



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**“DIVERSIDAD DE BACTERIAS ACUÁTICA EN POZAS DE
SALINIDAD EXTREMA EN CUATRO CIÉNEGAS COAHUILA “**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

ANTONIO CRUZ PERALTA

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA MARIA DE
GUADALUPE SOUZA SALDIVAR**

MÉXICO, D. F.

ABRIL 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de Octubre de 2006, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** a el alumno **ANTONIO CRUZ PÉRALTA** con número de cuenta **89552818** con la tesis titulada **"Diversidad de bacterias acuáticas en pozas de salinidad extrema en Cuatro Ciénegas, Coahuila"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VALERIA FRANCISCA E.L.M. SOUZA SALDIVAR**:

Presidente: DR. HOMERO JULIO EUDES CAMPO ALVES
Vocal: DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
Secretario: DRA. VALERIA FRANCISCA E.L.M. SOUZA SALDIVAR
Suplente: DR. SAI VADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
Suplente: DR. ARTURO CARLOS II BÉCERRA BRACHO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo

Atentamente
"POR MI RAZA HABÍARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitario, D.F., a 10 de Diciembre de 2006.


Dr. José Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Excmo. ante del Interesado.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de estudiar.

Agradezco a LA BECA de CONACyT por apoyarme durante estos años de estudio, ¡gracias!

Agradezco a los miembros del jurado Dr. Julio Campo; Dra. Valeria Souza; Dra. Esperanza Martínez; Dr. Salvador Rodríguez y Dr. Arturo Becerra por su apoyo y sugerencias que dieron a la tesis.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Valeria Souza gracias por todo el apoyo y por su constante e invaluable apoyo. Además de contribuir a mi formación académica y a motivarme a seguir adelante.

Agradezco a los miembros del jurado Dr. Julio Campo; Dra. Esperanza Martínez; Dr. Salvador Rodríguez; Dr. Arturo Becerra y Dra. Valeria por su apoyo y sugerencias, por el detalle de revisión de tesis, con los cuales se dio una mejor presentación a este trabajo.

Dra. Esperanza Martínez por la paciencia de venir a los tutorales y dejando múltiples ocupaciones, pero lo más importante es la dedicación que le dio a la tesis.

Dr. Salvador Rodríguez gracias por dedicarle tiempo al proyecto de tesis y sobre todo las revisiones de la tesis.

Dr. Arturo Becerra le agradezco la gentileza que ha tenido al leer la tesis y dar sus aportaciones para ella.

Dr. Luis Eguiarte gracias por el apoyo que me ha brindado todos estos años en el laboratorio.

Dr. René Cerritos gracias por la paciencia que me has tenido durante todo el proyecto de tesis.

M en C. Morena gracias por el ayudarme a las secuencias.

M en C. Sandra te agradezco la tención que has tenido.

Dra. Ana Escalante gracias por dedicarme tiempo en la lectura de los geles.

M. en C. Eria gracias por tu apoyo.

A los compañeros de laboratorio: que me apoyaron en todo momento gracias, René, Morena, Laura, Sandra, Ana, Erika, Jaime, Ricardo, Alejandro, Marcos, Roberto, Eria, Karla, Alejandra, Celeste, Enrique, Germán, Esmeralda y la Sra. Silvia.

A mis amigos: Bety, Toño, Lupita, Juanita, Liliana, Víctor, Araceli, Armando, Belem, David, Leonel, Teresa, Dulce, Don Ricardo, Sra. Amelia, Polo, Gaby Carlos, Ana Velasco, Ricardo Baza (q.e.d.) y muchos más.

Dedico esta tesis a la persona que más quiero Ana Sofía mi hija. Mi bebé que ya juega y me divierte con sus travesuras las cuales me hace reír. Gracias Sofí

A mi esposa que me anima, me consuela, me motiva y esta en todo, gracias Sra. Ana Vázquez por todo tu apoyo y muestras de cariño que me das.

A mis padres por su incondicional apoyo y por estar presente en todos los momentos de mi vida, y recordarme lo valioso que es no dejar de perseguir los sueños hasta hacerlos realidad gracias mamá Lucila y Papá Faus.

A mis hermanas Martha, Julia y María.

A Mis Hermanos Higinio, Enrique, Javier y Faustino (q.e.d.)

A mis Cuñados Jorge, José Antonio, Abraham, Pepe, Dany y cuñada Lety.

A mi tío Abdón, mis primos, primas

A mis sobrinos: Dany, Viky, Israel, Tony , Lupita, Pepe Tony, Miguel, Christian, Paco, Lalo, Naomi, Paola, Paulina,

A mi nueva familia: Miguel, Mago, Rodriguito, y toda la banda de Oaxaca.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado tanto.

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice	1
Resumen	2
Abstract	3
I INTRODUCCION	4
a) Diversidad bacteriana	4
b) ¿Como se mide la diversidad?	6
c) Una forma inicial de estimar la diversidad microbiana: morfotipos	7
d) Diversidad taxonómica de una comunidad microbiana: 16S rRNA	8
e) Otros métodos moleculares	11
II OBJETIVOS GENERALES	12
III OBJETIVOS PARTICULARES	12
IV HIPOTESIS	12
V MATERIAL Y METODO	13
a) Localización del lugar de trabajo	13
b) Sitio de colecta	14
c) Colecta de muestra	16
d) Método de sembrado	17
e) Extracción de DNA	17
f) PCR – REPs	18
g) Secuenciación del 16S rDNA	19
VI RESULTADOS	20
a) Morfología y textura de colonias bacterianas	20
b) Descripción de pozas	21
c) Bioquímica de bacterias	23
d) Análisis de los patrones de banda	24
e) Resultado de lecturas de corridas	25
(Dendograma de similitud)	25A
f) Resultado de secuenciación	26
VII) Discusión	29
VIII) Conclusiones	31
IX) Perspectivas	32
Bibliografía	33
Anexo 1 Medios de cultivo	36
Anexo 2 Secuencias	38
Anexo 3 Resultados de bacterias y azucares	40

Resumen

Los microorganismos que toleran o que necesitan altas concentraciones salinas se llaman halo-tolerantes y halófitos respectivamente. En estos sitios extremos la diversidad de especies suele ser baja ya que son ecosistemas estables, por lo que las adaptaciones al estrés fisicoquímico imperante son prioritarias y dejan poco espacio para la diversidad. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad bacteriana cultivable en 10 pozas de desecación con alta salinidad (1.3 Mol/L K, 1-23 mMol/L Ca, 3.4 Mol/L, 4-6.4 g/L HCO₃, 0.4-1.3 g/L Cl, 0.2-6 g/L SO₄) en el valle de cuatro Ciénegas, Coahuila, un lugar rico en sales de sulfato y calcio. La caracterización de la microbiota cultivable, se hizo utilizando morfotipos, REP-PCR y secuencias del 16s DNA. En el sistema de Río Mezquites se encontró una gran diversidad de morfotipos de cada una de las pozas de desecación. Esto a pesar de que los parámetros ambientales medidos (temperatura y pH) son los mismos entre pozas. Estos morfotipos fueron catalogados de acuerdo a su color, forma y textura de cada una de las colonias cultivables para después ser aisladas, secuenciadas y almacenadas. A cada morfotipo se realizaron análisis bioquímicos a cada uno de los morfotipos para determinar sus capacidades metabólicas, encontrando que estas bacterias heterótrofas tienen un amplio rango de crecimiento en medios con diferentes azúcares salvo en medios de cultivo con tendencias ácidas (azúcares y pH). El análisis de variabilidad genética usando los marcadores REP-PCR presentó una gran variedad de bandas únicas (alelos) por lo que deducimos que en la comunidad hay una gran variedad genética entre las cepas de bacterias aisladas, las cuales aunque provienen de una sola poza se distribuyen en un amplio árbol filogenético. Esta diversidad fue confirmada con las secuencias del 16S rRNA donde con una secuencia parcial de 500 pb se pueden detectar 11 diferentes géneros dentro de los cuales predominan los géneros *Bacillus*, *Halomonas* y las *Pseudovibrio*.

ABSTRACT

The microorganisms that tolerate or need high saline concentrations to grow are called halo-tolerant and halophiles respectively. In these extreme conditions the diversity of species is usually low because of the physiological stress. The objective of this work was to determine the diversity of cultivable bacteria in ten hyper-saline desiccation ponds (1,3 Mol/L K, 1-23 mMol/L Ca, 3,4 Mol/L, 4-6,4 g/L HCO₃, 0.4-1.3 g/L CL, 0,2-6 g/L SO₄) in the valley of Cuatrociénegas, Coahuila, a place rich in sulphate salts and calcium. The characterization of cultivable microbiota, was done by determining morphotypes, REP-PCR and sequences of 16s rDNA. In the zone of the system of Mezquites River we found a high diversity of morphotypes. These morphotypes were different in each of the ponds even though the environmental parameters (temperature and pH) were the same in all the ponds. These morphotypes were catalogued according to the color, form and texture. We performed the biochemical analysis of each morphotype in order to determine their metabolic capacities. All the heterotrophic bacteria analyzed showed a wide range of sugar assimilation except for the acid cultures. The analysis of genetic variability using REP-PCR displayed a great variety of unique bands (alleles) that show a high genetic diversity within each community reflected in the phylogenetic tree. This genetic diversity was confirmed with the 16S rRNA sequences where we determined 11 different genera such as *Bacillus*, *Halomonas* and *Pseudovibrio*

INTRODUCCIÓN

A) Diversidad bacteriana

El árbol filogenético de bacterias contiene alrededor de 20 phyla de representantes cultivables y otros 30 phyla que se sabe que existen pero aún no han sido cultivados. Las especies de bacterias muestran una gran diversidad en términos de morfología e historias evolutivas. Al menos se conocen 17 linajes principales de bacterias que derivan de estudios de cultivos de laboratorio y otros muchos han sido identificados al secuenciar genes de rRNA de bacterias en hábitats naturales. (Curtis y William, 2004, Madigan M. y Parker. 2003). La mayor cantidad que se conoce en la actualidad ha sido sobre diversidad en el mar (Venter et al 2004)

En general se sabe que las comunidades biológicas pueden contener pocas especies con muchos individuos (praderas) o numerosas especies con pocos individuos (selvas). Las comunidades que tienen una estructura compleja, rica en información, como lo refleja la alta riqueza de especies (número de especies diferentes), necesita una cantidad de energía mayor que aquéllas que son simples (Madigan y Parker, 2003). Esto determina que un sitio tendrá una tasa menor de producción primaria “en pie” (fotosíntesis por plantas) por unidad de biomasa mientras se mantenga un nivel de diversidad estable. Esta relación inversa entre la diversidad y la productividad es especialmente pronunciada cuando los cambios ambientales favorecen el crecimiento rápido de los microorganismos y el desarrollo de las comunidades microbianas complejas. Esto se debe a que las bacterias y archaeas regulan los ciclos biogeoquímicos, en particular el del carbono y nitrógeno que regulan la productividad de los ecosistemas. Con las técnicas de biología molecular podemos saber quiénes son los actores más importantes de esta productividad dentro de la microbiota, sin embargo no es fácil ni barato.

Los ambientes acuáticos continentales y marinos difieren considerablemente entre sí en sus propiedades fisicoquímicas y no es sorprendente que también sean distintas en la composición de especies microbianas que viven en ellas. Los organismos fototróficos predominan en la mayoría de ambientes acuáticos someros. En general en las zonas óxicas, las cianobacterias, las bacterias fermentadoras y heterótrofas. Son las más abundantes, mientras que en zonas anóxicas dominan las bacterias fototróficas no dependientes del oxígeno, las heterótrofas y litotróficas. Como es de esperarse, la actividad microbiológica de un ecosistema acuático depende de la productividad primaria que lleva acabo a los organismos fototróficos. Los fototróficos oxigénicos al fijar el CO₂ producen nuevo material orgánico, así como oxígeno. Algunas cianobacterias son también capaces de fijar nitrógeno atmosférico. (Falcón et al., 2005). Los microorganismos de los sistemas acuáticos tienen en común que pueden crecer en bajas concentraciones de nutrientes, en general son móviles por lo que tienen flagelo u otro mecanismo de desplazamiento.

Por otro lado, los humedales costeros son ambientes acuáticos particularmente interesantes ya que tienen poca profundidad y gradiente de nutrientes, oxígeno y sales y es por ésta razón que en ellos predominan plantas halotolerantes que a su vez sirven de resguardo para muchos organismos tanto macroscópico como microscópicos (Wetzel y Likens, 1991). Los microorganismos que toleran o que necesitan altas concentraciones salinas se llaman halo- tolerantes y halofitos respectivamente, a concentraciones elevadas de sal el ambiente hipertónico deshidrata los microorganismos halo-tolerantes, y además de afectar la presión osmótica, la concentración de sal suele desnaturalizar las proteínas. Estos organismos suelen excluir de sus células las altas y relativamente tóxicas y principalmente concentraciones de sodio en el caso del ambiente marino (Litchfield C. D., 1998). En estos sitios extremos la diversidad de especies suele ser baja ya que en estos ecosistemas controlados físicamente, las adaptaciones al estrés fisicoquímico imperante son prioritarias y dejan poco espacio para la diversidad. (Litchfield C. D., 1998)

b) ¿Cómo se mide la diversidad?

Existen tres niveles generales de diversidad biológica en los ecosistemas

- a) La genética, que es la variabilidad intra – poblacional.
- b) La de especie, que es la riqueza o variedad de éstas en un ambiente dado.
- c) La de la comunidad, que se refiere a la riqueza de especies que comparten un sitio.

Algunos índices estadísticos describen la riqueza y la distribución de especies en la comunidad; estos son los índices de diversidad de especie y se utilizan para describir el conjunto de las poblaciones de una comunidad, estas son técnicas estadísticas muy bien establecidas para el estudio de la ecología de microorganismos, sin embargo raramente se han aplicado a las comunidades microbianas debido a la dificultades técnicas actuales para clasificar y contar los microorganismos individuales (Atlas y Bartha, 1984). Los dos principales componentes de la diversidad de las especies son la riqueza de especies o variedad, y la uniformidad, o equitabilidad. La riqueza de especies puede expresarse mediante relaciones simples entre el número total de especies y el número total de organismos. La equitabilidad es una medida de proporción de individuos dentro de cada especie e indica si existe poblaciones dominantes (Curtis y William, 2004). Una medida de diversidad muy utilizada es el índice de diversidad de Shannon - Weaver (Shannon – Weaver, 1963), también conocido como índice de Shannon, este índice general de biodiversidad es sensible a la riqueza y a la abundancia relativa de especies. (Taylor, L. R. Kemptom, R. A. y Woiwod, I. P. 1976)

Tabla.1 Ejemplos de índice de diversidad de especies.

Índices	Formula	Variabes
Riqueza de especies (d)	$D = \frac{s-1}{\text{Log N}}$	S = Número de especies N = Número de individuos
Diversidad de Shannon – weaver (H)	$H = \frac{C}{N} \quad C = -\sum (N_i \log N_i)$	C = 2,3 N= Número de individuos de la especie i
Uniformidad (e)	$e = \frac{H}{\log S}$	H= Diversidad de Sannon – Weaver S= Número de especies.
Equitabilidad (J)	$J = \frac{H}{H_{\max}}$	H = Diversidad de Sannon – Weaver Hmax = Valor máximo teórico de índice de diversidad de Sannon – Weaver para la población estudiada, suponiendo que cada especie tenga solamente un miembro.

c) Una forma inicial de estimar la diversidad microbiana: *Morfotipos*

Para conocer mejor las características de un microorganismo, es decir, su fisiología metabólica así como su taxonomía, es necesario estudiarlos en un medio puro y cultivarlos con la cantidad de nutrientes necesarios, debido a que diferentes grupos bacterianos tienen diferentes requerimientos de crecimiento, como azúcares, fuente de nitrógeno, minerales (Cerritos, et al. 2008). La morfología de una colonia puede tener importancia taxonómica en un medio específico, y esta característica es dada por su borde y forma de elevarse sobre el medio de cultivo. El borde puede ser liso (redondeado u ovalado) o irregular (aserrado, lobulado o espiculado). (Ramirez-Gama, et al. 2003). Si pudiésemos hacer un corte en un plano perpendicular a la base de la colonia podríamos encontrar las siguientes posibilidades: morfología, superficie, consistencia, pigmentación, hemólisis y olor.

Morfología: La colonia está dada por su borde o forma, el borde puede ser liso (redondeado u ovalado); irregular (aserrado, lobulado o encrespado).

Superficie: La colonia examinada mediante la luz reflejada puede mostrar un aspecto liso y brillante a la luz y por el contrario, una textura rugosa y sin brillo.

Consistencia: La colonia bacteriana puede tener una consistencia variable de seca y frágil, grasienta, cremosa o viscosa y pegajosa. Esta característica sólo se aprecia cuando tocamos con el asa de siembra.

Pigmentación: Esta característica sólo de unas pocas especies bacterianas. La pigmentación se observa en colonias, y nunca en células individuales por ejemplo. Dentro de las bacterias patógenas, una de las formas pigmentadas más importantes el *Staphylococcus aureus* en su color amarillo dorado; en *Pseudomonas aeruginosa* es un pigmento verdoso.

Hemólisis: Algunas bacterias, fundamentalmente los cocos, pueden ser capaces de hemolizar los glóbulos rojos de un medio nutritivo sólido como agar sangre, debido a la liberación de unas sustancias denominadas hemolisinas. La hemólisis intensa se denomina β - beta hemólisis; la hemólisis parcial se conoce como α - alfa hemólisis y la ausencia de ésta se define ω - gamma.

Olor: cierto tipo de bacteria descompone sustratos para su metabolismo desprendiendo sustancias volátiles que proporcionan un olor característico en los cultivos puros de dichas bacterias. (Wimpenny Julian 1999)

Biotipo: en contraste con los organismos eucariontes, las bacterias exhiben una gran variedad de tipos metabólicos dentro de un grupo de bacterias se han utilizados tradicionalmente para definir su taxonomía, pero estos rasgos no corresponden a menudo con las clasificaciones genéticas modernas. El metabolismo bacteriano se clasifica en base a tres criterios importantes: el origen del carbono, la fuente de energía y los donadores de energía, sin embargo la mayoría de las bacterias no se pueden cultivar debido a que sus requerimientos nutricionales son desconocidos, es por eso que la diversidad genética de una comunidad microbiana puede evaluarse midiendo la heterogeneidad del DNA de toda la comunidad microbiana. (Wimpenny Julian 1999)

d) Diversidad taxonómica de una comunidad microbiana: 16S rRNA

Todos los seres vivos cambian su DNA con el tiempo debido a la mutación. Por ello sus genes se pueden considerar como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Suponiendo que los cambios que se producen se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal,

las diferencias en las secuencias de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan las distancias evolutivas existentes entre ellas. Esta idea, introducida por Zuckerkandl y Pauling, se ha venido utilizando durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación. (Mendoza y Rodicio, 2004)

El RNA ribosómico (rRNA) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970 (Mendoza y Rodicio, 2004). Los estudios de Woese originaron la división de los procariontas en dos grupos o reinos, *Eubacterias* y *Archaeobacterias*, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariontas. Además permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos. Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariontas. Desde entonces el análisis de los rRNA 16S se han utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procarionte, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana. (Mendoza y Rodicio, 2004)

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al rRNA 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todos los seres vivos.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado debido a lo restringida que está su estructura para poderse llevar a cabo la síntesis de proteínas.
3. En algunas partes de la molécula del ribosoma los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los

procariontes, y otras regiones son suficientemente variables para aportar datos a escalas más recientes, que separan inclusive especies dentro de un género, por lo que la misma molécula funciona a lo largo de toda la escala evolutiva.

4. El tamaño relativamente largo de los RNAr 16S (1,500 pb) minimiza las fluctuaciones estadísticas
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar lo que a su importancia taxonómica, existen base de datos amplias y en continuo crecimiento.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluyen tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos, y c) análisis de la secuencia (Rodicio y Mendoza. 2004).

La amplificación del ADNr 16S se consigue en un termociclador, gracias a la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro o de ADN ambiental. Para la extracción del ADN existen protocolos generales, pero pueden requerirse modificaciones, dependiendo de la bacteria. La disponibilidad de secuenciadores automáticos facilita enormemente la etapa de detención.

La última etapa será la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas, en la base de datos. Actualmente existen distintas bases de datos, algunas publicas cuyo acceso es libre a través de internet, como el Gen Bank NCBI (National Center for Biotechnology Laboratory), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), y Otras privadas como MicroSeq (Applied Biosystem) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System).

e) Otros métodos moleculares

Muyzer et al (1993) describieron un método molecular diferente para analizar la diversidad genética de las poblaciones microbianas complejas. Utilizan la electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (**DGGE**, denaturing gradient gel electrophoresis) para separar los fragmentos de los genes que codifican el rARN 16s y que han sido amplificados mediante PCR. Este enfoque ayuda a comprender la diversidad genética de las poblaciones microbianas no caracterizadas ya que pueden cortar la banda del gen y secuenciar o simplemente describir la cantidad de bandas y sus diferencias con otras comunidades.

Otra manera de evaluar la diversidad microbiana en las comunidades incluye un análisis de los perfiles de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (análisis FAME, fatty acid methyl ester), que indica la presencia de poblaciones microbianas específicas. Los análisis **FAME** se utilizan para identificar microorganismos aislados del ambiente. Ka et al. (1994) emplearon esta técnica para estudiar la diversidad de las poblaciones bacterianas degradadoras de ácido 2, 4 –diclorofenoxiacético (2,4 –D) en cultivos experimentales.

REP-PCR. Ka et al (1994) también evaluaron la diversidad basándose en los patrones obtenidos mediante la amplificación por PCR de secuencias polindrónicas extragénicas repetitivas (motivos repetitivos que no interrumpen genes) y que son característicos de cada genoma. (Cerritos et al. 2008)

OBJETIVOS GENERALES

Determinar la diversidad de bacterias cultivables en 10 pozas de desecación de diferente tamaño con salinidad extrema en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la diversidad bacteriana cultivable a diferentes niveles de resolución utilizando morfotipos, REP-PCR y secuencias del 16s DNA.

HIPOTESIS

H₀. Hay poca diversidad dado la condición extrema de cada poza y no hay organismos únicos en cada poza debido a que hay mucha migración y recolonización por agua y por viento (es lo que se ha observado en salinas del mundo).

H₁. Podemos encontrar organismos similares en las pozas cercanas y serán cada vez más distintas a medida que nos alejamos de las que están agrupadas. El río tendrá cosas muy diferentes por sus condiciones ambientales y su naturaleza dinámica.

H₂. Debido a la historia particular de cada sitio, cada poza tiene organismos únicos, incrementando esto la diversidad total del sitio.

V MATERIAL Y METODO

a) Localización del lugar de trabajo

El valle de Cuatro Ciénegas, es la parte central de Coahuila y en esta zona de México se cuenta con más especies endémicas de cualquier otro lugar en Norteamérica (Stein et al. 2000), por lo que el 7 de noviembre de 1994 fue declarada área natural protegida en la categoría de área de protección de flora y fauna (Espinosa, 2005). Esta es una área semidesértica rodeada por altas montañas. La sierra madre oriental atraviesa el estado de Coahuila de norte a sur con una sucesión de relieves calcáreos cuya máxima altura esta comprendida entre 2000 y 3000 metros; las incisiones de las cuencas fluviales han sido en parte colmadas en dispositivos efluviolacustre que hoy forman llanos entre montañas más o menos extensos. (Giovanno Badino et al. 2004)

Cuatro Ciénegas se encuentra a lo largo del paralelo 27° N, situada a una altitud de alrededor de 700 m, sobre una superficie de 840 km². La precipitación de la zona se ha estimado en promedio de 260mm/año, con una temperatura media de 21.2° C y de este dato podemos estimar que la media a 1500 m. de altura sea 16 ° C y a 2000m. de 13 °C (Giovanno Badino et al. 2004). Su clima es muy seco, semicálido, con pocas lluvias en verano y ocasionalmente algunas en invierno. Se caracteriza por la gran diversidad de ambientes acuáticos, entre los que destacan los humedales tipo pantano, incluyen también complejos sistemas de corrientes subterráneas, manantiales, canales, ríos, lagos y estanques temporales. Algunos manantiales son termales (30 - 35 °C) y su temperatura disminuye corriente abajo, lo cual puede deberse a un enfriamiento del agua a lo largo del curso o bien a que existen diferentes fuentes de abastecimiento de agua. Las aguas en general son duras, ya que contienen gran cantidad de sales de calcio y magnesio con sodio, potasio, sulfatos, carbonatos y cloruros. La dureza de las aguas se incrementa a partir de los manantiales hasta los ríos y las lagunas de desecación donde la salinidad es de niveles de saturación. El pH cambia de manera paralela, y varia de neutro (7.0- 7.2) en los manantiales hasta bastante básico (8.0 – 9.7) en los lagos terminales en fase de desecación (Eric C. y Marks, 2006).

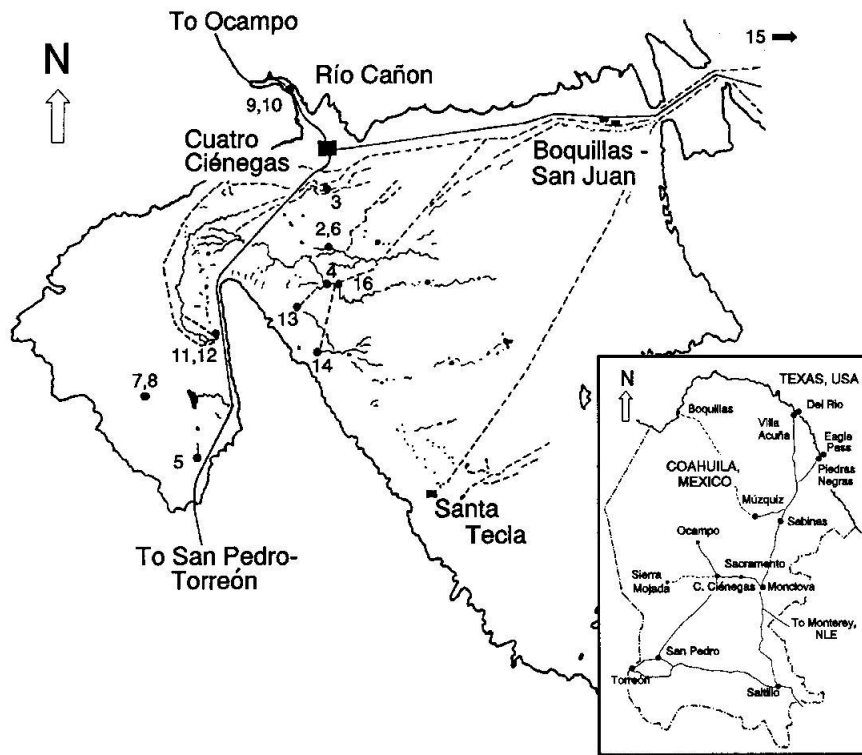


Figure 1. Sketch map of the Cuatro Ciénegas basin, central Coahuila, México, outlined by an approximate 800-m contour, and with some place names and the photographic sites (Figures 2-16 [dots]; the locale for Figure 15 is eastward, off the map). The inset of the Mexican State of Coahuila shows location of the town of Cuatro Ciénegas and additional place names.

Figura 1. Mapa del valle de cuatro Ciénegas tomada de <http://www.mapasmexico.net./goglemaps-resrva-cuatro-ciénegas.htm>. En el número 4 están localizadas aproximadamente las pozas de estudio.

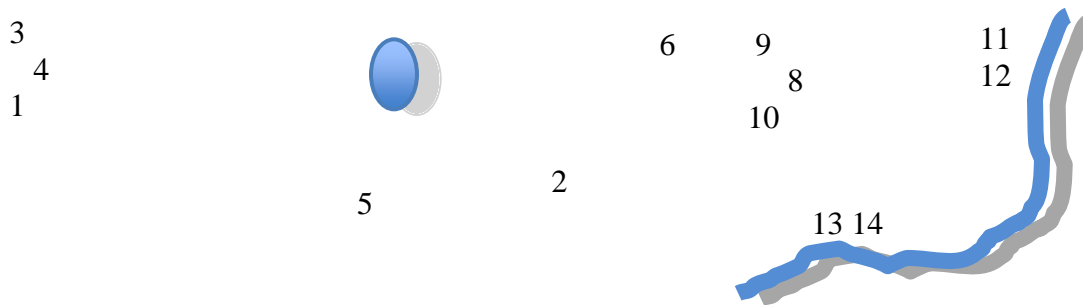
b) Sitio de colecta

Las pozas de desecación son muy fluctuantes estacionalmente y se encuentran en los alrededores del Río Mezquites. Las pozas fueron medidas en su diámetro desde 2 ejes, geo-localizada y mapeada en relación a cada una de ellas; cada una se fotografió y se describió de forma general (color).

Tabla 2. Matriz de distancias entre las pozas (km)

POZA	S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.000														
2	4.691	0.000													
3	0.110	4.606	0.000												
4	0.110	4.606	0.000	0.000											
5	3.450	1.270	3.370	3.370	0.000										
6	6.840	2.163	6.751	6.751	3.433	0.000									
7	3.455	1.238	3.371	3.371	0.178	3.398	0.000								
8	7.397	2.718	7.309	7.309	3.986	0.558	3.954	0.000							
9	7.397	2.718	7.309	7.309	3.986	0.558	3.954	0.000	0.000						
10	7.397	2.718	7.309	7.309	3.986	0.558	3.954	0.000	0.000	0.000					
11	7.979	3.307	7.889	7.889	4.576	1.143	4.541	0.593	0.593	0.593	0.000				
12	7.978	3.307	7.888	7.888	4.577	1.144	4.541	0.595	0.595	0.595	0.013	0.000			
13	7.143	2.459	7.060	7.060	3.697	0.616	3.689	0.604	0.604	0.604	1.080	1.087	0.000		
14	7.143	2.459	7.060	7.060	3.697	0.616	3.689	0.604	0.604	0.604	1.080	1.087	0.000	0.000	

Figura 2. Localización del muestreo de pozas de desecación en Río Mezquites con la posición relativa de las pozas en el área de estudio.



c) Colecta de muestras

En el sitio de colecta se tomaron 1 ml. de varios puntos de cada una de las pozas (por lo menos 5 puntos) se midió la temperatura y su pH. En la tabla 3 se describe a cada una de las pozas.

Tabla 3. Descripción de las pozas de desecación de Cuatro Ciénegas.

Poza	T °C	Largo	Ancho	Área	Color del agua	pH	W	N
1	23	2.53	0.73	1,25	Naranja con hojarasca	9	102°06' 344	26° 55' 174''
2	22	5.15	1.50	6,06	Amarillo oscuro	8	102°06' 193''	26°55' 097''
3	23	3.10	91	2,21	Casi rojo	7	102°06' 341''	26°55' 183''
4	23	3.85	81	2,44	Naranja en la orilla y claro en el centro	8	102°06' 341''	26°55' 183''
5	25	4.0	2.60	8,16	Rojo y verde costra de sal Pe.	9	102°06' 234''	26°55' 082''
6	30	0.69	0.38	0,20	Agua oscura	10	102°06' 123''	26°55' 108''
7	23	25	25	525	Claro y color del lado gris	8	102°06'592 ''	26°55' 037''
8	30	0.52	0.18	0,07	Oscuro y verdoso	8	102°06' 105''	26°55' 101''
9	33	0.32	1.95	0,49	Oscuro y verdoso	8	102°06' 105''	26°55' 101''
10	33	3.0	1.40	6,59	Oscuro y verdoso	8	102°06' 105''	26°55' 101''
11	26	3.70	90	2,16	Verde clara	8	102°06' 086''	26°55' 114''
12	31	0.48	0.47	0,17 7	Verde oscura	8	102°06' 086''	26°55' 116''
13	30	40	6	ND	Río azul claro	8	102°06' 115''	26°55' 021''
14	30	40	6	ND	Río azul claro	8	102°06' 115''	26°55' 021''

Las 5 muestras de cada poza fueron guardadas en un solo tubo estéril y mezclado con vigor para tener una buena representación de cada sitio en esta muestra compuesta. Se etiquetó y se mantuvieron en frío hasta ser sembradas in situ.

d) Método de sembrado

Se tomaron 100µl de cada tubo de muestra compuesta para cada poza, y se sembraron en una caja con medio de cultivo de agar marino. Se esparció la muestra con perlas de vidrio estériles. Se dejaron las cajas a cultivar en temperatura ambiente (35 – 38 °C aproximadamente) hasta observar crecimiento. Al llegar a la ciudad de México y en condiciones del laboratorio en CU se procedió al conteo de colonias, a su separación según el morfotipo y a su propagación o si fuera el caso aislamiento en una campana de flujo laminar y con un mechero encendido, utilizando nuevamente medio marino. Se aislaron las cepas puras hasta tener una por caja.

Para el aislamiento usualmente usamos el método de siembra por estría. Se toma una muestra de la colonia y se realiza una estría recta, a este inóculo se le da forma de un triángulo para obtener mayor masa bacteriana y se incuba a 37 °C. por dos días. La bacteria fue nombrada con la clave correspondiente: 1 1m1 que quiere decir de qué poza es y qué morfo es. Este procedimiento se realizó con cada una de las muestras obtenidas. Con este aislamiento y propagación es necesario almacenar los cultivos en medio UL (ver Anexo) a menos -80 C. De esta manera se tiene almacenado y cuando se le requiera para hacer un nuevo experimento lo podemos usar las veces que sea necesario sin que exista un cambio en la morfología inicial.

e) Extracción de DNA

Para la extracción de DNA genómico se tomó del cultivo puro de cada cepa previamente caracterizada morfológicamente utilizando el Kit DNeasy Tissue (250) cat No. 69506, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Guardó el DNA a -20 °C.

f) PCR-REPs

La caracterización genómica es muy importante para el estudio ecológico microbiano. La clasificación, identificación y diferenciación de los microorganismos está basada en las pruebas de caracterización fenotípicas. El DNA sea llevado a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en el fingerprinting emerge en que es una alternativa simple que caracteriza y diferencia a los microorganismos (Rademarker y Vinuesa et al. 2005). REPs – PCR fingerprinting basado en secuencias repetidas REP – PCR usando como primer complementarios de DNA que ocurre naturalmente de secuencias de DNA repetidas dispersas en el genoma bacteriano. La técnica para realizar este PCR es un poco diferente a los protocolos normales, sobre todo por que se necesita mayores cantidades de primer y de DNA. Las cantidades por reacción de 25µl fueron:

Agua pura 10.4µl.

PCR buffer 5µl.

Cloruro de magnesio 5.2µl.

DMSO 2.5µl.

dntps 2.5µl.

Box 0.5µl.

Taq poli 0.2µl.

DNA 1µl.

En este caso de PCR solo se usara un primer ya sea el BOX (5`CTACGGCAAGGCGACGCTGAC/C-3`) o el GST y los parámetros son las siguientes:

95 °C -2 minutos (1 ciclo)

93 °C – segundo (30 ciclos) desnaturalización

50 °C- 1 minutos (30 ciclos) alineación

65 °C – 8 minutos (30 ciclos) extensión

65 °C – 8 minutos (1 ciclo)

Todos los pasos previos al PCR se deben realizar en la campana con guantes y con material libre de DNA para evitar una posible contaminación.

Para observar las bandas resultantes de las amplificaciones del REPs-PCR se utilizó de una cámara de electroforesis de aproximadamente 20cm. de largo, debido a que las bandas de la amplificación son muy grandes y necesitan de mucho espacio para separarse. Los PCR se corren en un gel de agarosa al 2% con de buffer TAE (0.5x) con un tiempo de corrida de 3 hrs. a un voltaje de 180V. Para que se hagan evidentes las bandas ante la luz (UV) ultravioleta se necesita Bromuro de Etidio el cual se colocó en el buffer de corrida (80 µl/L). El Bromuro se pone en el buffer durante 10 a 15 minutos para que se tiña, después se enjuaga el gel con agua de la llave se coloca en una cámara de luz ultravioleta. A continuación se toma la foto de las bandas para después analizar los resultados. La corrida se efectúa adentro de un refrigerador de menos 4°C. para evitar que se caliente.

g) Secuenciación del 16S rDNA

La amplificación se llevó con los primers (1492R y 27F) y un PCR con las condiciones que se muestran a continuación:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	3`	1
94	1`	30
52	1´	30
72	1.20`	30
72	3`	1

Para la secuenciación se utilizó el primer 1492R y se llevó de la siguiente manera.

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
95	5`	1
95	10`	45
50	10`	45
60	4`	45

Se obtuvieron secuencias de aproximadamente 650 pb que fueron analizada en la computadora con las secuencias del Genbank en la base de datos.

VI RESULTADOS

a) Morfología y textura de colonias bacterianas

Las muestras ya crecidas se procedió a su taxonomía la cual consistió en observar su forma, color y textura de cada colonia. Además se le dio un nombre y número para su almacenamiento y así poderlas utilizar cuando se requiera.

Tabla 4. Características de las colonias cultivables que se aislaron en el sistema Mezquites de Cuatro Ciénegas.

P	N	T	G	O	Dc	Ci	De	Lo	Fu	Pu	Be	Co	Cr	Na	b	Tr	Am	R	Ca
1	38	23	1	6	7	23	1	1	0	0	16	0	1	2	1	0	16	0	1
2	15	22	5	0	0	3	2	10	0	0	13	0	0	0	0	1	1	0	0
3	12	23	7	0	0	5	4	1	2	0	5	2	1	2	2	0	0	0	0
4	27	23	7	25	0	0	0	1	1	0	24	0	0	2	1	0	0	0	0
5	66	25	8	0	0	8	27	2	2	26	16	0	1	0	5	0	17	6	18
6	23	23	9	0	0	13	7	3	0	0	4	3	1	1	5	0	1	5	0
7	15	23	5	0	0	12	2	0	1	0	1	0	1	12	1	0	0	0	0
8	17	30	9	0	2	11	3	1	2	0	3	0	2	4	0	0	0	7	0
9	22	33	1	0	1	7	9	9	0	0	9	0	0	3	6	0	0	3	0
10	21	33	8	0	0	1	1	1	6	0	4	0	0	1	9	0	0	8	0
11	15	26	7	2	0	0	0	0	0	0	9	3	0	0	1	0	0	1	0
12	23	31	1	0	17	0	0	0	0	0	7	8	0	2	0	0	0	0	5
13	34	30	1	0	2	0	0	0	0	0	17	3	3	1	4	0	0	0	4
14	20	30	9	0	0	0	0	0	2	0	9	0	0	3	1	0	0	0	7

P= poza, N= número de colonias; G= genotipos (morfología de colonias); A= ancho; L= largo; M= metros; O= ondulada; Dc= doble circular; Ci= circular; De= dentada; Lo= lobular; Fu= fusiforme; Pu= puntiforme; Be= beige; Co= café oscuro; Cr= crema; Na= naranja; B= blanca; Tr= translúcida o transparente; Am= amarilla; R= rojo y Ca= café. En promedio hay 24.8 (+/-13.93) cepas muestreadas por sitio con un promedio de 8 morfós por sitios (+/-2.7). Existiendo morfós predominantes en unos sitios que no están presentes en otros por ejemplo el puntiforme que se encuentra solo en la poza 5, mientras que el color beige se encuentran en todos los sitios.

b) Descripción de pozas

Las pozas son en general pequeñas con un promedio de área de 2.75 metros cuadrados sin tomar en cuenta el río y la laguna de desecación

FIGURA 3.

Descripción de numero de colonias y de morfotipos diferentes por sitio muestreado con agar marino.

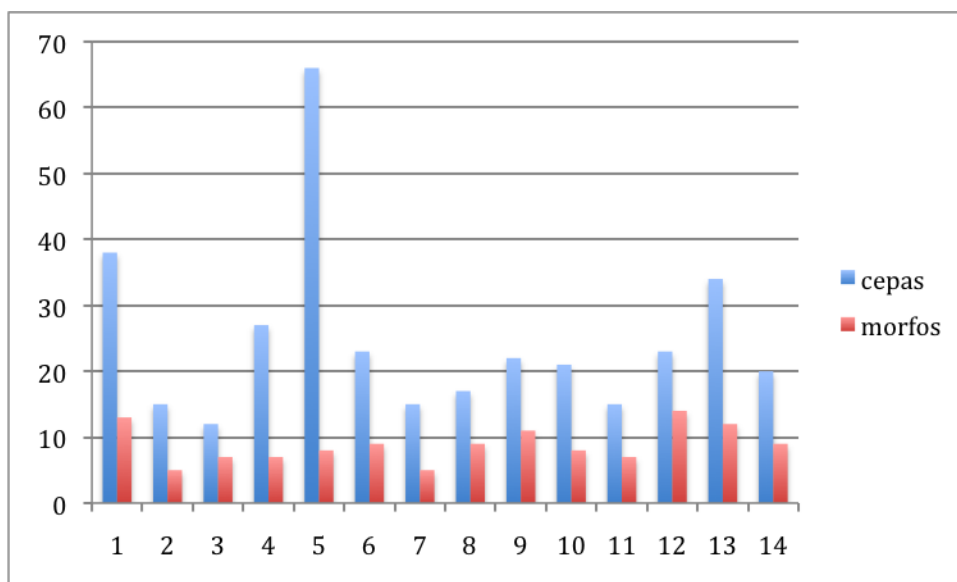


Figura 4.

Área de las pozas eliminando el río que tiene un área mucho mas grande y eliminando la poza 7 que tiene un área de mas de 500 mt2.

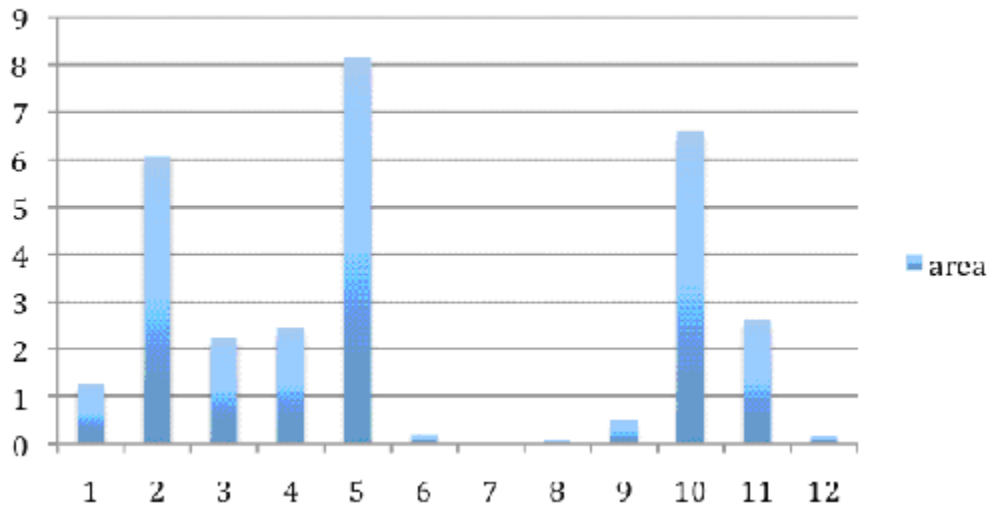
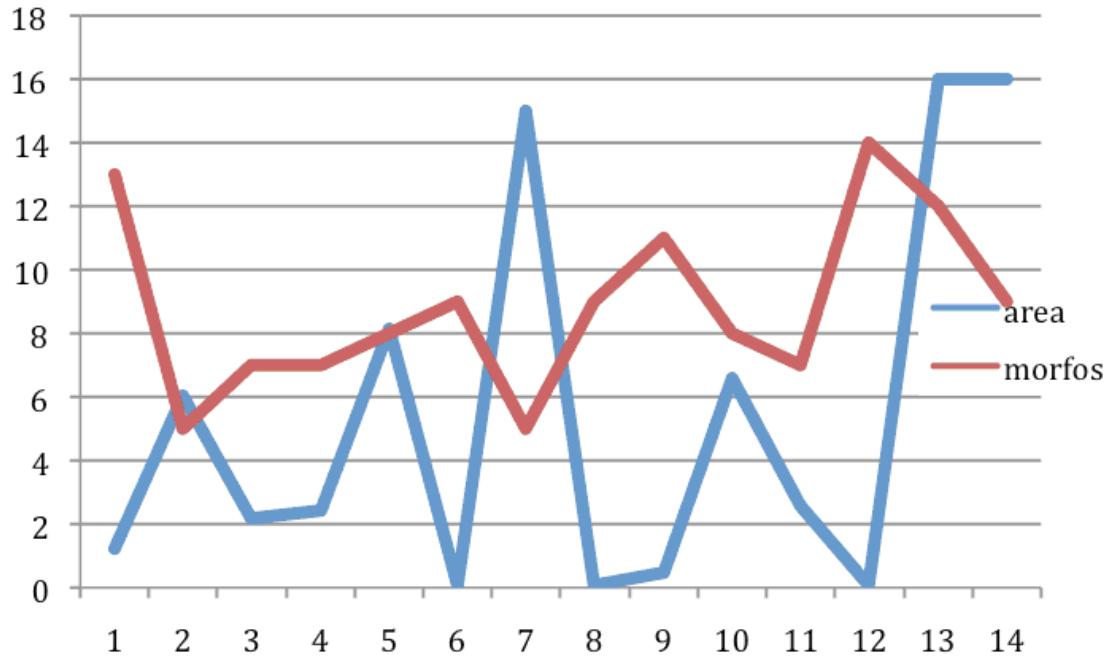


Figura 5

Relacion entre el area de la poza y el numero de morfos muestreados en la poza. El sitio 7 tiene un area de mas de 500 m² y el rio tiene un area indeterminada de varios km, sin embargo no tienen muchos morfos diferentes.



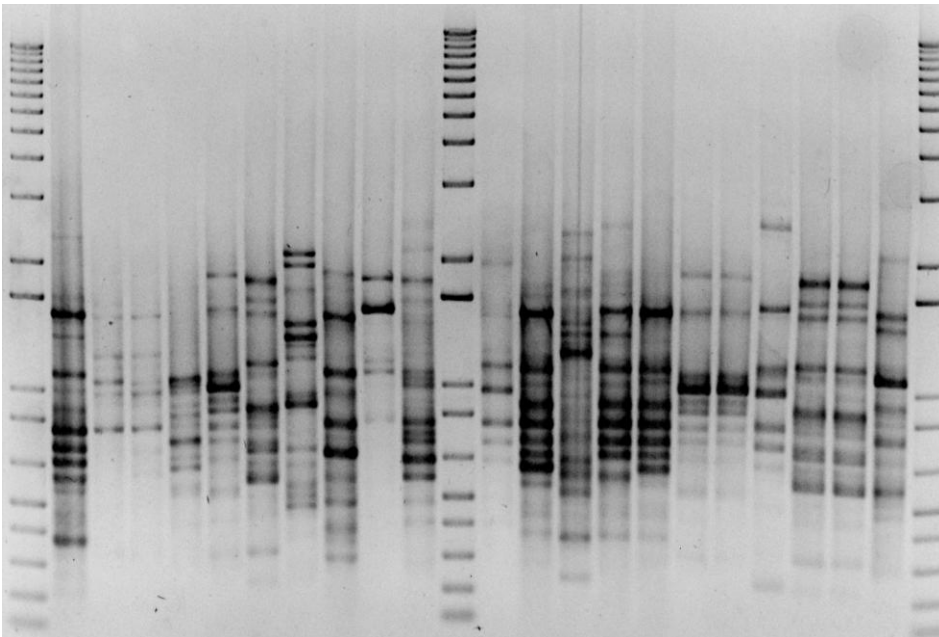
c) Bioquímica de bacterias

La experimentación consistió en 25 medios de cultivo con la base de agar marino, más el azúcar (anexo 1) particular como fuente de carbono. Se observó una gran variedad de metabolismos, predominando las cepas que pueden degradar varias fuentes de carbono como glicerol, arabinosa, trealosa, manosa, sacarosa, almidón, salicín y muchas más.

d) Análisis de los patrones de banda

Para el análisis de los patrones de banda obtenidos se usó el software GelCompar II. Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns. Manual versión 1. 01. Applied Maths BVBA. Los patrones producidos por REPs – PCR fueron comparados usando el coeficiente Pearson, el cual considera el número de bandas y su intensidad. Para el agrupamiento de los perfiles se usó el algoritmo UPGMA. (Padilla, 2003). La corrida de los productos de amplificación REPs – PCR se hace en geles de agarosa de aproximadamente 20 cm. de largo, esto es debido a que las bandas de amplificación son muy pesadas y de tamaño similar, posteriormente es teñida con bromuro de etidio. Al final se toma la foto la cual es guardada para su uso.

Figura 6. El gel de agarosa en la que muestra el perfil de corrida con su escalera molecular de 1Kb en las orillas y uno en el centro.



e) Resultado de lecturas de corridas

Dendograma de similaridad entre los perfiles obtenidos por el programa Gel compar II. Se analizaron 252 cepas con morfós diferentes, mismas que se biotipificaron. Dicho análisis se presenta en la figura 4. Para mayor comprensión se colorearon diferencialmente los números de las pozas y los morfotipos. La poza 14 se encuentra agrupada al final del dendograma de color verde claro y es la única donde hay un solo linaje en un solo sitio, en general observamos una gran diversidad de genotipos por sitio, siendo que prácticamente ninguna secuencia es idéntica a otra. Observar la Figura 7(dendograma de similitud pagina 25 A)

Figura 3.
Dendograma de
similitud calculado
por el programa Gel
compare II.

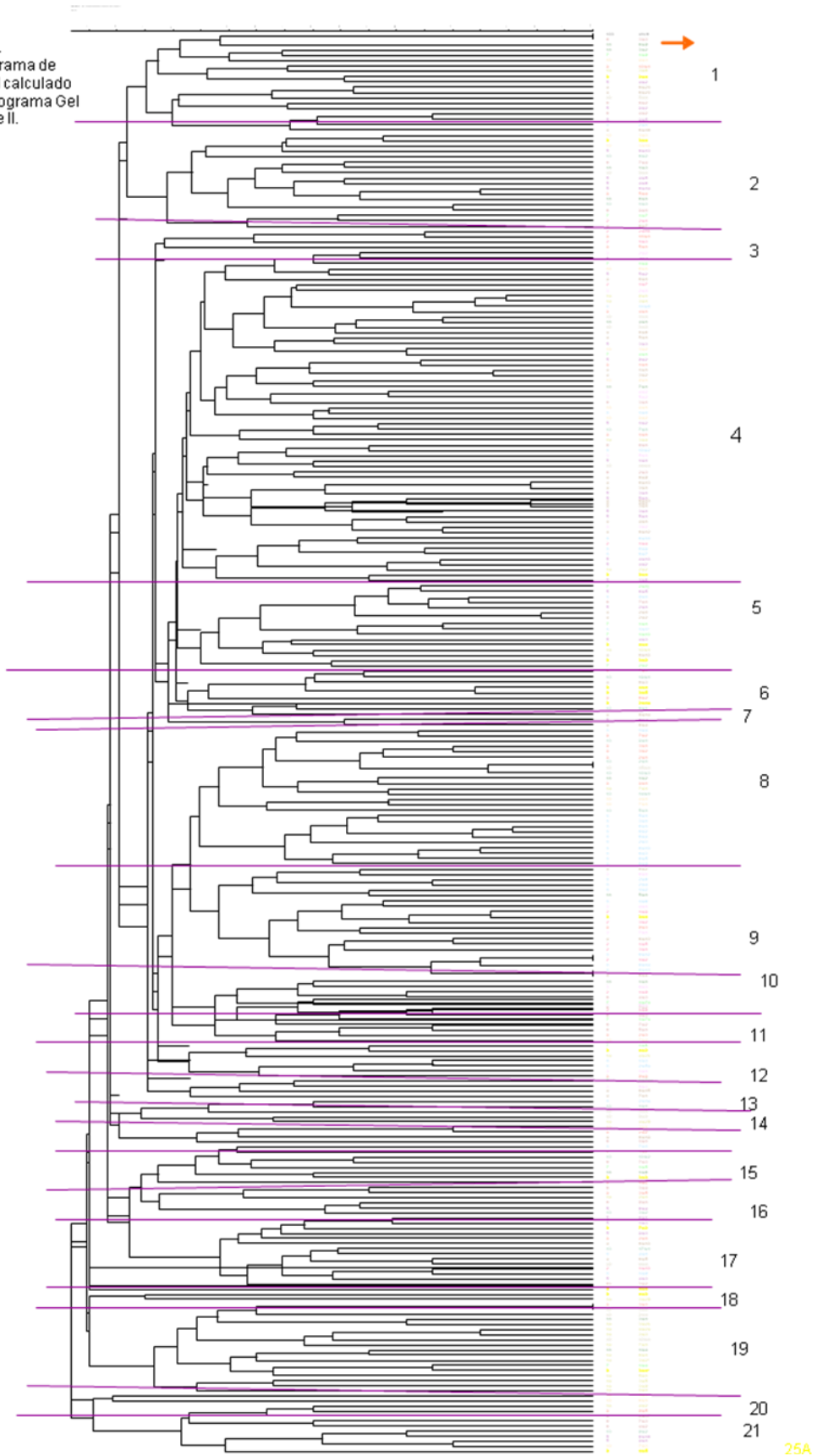


Tabla 5. Concentrado de información fenotípica, bioquímica y de diversidad genética usando REPs-PCR

P	N cepas	morfos	área	morf dominante	X azucares	X no crece en azucares	reps dif	clados de los reps
1	38	13	1.25	Beige circular	22	3	32	9*
2	15	5	6.06	Beige circular	21	4	13	5
3	12	7	2.21	Beige circ/dentado	22	3	12	5
4	27	7	2.44	Beige ondulado	22	3	27	9
5	66	8	8.16	Amarillas dentadas	21	4	26	7
6	23	9	0.2	Blanca circular	21	4	20	8
7	15	5	549	Naranja circular	20	5	13	8
8	17	9	0.63	Rojas circulares	21	4	16	12
9	22	11	0.49	Beige dentada /lobuladas	21	4	22	12
10	21	8	6.59	Beige fusiformes	21	4	14	8
11	15	7	2.61	Beige circular / café oscuras	22	3	12	8
12	23	14	0.17	Café doble circular	18	7	12	7
13	34	12	ND	Blancas circulares	22	3	15	7
14	20	9	ND	Naranjas circulares /beige	18	7	18	5*
total	252	14			25		252	21

*tienden a estar en un clado

f) Resultado de las secuencias 16s

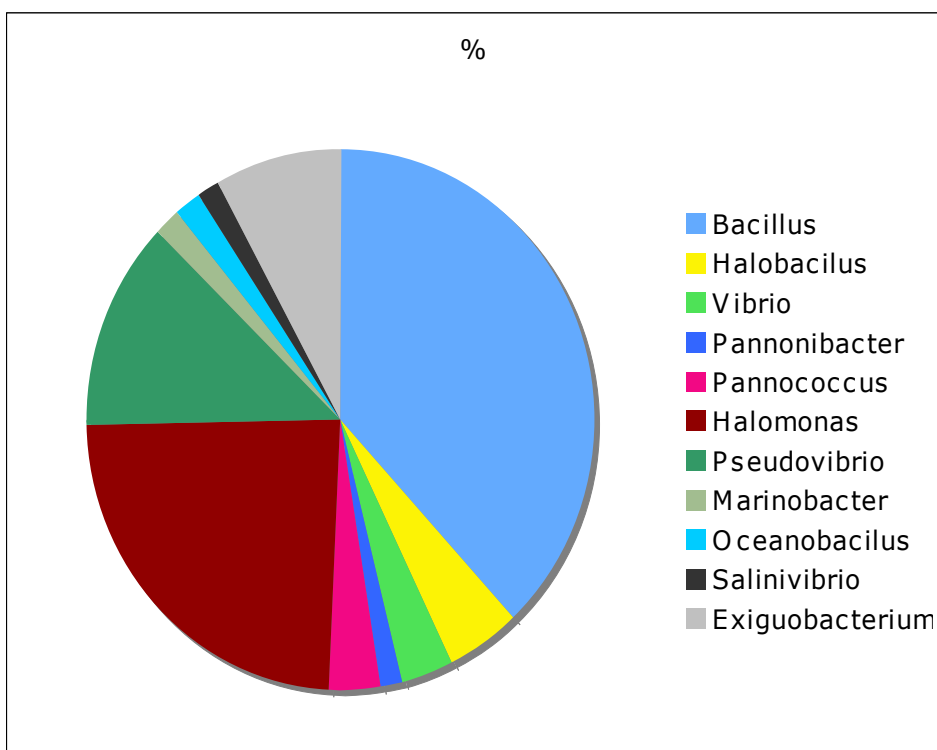
La comparación de 74 secuencias de los rDNA nos permitieron establecer, con mayor precisión las relaciones filogenéticas existentes entre organismos cultivados permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. Debido a que no se secuenció el gen completo la clasificación obtenida es solo a nivel genero, sin embargo el haber encontrado diferentes REP-PCR aún en sitios con un solo género nos hace pensar que la diversidad es mucho mayor de la que se pudo estimar con este fragmento de 16S rDNA.

Las secuencias que se obtuvieron se encuentran en el anexo 2.

Tabla 6 El número de géneros secuenciados esta relacionado con cuantas secuencias se obtienen por sitio y con cuantos morfos existen en cada lugar. Se secuencio al menos una muestra por género. En el anexo 3 se muestra la proporción de géneros muestreados por sitio.

area pozas (m ²)	morfos	Cepas	sec 16S	numero de géneros
1.25184906	13	38	14	5
6.067215	5	15	5	1
2.2156134	7	12	10	4
2.4492699	7	27	9	2
8.16816	8	66	7	4
0.20593188	9	23	4	2
525	5	15	3	2
0.07351344	9	17	3	3
0.4900896	11	22	2	2
6.59736	8	21	4	2
2.615382	7	15	6	2
0.17718624	14	23	2	3
ND	12	34	2	1
ND	9	20	2	2

Figura 7. Uniendo los datos de 16S rDNA de todas las pozas, observamos que este es un ecosistema notoriamente diverso para ser un ambiente extremo.



VII Discusión

En los primeros datos obtenidos de los cultivos de bacterias del sistema de Río Mezquites, se encontró una gran diversidad de morfotipos para cada una de las pozas de desecación, a pesar de que los parámetros ambientales medidos (temperatura y pH) aparentemente no explican esta diversidad ya que no presentaron rangos muy amplios de variación.

Estos morfotipos fueron catalogados de acuerdo a su color, forma y textura encontrando diferentes formas y colores que al final fueron clasificadas con sus respectivas iniciales para su almacenamiento para después ser aisladas, secuenciadas y almacenadas en medio UL.

En cada morfotipo se le analizó la bioquímica bacteriana encontrando que estas bacterias heterótrofas tienen un amplio rango de crecimiento en medios de azúcares del sistema mezquites las bacterias cultivables mostraron un apetito muy grande ya que comían de casi todo, lo único que no les gusta son los medios de cultivo con tendencias ácidas (azúcares y pH). Esto indica que los organismos obtenidos de las charcas saladas del Río Mezquites es un grupo bacterias con una amplia diversidad y potencial para nutrirse de diversas fuentes. En otros estudios similares en salinas ha encontrado que hay poca diversidad morfológica (Casamayor et al., 2005; 2006) y genética en sitios similares.

El análisis de variabilidad genética usando los marcadores REP-PCR nos han sido muy útiles para genotipificar bacterias cultivables y llevarnos a un éxito para caracterizar el aislamiento de bacterias cultivables de Cuatro Ciénegas. Estos resultados de patrón de bandeo obtenidos con REP – PCR presentaron una generación de una gran variedad de bandas únicas (alelos) por lo que deducimos que en la comunidad hay gran variedad genética entre la cepas de bacterias aisladas en un solo medio de cultivo, las cuales aunque provienen de una sola poza se distribuye en un amplio árbol filogenético, con excepción de la poza 14 cuyos habitantes forman un solo linaje. Esta diversidad fue confirmada con las secuencias.

Las secuencias obtenidas en el análisis del 16S rRNA fueron muy diversas ya aún a nivel de géneros de bacterias. La resolución del marcador taxonómico no fue suficientemente buena para distinguir especies dentro de los géneros (500pb en promedio) por lo que si en estudios futuros analizaremos el gen completo del 16S, encontramos seguramente mayor diversidad taxonómica. Dados todos estos datos, consideramos que la hipótesis que se cumple es la hipótesis alternativa 2, ya que a primera vista no hay ninguna relación entre el espacio y el tamaño de las pozas con su diversidad y cada poza aparentemente refleja historias diferentes que dan como resultado una diversidad única. Sin embargo, se requiere de un análisis mas cuidados para aumentar el tamaño de muestra y realizar estadística para confirmar esta última hipótesis.

VIII Conclusiones

Nuestros estudios sobre las bacterias cultivables de Cuatro Ciénegas sugieren una alta diversidad aún utilizando un solo medio de cultivo y considerando que fueron aisladas en ambientes de alta salinidad. Esto es evidente con los morfotipos así como con el análisis de REP-PCR donde se pudo observar una gran variedad genética entre los aislamientos de bacterias cultivables de Cuatro Ciénegas. Las secuencias de las bacterias cultivables muestran que muchas pozas tienen combinaciones de géneros diferentes, y algunas presentan géneros únicos, aunque la mayor parte presenta géneros muy comunes en este tipo de ambientes como son: *Bacillus*, *Halomonas* y *Pseudovibrio*, en ese orden de aparición. Esto es razonable ya que estos géneros se distinguen por tolerante a altas condiciones de salinidad. La resolución del marcador taxonómico no fue suficientemente buena para distinguir especies dentro de los géneros (500pb en promedio) por lo que si en estudios futuros analizaremos el gen completo del 16S, encontramos seguramente mayor diversidad taxonómica.

Los parámetros ambientales son muy importante en los procesos biológicos, y estamos seguros que en este estudio no es la excepción ya que aunque uno pensaría que no fueron determinantes para la distribución de la diversidad es muy posible que este resultado se deba a que no medimos suficientes variables ambientales como son el tipo de sales (todos los sitios salvo el río mezquites estaban a nivel de saturación de sales por lo que el conductímetro registraba valores poco confiables, por lo que no tomamos en cuenta estos valores) y nutrientes de las pozas. Sin embargo, consideramos que la diversidad es producto de la historia evolutiva, el azar y la adaptación particular de cada genotipo a su ambiente, por lo que, aunque los datos obtenidos como la variable de temperatura no existiera un rango muy amplio, es muy posible que en otras variables si lo tuviera.

Por otra parte, teniendo en cuenta el tamaño de cada poza encontramos que no había ninguna relación con la diversidad ya que pozas pequeñas podían tener

muchos genotipos mientras que pozas grandes pocos. Sin embargo, el tamaño de estas pozas de desecación no es estático y pozas pequeñas pudieron ser mucho mas grandes antes y evaporarse hasta quedar un pequeño charco mientras que pozas grandes pueden ser de reciente formación por lo que no ha tenido tiempo de acumular variación.

Por ultimo podemos suponer dada la prevalencia de los microbios en este tipo de ambientes extremos que es muy importante el papel de las bacterias (cultivables y no cultivables), en la eficiencia de nutrientes ya que estos organismos son los principales actores de los ciclos de nutrientes y la base de la cadena alimenticia de los sistemas acuáticos de estas zonas.

VIII PERPECTIVAS

Seria importante en el futuro no solo buscar las cepas cultivables en un solo medio sino ampliar el muestreo a varios medios así como hacer librerías de clonas de 16s ambiental.

BIBLIOGRAFIA

- Atlas R. y Bartha R. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología ambiental. Editorial Addison Wesley. México.
- Badino G., Bernabei T., De Vito A., Giulivo I y Savino G. 2004. Bajo el desierto “El misterio de las aguas de Cuatro Ciénegas. Instituto Coahuilense de Ecología. México.
- Dinger E. C., Hendrickson, Winsborough B. M. and Marrks J. C. 2006. Role of fish in structuring invertebrates on stromatolites in Cuatro Ciénegas, México. Hydrobiologia. Arizona university, box. USA. 563: 407- 429
- Curtis T and Willian T. 2004. Prokaryotic diversity and limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. Elsevier. 7:221-226.
- Espinosa A. L. 2005. Análisis de la diversidad de procariontes usando gen 16s ribosomal: origen marino de la región de Cuatro Cienégas, Cohauila. UNAM. Instituto de Ecología.
- Falcón, L. I, Pluvinage y E. J. Carpenter. 2005. Continuos cultures of N₂ – fixing unicelular cyanobacteria in limited media: maximun growth rates as a function of temperatura marine ecology. Progress serie, 285: 3-9-
- Gobat Jean – Michael and Aragno M., 2004. The living soil. Fundamentals of soil science and soil biology. Science publisher. USA.
- Invitrogen. 2005. Life Science Research. Pruducts and Services.
- Jean L. W. Redemarker, Henk J. M. Aarts and Vinuesa Pablo () Molecular typing of enviromental isolates.
- Kortrijik. B. 1999. GelCompar II. comparative Analysis of Electrophoresis Partens.
- Litchfield C. D. 1998. Survival strategies for mocroorganisms in hypersaline environmets and their relevance to life on early Mars. Meteoritcs & planetary Science. University Virginia USA. 33, 813 – 819.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos 10 ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Manual versión 1.01. Applied Maths BVBA. All rights reserved. Padilla C. y Ventura Gladis E. 2003. Genotipificación de aislamiento de *Bartonella bacilliformis*

por amplificación de elementos repetitivos mediante el uso REP – PCR y ERIC – PCR. Instituto Nacional de la Salud, Lima Perú.; 20 (3).

Mendoza M. C. and Rodicio M. R. 2004. Identification of en bacteria through 16S rRNA sequencing: Plinciples, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22 (4): 238-45.

Muyzer G., E. C. de – Wall y A. G. Vitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophorensis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes codogin for 16s RNA. *Appl. Eviron microbial* 59:695-700

Rademaker, Jaen, Aarts H. and Vinuesa P. 2005. Molecular typing of enviromental isolates. Chapter 4. *Molecular Microbial Ecology*. Mark osborn and cindy smith. pp 97- 126.

Ramirez-Gama, R. M., B. Luna Millan, O. Velasquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez , G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2003. *Manual de Practicas de Microbiología General*. 5 edición. Facultad de química, UNAM. México.

René C., Eguiarte L. E., Avita M., Siefert J., and Souza V. 2007. Diversity of culturable thermo – resistant bacterial species along an environmental gradient in an aquatic system in the valley of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología. UNAM.*

René C., Vinuesa P., Eguiarte L. E., Herrera – Estrella L., Alcaraz – Peraza L. Arvizu – Gómez J., Olmedo G., Ramírez E., Siefert J. L. adn and Souza V. 2008. *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a mederately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, México. *Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología. UNAM. International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58, 919 – 923.

Rodicio M. R y Mendoza M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Departamento de Biología Funcional. Área de microbiología. Universidad de Oviedo. España. Enferm Infecc. Microbiol Clin*. 22 (4): 238 – 245.

Souza V., Escalante A., Espinosa L., Valera A., Cruz A., Eguiarte L., García F. y Elser J. 2004. Cuatro Ciénegas. "Un laboratorio natural de astrobiología". *Ciencias*. Julio 75:4;12.

Stein, Bruce A. Lynn S. Kuther, Kutner, Junathan S. Adams. 2000. editores. *Precious Heritage: The Status of Biodiversity in the United States*. Oxford University Press.

Taylor, L. R: Kemptom, R. A. y Woiwod I. P. 1976. Diversity statistics and the log serie model.

Venter, J. C. Remington, K, Heidelberg, J. F. Halpern, A. L. Rusch, D. y Eisen J. A. 2004. Enviromental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.

Wetzel Robert G. and Likens Gene E. 1991. *Limnological Analyses*. Second Edition. Editorial Springer – Verlag. New York.

Wimpenny Julian T. 1999. *Handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems*. Volumen II chapter 5 The bacterial colony CRC press.

Anexo 1

Medio de cultivo

Agar marino en un litro de agua destilada.

Peptona.....	5g
Extracto de levadura.....	1g
Citrato férrico.....	0.1g
Cloruro de sodio.....	19.4g
Cloruro de magnesio.....	8.8g
Sulfato de sodio.....	3.2g
Cloruro de calcio.....	1.8g
Cloruro de potasio.....	0.55g
Bicarbonato de sodio.....	0.1g
Bromuro de potasio.....	0.08
Cloruro de estroncio.....	0.034
Ácido bórico.....	0.022
Silicato de sodio.....	0.04g
Fluoruro de sodio.....	0.002g
Nitrato de amonio.....	0.0016g
Fosfato dibásico de sodio.....	0.008g
Agar bacteriológico.....	15g

15 minutos en la autoclave.

Agar marino con azúcares.

Peptona.....	5g
Extracto de levadura.....	1g
Citrato férrico.....	0.1g
Cloruro de sodio.....	19.4g
Cloruro de magnesio.....	8.8g
Sulfato de sodio.....	3.2g
Cloruro de calcio.....	1.8g
Cloruro de potasio.....	0.55g
Bicarbonato de sodio.....	0.1g

Bromuro de potasio.....	0.08
Cloruro de estroncio.....	0.034
Ácido bórico.....	0.022
Silicato de sodio.....	0.04g
Fluoruro de sodio.....	0.002g
Nitrato de amonio.....	0.0016g
Fosfato dibásico de sodio.....	0.008g
Rojo de fenol	4g
Agar bacteriológico.....	15g

Azucres

Manosa, rafinosa, sacarosa, D- glucosa, almidón, lactosa, arabinosa, glicina, trealosa, dulcitol, fructosa, adonitol, sorbitol, salicin, manitol, xilosa, ramnosa, L - aspartico, D- alanina, L-glutamico, citrato, ácido málico, ácido fumarico, pH 4 y pH 9.

Agarosa

Para la corrida se utilizó agarosa ultra pure marca Invitrogen. El gel de agarosa al 1.5%.

Buffer

Buffer TAE al 0.5x

Cámara:

Para correr el DNA total se utilizó una cámara Horizontal Whatman Gel electroforesis. Con gel de 10cm. de largo.

Para el producto del PCR una cámara Danges de aproximadamente 25cm. de largo esto debido a que las bandas de amplificación son muy grandes.

Anexo 2

Secuencias 16s

Resultados de BLAST.

No.	POZA	ESPECIE	Pb	%
1	1AM 1m1	Bacillus subtilis	240	100
2	1AM 1m2	Bacillus endophyticus	250	100
3	1AM 1m4	Bacillus subtilis	240	96
4	1Am 2m3	Halobacillus sp	540	99
5	1AM 2m4	Halobacillus loasalis	360	100
6	1AM 4m1	Bacillus marisflavi	360	100
7	1AM 5m1	Bacillus endophyticus	450	100
8	1AM 6m6	Bacillus aquaemaris	240	97
9	1AM 6m7	Vibrio cholerea	520	99
10	1Am 6m11	Vibrio cholerea	500	99
11	1AM 6m13	Bacillus marisflavi	440	100
12	1AM 6m14	Bacillus marisflavi	450	100
13	1AM 7m1	Pannoniberter phragmitetus	400	99
14	1AM 11m6	Exiguobacterium homiense	400	100
15	2AM 1m8	Bacillus cereus	335	96
16	2AM 1m10	Bacillus boroniphilus	300	100
17	2AM 3m1	Bacillus boroniphilus	500	99
18	2AM 3m2	Bacillus boroniphilus	450	100
19	3AM 3m1	Pseudovibrio denitrificans	330	98
20	3AM 2m1	Bacillus endophyticus	440	100
21	3AM 2m2	Bacillus endophyticus	440	100
22	3AM 3m1	Bacillus boroniphilus	500	99
23	3AM 6m1	Planococcus citreus	360	100
24	3AM 3m2	Halobacillus locisalis	500	98
25	3AM 3m4	Pseudovibrio denitrificans	500	98
26	3AM 5m1	Pseudovibrio denitrificans	330	99
27	3AM 6m1	Planococcus sp.	475	98
28	3AM 7m1	Bacillus boroniphilus	400	96
29	4AM 1m1	Halomonas variabilis	440	100
30	4AM 3m1	Pseudovibrio denitrificans	440	99
31	4AM 4m1	Pseudovibrio denitrificans	400	97
32	4AM 5m1	Pseudovibrio denitrificans	450	99
33	4AM 6m1	Halomonas aquamarina	430	100
34	4AM 6m2	Halomonas venusta	350	97
35	4AM 6m4	Halomonas aquamarina	520	99
36	4AM 6m5	Pseudovibrio denitrificans	500	96
37	4AM 6m13	Pseudovibrio denitrificans	520	98
38	5AM 1m4	Halomonas variabilis	350	99

39	5AM 1m6	Halomonas variabilis	540	98
40	5AM 4m1	Halomonas variabilis	500	98
41	5AM 6m1	Halomonas venusta	280	99
42	5AM 6m13	Bacillus pumilus	450	99
43	5AM 9m2	Marinobacter aquaeoli	400	98
44	5AM 9m5	Halomonas variabilis	550	98
45	6AM3m3	Exiguabacterium homiense	530	99
46	6AM4m2	Bacillus sp	450	99
47	6AM 4m3	Bacillus sp	400	99
48	6AM 5m1	Bacillus macyae	470	99
49	7AM 1m4	Exiguabacterium homiense	430	98
50	7AM 1m6	Exiguabacterium homiense	440	98
51	7AM 1m8	Exiguabacterium homiense	450	98
52	8AM 3m1	Bacillus sp.	350	98
53	8AM 3m4	Bacullis sp.	320	97
54	8AM 6m2	Bacillus endophyticos	450	99
55	9AM 2m3	Bacillus endophyticos	440	99
56	9AM 5m4	Oceanobacillus	440	98
57	10AM 3m3	Bacillus subtilis	440	99
58	10AM 5m1B	Bacillus niabensis	250	97
59	10AM 7m4	Bacillus sphaericus	300	96
60	10AM 9m3	Bacillus subtilis	410	98
61	11AM 1m1	Halomonas sp.	450	97
62	11AM 1m2	Bacillus subtilis	550	99
63	11AM 2m1	Bacillus subtilis	500	97
64	11AM 2m2	Salinivibrio vallismortis	500	97
65	11AM 4m1	Halomonas sultidaens	450	98
66	11AM 7m1	Halomonas sp.	550	99
67	12AM 3m1	Halomonas sp.	440	98
68	12AM 12m1	Halolactobacillus miurensis	200	92
69	13AM 1m1	Bacillus licheniformis	210	94
70	13AM 2m1	Bacillus subtilis	550	99
71	14AM 1m1	Halomonas variabilis	440	99
72	14AM 2m1	Halomonas mierensis	550	98
73	3AM 1m1	Pseudovibrio denitrificans	440	100

Anexo 2

Crecimiento de las cepas obtenidas en diferentes medio mínimo adicionado con diferentes fuentes de carbono

No.	cepa	mano	rafi	saca	D-glu	Almi	Lact	Arab	Glyc	Trea	Dulc	Fruc	Adon	Sorb	Salic	Mani	Xilo	Ram	L-Asp	D-ala	L-Gluta	Citra	Mali	Fuma	pH 9	pH4.5
1	1 1m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
2	1 1m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
3	1 1m3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
4	1 1m4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
5	1 1m7N	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
6	1 1m8	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
7	1 2m1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
8	1 2m3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	1 2m4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
10	1 2m5 a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
11	1 3m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
12	1 4m1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
13	1 5m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
14	1 6m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
15	1 6m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
16	1 6m4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
17	1 6m5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
18	1 6m6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
19	1 6m7	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
20	1 6m8	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
21	1 6m12	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
22	1 6m13	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
23	1 6m14	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1
24	1 7m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	10	0	0	0	0	0	0	1	0
25	1 11m6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
26	1 10m2	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
27	2 1m2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
28	2 1m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
29	2 1m4	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
30	2 1m5	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
31	2 1m7	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
32	2 1m8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
33	2 1m9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0

No.	cepa	mano	rafi	saca	D-glu	Almi	Lact	Arab	Glyc	Trea	Dulc	Fruc	Adon	Sorb	Salic	Mani	Xilo	Ram	L-Asp	D-ala	L-Gluta	Citra	Mali	Fuma	pH 9
108	6 4m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
109	6 5m1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
110	6 6m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
111	6 6m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
112	6 7m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
113	6 7m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
114	6 7m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
115	6 7m4	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
116	6 8m1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
117	6 9m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
118	7 1m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
119	7 1m1*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
120	7 1m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
121	7 1m4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
122	7 1m5	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
123	7 1m6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
124	7 1m7A	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
125	7 1m7an	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
126	7 1m8	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
127	7 1m10	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
128	7 1m11	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
129	7 1m12	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
130	7 2m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
131	7 4m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
132	7 5m1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
133	8 2m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
134	8 2m1A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
135	8 3m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
136	8 3m1*	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
137	8 3m2	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
138	8 3m2N	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
139	8 3m3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
140	8 3m4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
141	8 3m5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
142	8 4m1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
143	8 5m1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
144	8 5m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0

No.	cepa	mano	rafi	saca	D-glu	Almi	Lact	Arab	Glyc	Trea	Dulc	Fruc	Adon	Sorb	Salic	Mani	Xilo	Ram	L-Asp	D-ala	L-Gluta	Citra	Mali	Fuma	pH 9	pH4.5
145	8 6m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
146	8 6m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
147	8 6m3	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
148	8 7m2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
149	8 8m1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
150	8 9m1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
151	8.2 1m1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
152	8.2 1m1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
153	8.2 1m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
154	8.2 2m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
155	8.2 2m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
156	8.2 2m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
157	8.2 3m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
158	8.2 3m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
159	8.2 4m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
160	8.2 5m1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
161	8.2 5m4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
162	8.2 6m1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
163	8.2 7m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
164	8.2 7m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
165	8.2 8m3	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
166	8.2 8m9	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
167	8.2 9m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
168	8.2 10m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
169	8.2 11m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
170	8.3 2m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
171	8.3 3m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
172	8.3 3m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
173	8.3 3m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
174	8.3 3m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
175	8.3 3m4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
176	8.3 4m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
177	8.3 5m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
178	8.3 5m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
179	8.3 6m1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
180	8.3 7m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
181	8.3 7m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0

No.	cepa	mano	rafi	saca	D-glu	Almi	Lact	Arab	Glyc	Trea	Dulc	Fruc	Adon	Sorb	Salic	Mani	Xilo	Ram	L-Asp	D-ala	L-Gluta	Citra	Mali	Fuma	pH 9	pH4.5
182	8.3 7m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
183	8.3 7m4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
184	8.3 8m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
185	8.3 9m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
186	8.3 9m2	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
187	8.3 9m3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
188	9 1m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
189	9 1m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
190	9 1m4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
191	9 1m6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
192	9 2m1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
193	9 2m2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
194	9 3m1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
195	9 4m1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
196	9 5m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
197	9 6m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
198	9 7m1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
199	10 2m1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
200	10 3m1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
201	10 3m2	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
202	10 3m5	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
203	10 4m1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
204	10 5m1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
205	10 6m1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1		1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
206	10 8m1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
207	10 8m2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
208	10 12m1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
209	10 13m1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
210	10 15m1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
211	10 16m1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
212	11 1m1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
213	11 2m1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
214	11 3m1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
215	11 3m2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
216	11 3m2A	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0
217	11 3m3	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
218	11 4m1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0

No.	cepa	mano	rafi	saca	D-glu	Almi	Lact	Arab	Glyc	Trea	Dulc	Fruc	Adon	Sorb	Salic	Mani	Xilo	Ram	L-Asp	D-ala	L-Gluta	Citra	Mali	Fuma	pH 9	pH4.5
219	11 4m2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
220	11 5m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
221	11 5m2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
222	11 5m3	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
223	11 6m1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
224	11 7m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0
225	11 8m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
226	11 8m2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
227	11 10m1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
228	11 10m2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
229	11 10m3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
230	11 10m4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0
231	11 10m5	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
232	11 11m3	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
233	11 11m4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
234	11 11m5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
235	11 17m1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
236	12 1m1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
237	12 2m1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
238	12 2m2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
239	12 3m1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
240	12 3m3	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
241	12 3m4	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
242	12 3m5	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
243	12 3m6	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
244	12 3m8	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
245	12 4m2	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
246	12 4m2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
247	12 4m2*	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
248	12 5m1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
249	12 6m1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
250	12 7m1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
251	12 8m1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
252	12 10m1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1