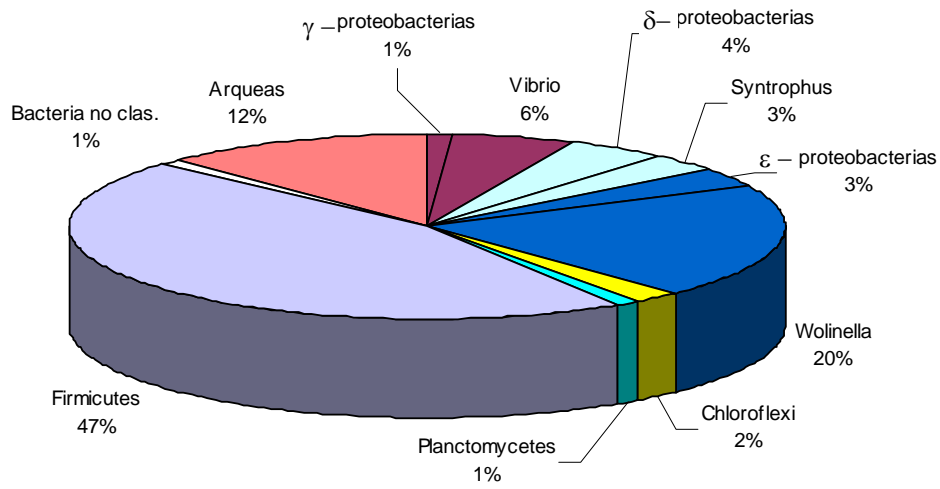
<i>ε proteobacteria</i>	CK2.20	1	AJ535251	Desulfobulbus	99	AJ704671	fDesulfobulbaceae	95.6	
	CK1.30	1	AF385539	gBdellovibrio	89	AF016755	gSyntrophus	64.7	
	CK1.85	1	AF385539	gBdellovibrio	87	AF016755	gSyntrophus	70.7	
	CK1.54	1	AY294215	gBdellovibrio	87.7	AF016755	gSyntrophus	71.5	
	CK2.16	2	AB013262	Epsilon	99	AY822333	gWolinella	92.8	
	CK2.77	3	AB013262	Epsilon	99	AB013262	gWolinella	93.6	
	CK2.81	2	AB013264	Epsilon	99	AB013260	gWolinella	94.3	
	CK2.5	3	AB015582	Epsilon	98	AY822355	gWolinella	92.4	
	CK2.21	3	AB015582	Epsilon	98	AY547996	gWolinella	93.2	
	CK2.62	1	AF449250	Epsilon	99	AF449250	gWolinella	93.7	
	CK2.80	1	AJ535216	Epsilon	99	AY897322	gWolinella	92.4	
	CK2.38	2	AB015258	Epsilon	99	AB015258	oCampylobacterales	94.1	
	CK2.87	1	AF420362	Proteobacteria	98	AB015582	gWolinella	92	
	CK2.9	1	AY197410	Proteobacteria	99	AB013260	gWolinella	91.9	
	CK2.31	1	AY133375	Bacteria	98	AY133375	gWolinella	96.3	
	CK2.83	1	DQ071101	Bacteria	97	AY547994	oCampylobacterales	92.6	
	<i>Proteobacteria</i> sin clasificar	CK1.70	1	AF317741	Bacteria	95	AF016740	Proteobacteria	73.1
		CK1.48	1	AJ306780	Bacteria	84	AF016740	Proteobacteria	64.5
		CK1.77	1	AY114311	Bacteria	85.9	AF016740	Proteobacteria	67
		CK1.89	1	AY592592	Bacteria	91	AY665428	Proteobacteria	63.5
	CK1.34	3	AB015549	Bacteria	92	AF016740	Proteobacteria	70.1	
<i>Acidobacteria</i>	CK1.8	1	AY225651	Acidobacteriaceae	95	AF223305	Bacteria	76.8	
	CK1.19	1	AY225651	Acidobacteriaceae	85	AF016740	Proteobacteria	74.6	
	CK1.45	1	AY225641	Acidobacteriaceae	90	AF016740	Proteobacteria	64.5	
	CK1.64	1	AY225641	Acidobacteriaceae	92	AF016740	Proteobacteria	75.6	
<i>Actinobacteria</i> <i>Chloroflexi</i>	CK1.65	1	AF424432	Actinobacteria	96	Z77577	Bacteria	88.1	
	CK1.96	1	AF424390	Chloroflexi	96	AF424390	Bacteria	82.2	
	CK2.51	2	AY542198	Chloroflexi	99	AY211664	Chloroflexi	81.5	
<i>Planctomycetes</i>	CK1.27	1	AF424502	Planctomycetes	92	AF424502	Bacteria	67.8	
	CK1.39	1	AY592681	Bacteria	90	AY500067	fPlanctomycetaceae	71.5	
	CK1.40	1	AF424489	Planctomycetes	92	AF424489	Planctomycetes	68.1	
	CK2.8	1	AY133431	Bacteria	98	AF029078	gPlanctomyces	84.5	
<i>Nitrospira</i>	CK1.3	1	AF317764	Bacteria	95	AY532586	Nitrospira	75.6	
	CK1.66	1	AF317764	Bacteria	95	AY592228	Nitrospira	79.9	
Gram - positivas	CK1.63	1	AJ271047	Candidate div OP10	89	AF428848	Candidate div OP10	63.8	
	CK2.1	37	AF154106	candidate division JS1	99	AF154106	Firmicutes	91.2	
	CK2.53	3	AF154106	candidate division JS1	99	AY592734	Firmicutes	93.4	
	CK2.69	1	AF154106	candidate division JS1	94.7	AY592367	Firmicutes	94.7	
	CK1.9	1	AY114311	candidate division WS3	93	AF194214	Bacteria	76.8	
Bacterias no clasificadas	CK1.67	1	AB015578	Bacteria	92	AY868010	Bacteria	75.9	
	CK1.29	1	AB187503	Bacteria	92	AB187503	Bacteria	60.2	
	CK1.10	2	AF328213	Bacteria	95	AF328213	Bacteria	74.4	
	CK1.22	1	AF332274	Bacteria	96	AF332274	Bacteria	84.4	
	CK2.18	1	AJ535232	Bacteria	97	AF424318	Bacteria	90.3	
	CK1.55	1	AY221083	Bacteria	85.2	AY930420	Bacteria	67.3	
	CK1.17	1	AY373394	Bacteria	98	AY373394	Bacteria	88.5	
	CK1.80	1	AY500087	Bacteria	95	AY500087	Bacteria	78.4	
	CK1.35	2	AY500093	Bacteria	96	AY500093	Bacteria	78.2	
	CK1.33	1	AY592085	Bacteria	98	AF313495	Bacteria	83.9	
<i>Archaea</i>	CK2.11	11	AF354137	Archea	99		--		
	CK1.1	1	AY856365	crenarchaeote	97		--		
	CK1.61	1	AF424521	crenarchaeote	98		--		
	CK1.95	1	AJ347776	crenarchaeote	95		--		

### Distribución sitio 1



**Fig. 8** Distribución de clonas bacterianas del sitio 1 (sin hidrocarburos). Se muestra la abundancia de bacterias encontrada en la librería de clonas del sitio 1. *Bdellovibrio* es un género de especies que pertenecen a las  $\delta$ -proteobacterias y *Parvibaculum* pertenece a las  $\alpha$ -proteobacterias. No clas. se refiere a las bacterias o proteobacterias sin clasificar.

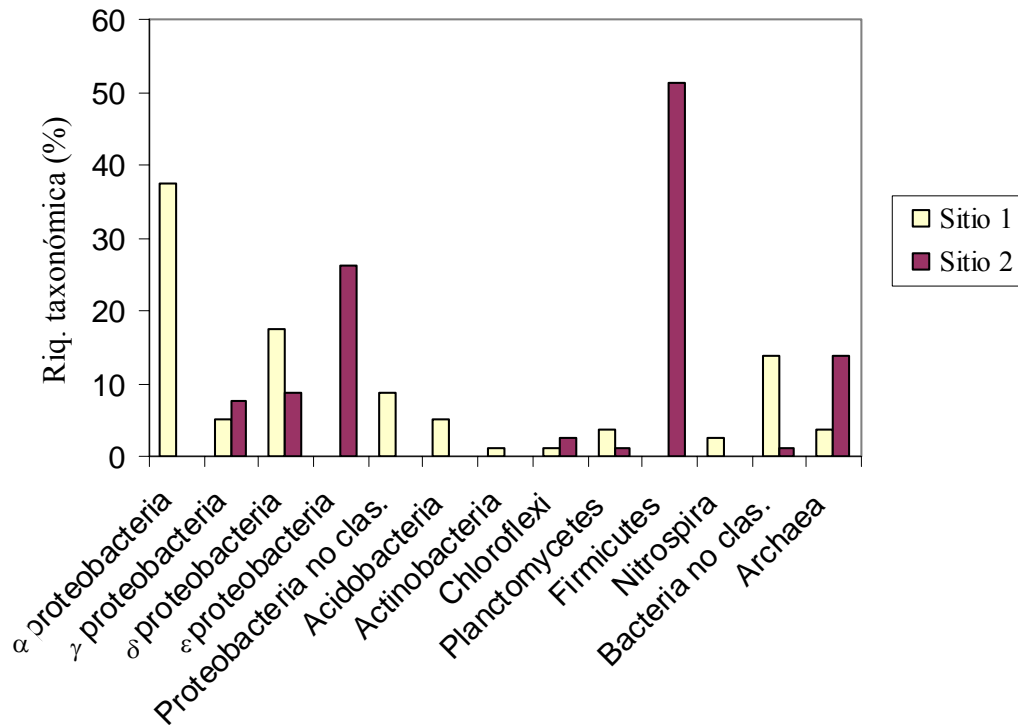
## Distribución sitio 2



**Fig. 9** Distribución de clonas bacterianas del sitio 2 (con hidrocarburos). Se muestra la abundancia de bacterias encontrada en la librería de clonas del sitio 2. *Vibrio* es un género que pertenece a las  $\gamma$ -proteobacterias, *Syntrophus* a las  $\delta$ -proteobacterias y *Wolinella* a las  $\epsilon$ -proteobacterias.

El sitio 2 (Fig. 9) muestra una menor riqueza en comparación con el sitio anterior ya que de las 90 clonas hubo 29 secuencias distintas. También se encontró la presencia de proteobacterias, sin embargo estas suman sólo el 37%, del cual un 23% lo conformaron  $\epsilon$ -proteobacterias, y  $\gamma$ -proteobacterias y  $\delta$ -proteobacterias un 7% cada una. Los géneros *Syntrophus* (perteneciente a la clase  $\delta$ -proteobacteria), *Vibrio* (a la  $\gamma$ -proteobacteria) y *Wolinella* (a la  $\epsilon$ -proteobacteria) fueron los únicos géneros concurridos (ver Tabla 3) conformando un 3%, 6% y 20% respectivamente. Un 47% pertenecen a una división candidata de las Gram positivas, siendo la mayoría de éstas la misma clona. El 2% resultaron pertenecer al phylum Chloroflexi y 1% al Planctomycetes. El 1 % son bacterias desconocidas no clasificadas. El 12% lo conforman arqueas.

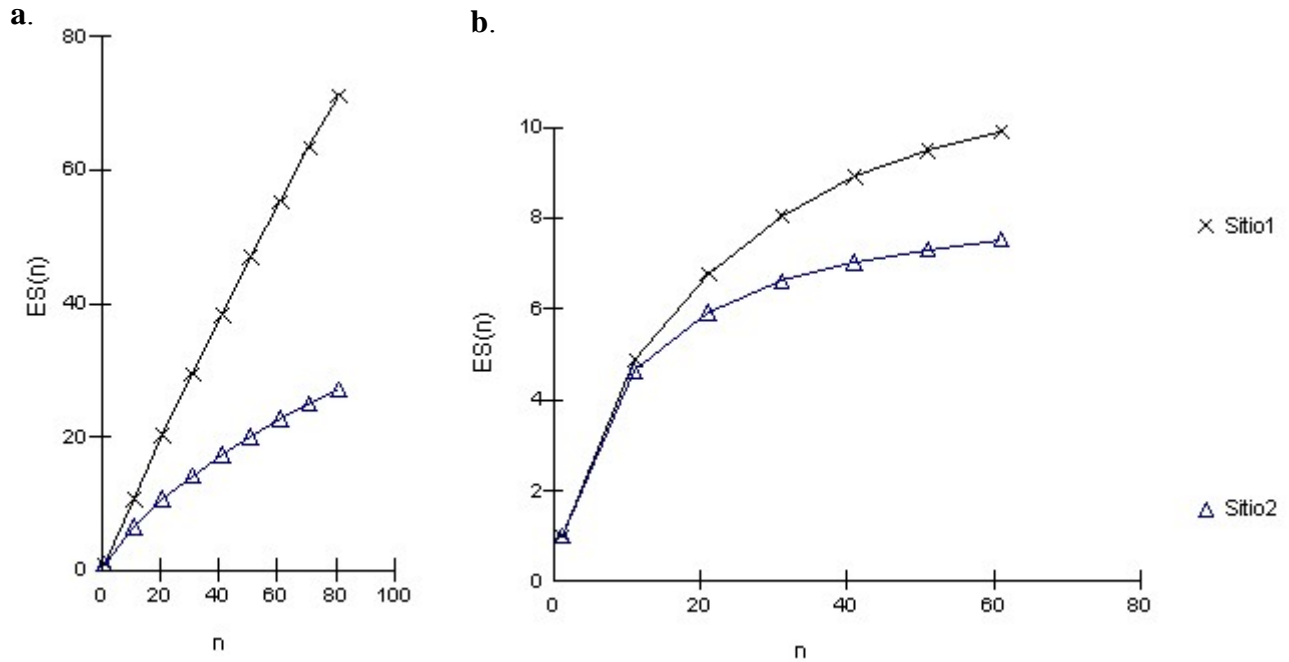
### Riqueza taxonómica de los dos sitios



**Fig. 10** Riqueza taxonómica de los dos sitios. Se comparan los phyla y clases (en el caso de las proteobacterias) de cada sitio.

Al comparar los phylum (y las clases de proteobacterias) de las dos muestras (Fig. 10) se encuentra que la mayor diferencia está en la proporción de alpha y epsilonproteobacterias, estando las primeras presentes en el sitio 1 y ausentes en el sitio 2 y las segundas lo opuesto.

En el sitio 1 se encontraron acidobacterias, actinobacterias y nitrospiras, contrariamente al sitio 2 que no hubo ninguna presencia de estos phyla. El otro gran contraste es la gran cantidad de bacterias Gram positivas del sitio 2 a comparación con el reducido número del sitio1. Las arqueas también tuvieron más concurrencia en el segundo sitio.



**Fig. 11** Curvas de rarefacción de las dos muestra.  $n$  es el número de clonas,  $ES(n)$  es el numero estimado de OTUs o especies. Las curvas X pertenece al sitio 1 (sin hidrocarburos) y las curvas  $\Delta$  pertenece al sitio 2 (con hidrocarburos). a) Curva calculada con cada secuencia distinta. b) Curva calculada con cada OTUs (grupos bacterianos semejantes a los de la Fig. 10).

Las curva de rarefacción de los dos sitios (Fig. 11) se realizaron tomando todas las secuencias distintas de la librería de clonas (Fig. 11a) o tomando como OTU (unidades taxonómicas operacionales) cada grupo distinto de los mismos grupos que se muestran en la Figura 10 (Fig. 11b). Las curvas son estimaciones estandarizadas al sitio peor muestreado, el sitio 1. Se observa que las curvas no alcanzan la asíntota y por lo tanto se podría decir que un muestreo más extenso es necesario para tener una buena confianza. Sin embargo las curvas microbianas en general nunca alcanzan esta asíntota (Gotelli & Colwell, 2001) y si la extrapolación de cada curva es clara, se toma como confiable. En este caso las dos curvas nos muestran claramente una riqueza mayor en el sitio 1.

En la Tabla 4 se muestran los índices de diversidad de Shannon y Simpson, indicándonos una mayor diversidad en el sitio 1 (sin hidrocarburos).

**Tabla. 4** Índices de diversidad. Los índices están calculados tomando cada secuencia distinta. S1 es el sitio sin hidrocarburos y S2 con hidrocarburos.

Índice de diversidad	S1 (sin)	S2 (con)
Simpson (D)	0.003	0.186
Shannon $\text{Log}_2$	6.104	3.538
Shannon $\ln$	4.231	2.453



## Discusión

### *Cuán representativa es una librería de clonas*

La creación de una librería de clonas es un método bastante estandarizado que permite observar la presencia de distintos organismos en el fondo marino, sin embargo esto no asegura que todos y cada uno de los organismos están representados, al contrario, si se analiza con detenimiento durante toda la metodología se pasa a través de varios filtros que a continuación se explican.

El primer filtro sería la lisis celular, este filtro se debe a que la pared celular varía en su estructura de organismo a organismo y hace que la resistencia de lisis varíe según el caso, teniendo así el ejemplo de las bacterias Gram-positivas que son mucho más difíciles de lisar. Así es un paso donde muchas de las bacterias que se quisieran integrar en un estudio como estos no logran sobrepasar este primer proceso. Por los datos del sitio 2 no parecería un gran problema, sin embargo es una misma secuencia la que aparece en la mayoría de las clonas y por lo tanto puede ser que sólo esa especie logró ser lisada y muchas otras no.

El siguiente filtro es la reacción de PCR con oligonucleótidos universales de bacterias; ya que no todas las bacterias tienen la secuencia consenso para la cual se han creado estos oligonucleótidos, por lo tanto el oligo no amplifica a todas por igual. Esto se ve reflejado en muchos trabajos en donde utilizando diferentes oligonucleótidos como primers encuentran distintas bacterias en su librería (p.ej. Watanabe *et al.*, 2002). Varios estudios dedicados a esta diferencia de resultados ya han sido publicados (Reysenbach *et al.*, 1992; Suzuki y Giovannoni, 1996).

La clonación es otro paso que mengua la muestra, a pesar de que los productos de PCR podría decirse tienen la misma oportunidad de integrarse en el vector, la muestra disminuye su tamaño y probablemente los organismos menos abundantes dejan de estar presentes. También un hecho importante de notar es, que en la transformación, las *E.coli* tienen preferencia por fragmentos no ricos en G + Cs y la compatibilidad con el vector es importante.

El sesgo con el que se representa una población de organismos en una librería de clonas es muy grande por todo lo antes mencionado, pero es por eso que el panorama general que nos da una librería de clonas no debe de tomarse como un mapa representativo del ambiente sino más bien como una muestra que nos dará una idea del todo. Aun así los métodos moleculares son las técnicas más sensibles hasta ahora para describir la composición compleja de las comunidades microbianas (Li *et al.*, 1999b).

### *Los grupos encontrados*

La presencia de proteobacterias es característica de todos los trabajos en sedimento marino en los cuales se ha analizado el gen del 16S (Tabla 1 y Espinosa, 2005 para otra revisión), sin embargo la variabilidad en las distintas clases varía. La presencia de  $\alpha$ -proteobacterias en el sitio 1 y ausencia en el sitio 2 se debe probablemente a la anoxia que existe en el sitio 2 y quizá a la falta de adaptabilidad de estas bacterias a habitar ambientes con hidrocarburos.

La alta presencia de deltaproteobacterias y arqueas en el sitio 2 sugiere la presencia de una gran población de organismos sulfato-reductores (otro ejemplo en Naganuma *et al.*, 1997), que suministran azufre reducido al hábitat y gracias a ellas tenemos presencia de H<sub>2</sub>S en este sedimento. Las bacterias sulfato reductoras se correlacionan con la presencia de petróleo e hidrocarburos (L'Haridon *et al.*, 1995, Voordouw *et al.*, 1996, Nilsen *et al.*, 1996, Margot *et al.*, 2000) y de hecho son capaces de oxidar alcanos, compuestos aromáticos y ácidos grasos (Phelps *et al.*, 1998).

De las epsilonproteobacterias ambientales se sabe poco, pero tienen potencialmente la capacidad de oxidar sulfuros anaeróbicamente (Todorov *et al.*, 2000) como epibiontes que se sugiere son (Li *et al.*, 1999a), así en el sitio 2, la alta presencia de las epsilonproteobacterias podría deberse a una elevada producción de sulfuros que les permite subsistir adecuadamente.

Anteriormente ya se ha mencionado que los microbios están consumiendo directamente los hidrocarburos, tomándolos como una fuente de carbono y energía (Lanoil *et al.*, 2001; Sassen *et al.*, 1993) pero para conocer si los hidrocarburos presentes en este sitio realmente son metabolizados y cómo, se necesitarían hacer más análisis químicos.

La oxidación de acetatos y otros donadores de electrones presentes en el sedimento del golfo de México como producto de la hidrólisis de hidrocarburos, se estaría llevando a cabo por bacterias como *Desulfobacterales*, y a su vez, la hidrólisis la propiciarían organismos como los del género *Syntrophus* que fermentan el benzoato a acetato (Madigan *et al.*, 2003). Co-cultivos de bacterias anaerobias similares a *Syntrophus* y *Wollinella* han mostrado que son capaces de degradar compuestos aromáticos incluidos fenol y benzoato (Barik *et al.*, 1985), teniendo probablemente la función de utilizar el hidrógeno de deshecho de la fermentación, como la del benceno (Phelps *et al.*, 1998). Sin embargo la fisiología más detallada y el nicho ecológico de estos grupos bacterianos aún está por determinarse (Dhillon *et al.*, 2003).

Algunos planctomycetes han sido relacionados con la oxidación anaeróbica del amoníaco (Schmid *et al.*, 2000; Strous *et al.*, 1999). Anteriormente se ha caracterizado a los tapetes de *Beggiatoa* spp. como proveedores de amoníaco (Joye *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2004), en este trabajo el sitio 1, que fue relacionado con tapetes bacterianos, tiene una mayor

presencia de planctomycetes y podría deberse a la presencia de los tapetes a los cuales se asoció la toma de la muestra.

La presencia de los géneros *Vibrio* y *Bdellovibrio* es de gran importancia, ya que podrían ser la base para buscar nuevas especies de bacterias de interés médico y ecológico, ya sea en la búsqueda de proteínas, en el caso de *Vibrio*, asociadas a las de especies patógenas, y en el caso de *Bdellovibrio* con especies capaces de ser patógenas de la primera (Jurkevitch, 2000), que nos podría llevar a encontrarlas con nuevas características debido a su ambiente natural del cual están proviniendo, o en el estudio de su nicho ecológico. Mecanismos que involucran la invasión de *Bdellovibrio* en *Vibrios* y en general en las Gram negativas, han hecho pensar en la solución para la evolución de una patogenicidad causada por alguna de éstas bacterias (ver Sockett & Lambert, 2004 para revisión). En los sitios de este trabajo estas especies se encuentran a una gran presión, y a una baja temperatura, por lo tanto mecanismos o proteínas funcionales de estos organismos tendrían la cualidad de ser resistentes a grandes presiones o funcionar a bajas temperaturas.

En este trabajo sólo encontramos *Bdellovibrio* sp. en el sitio 1 y *Vibrio* sp. en el sitio 2, éstas últimas son especies anaerobias facultativas, sin embargo las especies *Bdellovibrio* son aerobias. Quizá la ausencia de *Vibrio* en el sitio 1 se debe a la presencia de las *Bdellovibrio*, ya Rice *et al.* (1998) mencionaban que éste género podría tener un papel modulador en la naturaleza siguiendo un modelo de presa-depredador.

Las bacterias gram-positivas son muy dominantes en el sitio con hidrocarburos, lo cual hace sentido con su caracterización de ser anaeróbicas y ser más resistentes al medio por su pared celular. Aún así la gran abundancia de éstas no hace que la riqueza en el sitio aumente pues la mayor parte de las clonas (37) son la misma secuencia (99%) que la [AF154106](#), una secuencia proveniente de una clona de una librería del golfo de México, otro sitio con emanaciones de hidrocarburos (O'Neill, no publicado).

Por último las arqueas encontradas pertenecen al género de las *Crenarchaeota* que al parecer son comunes en los sedimentos superficiales (Vetriani *et al.*, 1999). Li *et al.* (1999c) las introducen a un modelo de circulación de azufre con el papel de productoras del metano que las bacterias sulfato reductoras utilizarían para oxidar; aunque realmente no se tiene ningún dato para afirmar que las arqueas aquí presenten tengan ese papel. Sin embargo la oxidación anaeróbica del metano sí se lleva a cabo en este sitio, demostrada por la precipitación de carbonatos presentes en el sedimento (Canet, *et al.*, in press) y seguramente asociada a la reducción de sulfatos marinos.

Muchas de las clonas y de las bacterias a las que las secuencias de este trabajo fueron semejantes aún están muy pobremente descritas y por lo tanto podemos decir todavía muy poco del papel de cada organismo, sin embargo la distribución bacteriana en cada sitio tiene sus propias cualidades. Se observa hoy en día que hay grupos de bacterias cosmopolitas y

otros que se presentan sólo en ciertos ambientes (Hugenholtz *et al.*, 1998), por lo tanto algunos grupos aquí descritos podrían ser característicos del lugar o quizá de ambientes con las mismas características. Por otro lado, una interpretación más real del papel funcional de cada organismo provendría de otros estudios como con trazadores radioactivos para determinar cierta actividad metabólica o del estudio de ARNm, o librerías de clonas de otros genes funcionales, que dieran una definición más puntual de algún grupo bacteriano de interés.

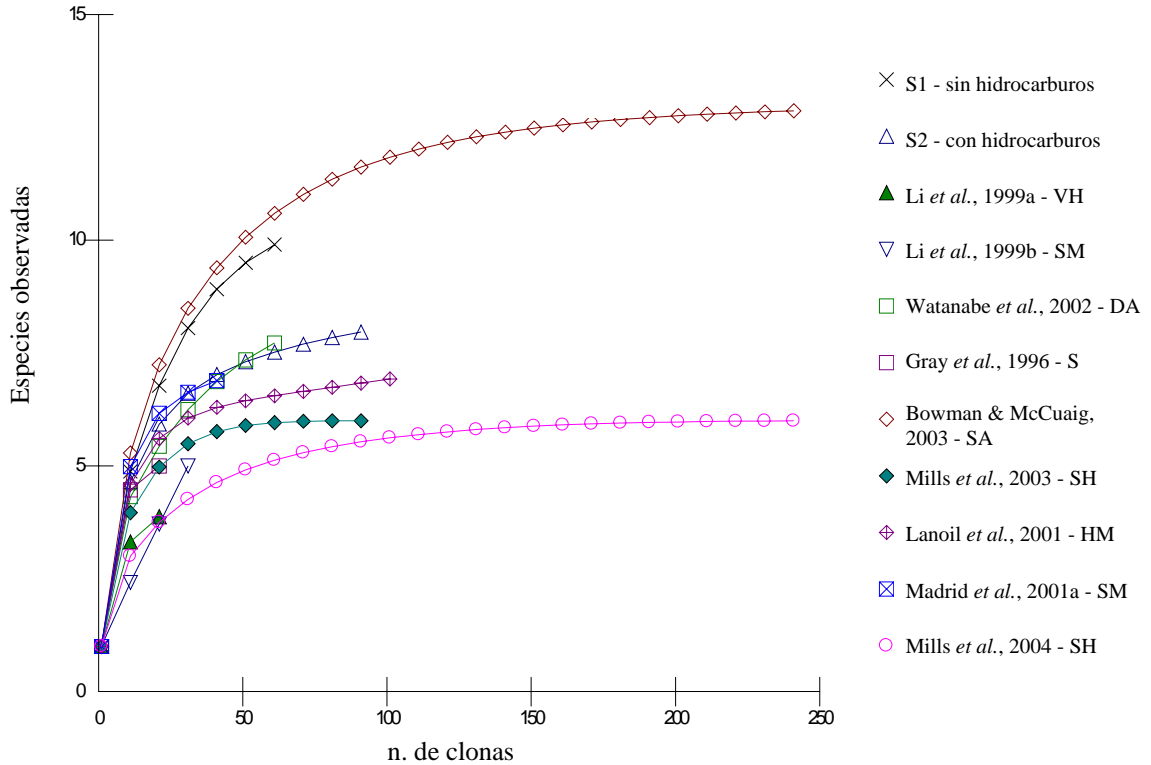
### *Comparando riquezas*

En este trabajo las dos librerías fueron creadas con el mismo método por lo tanto tienen el mismo sesgo, entonces son cualitativamente confiables de comparar.

La riqueza taxonómica presente es mayor en el sitio uno (sugerido desde el inicio al observar los datos y analizado con mayor certeza en las curvas de rarefacción de la Fig. 11), y de hecho los índices de Shannon y Simpson también indican una mayor diversidad. En la curva de rarefacción *a* se observa que el sitio 2 podría decirse está llegando al límite del muestreo (acercándose a la asíntota), en comparación con el sitio 1 que más bien estaría lejos de ser un buen muestreo. Por otro lado la curva *b* podría decirse que muestra todos los grupos bacterianos puesto que la curva casi se acuesta en la asíntota.

Lo anterior podría deberse a muchos factores y aunque las variaciones en la estructura comunitaria en ecosistemas marinos varía a micro escala dependiendo de los nutrientes (p.ej. Azam & Long, 2001; Bowman & McCuaig, 2003), en este caso considero esenciales la cantidad de hidrocarburos y la cantidad de oxígeno presentes en cada sitio, pues estos favorecen un medio desapacible para muchos microorganismos. De hecho si observamos la curva de rarefacción con los distintos sitios representados (Fig.11b) la riqueza taxonómica más baja se encuentra en los sitios anóxicos con hidrocarburos, incluyendo al sitio 2; por el contrario la librería del sitio 1 se encuentra cercana a la curva de mayor riqueza que corresponde a la librería de Bowman & McCuaig (2003).

El grano del sedimento es tan pequeño que de hecho las bacterias y los diversos compuestos tienen poca movilidad, esto, como ya se mencionaba en la introducción, quizá es la causa de la calidad anóxica u óxica del sitio con hidrocarburos y el sitio sin éstos respectivamente.



**Fig. 12** Curva de acumulación de los estudios de la Tabla 1. Se observa que dos de las muestras están extensa y suficientemente muestreadas, la de Bowman & McCuaig, 2003 (rombos) y la de Mills *et al.*, 2004 (círculos). VH ventila hidrotermal, SM sedimento de mar profundo, DA depósito artificial de petróleo, S sedimento marino de aguas someras, SA sedimento antártico, SH sedimento con hidrocarburos, HM hidratos de metano.

Las condiciones ambientales y la fuente de energía no sólo dicta la composición de la comunidad microbiana y su riqueza sino también constriñe las características fisiológicas, así los organismos presentes en el sitio de estudio de este trabajo tienen que estar adaptados al frío, a la anoxia o hipoxia y subsistir a una erupción, teniendo la vida que reacomodarse a cada evento. De hecho sobre los microorganismos se sugiere o que se adaptan muy rápido a los cambios, pudiendo así subsistir y volver a multiplicarse rápidamente, o son nuevas bacterias que colonizan cada vez, proviniendo ya sea de niveles superiores o de los alrededores. Es difícil determinar el origen de los organismos presentes, sin embargo parte de ellos probablemente tiene la capacidad de una rápida adaptación, debida quizá a su metabolismo y a su interrelación, y otra parte seguramente son nuevos colonizadores de zonas contiguas, creándose así una composición comunitaria distinta de sitio a sitio.

## Conclusiones

En este estudio se muestra que la diversidad bacteriana es variable entre sitios cercanos con condiciones abióticas diferentes y que su caracterización debe ser a micro escala (mm) por la heterogeneidad del suelo marino. Las hipótesis nulas entonces quedan rechazadas.

Las clonas fueron similares a sitios distintos. El sitio 1 a organismos marinos, la mayoría bénticos, bastante estándares; y el sitio 2 a organismos de localidades con carga de hidrocarburos, ambientes anóxicos y ambientes contaminados.

El sitio 1 tuvo una mayor diversidad que el sitio 2 que parecía tener una rica carga de nutrientes, sin embargo la difícil sobrevivencia en los hidrocarburos al parecer tiene un papel fundamental en la selección de los microorganismos especializados a ciertos ambientes.

Hay grupos bacterianos que podrían presentar patrones de biogeografía como las  $\alpha$ -proteobacterias y las  $\varepsilon$ -proteobacterias; y grupos como las  $\gamma$ -proteobacterias,  $\delta$ -proteobacterias y Gram-positivas pudieran ser cosmopolitas. Sin embargo las clasificaciones alcanzadas a la fecha son poco profundas (a nivel de phylum generalmente) y es necesario conocer más de la composición fina de estos grupos.

La descripción de un sitio nuevo, con condiciones a las que llamaríamos extremas, nos lleva al descubrimiento de muchos organismos aun no caracterizados, pudiendo ser estos estudiados y explotados en un futuro próximo.

Las técnicas moleculares de extracción de ADN y las librerías de clonas del gen ribosomal 16S son un método sensible para hacer un panorama general de la diversidad microbiana. Sin embargo el papel biogeoquímico y ecológico tiene que ser aclarado con otros medios como estudios de genómica, de cultivo, fisiológicos, etc.

## Perspectivas

Hacer el análisis filogenético con las secuencias obtenidas, nos llevaría a obtener información sobre la posible evolución de las bacterias en esta localidad.

Una alternativa más tradicional a este estudio podría ser la realización de cultivos, pero se debe tomar en cuenta que para obtener un espectro amplio de bacterias u otros organismos se necesitarían tener las condiciones del lugar de recolección, es decir, un ambiente hiperpresurizado, el porcentaje de sales, nutrientes, etc. y la temperatura que allí encontramos. Esto nos permitiría llevar a cabo el seguimiento de alguna de estas bacterias extremófilas que podría llevarnos a encontrar nuevas proteínas o mecanismos fisiológicos con importancia ecológica, médica y/o biotecnológica.

El 16S ADN<sub>r</sub> es un gen con una alta resolución, sin embargo se encuentra en el umbral de resolución de una especie (Rossello & Amman, 2001). Por lo tanto sería necesario llevar a cabo otros estudios para determinar por un lado las especies presentes y por otro su ecología. El estudio de otros genes, del ARNm, los análisis biomoleculares de lípidos entre otros, las mediciones del metabolismo en el medio, son ejemplos de estos posibles análisis para obtener datos tanto biogeoquímicos como biogeográficos.

La construcción de sondas para FISH para comparar comunidades semejantes distribuidas en distintos ambientes, rápida y puntualmente y el estudio de la estratificación de comunidades tanto horizontal como verticalmente, sería una opción que nos dejaría un estudio como éste.

El empezar a conocer la presencia, fisiología y ecología de estos microorganismos nos puede llevar a encontrar un modelo que sea consecuente con su papel en cada ecosistema, y así tener un panorama más claro de todos los ciclos biogeoquímicos que sostienen a la Tierra.

Las tres propiedades o variables fundamentales de la microbiología marina, las cuales todavía están lejos de ser medidas rutinariamente son: la estructura comunitaria, el total de microorganismos presentes (biomasa microbiana), tasas de metabolismo y crecimiento (Kart y Dore, 2001). Alrededor de esto es en lo que se debe enfocar la investigación futura.

## Referencias

- Abeliovich, A., 2001. The Nitrite oxidizing bacteria. Dworkin M. et al. (Eds.), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III ed., release 3.7, Springer–Verlag, Nueva York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index>.
- Aharon, P., Fu, B.S., 2000. Microbial sulfate reduction rates and sulfur and oxygen isotope fractionations at oil and gas seeps in deepwater Gulf of Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 233–246.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 522–529.
- Angert, E.R., Northup, D.E., Reysenbach, A.L., Peek, A.S., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogists* 83: 1583–1592.
- Azam, F., Long, R.A., 2001. Oceanography - sea snow microcosms. *Nature* 414, 495–497.
- Barik, S., Brulla, W.J., Bryant, M.P., 1985. PA1, a versatile anaerobe obtained in pure culture, catabolizes benzenoids and other compounds in syntrophy with hydrogenotrophs, and P-2 plus *Wolinella* sp. degrades benzenoids. *Applied Environmental Microbiology* 50, 304–310.
- Barns, S.M., Fundyga, R.E., Jeffries, M.W., Pace, N.R., 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91(5), 1609–13.
- Bohrman, G., Schenck, S. 2004. RV Sonne. Cruise report SO174. OTEGA II: Balboa-Corpus Christi-Miami (Octubre 1 – Noviembre 12, 2003) GEOMAR 117, Kiel, Germany, 130 pp.
- Bowman, J.P., McCuaig, R.D., 2003. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Applied Environmental Microbiology* 69 (5), 2463–83.
- Canet, C., Prol-Ledesma, R.M., Bohrmann, G., Lozano-Santa Cruz, R., Linares, C., Mortera-Gutiérrez, C., Escobar-Briones, E., Cienfuegos, E., Morales-Puente, P., in press. Mineralogical and geochemical characterization of hydrocarbon seep sediments from hydrocarbon seepage sites in the Gulf of Mexico.
- Cantú-Chapa, A. 2001. Mexico as the western margin of Pangea based on biogeographic evidence from the Permian to the Lower Jurassic. C. Bartolini, R.T. Buffer, y A. Cantú-Chapa, eds., *The western Gulf of Mexico Basin: Tectonics, sedimentary basins, and petroleum systems*. American Association of Petroleum Geologists Memoir 75, 1–27.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 1, 33.



Curtis, T.P., Sloan, W.T., Scannell, J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99, 10494–10499.

DeLong, E.F., 1997. Marine microbial diversity: the tip of the iceberg. *Trends Biotechnology* 15, 203–207.

Deming, J.W., Baross, J.A., 1993. The early diagenesis of organic matter: bacterial activity. Engel, M.H., Macko, S.A. (Eds), *Organic geochemistry*, Plenum Press, New York. pp. 119-144.

Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., 2003. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Applied Environmental Microbiology* 69, 2765-72.

Dworkin M. et al., eds., 2004. *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community 2004*, Springer-Verlag, Nueva York.  
<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>

Espinosa, L., 2005. Análisis de la diversidad de procariontes usando el gen 16s ribosomal: origen marino de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis de maestría. UNAM. pp.70.

Ewing, T.E., 1991. Structural framework. Salvador, A. (Ed.), *The Geology of North America. The Gulf of Mexico Basin*, Vol. J. The geological Society of America, USA, pp. 31-52.

Ezaki, T., Li, N., Kawamura, Y., 2001. The Anaerobic Gram-Positive Cocci. Dworkin M. et al. (Eds.), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III ed., release 3.7, Springer-Verlag, Nueva York.

Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn T.G., 2004. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, Nueva York, II ed., Release 5.0.

Gordon, D.A., Giovannoni, S.J., 1996. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific Oceans. *Applied Environmental Microbiology* 62, 1171-1177.

Gotelli, N.J., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4, 379-391.

Gray, J.P., Herwig, R.P., 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4049–4059.

Guzman-Vega, M.A., Mello, M.R., 1999. Origin of oil in the Sureste Basin, Mexico. *AAPG Bulletin* 83 (7), 1068-1095.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180 (18), 4765-4774.

Hughes, J., Bohannan, B.J.M., 2004. Applications of ecological diversity statistics in microbial ecology. Akkermans, A.D.L. et al., (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual* 2<sup>nd</sup> Ed., Netherlands, pp. 1321-1344.

Hurlbert, S.N., 1971. The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52, 577-586.

Jannasch, H.W., Wirsen, C.O., 1979. Chemosynthetic primary production at east Pacific sea floor spreading centers. *BioScience* 29, 592-598.

Jannasch, H.W., Wirsen, C.O., 1983. Microbiology of the deep sea. Rowe, G.T. (Ed.), *The sea. Deep Sea Biology*, Vol. 8. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 231-259.

Jaspers, E., Nauhaus, K., Cypionka, H., Overmann, J., 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 153–164.

Joye, S.B., Boetius, A., Orcutt, B.N., Montoya, J.P., Schulz, H.N., Erickson, M.J., Lugo, S.K., 2004. The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chemical Geology* 205, 219-238.

Jurkevitch, E., The genus *Bdellovibrio*. 2000. Dworkin, M. et al. (Eds.), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III ed., release 3.1 Springer-Verlag, Nueva York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>.

Karl, D.M., Dore, J.E., 2001. Microbial ecology at sea: sampling, subsampling and incubation considerations. *Methods in Microbiology*. 30, 13-39.

Kennicutt, M.C., Brooks, J.M., Bidigare, R.R., 1988. Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities – I. Rational distribution of hydrocarbon seep page and associated fauna. *Deep-sea Research* 35, 1639-1651.

Kemp, P.F., Aller, J.Y., 2003. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 161-177.

Kerstens, K., Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt E., 2003. Introduction to the Proteobacteria. Dworkin, M. et al. (Eds.), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III ed., release 3.12 Springer-Verlag, Nueva York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>.

Kuo, A., Garrity, G.M., 2002. Exploiting microbial biodiversity. Staley, J.T., Reysenbach, A.L. (Eds.), *Biodiversity of microbial life*. Wiley-Liss, Inc., New York. pp. 477-520.

Lanoil, B.D., Sassen, R., La Duc, M.T., Sweet, S.T., Nealson, K.H., 2001. Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Applied Environmental Microbiology*, 67 (11), 5143-5153.

- Letouzey, J., Gaumet, F., Moretti, I., Sanchez, J.R., Tenreyro, R., 2003. Tectonics and Petroleum Systems of the Southern Gulf of Mexico (North Cuba), AAPG International Conference, Barcelona, Spain (Resumen).
- L'Haridon, S., Reysenbach, A.L., Glénat, P., Prieur, D., Jeanthon, P., 1995. Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. *Nature* 377, 223–224.
- Li, L., Guenzennec, J., Nichols, P., Henry, P., Yanagibayachi, M., Kato, C., 1999a. Microbial diversity in Nankai Trough sediments at a depth of 3,843m. *Journal of Oceanography*. 55, 635-642.
- Li, L., Kato, C., Horikoshi, K., 1999b. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depth. *Biodiversity and Conservation*. 8:657-677.
- Li, L., Kato, C. and Horikoshi, K., 1999c. Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. *Marine Biotechnology* 1, 391-400.
- MacDonald, I. R., Guinasso, N. L., Ackleson, Jr., S. G., Amos, J.F., Duckworth, R., Sassen, R., Brooks, J.M., 1993. Natural oil slicks in the Gulf of Mexico are visible from space. *Journal of Geophysical Research* 98, 16351-16364.
- MacDonald, I.R., Bohrmann, G., Escobar, E., Abegg, F., Blanchon, P., Blinova, V., Bruckmann, W., Drews, M., Eisenhauer, A., Han, X., Heeschen, K., Meier, F., Mortera, C., Naehr, T., Orcutt, B., Bernard, B., Brooks, J., de Farago, M., 2004. Asphalt volcanism and chemosynthetic life in the Campeche Knolls, Gulf of Mexico. *Science* 304 (5673), 999-1002.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Pearson Education Inc. NJ. USA. 10<sup>a</sup> edición.
- Madrid, V.M., Taylor, G.T., Scranton, M.I., Chistoserdov, A.Y., 2001a. Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. *Applied Environmental Microbiology* 67(4), 1663-74.
- Madrid, V.M., Aller, J.Y., Aller, R.C., Chistoserdov, A.Y., 2001b. High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile mud deposits off French Guiana: identification of two new bacterial candidate divisions. *FEMS Microbiology Ecology* 37, 197-209.
- Margot, M., Ollivier, B., Patel, B.K.C., 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 103-116.
- Marton, G., Buffler, R.T., 1993. The Southeastern Gulf of Mexico in the framework of the opening of the Gulf of Mexico Basin. Mesozoic and early cenozoic development of the Gulf of Mexico and Caribbean region. A context for hydrocarbons. GCSSEPM Foundation 13<sup>th</sup> Annual Research Conference Proceedings, pp.51-67.
- Mills, H.J., Hodges, C., Wilson, K., MacDonald I.R., Sobecky P.A., 2003 Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology* 46, 39-52.

Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., Sobecky, P.A., 2004. Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Applied Environmental Microbiology* 70 (9), 5447-58.

Moyer, C.L., 2001. Molecular phylogeny: applications and implications for marine microbiology. *Methods in Microbiology* 30, 375-394.

Nehring, R., 1991. Oil and gas resources. Salvador, A. (Ed.), *The Geology of North America. The Gulf of Mexico Basin*, Vol. J. The geological Society of America, USA, pp. 445-494.

Nilsen, R.K., Beeder, J., Thorstenson, T., Torsvik, T., 1996. Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field waters and oil reservoirs. *Environmental Microbiology* 62, 1793-1798.

Ocean Drilling Program, ODP. <http://www-odp.tamu.edu>.

Olsen G.J., Woese, C.R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB Journal*, 7, 13-23 .

Ogram, A., Saylor, G.S., Gustin, D., Lewis, R.J., 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiology Methods* 7, 57-66.

Parkes, R.J., Cragg, B.A. Bale, S. J. Getliff, J.M., Goodman, K., Rochelle, P.A., Fry, J.C., Weightman, A.J., Harvey, S. M., 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature* 371, 410-413.

Phelps, C.D., Kerkhof, L.J., Young, L.Y., 1998. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 269-279.

Rappé M.S. y S.J. Giovannoni 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* 57, 369-394.

Redfern, R., 2001. *Orígenes: la evolucion de los continentes, los oceanos y la vida en nuestro planeta*. Ed. Paidós Iberica. p280.

Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1992. Differential amplification of rDNA genes by polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology* 58, 3417-3418.

Rice, T.D., Williams, H.N., Turng, B.F., 1998. Susceptibility of bacteria in estuarine environments to autochthonous bdellovibrios. *Microbial Ecology*, 35, 256-264.

Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., Harry, M., 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 18 (1), 47-60.

- Roselló-Mora R., Amann R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 39–67.
- Salvador, A., 1991. Origin and development of the Gulf of Mexico Basin. Salvador, A. (Ed.), *The Geology of North America. The Gulf of Mexico Basin*, Vol. J. The geological Society of America, USA pp. 389-444.
- Sanders, H.L., 1968. Marine benthic diversity: a comparative study. *American naturalist*. 102, 243-282.
- Sassen, R., Roberts, H.H., Aharon, A., Larkin, J., Chinn, E.W., Carney, R., 1993. Chemosynthetic bacterial mats at cold hydrocarbon seeps. *Gulf of Mexico continental slope. Organic Geochemistry* 20, 77– 89.
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Schleifer, K.H., Wagner, M., 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic Applied Microbiology* 23, 93-106.
- Shallenberg, M., Kalf, J., Rasmussen, J.B., 1989. Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts. *Applied Environmental Microbiology* 55 (5), 1214-1219.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The mathematical theory of communication*. Urbana, University of Illinois Press.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Socket, R.E., Lambert, C., 2004. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology* 2(8), 669-75. Review.
- Sorensen, K.B., Lauer, A. Teske, A., 2004. Archeal phylotypes in a metal-rich and low-activity deep subsurface sediment of the Peru Basin, ODP Leg 201, Site 1231. *Geobiology* 2, 151-161.
- Staley, J.T., 2002. A microbiological perspective of biodiversity. Staley, J.T., Reysenbach, A.L. (Eds.), *Biodiversity of microbial life*. Wiley-Liss, Inc., New York. pp. 3-23.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., Van De Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete *Nature* 400, 446 – 449.
- Suzuki, M. T., Giovannoni, S. J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied Environmental Microbiology* 62, 625–630.
- Tiedje, J. M., and J. L. Stein. 1999. Microbial diversity: strategies for its recovery. Demain A.L., Davies J.E. (Eds), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, D.C. USA. pp. 682-692.

- Todorov, J.R., Chistoserdov, A.Y., Aller, J.Y., 2000. Molecular analysis of microbial communities in mobile deltaic muds of Southeastern Papua New Guinea. *FEMS Microbiology Ecology* 33, 147-155.
- Vetriani, C., Jannasch, H.W., MacGregor, B.J., Stahl, D.A., Reysenbach, A.L., 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic *Archaea* in deep-sea sediments. *Applied Environmental Microbiology* 65, 4375-4384.
- Voordouw, G., Armstrong, S.M., Reimer, M.F., Fouts, B., Telang, A.J., Shen, Y., Gevertz, D., 1996. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 62, 1623-1629.
- Wade, T.L., Kennicutt, M.C., Brooks, J.M., 1989. Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities – III. Aromatic hydrocarbon concentration in organisms, sediments and water. *Marine Environmental Research* 27, 19-30.
- Watanabe, K., Kodama, Y., Kaku, N., 2002. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiology* 2, 23-32.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95 (12), 6578-6583.
- Wilson, H.H., 2004. Extensional evolution of the Gulf of Mexico basin and the deposition of tertiary evaporites. *Journal of Petroleum Geology* 27 (1) 105-109.
- Wirsen, C.O., Sievert, S.M., Cavanaugh, C.M., Molyneaux, S.J., Ahmad, A., Taylor, L.T., DeLong, E.F., Taylor, C.D., 2002. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 316–325
- Wise, M.G., McArthur, J.V., Shimkets, L.J., 1997. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Applied Environmental Microbiology* 1505-1514.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews* 51, 221–271.
- Woese, C.R., 2002. Perspective: Microbiology in transition. Staley, J.T., Reysenbach, A.L. (Eds.), *Biodiversity of microbial life*. Wiley-Liss, Inc., New York. pp. xxvii-xxxii.
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domains: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74, 5088–5090.
- 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 Science USA* 87, 4576–4579.

Yayanos, A.A., 2001. Deep-sea piezophilic bacteria. *Methods in Microbiology* 30, 616-637.

Yoshida, N., Takahashi, N., Hiraishi, A., 2005. Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin-dechlorinating microbial community by use of microcosm studies *Applied Environmental Microbiology* 71, 4325-4334.

Zhao, K., Lerche, I., 1993. Dynamical, thermal and hydrocarbon maturity impacts of emplaced salt sheets in sedimentary sequences. Mesozoic and early Cenozoic development of the Gulf of Mexico and Caribbean region. A context for hydrocarbon exploration. Pindell, J.L., Perkins, B.F. (Eds.), Society of Economic Paleontologists and Mineralogists Foundation. 13<sup>th</sup> Annual Research Conference. pp.123-133.

Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environmental Microbiology* 62, 316-22.

Zhou, J., Xia, B., Huang, H., Palumbo A.V., Tiedje, J.M., 2004. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Applied Environmental Microbiology* 70, 1723–1734.

## Apéndices

### Apéndice I

#### CONDICIONES DE PCR

a) Para amplificación del 16S ADNr:

	Para 50µL de reacción (µL)	Concentración Final
Buffer	5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	5.5	2.75 mM
dNTP 10 mM	1	0.20 mM
Oligos 10 µM	0.3	0.06 µM
Taq 5 U/µl	0.2	1U
DMSO	2.5	5%
H <sub>2</sub> O	34.5	
DNA	1	

Programa PCR	
94°	10 min.
92°	1 min.
55°	1 min.
72°	2 min.
72°	10 min.
4°	∞

} x35

b) Para secuenciación:

	Para 15µL de reacción (µL)
BDT	3
Oligo M13	1.3
H <sub>2</sub> O	6
DNA	4.7

Programa PCR	
95°	5 min.
95°	10 seg.
50°	5 seg.
60°	4 min
4°	∞

} x45



## ***Apéndice II***

### EXTRACCIÓN DE BANDAS DE GEL

(Tomado de la guía del kit)

*Qiaquick gel extraction kit*, marca Qiagen. Cat. No. 28706

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

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

### ***Apéndice III***

#### **CLONACIÓN**

(Tomado de la guía del kit)

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

##### *Preparación de la clonación*

1. Para muestras ambientales que han sido extraídas de gel, el producto se poliadenila nuevamente justo antes de clonar, en una reacción que contiene: 100 ng del producto, 1 unidad de taq, buffer 1X con 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 166 μM dATP de la siguiente forma:

De 100 a 200 ng del producto en 22 μl

3 μl buffer 10X con magnesio ya incluido

5 μl dATP a 1mM

0.2 μl Taq

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

2. Para empezar a clonar, tener listos:

Tubos estériles

Baño a 42 grados

2 Cajas con LB con 50 μg/ml ampicilina o 50 μg/ml kanamicina por cada vial de bacterias competentes

40 mg/ml de X gal en DMF

Incubadora a 37 grados

3. Antes de empezar el experimento:

Encender baño a 42° C

Calentar medio SOC a TA

Calentar cajas de LB a 37° C, durante 30 minutos

Después de los 30 minutos, esparcir 40 μl de X gal en cada caja; incubar a 37° C hasta que se usen. Descongelar en hielo un vial de bacterias por cada transformación.

##### *Para ligar el producto*

1. Hacer la mezcla siguiente:

Poner de 0.5 a 4 μl del producto de PCR a ligar (para productos ambientales se usaron 4 μl, unos 10-20 ng)

Agregar 1 μl de SALT SOLUTION

Añadir agua estéril para completar 5 μl

En estos 5 μl añadir 1 μl del vector TOPO

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

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

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

### *Transformación*

1. Añadir 2µl de la reacción de ligación en un vial de bacterias competentes. NO MEZCLAR PIPETEANDO.
2. Incubar en hielo de 5 a 30 minutos (para clonar PCRs grandes o mezclas de productos es mejor dejarlo 30 minutos).
3. Poner las bacterias a 42 °C durante 60 segundos para inducirles a “Heat-Shock”.
4. Transferir el tubo en hielo inmediatamente.
5. Añadir 250 µl de medio SOC a TA.
6. Tapar el tubo y agitarlo horizontalmente a 200 rpm a 37 °C durante una hora.
7. Sembrar de 10 a 50 µl de cada reacción de transformación en las cajas de medio precalentadas. Se recomienda sembrar dos volúmenes distintos de bacterias para asegurar una correcta cantidad de colonias. Para clonación de productos ambientales, sembrar 100 µl y 200 µl.
8. Una reacción de clonación eficiente producirá cientos de colonias. Elegir unas 10 blancas o azules claras para analizar. NO ELEGIR LAS COLONIAS AZUL OSCURO.

### *Selección de clonas positivas*

1. Con un palillo se tomó una pequeña muestra de la colonia y se resuspendió en 10 µl de agua limpia; se incubó a 96°C durante una hora en un tubo de PCR y se cargaron los 10 µl en un gel de agarosa al 1% para visualizar el tamaño de los plásmidos.
2. Las colonias con inserto fueron incubadas ON en LB con 50 µg/ml de kanamicina o ampicilina, y se congelaron en 1 ml de LB con glicerol al 15% (V/V).

## Apéndice IV

### EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

(Tomado de la guía del kit)

*Montage Plasmid Miniprep<sub>96</sub> Kit*, marca Millipore. Cat. No.

#### *Protocolo de lisado completo*

La optimización del kit se lleva a cabo con LB 2X:

Tristona	20g
Extracto de levadura	10g
NaCl	10g

1. En una placa de 96 pozos inocular las colonias obtenidas de *E.coli* en 1 mL de LB 2X con 50 µg/ml ampicilina o 50 µg/ml kanamicina (el opuesto al utilizado en la clonación), cubrir con las tapas (provisas ambas en el kit) e incubar a 37°C a 320 rpm durante 20-24 hrs.
2. Centrifugar las placas con pozos a 1500 x g durante 5-7 min. Inmediatamente después de la centrifugación decantar. Secar bien boca abajo en toallas de papel para evitar residuos de medio de cultivo.
3. Agregar 100 µL de solución 1 a cada pozo y resuspender bien (con agitador, vortex o pipeta).
4. Agregar 100 µL de solución 2 a cada pozo y mezclar fuertemente durante 1 min. Incubar a temperatura ambiente durante 2 min (no exceder los 5 min).
5. Agregar 100 µL de solución 3 a cada pozo y mezclar fuertemente durante 2 min. En este punto el lisado bacteriano se transfiere a la placa *de limpiado* (clearing plate).
6. Colocar la placa *de plásmido* (PLASMID plate) dentro del colector de vacío (manifold).
7. La placa de limpiado se coloca encima del colector de vacío y se ajusta la presión del vacío a 8 pulgadas de Hg.
8. Aplicar el vacío durante tres minutos o hasta que todo el lisado se haya filtrado a la placa de plásmido.
9. Colocar la placa de plásmido encima del colector (y opcionalmente alguna placa en el interior para recuperar el deshecho) y aplicar vacío a 24 pulgadas durante 5-7 min o hasta que los pozos estén vacíos. Descartar deshechos.
10. Agregar 200 µL de la solución 4 a cada pozo de la placa de plásmido y aplicar de nuevo vacío a 4 pulgadas durante 3-5 min o hasta que los pozos estén vacíos. Descartar deshechos.
11. Para recuperar los plásmidos agregar 50 µL de solución 5 a cada pozo de la placa de plásmidos y dejar en reposo 30 min.
12. Extraer pipeteando la solución de cada pozo y colocar en pozos correspondientes de una placa limpia (V-bottom plate) para almacenar. Sellar bien y almacenar en refrigerador. Se pueden mantener varias semanas.

Se puede realizar una electroforesis en un gel de agarosa de una muestra de cada plásmido para checar la correcta extracción, calidad y concentración de plásmidos.

## Apéndice V

### SECUENCIAS UTILIZADAS

Las secuencias que alinearon con las de este trabajo, su nombre, su número de acceso, la referencia y proveniencia de la secuencia. VH ventila hidrotermal, EF emanación fría de hidrocarburos (cold-seep), SM sedimento marino, SMP sedimento de mar profundo, SC sedimento costero, SAD sedimento de agua dulce, MDDP microcosmos declorado de dióxido policlorado, MF micronódulos ferromagnéticos, FAM formación acuática microbiana en cuevas, DLM depositos de lodo movibles, DP derrame de petróleo, SAM sedimento marino asociado a infiltraciones de gas metano, BM Bahía de Monterrey, DM deshechos de minas, SMA sedimento marino anóxico, SC sedimento saturado de cueva, CAPA columna de agua de la planicie abisal Porcupine, FI Fluidos incrustados

Nombre de la secuencia	No. acceso	Referencia	Proveniencia
Unidentified epsilon proteobacterium strain NKB10	<a href="#">AB013262</a>	Li,L. <i>et al.</i> , 1999a	VH, Nankai, Japón
Unidentified epsilon proteobacterium strain NKB12	<a href="#">AB013264</a>	Li,L. <i>et al.</i> , 1999a	VH, Nankai, Japón
Unidentified epsilon proteobacterium clone:JTB315	<a href="#">AB015258</a>	Li,L. <i>et al.</i> , 1999c	EF, Fosa de Japón
Unidentified bacterium 16S rRNA gene, strain BD3-7,	<a href="#">AB015549</a>	Li,L. <i>et al.</i> , 1999b	SMP, Japón
Unidentified bacterium strain BD7-2 ps	<a href="#">AB015578</a>	Li,L. <i>et al.</i> , 1999b	SMP, Japón
Unidentified epsilon proteobacterium strain BD7-6	<a href="#">AB015582</a>	Li,L. <i>et al.</i> , 1999b	SMP, Japón
Uncultured gamma proteobacterium clone: Y121	<a href="#">AB116496</a>	Asami,H. <i>et al.</i> , 2005	SC
Uncultured bacterium clone:TSBW08	<a href="#">AB187503</a>	Yoshida,N. <i>et al.</i> , 2005	MD
Uncultured Parvibaculum sp. clone: JT58-22	<a href="#">AB189345</a>	Li,L. <i>et al.</i> , 1999c	EF, Fosa de Japón
Uncultured bacterium SCALE-11	<a href="#">AF146263</a>	Bowman,J.P. <i>et al.</i> , 2000	SC anóxico, antártico
Uncultured hydrocarbon seep bacterium GCA025	<a href="#">AF154106</a>	O'Neill, <i>et al.</i> no publicado	EF, Golfo de México
Uncultured ferromanganous micronodule bacterium MND8	<a href="#">AF292999</a>	Stein,L.Y. <i>et al.</i> , 2001	MF y SAD, Green Bay
Unidentified bacterium wb1_A08	<a href="#">AF317741</a>	Holmes,A.J. <i>et al.</i> , 2001	FAM, Australia
Unidentified bacterium wb1_F07	<a href="#">AF317764</a>	Holmes,A.J. <i>et al.</i> , 2001	FAM, Australia
Unidentified bacterium wb1_F07	<a href="#">AF317764</a>	Holmes,A.J. <i>et al.</i> , 2001	FAM, Australia
Uncultured bacterium clone KS77	<a href="#">AF328213</a>	Madrid,V.M. <i>et al.</i> , 2001b	DLM, Guyana Francesa
Uncultured bacterium clone C12-10	<a href="#">AF332274</a>	Ogino,A. <i>et al.</i> , 2001	DP, Sakondani, Japan
Uncultured archaeon isolate Eel-36a2G10	<a href="#">AF354137</a>	Orphan,V.J. <i>et al.</i> , 2001	SAM, SMA, BM
Bdellovibrio sp. oral clone CA006	<a href="#">AF385539</a>	Paster,B.J. <i>et al.</i> , 2002	Lesión clínica normal
Uncultured proteobacterium isolate C1_B011	<a href="#">AF420362</a>	Teske,A. <i>et al.</i> , 2002	VH, Cuenca Guaymas
Uncultured gamma proteobacterium MERTZ_0CM_102	<a href="#">AF424138</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured alpha proteobacterium MERTZ_2CM_62	<a href="#">AF424272</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured alpha proteobacterium MERTZ_0CM_310	<a href="#">AF424286</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured green nonsulfur bacterium MERTZ_0CM_109	<a href="#">AF424390</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured actinobacterium MERTZ_21CM_395 ps	<a href="#">AF424432</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured planctomycete MERTZ_21CM_160	<a href="#">AF424489</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured planctomycete MERTZ_21CM_399	<a href="#">AF424502</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured crenarchaeote MERTZ_0CM_48	<a href="#">AF424521</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured alpha proteobacterium clone MERTZ_0CM_263	<a href="#">AF425762</a>	Bowman & McCuaig, 2003	SM, antártico
Uncultured epsilon proteobacterium clone R76-B76	<a href="#">AF449250</a>	Lopez-Garcia,P. <i>et al.</i> , 2002	VH
uncultured bacterium CH21 partial 16S rRNA gene	<a href="#">AJ271047</a>	Dalevi,D. <i>et al.</i> , 2001	Planta de tratamiento
Uncultured delta proteobacterium GR-296.I.93	<a href="#">AJ301565</a>	Selenska-Pobell,S. 2002	DM de uranio
Uncultured bacterium clone SHA-100	<a href="#">AJ306780</a>	Schloetelburg, no publicado	MDDP

Vibrio fortis strain LMG 21566	<a href="#">AJ514915</a>	Thompson, <i>et al.</i> no publicado	Ambiente marino
Uncultured epsilon proteobacterium Hyd01-01	<a href="#">AJ535216</a>	Knittel,K. <i>et al.</i> , 2003	SAM, Cascadia, Oregon
Uncultured bacterium partial clone Hyd24-12	<a href="#">AJ535232</a>	Knittel,K. <i>et al.</i> , 2003	SAM, Cascadia, Oregon
Uncultured delta proteobacterium clone Hyd89-22	<a href="#">AJ535247</a>	Knittel,K. <i>et al.</i> , 2003	SAM, Cascadia, Oregon
Uncultured delta proteobacterium clone Hyd89-40	<a href="#">AJ535251</a>	Knittel,K. <i>et al.</i> , 2003	SAM, Cascadia, Oregon
Uncultured alpha proteobacterium clone MBMPE39	<a href="#">AJ567553</a>	Xu,M.X. <i>et al.</i> no publicado	SMP
Uncultured alpha proteobacterium clone MBMPE43	<a href="#">AJ567557</a>	Xu,M.X. <i>et al.</i> no publicado	SMP
Uncultured delta proteobacterium partial clone MBMPE81	<a href="#">AJ567571</a>	Xu,M.X. <i>et al.</i> no publicado	SMP
Uncultured alpha proteobacterium clone MBAE3	<a href="#">AJ567572</a>	Xu,M.X. <i>et al.</i> no publicado	SMP
Uncultured alpha proteobact clone MBAE43	<a href="#">AJ567596</a>	Xu,M.X. <i>et al.</i> no publicado	SMP
Uncultured green non-sulfur bacterium MBAE74	<a href="#">AJ567614</a>	Xu,M.X. <i>et al.</i> no publicado	SMP
Uncultured delta proteobacterium clone E01-9C-23 ps	<a href="#">AJ581352</a>	Steffens,S. no publicado	Simbiontes de esponjas
Uncultured candidate division WS3 bacterium clone LD1-PA13	<a href="#">AY114311</a>	Freitag,T.E, 2003	SMA
Uncultured bacterium clone BB2_84	<a href="#">AY133365</a>	Powell,S.M. <i>et al.</i> , 2003	SC antártico, contaminado
Uncultured bacterium clone BB2_96	<a href="#">AY133375</a>	Powell,S.M. <i>et al.</i> , 2003	SC antártico, contaminado
Uncultured bacterium clone OB3_73	<a href="#">AY133431</a>	Powell,S.M. <i>et al.</i> , 2003	SC antártico, contaminado
Uncultured proteobacterium clone B03P029	<a href="#">AY197410</a>	Dhillon,A. <i>et al.</i> 2003	VH, Cuenca Guaymas
Uncultured Acidobacteria bacterium clone WCB116	<a href="#">AY217494</a>	Chelius & Moore no publicado	SC, Wind, Dakota Sur
Uncultured alpha proteobacterium clone WCPAP11	<a href="#">AY220715</a>	Gallagher,J.M. <i>et al.</i> , 2004	CAPA,Atlántico noreste
Uncultured bacterium clone CCU8	<a href="#">AY221083</a>	Fowler,R. <i>et al.</i> no publicado	SC, Mammoth, EUA
Uncultured alpha proteobacterium clone AT-s3-44	<a href="#">AY225603</a>	Lopez-Garcia,P. <i>et al.</i> , 2003	VH,Cordillera Atlántico
Uncultured Acidobacteriaceae bacterium clone AT-s3-24	<a href="#">AY225641</a>	Lopez-Garcia,P. <i>et al.</i> , 2003	VH,Cordillera Atlántico
Uncultured Acidobacteriaceae bacterium clone AT-s3-56	<a href="#">AY225651</a>	Lopez-Garcia,P. <i>et al.</i> , 2003	VH,Cordillera Atlántico
Bdellovibrio sp. MPA	<a href="#">AY294215</a>	Davidov & Jurkevitch, 2004	Cepa del MPA
Uncultured bacterium clone A101	<a href="#">AY373394</a>	Zeng,R. <i>et al.</i> , 2005	SMP, Pacífico
Uncultured bacterium clone A56	<a href="#">AY373412</a>	Zeng,R. <i>et al.</i> , 2005	SMP, Pacífico
Uncultured bacterium clone A56	<a href="#">AY373412</a>	Zeng,R. <i>et al.</i> , 2005	SMP, Pacífico
Uncultured bacterium clone B21	<a href="#">AY375070</a>	Zeng,R. <i>et al.</i> , 2005	SMP, Pacífico
Uncultured bacterium clone C10	<a href="#">AY375087</a>	Zeng,R. <i>et al.</i> , 2005	SMP, Pacífico
Uncultured delta proteobacterium clone Dover144	<a href="#">AY499730</a>	Bowman <i>et al.</i> no publicado	SM, Australia
Uncultured delta proteobacterium clone Dover441	<a href="#">AY499736</a>	Bowman <i>et al.</i> no publicado	SM, Australia
Uncultured delta proteobacterium clone Dover221	<a href="#">AY499739</a>	Bowman <i>et al.</i> no publicado	SM, Australia
Uncultured alpha proteobacterium clone Nubeena268	<a href="#">AY499896</a>	Bowman <i>et al.</i> no publicado	SM, Australia
Uncultured bacterium clone Nubeena35	<a href="#">AY500082</a>	Bowman <i>et al.</i> no publicado	SM, Australia
Uncultured bacterium clone Nubeena132	<a href="#">AY500087</a>	Bowman <i>et al.</i> no publicado	SM, Australia
Uncultured bacterium clone Nubeena348	<a href="#">AY500093</a>	Bowman <i>et al.</i> no publicado	SM, Australia
Uncultured Chloroflexi bacterium clone GoM HDB-07	<a href="#">AY542198</a>	Mills,H.J. <i>et al.</i> 2005	SAM, Golfo de México
Uncultured delta proteobacterium clone GoM HDB-32	<a href="#">AY542210</a>	Mills,H.J. <i>et al.</i> 2005	SAM, Golfo de México
Uncultured bacterium clone Kazan-1B-08/BC19-1B-08	<a href="#">AY592085</a>	Heijs,S. <i>et al.</i> no publicado	SM, Volcán Kazan, UE
Uncultured bacterium clone Napoli-1B-37	<a href="#">AY592592</a>	Heijs,S. <i>et al.</i> no publicado	SM, Volcán Kazan, UE
Uncultured bacterium clone Napoli-3B-04	<a href="#">AY592681</a>	Heijs,S. <i>et al.</i> no publicado	SM, Volcán Kazan, UE
Alteromonadaceae bacterium BA-3	<a href="#">AY643537</a>	Barash,Y. no publicado	Arrecife coralino
Delta proteobacterium 112	<a href="#">AY835388</a>	Vandieken, <i>et al.</i> no publicado	SM, Ártico
Uncultured archaeon clone CTD005-11A	<a href="#">AY856365</a>	Mehta,M.P <i>et al.</i> (in press)	SM, Seamont, Pacífico
Uncultured bacterium clone FS266-77B-03	<a href="#">AY869685</a>	Huber,J.A. <i>et al.</i> no publicado	FI, Cordillera Atlántico
Uncultured marine bacterium clone PB2.9	<a href="#">DQ071101</a>	Lau,W.W. <i>et al.</i> no publicado	Supf. Marina, EUA

## Abreviaturas

- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ADNr** Ácido desoxirribonucleico ribosomal
- ARNr** Ácido ribonucleico ribosomal
- AVHRR** Radiómetro avanzado de muy alta resolución (del inglés *Advanced Very High Resolution Radiometer*)
- BLAST** Herramienta básica de búsqueda de alineación local (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*)
- BSA** Albúmina Sérica Bovina (del inglés *Bovine Serum Albumine*)
- DGGE** Gel de electroforesis de gradiente desnaturalizante (del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)
- DMF** Dimetilformamida
- GM** Golfo de México
- LB** Medio de cultivo Luria (del inglés *Luria Broth*)
- OFOS** Sistema de observación del suelo oceánico (del inglés *Ocean Floor Observation System*)
- OTUs** Unidad Taxonómica Operativa (del inglés *Operational Taxonomic Unit*)
- pb** Pares de bases
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)
- pH** Potencial de Hidrógeno
- RAPDs** ADN polimórfico amplificado al azar (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*)
- RDB** Ribosomal Data Base Project
- rpm** Revoluciones por minuto
- T-RFLPs** Fragmentos finales y polimórficos por el tamaño de restricción (del inglés *Terminal Restriction Fragments Length Polimorfism*)
- TVG** Draga guiada por imagen de televisión (del inglés *TV-guided*)
- TV-MUC** Multinucleador guiado por imagen de televisión (del inglés *TV-multicorer*)
- u** Unidad