



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



Ecología de *Chiridota heheva* holoturia asociada a un fondo abisal con
volcanismo de asfalto en el sector suroeste del Golfo de México

TESIS

Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

P r e s e n t a

Biólogo Ramón Gerardo Velázquez Luna

Directora de Tesis: Dra. Elva G. Escobar Briones.

Comité Tutorial: Dr. Miroslav Macek

Dr. Martín Soto Jiménez

Dr. Alfredo Laguarda Figueras

Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez

México D.F., Octubre 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.

A Mi Familia y amigos con todo mi Amor

A mi Mamá Amalia Luna Parra

La uniformidad es la muerte; la diversidad es la vida.
Mijail Bakunin

Amar lo que haces y sentir lo que importa, ¿qué podría ser mejor?
Catherine Graham

Para las personas creyentes, Dios esta al principio. Para los científicos está el final de todas sus reflexiones.
Max Planck

Y veras al pepinillo marino conquistar el universo submarino
Fobia

En el mar nació la vida, el mar nos reclamara algún día, así que vive tus sueños o ¿tienes algo mejor que hacer?
Ramón.

Agradecimientos

Dra. Elva Escobar B. Por su paciencia y su guía, mi eterno agradecimiento por todas las enseñanzas que me permitirme aprender cada vez más.

Al Comité Tutorial Drs. Miroslav Macek, FESI Alfredo Laguarda, Martín Soto, Luis Maldonado del ICML por sus atenciones, sugerencias, guía y tiempo.

Dr. Francisco Solís ICML por su apoyo en la identificación de la holoturia, sus enseñanzas y tiempo.

Al PCML por su recibimiento Dra. Gloria Vilaclara, a Gaby Almaraz, Lupita, Chantal Diana siempre con una sonrisa apoyándome en todo los tramites en posgrado.

Proyecto de GEOMAR y RCOM de la Universidad de Bremen en una colaboración entre el ICML-UNAM y la Universidad de Texas A & M.

Proyectos CONACyT y PAPIIT que apoyaron los análisis requeridos para el desarrollo de esta tesis.

El ICML por el apoyo con presupuesto e infraestructura al Laboratorio de Biodiversidad y Macroecología a cargo de la Dra. E. Escobar,

A las tripulaciones de los buques oceanográficos R/V *Sonne* y R/V *Meteor*, y del ROV *Quest*.

Las imágenes utilizadas en este estudio para la caracterización del hábitat se agradecen a MARUM

Dr. Gerhard Bohrman, a Markus Bruening por la asesoría apoyo con la edición de las imágenes y videos para la realización de este trabajo y su amistad.

Dra. Antje Boetius y al MPI el grupo habitat: Dr. Alban Ramete, Sandra, Cristina, Jannine, especialmente Bárbara y Verena Witt, y su orientación para este trabajo y amistad.

A Luciana Raggi y Daniel Santillano, por su apoyo, en el laboratorio MPI consejos enseñanzas y amistad.

A CONACyT por la beca recibida para la realización de esta Maestría y beca Mixta para la estancia en Bremen Alemania.

Agradecimientos personales.

A mi madre por todo su amor y su apoyo incondicional.

A mi familia por su amor.

Dra. Elva Escobar por toda su paciencia, su consejo jalones de orejas y ánimos para terminar este trabajo, mil gracias por siempre.

A mis amigos compañeros de mi vida Cuauhtemoc, Elsa, Sergio, Oscar por su amor y apoyo en todo momento.

A los amigos del laboratorio: Myrna, Javier, Adris, por su cariño, apoyo, ánimos, consejos y toda su ayuda mil gracias.

Amigos de la UAM. Diana, Adalid, Octavio, Eli "Doñita", y todos los demás por su cariño, y porras.

A los amigos, compañeros y alumnos del CONALEP Aztahuacan por que me animan e inspiran a seguir con los sueños que alguna vez se forjaron en la prepa.

A los compañeros de prepa donde quiera que estén, que hayan logrado sus sueños.

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Características del mar profundo	7
Equinodermos en el mar profundo	8
Dietas en el mar profundo	8
Estrategias para evaluar dietas	10
Caracterización molecular microbiana y secuencias	11
El hábitat béntico	13
Granulometría (tamaño de grano)	13
Composición elemental de la materia orgánica	13
Antecedentes	14
Dieta de las holoturias	15
Isótopos estables en el estudio de las dietas	15
Isótopos en sedimentos	16
Área de Estudio	19
Objetivo General	21
Metas	21
Hipótesis	21
Metodos	
Trabajo de Campo	22
Trabajo de Laboratorio	
→ Identificación de las holoturias	23
Descripción del hábitat	
→ Tamaño de Grano	23
→ Composición elemental del sustrato	24
→ Identificación del Hábitat de <i>Chiridota</i> heheva	25
Descripción de la Dieta	26
Análisis Isotópico	26
Secuenciación de contenido gástrico	27
→ Creación de librerías de clonas	29
Resultados	
Identificación de holoturia	33
Descripción del hábitat	
Tamaño de Grano	35
Composición Elemental	36
Identificación del Hábitat	38
Abundancia de <i>Chiridota</i> heheva	42
Contenido estomacal	45
Caracterización isotópica	47
Secuenciación de contenido estomacal	48
Discusión	53
Conclusiones	64
Referencias	65
Anexos	81

Lista de Figuras

Fig. 1. Rasgos de un monte donde se ilustra la infiltración de gas gusanos de tubo y tapetes bacterianos.	8
Fig.2. Árbol filogenético universal que muestra los tres dominios.	12
Fig. 3 y 4 Mapa del Golfo de México mostrando la localización del volcán de asfalto y sitio de colecta.	20
Fig.5. <i>Chiridota heheva</i> , se ilustra su coloración púrpura y manchas blanquecinas en un ejemplar recién colectado.	33
Fig. 6. Espículas del tipo ruedas de seis rayos, característica de <i>Chiridota heheva</i> .	34
Fig. 7 Distribución del tamaño de grano encontrado en fondos con sedimento suave donde ocurre <i>Chiridota heheva</i> .	36
Fig. 8 Diferencias en la concentración del porcentaje de Nitrógeno en el sedimento superficial para las localidades de sedimentos suaves.	37
Fig.9 Diferencias en la concentración del porcentaje de Carbono orgánico en el sedimento superficial para las localidades de sedimentos suaves.	37
Fig. 10 Mapa donde se ilustran los datos de sedimento en el sitio de colecta de las holoturias. Identificación del hábitat con video e imágenes.	38
Fig.11 Tipos de fondos donde ocurren las holoturias: a) con actividad y conchas, b) abisales típicos con madrigueras, c) con tapetes bacterianos y d) con gravas de asfalto.	41
Fig.12 Tipos de topografías del asfalto donde ocurren las holoturias: a) fondos con elevaciones topográficas, b y c) fondos con canales y bacterias; d) lago de bacterias.	42
Fig.13 Análisis ANOVA donde se muestran las diferencias entre los hábitat donde se observa la presencia de holoturias.	43
Fig. 14 Variación de la abundancia de la holoturia <i>C. heheva</i> en los hábitat reconocidos en los fondos suaves.	44
Fig. 15 Variación de la abundancia de la holoturia <i>C. heheva</i> en los hábitats de los fondos con flujo de asfalto.	45
Fig. 16 a) Foraminíferos y fitodetritus en el contenido estomacal de <i>Chiridota heheva</i> y b) Foraminíferos, fitodetritus, espículas y frústulas de <i>Chaetoceros</i> (Ehrenberg 1844).	46
Fig. 17 a) y b) Restos de metazoarios sin identificar.	46
Fig. 18 a) y b) Restos de componentes de fitodetrito.	46
Fig. 19 Imágenes de microscopia de epifluorescencia en muestras del contenido estomacal de la especie <i>Chiridota heheva</i> , de la localidad Chapopote en el SW del Golfo de México preparadas con DAPI.	47
Fig. 20 Relación isotópica estable de los componentes dietéticos potenciales de <i>Chiridota heheva</i> con base en organismos y tipos de bacterias reconocidos en infiltraciones de metano en el Golfo de México.	48
Fig. 21 Análisis filogenético de las secuencias obtenidas del contenido estomacal.	50-52

Lista de Tablas

Tabla 1 Composición isotópica del ($\delta^{13}\text{C}$ en ‰) en CO_2 , metano, etano, propano, l-butano y n-butano presentes en el volcán de asfalto. Tomada de MacDonald <i>et al.</i> , (2004)	16
Tabla 2 Valores en sedimentos de isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, de estudios realizados en el Golfo de México y otros océanos.	16
Tabla 3 Coordenadas de los sitios de muestreo en el volcán de asfalto Chapopote.	20
Tabla 4 Clasificación del tamaño de grano (tomado de Gray 1981).	24
Tabla 5 Número de imágenes analizadas de cada campaña en la zona del volcán de asfalto tomadas mediante ROV	25
Tabla 6 Análisis comparativo entre las especies de <i>Chiridota</i> encontradas en ventilas hidrotermales y en infiltraciones frías.	34
Tabla 7 Distribución porcentual del tamaño de grano de las localidades con sedimento.	35
Tabla 8 Porcentajes de C, N y S orgánicos, proporción C:N en sedimentos del volcán de asfalto.	36
Tabla 9 Clasificación de hábitat, y abundancia relativa de <i>C. heheva</i> de acuerdo a imágenes por campaña e inmersiones	39
Tabla 10 Muestra promedio desviación estándar de la abundancia de <i>Chiridota heheva</i> en hábitats con fondo suave.	43
Tabla 11 Valores promedio de la abundancia para cada tipo de hábitat en los fondos duros asociados al volcán de asfalto.	45
Tabla 12 Resumen de la revisión de contenido estomacal con microscopía óptica.	46
Tabla 13 Resultados de isotopía estable de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ realizada en músculo y contenido estomacal de <i>C. heheva</i> .	47
Tabla 14 Clasificación de las secuencias de las clonas obtenidas. La <i>secuencia más parecida</i> es el número de acceso de la secuencia más cercana encontrada en las bases de datos GenBank.	49
Tabla 15.- Resumen de estudios que reportan presencia de <i>Chiridota heheva</i>	62

Resumen

Este estudio tiene como objetivo caracterizar la especie de holoturia, componente dominante, del sistema quimiosintético del volcán de asfalto "Chapopote" en la planicie abisal del suroeste del Golfo de México a través de describir el hábitat, la dieta y los patrones de distribución. El área de estudio, ubicada a 3000m de profundidad se caracteriza por la presencia de sustratos duros cubiertos por tapetes de bacterias en los cuales se infiltran hidrocarburos y metano y sobre los cuales se agregan las holoturias. Los registros visuales, muestras de sustrato y organismos se recolectaron por medio del robot Quest a bordo del B/O Meteor en 2006 en una colaboración del ICML- UNAM con la Universidad de Texas A & M y RCOM de la Universidad de Bremen. Las holoturias se identificaron como *Chiridota heheva* previamente descrita para infiltraciones frías del talud continental de Louisiana y del Escarpe de Florida. La talla promedio de la especie fue 14.17 ± 1.70 cm. y se caracterizó por coloración púrpura, espículas circulares de seis rayos presentes en todo el cuerpo y 12 tentáculos en el disco terminal cefálico. Las holoturias ocurren en fondos con infiltración con tapetes bacterianos y asfalto y en abisales típicos en las inmediaciones. La mayor densidad de holoturias ocurre asociada a tapetes de bacterias. Los fondos abisales donde ocurren las agregaciones de holoturias se caracterizan por contenido de carbono de $22.53 \pm 7.4\%$, nitrógeno de $1.46 \pm 0.018\%$ y azufre en un intervalo de 0.20 ± 0.11 a $3.34 \pm 1.21 \%$. La relación C/N en los núcleos de sedimento varió de 7.74 ± 1.77 a 70.22 ± 24.5 . La dieta de las holoturias incluye componentes de la macrofauna béntica, detrito de origen fotoautotrófico y bacterias filamentosas con restos de asfalto dándole una señal isotópica estable a la holoturia entre -37.66 y -33.15% $\delta^{13}\text{C}$ y 3.08 a 7.82 $\delta^{15}\text{N}$, característica de fauna de ambientes quimiosintéticos. Las bacterias del contenido estomacal incluyen a los grupos de gama proteobacterias, Cytobacteriales- Flavobacteriales- Bacteroidales, y *Vibrio* característicos de sitios con infiltración de metano e hidrocarburos. La densidad de *Chiridota heheva* en el volcán de asfalto es elevada comparada con el Escarpe de Florida o el Cañón Alaminos.

ABSTRACT

Abyssal habitats depend mostly from the export of organic matter to support life in the seafloor. This study has as objective to describe the habitat, the diet and the distribution patterns of *Chiridota heheva* a dominant abyssal holothurian species, component of the benthic asphalt volcano "Chapopote" system in the Southwest of the Gulf of Mexico. The study area, located at 3,000m depth is characterized by hard substrates, the presence of bacterial mats hydrocarbon and methane seepage. The visual records, substrate samples and specimens were collected with the ROV Quest in a collaborative cruise among ICML UNAM, the University of Texas A & M and RCOM of the University of Bremen on board the B/O Meteor in 2006. The holothurian species has been previously identified in the northern Gulf of Mexico from cold seeps in the Louisiana continental slope and the Florida Escarpment. Our results show that specimens occurring in the Chapopote site have an average total length of 14.17 ± 1.70 cm and follow the species diagnosis well with purple body color, circular spokes of six rays throughout the body and 12 tentacles in the cephalic terminal disk. Habitats where the species occurs include bacterial mats, asphalt and nearby soft sediment abyssal seafloor. The sediment elemental composition at sites where holothurians of this species aggregate is $22.53 \pm 7.4\%C$, $1.46 \pm 0.018\%C$ and 0.20 ± 0.11 to $3.34 \pm 1.21\%S$ with a C/N ratio ranging 7.74 ± 1.77 to 70.22 ± 24.50 . Gut content of *C. heheva* includes benthic macrofaunal components, phytodetritus and bacteria filaments with asphalt remains. The bacterial groups recorded in the gut contents include proteobacteria, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* and *Vibrio* characteristic methane and hydrocarbon seep sites. The stable isotopic signature of the holothurian muscle tissue ranges -37.66 to -33.15‰ $\delta^{13}C$ and 3.08 to 7.82 $\delta^{15}N$ characteristic of a diet sustained by a chemosynthetic source. The largest aggregations were recorded associated to bacterial mats. The abundance of *C. heheva* is higher in the asphalt volcano habitats compared to previous records from the Florida Escarpment and the Alaminos Canyon.

Introducción

Los datos ecológicos nos dan información sobre la historia de los organismos así como sobre las interacciones biológicas y los procesos asociados que regulan la abundancia de las especies. Lo anterior permite formular hipótesis sobre los cambios existentes o los que pueden suceder (Krebs, 1985).

Características del mar profundo. Más de 50% de la superficie de la Tierra está cubierta por sedimentos abisales de origen biogénico (Parkes *et al.*, 2000) los cuales se forman por la exportación de la producción primaria generada en la capa eufótica (1-3%). En mar abierto éstos son depositados como agregados al fondo en el sedimento superficial en forma de carbono orgánico particulado (COP). La temperatura del medio, el tamaño de la partícula y la actividad bacteriana determinan la cantidad y calidad de la materia orgánica que llega a los sedimentos y que es viable para su uso por el bentos reflejándose como biomasa béntica (Vetriani, 1999). De la materia orgánica depositada en los sedimentos oceánicos una porción es reciclada por las bacterias en la interfase sedimento-agua mediada por protozoarios y la actividad de invertebrados como rotíferos, anélidos, algunos moluscos y equinodermos entre otros (Parkes *et al.*, 2000; Turley y Dixon 2002). El carbono articulado (CP) que se sedimenta puede derivar de varias fuentes, por ejemplo de hidrocarburos, y es importante para las poblaciones microbianas de sedimentos de mar profundo que habitan en condiciones de escasos recursos (Parkes *et al.*, 2000). Las concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) en ambientes profundos son comparables a las concentraciones en el mar y agua epicontinental y es una de las fuentes de energía para los organismos del sedimento de mar profundo (Pettersson *et al.*, 1990). Los depósitos de hidrocarburos están íntimamente asociados con el predominio de comunidades bénticas sostenidas por materia orgánica de tipo quimiosintético. Estas son complejas y dependen de los procesos microbianos a través de simbiosis o por poblaciones de vida libre que oxidan hidrocarburos reducen CO₂ vía metanogénesis, oxidación de H₂S y reducción de los sulfatos (Sassen *et al.*, 1993; Kotelnikova, 2002). Algunos estudios se han reconocido la existencia de comunidades bénticas asociadas a sitios de emanaciones naturales de hidrocarburos fósiles y de gas metano entre otro tipo de emanaciones a profundidades que de 300 y 3,600 m de profundidad (Paull *et al.*, 1985, Suess *et al.*, 1998, MacDonald *et al.*, 2003). Los organismos heterótrofos característicos de este tipo de microambientes (e.j. Fig. 1) son

gusanos vestimentíferos (*Lamellibranchia* sp.), bivalvos *Vesycomyidae* (*Calyptogena* sp.), almejas de la familia *Lucinidae* y *Thyasaridea* que alojan en sus tejidos como endosimbiontes a bacterias (MacDonald *et al.*, 2003, Levin y Mendoza, 2007). La variación en la complejidad de estas comunidades bióticas depende de las condiciones físico-químicas de cada localidad con grupos fisiológicos específicos de microorganismos que sobreviven quimioautotróficamente en este tipo de ambientes (Soto *et al.*, 2004, Krüger *et al.*, 2005).

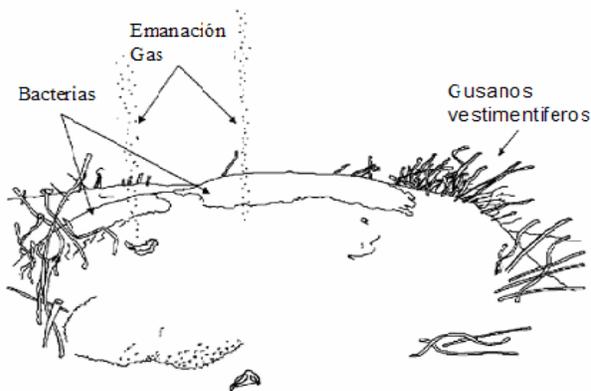


Fig. 1. Rasgos de un monte donde se ilustra la infiltración de gas, gusanos de tubo y tapetes bacterianos (Sassen *et al.*, 1993).

Equinodermos en el mar profundo. El phylum Echinodermata domina la megafauna en el mar profundo (Gage y Tyler, 1991). De los equinodermos los holoturoideos son el grupo que se alimentan retrabajando el sedimento superficial para aprovechar el material orgánico depositado en los sedimentos. Algunas especies como *Eupentacta*, *Aslia*, *Selenkothuria*, *Psolus*, *Cucumaria*, extienden sus tentáculos ramificados cubiertos de mucus atrapando así las partículas ingiriendo la materia orgánica (Brusca y Brusca, 1990, Hudson *et al.*, 2004). Las holoturias pueden extraer del fango el alimento por medio de series de cirros vibrátiles distribuidos a lo largo de surcos especiales que lo conducen a través del tubo digestivo (Barnes y Ruppert, 1996; Hudson *et al.*, 2004). Las bacterias asociadas a la materia orgánica representan el alimento de muchos invertebrados, incubándose en el tracto digestivo de algunos de ellos como en el caso de erizos de mar y de las holoturias (Cifuentes *et al.*, 1998).

Las dietas en el mar profundo. La ecología de mar profundo típico depende de la exportación de detrito orgánico desde la zona eufótica (Vetriani, 1999). La fauna asociada al sedimento que habita a más de 200 m se sostiene del carbono orgánico particulado (COP) enriquecida por agregados orgánicos (Duursma y Dawson 1981). La composición,

abundancia y biomasa se encuentran estrechamente relacionadas a la cantidad y calidad de COP tanto en columna de agua como el sedimento. Los compuestos orgánicos disponibles son consumidos por animales grandes, móviles o pequeños que viven en los intersticios del sedimento, la tasa de entrada y valor nutritivo del detrito disminuyen con la profundidad y distancia a la costa produciendo un cambio progresivo en composición de las especies y su abundancia; la labilidad de la materia orgánica varía por su origen fitoplancton (diatomeas), heces y mudas del zooplancton (copépodos), o microzooplancton y otros componentes del circuito microbiano permitiendo que las tramas alimentarias tiendan a simplificarse o a representar interacciones complejas (Eppley y Peterson 1979, Wakeham y Canuel, 1988, Legendre y Rasoulzadegan, 1996; Parsons *et al.*, 1996)

En el proceso de utilización de la materia orgánica los microorganismos participantes en la diagénesis transportan los sustratos a la célula y los utilizan ya sea directamente o mediante una hidrólisis enzimática extracelular o ectocelular (Boetius *et al.*, 2000). Cada una de las poblaciones de bacterias es específica a condiciones de oxígeno disuelto, tipo de nutrientes y otros aceptores de electrones, condiciones que promueven que las bacteria formen consorcios para un mejor aprovechamiento de los recursos disponibles como ejemplo; la mayoría que los reductores del sulfato requieren de ácidos grasos producidos por otras bacterias como fuente de carbono (Fabiano y Danovaro, 1998; Boetius *et al.*, 2000)

La distribución de bacterias presenta una correlación significativa con las concentraciones de materia orgánica que estimula la actividad bacteriana (Parkes *et al.*, 2000). La distribución de la diversidad bacteriana es independiente de profundidad, sin embargo las concentraciones de ciertos compuestos pueden favorecer a algunos grupos bacterianos (Urakawa *et al.*, 1999, Parkes *et al.*, 2000). Por consiguiente, la presencia de cambios en calidad y cantidad de la materia orgánica pueden determinar el potencial redox en el sedimento, controlando con ello la diversidad bacteriana (Luna *et al.*, 2004). La presencia de bacterias en sedimento es de interés al intentar elucidar relaciones tróficas con la macroinfauna (Strong *et al.* 1984). La diversidad microbiana (de acuerdo al índice de Shannon a partir de identificación de ribotipos) y su abundancia (a partir del conteo de bacterias en sedimento) se han empleado como una medida relativa de la contribución (funcionando como nutrición de otros organismos o como procesadores de nutrientes) y aportando al suministro del carbono local (Strong *et al.* 1984), la fauna béntica beneficiada

por el carbono exportado se refleja en el tipo de gremios tróficos predominando especies filtradoras y/o bacterívoras (Eltringham 1991, Gage y Tyler 1991). Estos basan su dieta en COP o microorganismos que lo recubren, que transforman en tejido orgánico útil tanto para el circuito microbiano o bien lo transfieren a los siguientes niveles tróficos (Strong *et al.*, 1984, Eltringham 1991).

Estrategias para evaluar dietas: el estudio de las relaciones tróficas es un tópico central en el entendimiento de un ecosistema, estudiar el contenido estomacal provee información sobre el tipo de alimento específico que ingieren los animales bénticos. Las observaciones *in vivo*, los análisis de contenido digestivo mediante análisis con microscopio revelaría ciertas preferencias alimenticias (Hudson *et al.*, 2004). Un análisis más riguroso nos puede indicar calidad, o bien el camino general de los nutrientes y la transferencia de energía a través de la red alimenticia, en este contexto la composición de isótopos estables nos provee de una herramienta poderosa para la investigación de las redes tróficas (DeNiro y Epstein, 1978, Fry y Parker, 1979).

Composición de la isotopía estable de los tejidos y contenidos gástricos. Desde que en la década de los 80's se demostró que la proporción del isótopo pesado del N era superior en los consumidores que en su fuente de alimentación (DeNiro y Epstein, 1981), se vislumbraron las posibilidades que tenían estas técnicas para el estudio de las redes tróficas surge el concepto de enriquecimiento isotópico o fraccionamiento trófico que es expresado como $\Delta = \delta^{15}\text{N}_{\text{consumidor}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{dieta}}$. (Vanderklift y Ponsard, 2003). La abundancia natural de los isótopos puede ser usada para buscar patrones y mecanismos que operen en los procesos globales que se dan en la naturaleza o en un único organismo, pudiendo ser utilizados, para estudiar el reciclado de los elementos en ecosistemas terrestres o marinos y también a la escala de la red trófica (Lajtha y Michener, 1994). Los análisis de isótopos estables se han utilizado en estudios ambientales geológicos ecológicos, geoquímicos, bioquímicos, oceanográficos e hidrológicos. El principal uso de los isótopos estables se basa en el fraccionamiento que sufren por procesos fisicoquímicos, biológicos y geológicos, los cuales presentan pequeños pero apreciables cambios en la proporción de sus isótopos (Lajtha y Michener, 1994).

Los isótopos estables pueden constituir una herramienta muy útil para el estudio de los flujos de energía en las cadenas alimenticias, la composición isotópica del carbono de los animales depende de la ingesta, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los consumidores

reflejan su dieta (DeNiro y Epstein, 1978). Algunos de los procesos que contribuyen a este enriquecimiento son: (i) pérdida preferencial de $^{12}\text{CO}_2$ en la respiración; (ii) captación selectiva de compuestos $\delta^{13}\text{C}$ durante la digestión; (iii) fraccionamiento metabólico durante la formación de distintos tipos de tejidos (pelo > cerebro > músculo > hígado > adiposo) (Guerrero y Berlanga, 2000). Esta transferencia conservativa de la composición isotópica ($< 1\text{‰}$) del animal respecto a la dieta, por tanto, se puede emplear como trazador de la red trófica en sistemas donde existan diferencias en los valores de $\delta^{13}\text{C}$, tales como plantas C3 o C4 o sistemas marinos respecto a terrestres (Kang *et al.*, 2003). Se estima que existe un enriquecimiento en el isótopo pesado de C de 0.5 a 1,1 ‰ por nivel trófico. A diferencia del carbono, el nitrógeno presenta un mayor enriquecimiento del ^{15}N en el animal respecto de su dieta., estimado en 2.8 a 3.4 ‰ por nivel trófico (Jacob *et al.*, 2005). En el caso del ^{34}S no parece haber un incremento en el animal respecto a la dieta, a lo largo de los distintos niveles tróficos (Hershey y Peterson, 1996).

Caracterización molecular microbiana y secuencias. El crecimiento de los microorganismos está limitado por la fuente de nutrientes, especialmente el carbono orgánico (C_{org}). El carbono fijado durante la producción primaria es transferido a través de la red trófica a los niveles superiores o bien es utilizado por microheterótrofos del circuito microbiano (Azam *et al.*, 1983). La biomasa microbiana y la materia orgánica detrítica constituyen importantes fuentes de alimento para los organismos detritívoros y filtradores de los sistemas acuáticos.

La biología molecular ofrece herramientas para la caracterización de comunidades mixtas de microorganismo, acercamientos que requieren extracción y purificación de ADN de la comunidad presente en los sedimentos y tierras. El aislamiento de ácidos del nucleicos bacterianos de ambientes naturales se ha vuelto una herramienta útil para descubrir bacterias que no pueden cultivarse, para revelar la diversidad genotípica y sus cambios en los ecosistemas de ahí su importancia para la utilización de esta herramienta en los estudios de ecología de ambientes extremos como las infiltraciones de metano o lugares como chapopote (Zhou *et al.*, 1996; Juniper *et al.*, 2001, Raggi, 2005)

Durante las décadas de los 60 y 70's se desarrollaron las bases de la taxonomía molecular. Lo que permitió elucidar las relaciones entre los seres vivos y establecer un sistema de clasificación filogenético, se utilizó el gen que codifica el RNA de la subunidad del ribosoma, DNAr 16_S en procariotas y DNAr 18s en eucariotas. Algunos autores

publicaron en los años 1980's las primeras aproximaciones hacia la evolución y ecología de los microorganismos (e. g. Pace *et al.*, 1986, Woese *et al.*, 1990, Olsen y Woese, 1993). Su propuesta se basa en el análisis del gen 16s RNAr que se encuentra estructural y funcionalmente conservada, su secuencia de bases es fácilmente alineable, dicho análisis clasificaba todos los seres vivos en tres dominios (Fig. 2), dos procarióticos (bacterias y arqueas) y uno eucariótico (Woese *et al.*, 1990, Giovanonni *et al.*, 1990).

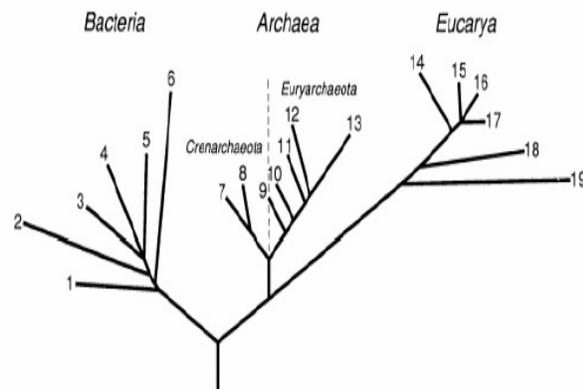


Fig.2. Árbol filogenético universal que muestra los tres dominios. El orden y largo de las ramas fue determinado haciendo comparaciones de secuencias del gen 16s y 18s ribosomal (tomado de Woese 1990). Bacteria: 1 Thermotogae, 2 Bacteroidetes, 3 Cyanobacterias, 4 Proteobacterias, 5 Grampositivas, 6 Chlorobi; Arqueas, la línea punteada divide a las Crenarchaeota: 7 Ayrediciumy 8 Thermoproteus, del reino Euryarchaeota: 9 Thermococcales, 10 metanococcales, 11 Methanobacterias, 12 Methanomicrobialesy 13 Halófilasextremas; Eucarya: 14 animales, 15 ciliados, 16 plantas verdes, 17 hongos, 18 flagelados y 19 micropodia.

La subunidad de RNA ribosómico (RNAr) 16s es de un tamaño intermedio (1500 nucleótidos) en comparación con el 5s ó 23 s (los RNAr de la subunidad 50s) la cual la hace de fácil manejo pero suficientemente larga para evitar fluctuaciones estadística, existen bases de datos que se expanden continuamente, como son el Ribosomal Data Base II (RDBII) y el GenBak. Mediante esta herramienta se ha logrado identificar la diversidad bacteriana que se encuentran en sedimentos de mar profundo (Juniper *et al.*, 2001).

Las bacterias que son fundamentales en ambientes quimiosintéticos juegan un papel importante en la producción primaria dentro de éstos ambientes extremos, los tapetes bacterianos son determinantes para la nutrición de otros organismo, al analizar el contenido estomacal de estos usando técnicas de análisis de huellas digitales (fingerprinting) de DNA como, desnaturalización en gel por electroforesis (DGGE), polimorfismo de longitud de restricción terminal (T-RFLP) y el análisis automatizado de

espacios intergénicos ribosomales (ARISA-automated ribosomal intergenic spacer analysis) (Fisher y Triplett, 1999). Esta técnica amplifica fragmentos de DNA característicos de los taxa presentes y compararlos con las bases de datos y permite conocer a detalle tipos de bacterias ingeridas. Estas estrategias proporcionan resultados rápidos, a bajo costo, son reproducibles y estiman la composición de la comunidad en forma de análisis de fragmentos de DNA. Los datos resultantes son a menudo considerados análogos a datos de composición de comunidad que son comúnmente analizados en estudios ecológicos "clásicos" permitiendo determinar índices de importancia ecológica (Fisher y Triplett, 1999, Juniper *et al.*, 2001).

El hábitat béntico. El bentos en el ecosistema marino es de gran importancia por su papel en los procesos primarios, los ciclos biogeoquímicos donde se encuentra estrechamente vinculado al reciclamiento de materiales en la interfase agua-sedimento. Los componentes bénticos ocurren a lo largo de todo el gradiente batimétrico, desde la zona litoral hasta los abismos (Edgcomb *et al.*, 2002).

Los factores ambientales que determinan la distribución de la vida en el mar profundo incluyen la baja temperatura (2 a 4°C), la elevada presión hidrostática (1 atm. por cada 10m de profundidad), la ausencia de luz solar y la variabilidad de la concentración de oxígeno disuelto (0 en zonas anóxicas a 6 mg L⁻¹ en las planicies abisales) que influyen en conjunto sobre la fisiología de los organismos (Escobar-Briones, 2004).

Tamaño de grano. El sedimento está formado por partículas tanto de origen biológico como de origen inorgánico; por tanto, el estudio de sus características aporta información tanto de factores bióticos como abióticos de relevancia para la evaluación de cualquier sistema acuático. Los sedimentos pueden ser considerados como un banco de información ambiental y tanto los procesos naturales como las actividades antropogénicas dejan, directa o indirectamente, una huella en el registro sedimentario (Gray, 1974). La biomasa béntica tiene una relación estrecha con el tipo de sustrato, el tamaño de grano es un parámetro determinante para la fauna que vive en el sedimento ya que éste no sólo ofrece apoyo, sino también una fuente de alimento. Lo anterior está vinculado a las variaciones en el tamaño de las partículas que determinan el espacio intersticial disponible para acumular agua y dar espacio a bacterias y metazoarios, delimita las cantidades de materia orgánica y oxígeno que penetran en los espacios intersticiales. A mayor

profundidad la heterogeneidad del sustrato se va perdiendo hasta predominar las arcillas en la planicie abisal (Vegas 1971; Gray, 1974).

Composición elemental del sedimento. La materia orgánica se genera *in situ* (autóctona) o es producida fuera del área (alóctona) y transportada ya sea por corrientes, transporte vertical reconocido como floculas de materia orgánica con organismos adheridos (Turley *et al.*, 1995). El nitrógeno elemental es indicador de materia orgánica lábil, ya que es prácticamente inexistente en la porción mineral de los sedimentos. Al igual que el C_{org} , tiene su origen en el detríto razón, por la cual existe correlación entre la materia orgánica y el nitrógeno total en el sedimento superficial (Hakanson, 1984). La proporción de C/N, además de ser un indicador de condiciones tróficas, sirve como indicador de la procedencia de la materia orgánica. La materia orgánica autóctona es mas rica en compuestos proteínicos de bajo peso molecular, ricos en nitrógeno y de baja proporción C/N (típicamente < 10), en tanto que la materia orgánica alóctona con proporción de material húmico, que tiene un peso molecular más elevado, es rica en compuestos de carbono y la proporción C/N tiende a ser mucho mas elevada, con valores que oscilan entre 20 y 30 (Meyers e Ishiwatari, 1993).

La materia orgánica en los sedimentos marinos representa un reservorio importante para el ciclo global del carbono, ésta se vincula con la diagénesis temprana y juega un papel importante en la química del océano. La materia orgánica puede ser de origen terrestre, marino o antropogénicos y las trampas de sedimento o núcleos recolectados son estrategias diversas para su estudio (García-Villalobos y Escobar-Briones 2008).

Antecedentes

Chiridota heheva es una nueva especie de holoturia descrita por Pawson y Vance (2004) de infiltraciones de metano en Georgia y para el Escarpe de Florida. La especie se describe como oportunista habitando fondos ricos en materia orgánica en infiltraciones frías, la planicie abisal de Puerto Rico, sustratos de madera, sedimentos suaves de diapiros de Blake Ridge y fondos marinos de Centroamérica (Pawson y Vance 2004). Ésta se alimenta potencialmente de sedimento, material suspendido obteniendo su nutrimento de fuentes variadas aún no descritas.

Los registros de equinodermos en ambientes quimiosintéticos como son ventilas hidrotermales, infiltraciones frías, y cadáveres de ballenas son aunque limitados caracterizados por una variedad grande y densidad elevada. Los ofiúridos, que tal vez es uno de los taxa más abundantes del mar profundo de ambientes no reductores están bien documentados en ventilas hidrotermales e infiltraciones frías (Deming y Colwell 1982, Goffredia *et.al.*, 2004). De igual manera las holoturias, incluyendo los Synaptidae y a *Chiridota*, se consideran un grupo dominante en las ventilas (Desbruyeres y Segonzac, 1997). En el Escarpe de Florida se han observado densas poblaciones de *Chiridota sp* asociadas a camas de mejillones *Bathymodidus sp.* (Van Dover *et al.*, 2003).

El hábitat de las holoturias del género *Chiridota* incluye agregaciones de gasterópodos y mejillones, las grietas de las rocas y sedimento suave. En el caso de la especie *C.hydrotermica* la periferia de la zona activa de la ventila muestra agregaciones con densidades de 23 ind./m² y hasta 30 ind./m². En algunas localidades se ha observado que una parte del cuerpo está enterrada con los tentáculos abiertos sugiriendo una alimentación filtradora (Smirnov *et.al.*, 2000; Störh y Segonzac, 2005).

Sibuet y Olu (1998) han reconocido 211 especies en infiltraciones frías y sólo una, *Phogonophoran lamellibrachia barhami* es común a infiltraciones frías y pecios donde *Chiridota heheva* también es común. En infiltraciones frías las holoturias se agregan en mayor número con valores de 12 ind./m². La asociación en Kasimm (Japón) a profundidades de 5,640m entre *Chiridota* es con camas de mejillones de la especie *Calyptogena phasediformis* y tapetes bacterianos. Otras holoturias sinalactidas tienen este mismo tipo de vinculación en Nankai a 3830m (Juniper y Sibuet, 1987). Equinoideos como: *Sarsiaster greigi*; ofiuroideos como *Ofioctenella acies*; y asteroideos como *Brisingias sp.*

(Hecker, 1985, Sibuet y Olu, 1998, Levin y Mendoza, 2007) se asocian en infiltraciones frías a mejillones como *Bathymodiolus heckeriae*.

Dietas de holoturias. Algunos estudios han examinado la dieta las holoturias para conocer las preferencias alimenticias. En general estos organismos se reconocen como procesadores del substrato béntico (Hudson *et al.*, 2004), asimilando fitodetritus, materia orgánica y microorganismos asociados al sedimento (e.g. levaduras, bacterias) ingiriendo así mismo invertebrados de la meiofauna. Las heces fecales se convierten en puntos de alta concentración de materia orgánica (Sambrano, 1987). Las especies abisales de fondos blandos incluyen en su dieta además de materia orgánica particulada, foraminíferos y componentes de la macrofauna. Los análisis de contenidos gástricos muestran la presencia de fitodetritus, bacterias y protozoarios (Hansen 1975; Roberts *et al.*, 2001; Wigham *et al.*, 2003; Hudson *et al.*, 2004)

Isótopos estables en el estudio de las dietas: En el suroeste del Golfo de México se han realizado análisis de isótopos estables en estudios ecológicos para establecer las principales fuentes de carbono en tramas tróficas por medio de la relación de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, así como para reconocer la complejidad trófica por medio de la relación de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

La fauna béntica de fondos suaves de la plataforma continental del SO del Golfo de México utiliza carbono orgánico que puede discernirse en biogénico marino y terrestre (Soto *et al.*, 1980; Soto y Escobar-Briones 1995). En las infiltraciones de hidrocarburos de la Bahía de Campeche los valores de ^{13}C y ^{15}N varían entre -19.4 y 11.1 sin diferenciarse de los valores ambientales no referidos a la infiltración (González, 1997). En el Escarpe de Florida en localidades no afectadas por infiltración los valores para holoturias son de ^{13}C (-19.75) ^{15}N (11.08); para ofiuroideos de ^{13}C (-21.79), ^{15}N (11.88) y para asteroideos de ^{13}C (-21.31), ^{15}N (13.18) (Levin y Mendoza 2007).

Isótopos en sedimento: Los estudios realizados en infiltraciones frías del sector norte del Golfo de México incluyen los de Sassen *et al.* (2004). En el volcán de asfalto en el Golfo de México se encuentran infiltraciones de metano y aceites, depósitos de hidratos de gas de los que contamos con valores isotópicos de ^{13}C (Tabla 1) (MacDonald *et al.*, 2004).

Tabla 1 Composición isotópica del ($\delta^{13}\text{C}$ en ‰) en CO_2 , metano, etano, propano, i-butano y n-butano presentes en el volcán de asfalto. Tomada de MacDonald *et al.*, (2004)

Muestra	CO_2		Metano		Etano		Propano		i-Butano		n-Butano	
	Conc.	^{13}C	Conc.	^{13}C	Conc.	^{13}C	Conc.	^{13}C	Conc.	^{13}C	Conc.	^{13}C
Hidratos de Gas	3,000	-19.9	962,000	-50.1	29,000	-33.2	33,000	-27.1	8,000	-28	1,700	
Sedimento con aceite	22,200	-7.5	47,400	-55.1	4,830	-34.1	9,217	-29	6,660	-40	295	
Sedimento con Asfalto	1,330		17.4		1.5		0.8		0.04		0.2	

Los estudios realizados por Botello *et al.*, (1987) en sedimentos del banco de Campeche presentan valores de ^{13}C de -22.7, -21 y de -19.8; El estudio de Guzmán y Mello (1999) sobre petróleo de la Sonda de Campeche reconoció valores de ^{13}C -27 a -27.7; y los sedimentos y comunidad bentónica asociada a la influencia de hidrocarburos descrita por González (2004) reconoce valores de ^{13}C de -21 a -21.6 y ^{15}N de 4.1 a 7.4. La Tabla 2 provee diversos valores en la región y otras del océano.

Tabla2 Valores en sedimentos de isótopos de ^{13}C y ^{13}N , de estudios realizados en el Golfo de México y otros Océanos.

Valores en sedimento		
Zona	^{13}C (‰)	Referencia
Sonda de Campeche SO del Golfo de México	-21.0 a -21.6	Soto <i>et al</i> (1980)
Sonda de Campeche SO del Golfo de México	-20.5 a -21.9	Botello <i>et al.</i> (1987)
Sonda de Campeche SO del Golfo de México	-19.3 a -20.6	Raz-Guzmán (1995)
Sonda de Campeche	-26.0 a -27.5	Guzmán y Mello (1999)
Louisiana, Texas, Tamaulipas Veracruz	-19.5 a -21.6	Gearing <i>et al.</i> (1976)
O del Golfo de México y Florida	-20.6	Macko <i>et al.</i> (1984)
Plataforma continental del Norte del Golfo de México	-20 a -22.1	Gearing <i>et al.</i> (1976)
NO del Golfo de México	-26.5 a -27.5	Wade <i>et al.</i> (1989)
NO del Golfo de México	-26.0 a -27.4	Kennicutt <i>et al.</i> (1988)
NO del Golfo de México	-30 a -50	Mango y Elrod (1999)
Cuenca San Clemente Pacífico Oriental	1.24 a 3.63	Escobar y Tamez (2006)

Valores en sedimentos		
Zona	¹³ N (‰)	Referencia
Sonda de Campeche	4.1 a 7.4	
NO del Golfo de México	6.5	Macko <i>et al.</i> (1984)
Sur de Florida	3.6	Macko <i>et al.</i> (1984)
Norte del Golfo de México	5.2	López-Veroni (1998)
Bahía Concepción Canadá	8.5	Ostrom <i>et al.</i> (1997)
Bahía de Auke, Alaska EEUU	5.9	Goering <i>et al.</i> (1990)
Atlántico Norte	2.3 a 8.0	Voss <i>et al.</i> (1996)
Santa Bárbara, California EEUU	10.0	Sweeney y Kaplan(1980)
Bahía de Tokio, Japón	6.6 a 8.7	Wada <i>et al.</i> (1990)
Cuenca San Clemente, Pacífico Oriental	0.25 a 0.15	Escobar y Tamez (2006)

El uso de observaciones directas para el estudio de predilección de hábitats: en observaciones *in situ* mediante robot controlado a distancia (ROV) se ha observado que la alimentación puede ser selectiva y se relaciona con la cantidad de material fresco presente en el ambiente, de la locomoción de las holoturias y de su tentáculos los cuales utiliza casi todos simultáneamente para seleccionar las partículas en el sedimento (Hudson *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2006). La holoturia presenta una respuesta al cambio de la cantidad y calidad de alimento disponible (Roberts *et al.*, 2000).

Los estudios de contenido estomacal, utilizando microscopios, reconocen la ingesta de fitodetritus, testas o partes de macroinvertebrados (como restos de poliquetos gasterópodos, bivalvos, foraminíferos, y paquetes fecales). Estos sugieren la existencia de una selectividad en el tamaño de la partícula, dada por la diversidad de tentáculos (Sambrano *et al.*, 1990; Roberts, *et al.*, 2000).

Raggi (2005) en su estudio de diversidad bacteriana en el Golfo de México al comparar sitios de muestreo distintos un típico abisal y otro en ambiente quimiosintéticos, encontró una marcada diferencia en la composición de los grupos bacterianos encontrados, indicando una heterogeneidad en el ambiente y por ende en la diversidad bacteriana. Ravenschlag *et al.* (2001) describen la actividad y contenido celular de bacterias sulfatoreductoras en sedimentos del mar Ártico con la técnica de hibridación *in situ* (FISH), y análisis de RNAr, destacando dos grupos principales, Desulfosarcina-Desulfococcus. Orphan *et al.* (2001) realizaron un análisis comparativo entre Arqueas oxidadoras de metano y bacterias sulfatoreductoras en sedimentos bajo condiciones

anóxicas. El estudio tomó muestras de diversas zonas de infiltraciones en las que las actividades de microorganismos fueron detectados por la baja señal del ^{13}C , utilizado como biomarcador, realizando la identificación de los consorcios mediante el análisis de la subunidad 16s, identificando bacterias sulfatoredutoras como parte de la población presente en estos ambientes. Arvison *et al.* (2004) realizaron estudios de tapetes bacterianos en comunidades quimiosintéticas en el Norte del golfo de México, en fondos de mejillones, tubos de gusano, tapetes de *Beggiatoa*, reportando una alta diversidad bacteriana.

Las emanaciones o filtraciones se originan como consecuencia de la geodinámica que se presenta en áreas de fallamiento por fracturas en deformaciones diapíricas, intrusión de rocas sedimentarias o ígneas y emanación directa desde la roca madre (Soto *et al.*, 2004). Las infiltraciones de metano son áreas del suelo marino en donde hay una fluida y rica emanación de sulfuros, metano y otros hidrocarburos (MacDonald *et al.*, 2003). Los primeros estudios de infiltraciones de metano se realizaron en 1984 por el Dr. Charles Paull en la bahía de Monterey, California a 3,200 m de profundidad. Desde entonces, se han estudiado estas infiltraciones en otras partes del mundo, incluyendo el golfo de México, el mar de Japón, y en aguas de la costa de Alaska. Las infiltraciones más profundas conocidas se distribuyen entre las trincheras de Kuril y de Japón y el monte submarino de Kashima en el mar de Japón a una profundidad de 5,000 a 6,500 m (Sibuet y Olu, 2005). La presencia de los organismos está definida por la composición de los fluidos termogénicos ricos en metano como fuente de energía para una alta productividad. La producción de sulfatos y la sulfatoreducción en los sedimentos representan un proceso determinante en la composición de las especies bacterianas y de metazoarios en el sedimento. Las especies dominantes son grandes bivalvos de la familia *Vesicomyidae* o *Mytilidae*, otros: *Solemyidae*, *Thyasiridae*, *Lucinidae*, gusanos los *pogonóforos* y las esponjas *Cadorhizidae* e *Hymedesmiidae*. Entre las diferentes especies que se han estudiado existen casi 64 que viven en simbiosis con bacterias oxidadoras de metano o sulfatos o ambas siendo a la fecha 211 especies. Comparativamente entre ventilas hidrotermales y sitios con infiltración de metano se han reconocido 13 especies comunes (Van Dover *et al.*, 2003). En la meiofauna compuesta de foraminíferos y nemátodos y de la meiofauna compuesta por poliquetos, bivalvos, copépodos, gasterópodos, anfípodos adaptado a altas concentraciones de H_2S , se alcanzan densidades de 52,593 ind/m⁻²

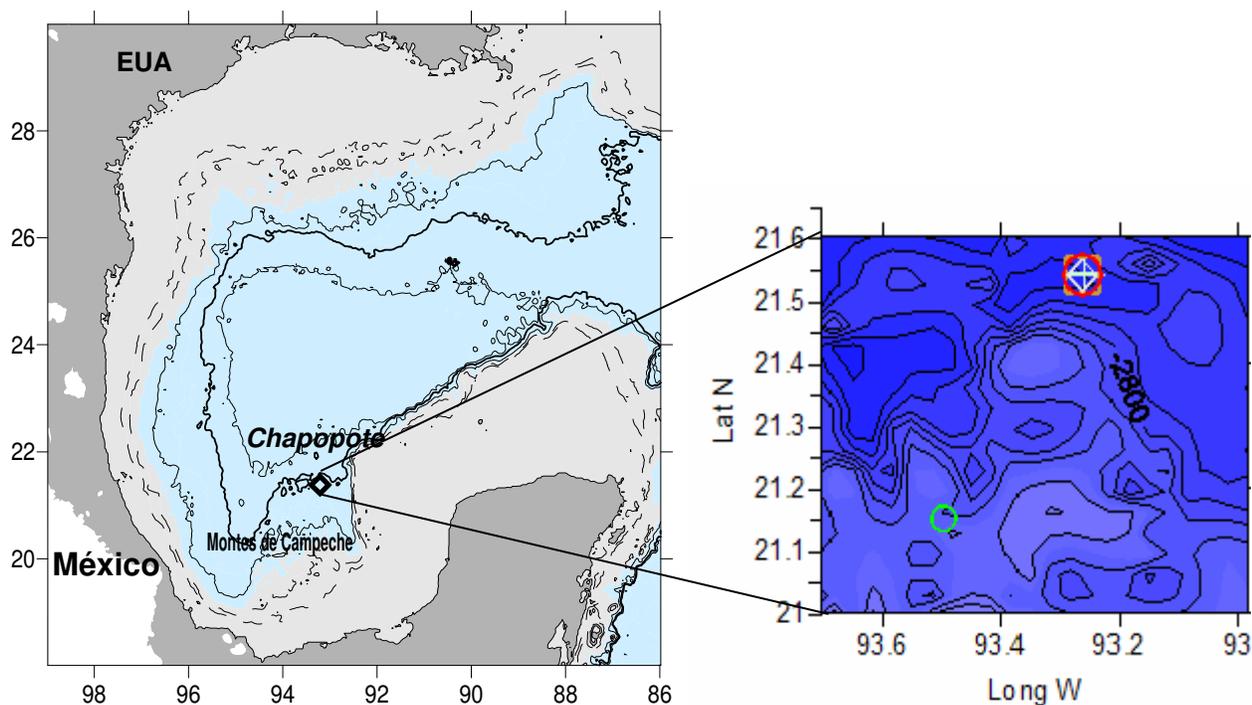
(Sergeeva y Gulin 2007). Las comunidades de mejillones, bivalvos y gusanos de tubo ofrecen condiciones adecuadas para el establecimiento de otras especies como el camarón *Alvinocaris*, cangrejos *Galatheidae*, así como para ofiúridos u holoturias que se establecen en estos sitios que junto con peces aprovechan la biomasa elevada de invertebrados (Carney 1994, Cordes *et al.*, 2007).

Área de Estudio

El Golfo de México está situado en la zona subtropical entre las latitudes 18° y 30°N y las longitudes 82° y 98°W. El golfo de México representa una de las grandes cuencas marinas regionales que limita las costas orientales de la Republica Mexicana. Éste ha considerado como un mar marginal de forma casi circular. El golfo de México posee un área similar a un círculo con un diámetro de 1,500 km (Salvador, 1991) con profundidades que van más allá de los 3,700 m y que se encuentra situado en la zona subtropical. Se comunica con el Océano Atlántico Norte por el estrecho de Florida y con el Mar Caribe por el canal de Yucatán (Monreal y Salas, 1997), creando un ambiente parcialmente aislado, que puede ser considerado un gran ecosistema marino, aunque con cierto intercambio (Wiseman y Sturges, 1999). Las principales masas de agua reconocidas en el Golfo de México son: el Agua Subtropical Subsuperficial del Caribe (AstSsC), el Agua Subtropical Subsuperficial del Golfo de México (AstSsGM), el Agua Común del Golfo (ACGM), el Agua Intermedia Antártica (AIA) y el Agua Profunda Noratlántica (APNA) (Monreal y Salas, 1997). Las aguas profundas del Golfo de México poseen características similares al Agua Profunda del Atlántico Norte, que han sido modificadas en su trayecto a través del Caribe, enriqueciéndose de nutrientes y disminuyendo ligeramente su concentración de oxígeno (Shiller, 1999). De manera general, entre los 1,000 y 2,000 m de profundidad se registra una salinidad de 34.96 y 34.99 UPS y una temperatura de 4 a 4.1° C (de la Lanza , 1991). Los perfiles de oxígeno y nutrientes (así como salinidad y temperatura potencial) no muestran gradientes significativos por debajo de los 1,500 m, (Shiller, 1999). El oxígeno disuelto en aguas del fondo se encuentra en concentraciones de 5 y 5.75 ml L⁻¹ (Shiller, 1999).

En el talud continental a profundidades de 500 y 1,000 m se han reconocido infiltraciones de hidrocarburos y presencia de hidratos de metano (Arvidson *et al.*, 2004). La zona de los montes de Campeche que se localiza en la Bahía de Campeche tiene una topografía 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). Los diápiros forman trampas o pasos de hidrocarburos provenientes de las capas inferiores (Ewing, 1991; Zhao y Lerche; 1993). MacDonald *et al.* (2004) describieron que uno de esos montes denominado *Chapopote* (21°54'N, 93°26'W) presentó depósitos de asfalto solidificado (Fig. 3 y Fig. 4, en la tabla 3 se muestran los sitios de muestreo). Este conforma un cráter encontrado en la cima de la estructura con asfalto que asemeja 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).



Figs. 3 y 4 Mapa del Golfo de México mostrando localización del volcán de asfalto denominado Chapopote y en él la ubicación de los sitios de muestreo de este estudio.

Tabla 3 Coordenadas de los sitios de muestreo en el volcán de asfalto, Chapopote.

	Sitio	Longitud. o N	Latitud. o W	Profundidad. (m)
1	06R1N1	21 14 97	93 49 77	2,296
2	12-2R2N1	21 54 23	93 25 92	2,943
3	13R1N1	21 54 12	93 25 65	2,902
4	14-1R1N1	21 53 97	93 26 19	2,897
5	19R1N1D	21 53 99	93 26 16	2,875
6	25-22R2	21 53 91	93 26 16	2,916

Objetivo

Este trabajo tiene como objetivo describir la ecología de la holoturia *Chiridota heheva* asociada al volcanismo de asfalto en el suroeste del Golfo de México.

Metas

- Establecer la identidad de la holoturia
- Describir el hábitat
 - Caracterizar el sustrato donde ocurre la especie a partir del tamaño de grano, análisis de video y fotografías.
- La composición elemental de C_{org} y N del sedimento para establecer la naturaleza de materia orgánica en localidades donde predomina la holoturia
- Describir la dieta que permita establecer el uso que la especie tiene sobre el hábitat
 - Revisión microscópica y descripción del contenido alimentario de holoturias recolectadas sobre el asfalto
 - Caracterizar la composición isotópica estable de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del tejido y contenido gástrico para establecer el origen de la dieta y la posición trófica de la especie
 - Secuenciar los contenidos gástricos y el sedimento abisal vinculando la diversidad molecular encontrada en ambos

Hipótesis

La población bacteriana es fundamental en la nutrición de *Chiridota heheva* en el volcán de asfalto

H° La población de *Chiridota heheva* no depende en esencia de los tapetes bacterianos del volcán de asfalto.

H° Las señales isotópicas de sedimento y organismos quimiosintéticos del volcán de asfalto son diferentes a otros sitios marinos alejados del volcán de asfalto.

H° La diversidad bacteriana es indicativa de condiciones ambientales del volcán de asfalto

Métodos

Trabajo de campo: Colecta de material biológico. Las muestras se colectaron en la región del suroeste del Golfo de México durante la campaña oceanográfica GeoB M67/2b “*Fluid seepage of Chile and in the Gulf of Mexico*” a bordo del B/O Meteor de Alemania. Esta colecta se realizó en el marco del proyecto de colaboración entre México, a través de la UNAM – Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y Alemania, con el Research Center Ocean Margins (RCOM) de la Universidad de Bremen y GEOMAR, en el estudio conjunto desde los procesos relacionados con infiltraciones de fluidos en el suelo oceánico. Para la colecta se empleó el RVO *Quest* (del inglés *Remote Operated Vehicle* -Vehículo operado a distancia- estos robots son particularmente útiles para estudios que se realizan cerca del fondo marino) con dos brazos mecánicos y capacidad de succionar y depositar en canastillas de acrílico a los organismos que se encontraban sobre el fondo. Así mismo se obtuvieron imágenes y video de la actividad de colecta y de la presencia de estos organismos ya que el robot cuenta con cámaras de navegación y de manipulación. Los organismos se colocaron en agua de sitio, enfriada a 4°C al llegar a bordo y se cubrieron para evitar su exposición directa al sol. En el laboratorio húmedo se procedió a medir los organismos, a tomar registro fotográfico y posteriormente a disectarlos para extraer el tubo digestivo. Del tubo digestivo se llevó a cabo el análisis de contenido estomacal, el análisis elemental, el análisis de isotopía estable y de fosfolípidos, para lo cual cada submuestra se preservó en forma distinta. Para el estudio del contenido gástrico la sección del tubo gástrico se conservó en frascos de vidrio de 17mL con glutaraldehído al 4% y buffer; que conserva las estructuras celulares; para los análisis biogeoquímicos el material se secó a bordo. Para la identificación de la especie el organismo y futuros estudios moleculares éste se conservó en etanol.

Las muestras de sedimento superficial se recolectaron con un nucleador múltiple (MUC) operado desde cubierta y núcleos colectados con el ROV que permiten elegir el tipo de fondo. En ambos casos se obtuvieron las réplicas para el análisis de C y N_{org} por subnúcleos de 1.8 cm de diámetro. Para cada réplica se seccionó éste en estratos que se nombraron nivel 1 (N1) al sedimento de 0 a 1cm al interior del sedimento, nivel 2 (N2) de 1.1 a 5cm, nivel 3 (N3) de 5.1 a 10cm. Cada sección se congeló a -20°C debidamente rotulada.

Trabajo de Laboratorio

Identificación de la holoturia. Para establecer la identidad de la holoturia se realizó la identificación de los organismos, extracción de espículas de la parte de los tentáculos en el laboratorio de taxonomía y sistemática de equinodermos las cuales se colocaron en un portaobjetos agregándoles hipoclorito de sodio (al 18%) para diluir el tejido y poder observar las ruedas y bastoncillos – midiendo un total de 10 piezas- que se encuentran en éstas. Se procedió a su revisión en microscopio (Leica DMIRB con un aumento de 20X-40X) para identificación de ruedas y bastoncillos tomado registro fotográfico.

Descripción del Hábitat

La caracterización del sustrato donde ocurre la holoturia se realizó a partir de la evaluación del tamaño de grano, la composición elemental del sustrato y la descripción a partir de imágenes y video obtenidos con el vehículo operado remotamente (ROV). El tamaño de grano y la composición elemental solamente se realizaron en localidades muestreadas donde ocurrió *Chiridota heheva*, en las localidades donde el sustrato fue asfalto y éste estuvo desprovisto de sedimento suave estos dos análisis no se realizaron.

Tamaño de grano. El análisis del tamaño de grano se realizó con el equipo láser, Coulter Modelo LS230 (Small Volume Modulo Plus). La estrategia seguida consistió en medir el tamaño de las partículas por difracción del haz de luz láser la cual es usada como un contador de todas las partículas que atraviesan el haz y difractan la luz. El análisis granulométrico se realizó en partículas con tallas en un intervalo de 0.04 a 2000 μm . La medición se requirió que la muestra (aproximadamente 0.1 g) estuviera dispersa y seca. De cada muestra se realizaron cinco a seis lecturas repetidas dependiendo de la homogeneidad. En muestras húmedas se tomó una porción pequeña lo más homogénea, representativa de toda la muestra, que se colocó en un vaso de precipitado de 50 mL junto con 30 mL de una solución dispersante de hexametáfosfato de sodio (100g/l de agua destilada) donde se dejó por 24 h para que actuara el dispersante en la muestra y procediera a disgregar todas las partículas. Posteriormente se agitó y homogenizó la muestra y con una pipeta Pasteur se tomó una pequeña porción que se adicionó al equipo láser. El equipo se mantuvo encendido con anticipación por lo menos 2 hrs. previo a aplicar la muestra para estabilizar la temperatura del instrumento, variable importante en la medición. El equipo tiene la capacidad de reconocer si la cantidad de muestra es

aceptable en un intervalo entre 8 y 12% de obscuración, para iniciar el análisis de tamaños de partículas. Una vez analizada la muestra, el equipo envió la información a la computadora y transformó la información detectada en una gráfica (% de volumen de muestra vs. diámetro de partículas), y el listado de todos tamaños de partículas detectados. Con los valores de las repeticiones en cada muestra analizada, se obtuvo un promedio final, la gráfica promedio y se determinaron los parámetros estadísticos texturales (Tabla 4) que incluyeron: tamaño de grano promedio, M_z ; desviación estándar, σ_I ; grado de asimetría gráfica inclusiva S_{ki} , y curtosis, K_G (Folk, 1974).

$$\begin{array}{l} \text{Promedio gráfico (media)} \\ \text{Desviación estándar gráfica inclusiva} \end{array} \quad \begin{array}{l} M_z = (\phi_{16} + \phi_{50} + \phi_{84}) / 3 \\ \sigma_I = \phi_{84} - \phi_{16} + \phi_{95} - \phi_5 \end{array}$$

Tabla 4. Clasificación del tamaño de grano (tomado de Gray 1981).

Tamaño de grano Mm	Escala phi (ϕ)	Tipo de Sedimento
256	-8	Guijarro
64	-6	Guijarro
16	-4	Grava
4	-2	Grava
2	-1	Gránulos
1	0	Arena muy gruesa
0.5	1	Arena gruesa
0.25	2	Arena mediana
0.125	3	Arena fina
0.0625	4	Arena muy fina
0.031	5	Limos gruesos
0.0039	8	Limos
0.002	9	Limos
0.00006	14	Arcillas

Composición elemental del sustrato. Para el análisis de carbono y nitrógeno orgánico el sedimento se descongeló en el laboratorio a temperatura ambiente y se colocó en vasos de precipitado, para acidularse con una solución de HCl 0.2 N y con ello eliminar el exceso de carbonatos. Para eliminar el exceso de ácido se enjuagó con agua bidestilada a alcanzar un pH de 7. El sedimento se secó en horno a 60 °C, una vez seco completamente se molió y se colocó en viales de vidrio debidamente etiquetados para el análisis elemental. El porcentaje de carbono y nitrógeno orgánico se determinó por triplicado en un analizador elemental FISSONS modelo EA1108 siguiendo la técnica descrita en Pella (1990). Esta estrategia se basa en la combustión de la muestra

previamente pesada y empaquetada en un contenedor de estaño/aluminio, a una temperatura de 925-1000°C en atmósfera de oxígeno puro. Los gases obtenidos, arrastrados por flujo de Helio son filtrados a través de una serie de agentes químicos para eliminar los Halógenos, el Azufre y el Fósforo. Al pasar por un filtro de cobre granulado calentado a 650° se elimina el oxígeno sobrante y reduce los óxidos de nitrógeno a N₂, y por otro convierte el CO en CO₂. Finalmente los gases obtenidos (CO₂, N₂ y H₂O) controlados en condiciones de temperatura, presión y volumen se separan por una columna cromatográfica a cuya salida se sitúa un detector de conductividad térmica que traduce el caudal de los gases en una corriente eléctrica proporcional. Estas corrientes, una vez procesadas junto al peso de la muestra y a las constantes internas del equipo, son las que indican los porcentajes de cada elemento en la muestra, unidades de medición con respecto al peso seco. La desviación típica de esta estrategia fue menor del 0.3% absoluto.

Identificación de Hábitats

Para la identificación del hábitat se realizó la revisión de al menos 30 fotografías de cada una de las campañas realizadas en la zona de estudio (Tabla 5): 37 imágenes de dos inmersiones del equipo OFOS durante la campaña SO-174 (realizada a bordo del B/O SONNE en Octubre-Noviembre de 2003) y 30 imágenes de alta resolución provenientes de inmersiones de la campaña M67/2b (realizada a bordo del B/O Meteor en Febrero-Marzo de 2006). Las imágenes se obtuvieron mediante las cámaras del ROV *Quest*. Las cámaras con las que cuenta el ROV son: 1 cámara de video DSPL SSC 6500 Color-zoom, 1 cámara de video Insite Pegasus Colorzoom, 2 cámaras de video Insite Aurora FixFocus, 1 cámara de video Broadcast Quality Insite Scorpio 3.4 Mpix. El video se grabó con los programas los programas Adobe Premiere Pro, Adelle GIS (Arc View), Adelle Video (VCR remote controler). El estudio sistematizado de estos videos permitió reconocer y describir los hábitats en que ocurren las holothurias. Las imágenes y los videos se analizaron en formato de imagen *.jpg y *.bmp.

Tabla 5. Número de imágenes analizadas de cada campaña en la zona del volcán de asfalto tomadas mediante

Año	Campaña	Inmersión	N° imágenes
2003	SO-174	OFOS 13	30
		OFOS 14	7

2006	M67/2b	D81	5
		D83	25

En cada imagen se evaluó el número de holoturias presente y el grado de agregación. Para el análisis se procuró que el ángulo de toma de cada imagen fuera el mismo así como la altura a la cual se obtuvo cada imagen. Este estudio no tuvo como finalidad determinar densidades (ind./área) o tallas ya que existen diversas variables y criterios (punto de fuga, transparencia del agua, iluminación similar, apertura del diafragma, etc.) que requerían haberse contemplado durante la toma de éstas y no fue factible llevarlos a cabo dado la naturaleza exploratoria de ambas campañas. Las imágenes provienen de diversos hábitats asociados al volcán de asfalto permitiendo con ello reconocer a partir de la mayor abundancia (número de individuos) y grado de agregación de *Chiridota heheva* y la preferencia de hábitats por los organismos.

Los datos se clasificaron por tipo de fondo (suave, duro y con bacterias) y por la heterogeneidad generada por otra fauna asociada, la topografía de macro y microescala y la bioturbación o actividad quimiosintética presente en el fondo. Los datos clasificados se analizaron con un anova de una vía con 95% de confiabilidad

Descripción de la dieta. La revisión de los contenidos gástricos se realizó con un microscopio óptico siguiendo la estrategia descrita en Hudson (2004) tomando una alícuota de contenido estomacal, diluida en 1mL de agua destilada, colocada en un portaobjetos, cubriendo y sellando. Cada muestra se observó en un microscopio Zeiss Axiostar plus con objetivos de 10x y 40x y se registraron los diferentes campos fotográficamente con una cámara Cannon adaptada a la computadora. Para describir el contenido estomacal se realizó microscopia de epifluorescencia usando para ello tinción 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). Para lo cual se efectuó una dilución de 10µL de contenido estomacal en 1 mL de agua libre de bacterias previamente filtrada a través de Acrodiscos de 0.2µm. La dilución se filtró utilizando una membrana de policarbonato (películas que no tienen estructura filamentosa y son homogéneas) de 25 mm de diámetro con una apertura de poro de 0.2 µm posterior a la cual se tiñó con 10 µL de solución DAPI, esperando 5 minutos para su tinción. El filtro se colocó en un portaobjetos con una gota de aceite de inmersión, se le colocó el cubreobjetos y se agregó una gota de aceite de inmersión para su observación en microscopio de fluorescencia con

un objetivos de 100x en un microscopio Leica DMLB y se realizó el registro fotográfico en al menos 30 campos en cada preparación con la cámara Canon adaptada a computadora.

Para el análisis isotópico estable del tejido de la holoturia (músculo y contenido gástrico) se procedió a enjuagar con agua bidestilada, posteriormente se acidularon con HCl 0.2 N para eliminar la presencia de carbonatos de calcio que forman las espículas. Los carbonatos están más enriquecidos en ^{13}C que el carbono orgánico y pueden resultar en datos equivocados análisis de materia orgánica si éste no se ha removido (Newman, 1991). La acidulación remueve los carbonatos previa la evaluación en el espectrómetro de masas (Jacob *et al.*, 2005). Es recomendable hacerlo gota por gota hasta liberar todo el CO_2 (Jacob *et al.*, 2005), el cese del burbujeo nos indica que los carbonatos han sido removidos aunado a un pH ácido de la mezcla, posteriormente se enjuagan con agua destilada para remover el ácido (Newman, 1991; Kang *et al.*, 2003) y al alcanzar un pH de 7, se congelaron para inmediatamente liofilizarlas en el Instituto de Química, hasta secar completamente el tejido. Posteriormente se molieron en mortero de ágata y se colocaron en viales de vidrio limpios. Mediante un espectrómetro de masas se determinó la proporción de isótopos estables de carbono y nitrógeno, separando los núcleos atómicos con base en su relación masa-carga (m/z).

Los espectrómetros de masas también denominados *cromatógrafos de gases*, que puede ser acoplado a un *espectrómetro de gases*. En esta técnica se calienta, hasta vaporizar e ionizar la muestra, estos iones se envían en un compartimiento aceleración y se pasan a través de una lámina metálica. Un campo magnético se aplica a un lado del compartimiento que atrae a cada uno de los iones con la misma fuerza (suponiendo carga idéntica) y los desvía sobre un detector. Naturalmente, los iones más ligeros se desviarán más que los iones pesados porque la fuerza en cada ion es igual pero tienen menos masa. El detector mide exactamente cuan lejos se ha desviado cada ion y de aquí se calcula el "cociente masa por unidad de carga". De esta información es posible determinar con un alto nivel de la certeza cuáles era la composición química de la muestra original; para este análisis se peso alrededor de 1mg de muestra de tejidos (liofilizados, molidos y homogeneizados) y los datos son expresados en ‰ - partes por mil (Kang *et al.*, 2003). Los análisis fueron realizados en el laboratorio de espectrometría de masas del instituto de geología el material de referencia es PDB para ^{13}C y nitrógeno atmosférico para ^{15}N

Secuenciación de contenido gástrico. Para la extracción de DNA del contenido gástrico como para la de la muestra de sedimentos superficiales se utilizó el procedimiento modificado de Zhou (1996) en Mouneé *et al.*, (2003).

Para el contenido gástrico se realizó un enjuague de la muestra en agua Milli Q tres veces previo al protocolo de extracción que se aplica a las dos muestras de sedimento del volcán de asfalto, la primera etiquetada como GOM_A presenta características típicas de mar profundo sin presencia de hidrocarburos en ninguno de sus subniveles. La muestra dos, etiquetada GOM_B representa al sitio con infiltración de hidrocarburos y se caracteriza por olor a petróleo, presenta una coloración oscura.

Protocolo de Extracción de DNA usado para las muestras obtenidas.- Las muestras permanecieron en hielo hasta que se agregaron los primeros reactivos.

- 1.- 6.75 mL de buffer de extracción (100mM TrisHCl pH8, 1.5M NaCl pH8, 100mM EDTA, 100mM fosfato de Na, 1% CTAB) a aproximadamente 2.5 g de sedimento. Se usaron tubos falcon de 15mL

Se congeló con N₂ líquido y se derritió a 65°C tres veces.

- 2. – La tercera vez se dejó equilibrar a 37°C y se añadieron 25 µL proteinasa K (20mg/mL), Se agitó horizontalmente a 37°C por 30 min.
- 3.- Se agregaron 0.75 mL SDS 20%. Se incubó a 65°C por una hora y cada 15-20 min. Se realizó un movimiento suave de inversión de los tubos.
- 4.- Se centrifugó a 4,000 rpm 12min a 4°C, coleccionar todo el supernadante en tubos limpios y se le agregó igual volumen de cloroformo/isoamil alcohol, (24:1 vol/vol) para limpiar de compuestos orgánicos mezclando suavemente por inversión (no se usó el Vortex porque podría dañar el DNA)
- 5.- Se centrifugó de nuevo a 4,000 rpm por 12min a 4°C
- 6.- Se recuperó la fase acuosa (probando con una gota de agua para asegurarse cuál era la fase acuosa). En caso de que la muestra presentara turbidez o precipitados se repitió la limpieza de nuevo con cloroformo/isoamil alcohol.
- 7.- Se agregó 0.6 vol de isopropanol y se incubó por una hora a temperatura ambiente para precipitar el ADN.
- 8.- Se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C por 15 min. para concentrar en el fondo el ADN.
- 9.- Se decantó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 10-20 mL de etanol 80% frío.
- 10.- Se centrifugó de nuevo a 13,000 rpm a 4°C durante 15 min, se decantó sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente.
- 11.-Se resuspendió en 40-50 µL de agua Milli-Q para PCR.

El bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB) es un compuesto que se usa para extraer las paredes celulares. Otros compuestos activos que son utilizados para la degradación de polisacáridos y restos celulares son la polivinil-polipirrolidona (PVPP), el

ascorbato de sodio (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001, Juniper *et al.*, 2001) o el citrato de sodio (Edwards *et al.*, 2000, Sørensen, *et al.*, 2004); El dodecil-sulfato sódico (SDS ó NaDS) también conocido como laurel-sulfato sódico (SLS), es un compuesto tensoactivo iónico y sirve para retirar aceites y grasas (Mouneé *et al.*, 2003).

PCR.- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR-por sus siglas en inglés) es un método que amplifica fragmentos de ADN. En este estudio se utilizaron los cebadores o “primers” GM3 (5’AATTTATTATTCTGGTAAGACATTC ‘3)/ GM4 (5’-AAAGTTTTAATAATTTATTATTCTGG-3’) oligonucleótidos para la amplificación del gen 16s RNAr bacteriano.

Una mezcla maestra, o *master mix*, base para la amplificación de las muestras de ADN.

Master mix 1X (1 reacción)

5X buffer	5.0µL
MgCl ₂	2.5µL
BSA	0.75µL
dNTPS	0.625µL
Primer 1 ó F-1	0.25µL
Primer 2 o F-2	0.25µL
Tagploimerasa	0.25µL
HO	14.375µL

Para cada muestra se colocan 24 µL de la mezcla base X 1µL de ADN

Condiciones del termociclador (Eppendorf Master cycler gradient), programa para GM3 y GM4.

1- 94 °C	2 seg	} 30 veces
2- 94 °C	45 min	
3- 43 °C	45 seg	
4- 72 °C	90 seg	
5- GOTO	2 rep.	
6- 72 °C	7min	
7- 4°C	conservar	

La presencia de ADN y su concentración se comprueba en nano-drop que es un espectrómetro de rango amplio (UV/VIS) 220-750nm, y se requiere a partir de 1µL de muestra para su medición, con alta precisión y reproducibilidad. Se realizó un segundo PCR para ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis)(Ver Anexo 3)

Por cada 50 µL de reacción se calculó el volumen final de reacción concentración de 20-25ng/tubo (dilución en agua TAE) preparando en la siguiente mezcla maestra para PCR en hielo, en oscuridad cubriendo de la luz a los cebadores.

Creación de librería de clonas.- La clonación de los productos se realiza en el vector

pGEM TEasy de acuerdo a las indicaciones del kit “pGEM-TEasy Vector System I Fa. Promega”. Las clonas con inserto se seleccionaron de acuerdo al tamaño del plásmido observado en un gel de agarosa al 1% (Juniper *et.at.*, 2001). La extracción de DNA (Kit Mobio o Extracción Manual según Zhou, 1996) para el PCR fue

Componentes de mezcla base

	1X
dNTPs	2 μ L
10X Buffer	2 μ L
Primer GM1(100 μ M)	0.2 μ L
Primer GM12(100 μ M)	0.2 μ L
Eppendorf Taq Polimerasa	0.1 μ L
H ₂ O-PCR	12.5Ll
DNA (25ng/ μ L)	1 μ L
Temperatura de alineamiento	70°C (tapa a 110°C)

El gel se corrió por electroforesis para verificar presencia de DNA, la purificación de los Productos se realizó mediante kit QIAquick. La ligación de vector (pGEM-TEasy) se realizó siguiéndole siguiente protocolo:

2x buffer de ligación rápida T4-DNA Ligasa	5 μ L
pGEM-TEasy Sistema vector I (25ng)	0.5 μ L
T4 DNA ligasa	1 μ L
Producto de PCR	x μ L
H ₂ OPCR	X μ L
Volumen final	10 μ L

Nota: se dejó toda una noche

Transformación:

1 μ L producto de ligación

25 μ L TOP10-Cell (se conservan a -80°C)

- 1 se mantuvo en hielo no menos de 30min.
- 2 30 seg. en baño a 42°C
- 3 2 min. en hielo
- 4 se agregaron 250 μ L de medio SOC (estéril)
- 5 se mantuvo 1hr. a 37°C agitando
- 6 se añadió en forma cruzada en los platos con agar y LB (ver apéndice) por cada muestra 5 cajas Petri con agar adicionando entre 30-50 μ L por caja
- 7 se incubó por 14hrs

Selección de clonas blancas.- Se preparó el plato de pozos profundos con 300 μ L de medio de LB/Ampicilina-80 μ L/mL en cada pozo. Con un palillo estéril se seleccionaron las clonas blancas y se añadieron en cada pozo (se esperaron 96 clonas del total de todas las caja Petri). Se sellaron con cinta e incubaron bajo agitación (250 rpm) por 16hr a 37°C

Stocks de glicerol.- Se combinaron 50µL de cultivo con 50µL de glicerol en microplatos (pozos pequeños) se sellaron y mezclaron suavemente manteniendo en refrigeración a -20°C. Se insertó el control de ThermoFast 0.2 mL en 96 muestras de las cuales 94 correspondieron a clonas, 1 control positivo y un control negativo.

Mezcla maestra	1reacción
dNTPs	2µL
10 X Buffer	2µL
Primer 1 M13F(50µM)	0.2µL
Primer 2 M13R(50µM)	0.2µL
Eppendorft Taq polimerasa	0.05µL
H ₂ O-PCR	12.55µL
<u>Producto de cultivo</u>	<u>1µL</u>
Volumen final	20µL

El programa M13K fue:

Inicio a 110°

95° 05min

95° 01min

60° 01min

72° 03min

Inicio y 2 Rep 39

72° 10min

Mantener a 4°

Terminar el gel de electroforesis a 80V por 45min.

Purificación con sephadex

Secuenciación de clonas positivas:

Mezcla maestra:	1 reacción
Big Dye(Bd)	1µL
Buffer	1µL
Primer GM1	1µL
H ₂ O-PCR	1µL
<u>Producto</u>	<u>1µL</u>
Volumen final	5µL

Programa para el Termociclador SeqGM1F

Tapa a 110°

96° 10min

R=1°/s

56° 05seg

60° 0.4min

Ir a 1 rep 39

Mantener a 4°C Finaliza.

El producto terminado se envía a secuenciación. Con base en la metodología antes descrita se obtuvo ADN del contenido gástrico de las holoturias, se amplificó y se creó una librería de clonas las cuales se secuenciaron, y se obtuvieron 46 secuencias de uno de los contenidos; se asignó a cada clona su afiliación taxonómica más específica posible según las secuencias del Genbank (ver Tabla 4 sección de Resultados).

El análisis filogenético se realizó con las diversas secuencias obtenidas con los programas GeneMapper, R, PAST, BioEdit, y con una comparación con las bases de datos GenBank que contienen una gran cantidad de secuencias de 16S RNAr. Mediante el programa ARB se crea un árbol filogenético. Éste es un programa que incluye diversas herramientas para la manipulación de la secuencia de bases y análisis de datos. La base de datos central de procesado (alineado) y secuencias de datos adicionales vinculados a las respectivas entradas de secuencias se estructura con base en la filogenia. Lo anterior se logra con base en una matriz usando la distancia de Phylip o usando parsimonia, mayor similitud de secuencias alineadas el cual construye pequeños árboles añadiendo secuencias que presenten mayor similitud, las herramientas de análisis como fasta, blast zucker y fastDNAMl, permite optimizar la creación de árboles y árboles subalternos con los diferentes parámetros, permite además una alineación de secuencias automática o manual. El árbol filogenético se realizó aplicando las herramientas integradas en la paquetería. La máxima parsimonia y la optimización de la reconstrucción completa de los árboles que representan la secuencia completa de datos requirieron más de 20,000 entradas (Wolfgang *et. al.* 2004).

Resultados

Identificación de la holoturia. La identidad de la holoturia permitió reconocer que los organismos colectados se identificaron como la especie *Chiridota heheva*. La especie se ubica taxonómicamente como:

Phylum Echinodermata

Clase: Holoturoidea

Orden: Apodida

Suborden: Synaptida; Smirnov, 1998

Familia: Chiridotidae Östergren 1898

Género: *Chiridota* Eschscholtz, 1829

Especie: *Chiridota heheva*, Pawson y Vance, 2004

Diagnosis. Estos organismos presentan 12 tentáculos con un disco terminal caracterizados por un soporte de bastoncillos y anillos calcáreos que utilizan como dedos que son libres y se extienden durante la alimentación. La dermis está cubierta con puntos blancos numerosos y conspicuos, el tejido muscular se caracteriza por espículas características del tipo ruedas de papilas -llamados en inglés wheel papillae- (Fig. 6) El cuerpo es cilíndrico, con una longitud de aproximadamente 132 mm y con un diámetro proporcional al 5 % de su longitud (Fig. 5), en vivo estos organismos pueden exceder los 200mm (Pawson y Vance, 2004).



Fig.5. *Chiridota heheva*, se ilustra su coloración púrpura y manchas blanquecinas en un ejemplar recién colectado. Imagen E. Escobar

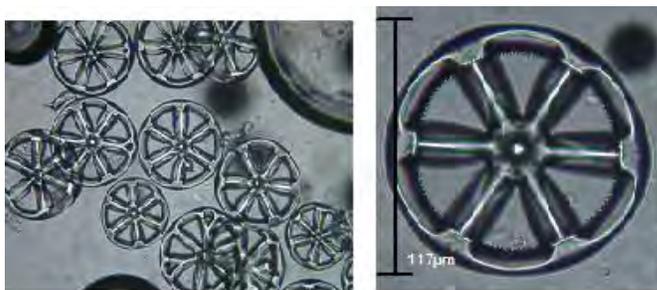


Fig. 6. Espículas del tipo ruedas de seis rayos, característica de *Chiridota heheva*. Imagen Ramón Velázquez.

En la tabla 6 se muestra un comparativo entre *Chiridota* hidrotermica y *Chiridota heheva*, ambas holoturias se reportan para ambientes extremos la primera para ventilas hidrotermales y la segunda para infiltraciones frías, se muestran sus semejanzas y diferencias.

Tabla 6. Análisis comparativo entre las especies de *Chiridota* encontradas en ventilas hidrotermales y en infiltraciones frías.

	<i>C. hydrothermica</i>	<i>C. heheva</i>
Tentáculos		
Número	12	12
Forma	como lóbulo	almohadilla con dedos
Procesos	formados por fusión	bifurcados
Anillo calcáreo		
Depresión posterior	si y profunda	si y profunda
Mediodorsal interracial	si	si
Ventral	con perforaciones	sin perforación
Dorsal	con perforaciones	bipartida
Espículas		
Forma	rueda con 6 rayos	rueda con 6 rayos
Talla	66-202µm	175-177µm
Agregadas en papilas	si numerosas y conspicuas	si numerosas y conspicuas
Ubicación	todo el cuerpo	todo el cuerpo
Especulas tentaculares		
Forma	En varas	En varas
Longitud	140-250µm	100-202µm
Vesículas polianas	20	20 ó más
Embudos ciliares	solo uno	no presenta
Longitud (mm)	8- 15 cm.	20 cm.
Diámetro (mm)	1.3-1.8 cm.	1.5 cm.
Referencia (Autor, año)	Smirnov <i>et al.</i> , 2000	Pawson y Vance, 2004

Descripción del Hábitat

Tamaño de grano. En los fondos lodosos de las localidades 1 y 2 se reconoció la predominancia de limos en un porcentaje mayor al 60%, en las demás localidades los limos representados por arriba del 50%. Las arcillas se presentaron en un 17 % en la localidad 1 y 29% en el sitio 2, y fueron mayores al 40% para los sitios 3 a 6. Las arenas se registraron en 16% para el sitio 1, solamente el 5.9% en el sitio 2 y en 3.3% para el sitio 3, en las localidades las arenas estuvieron en menos del 1%, siendo menor aún en el sitio 6. Estos resultados reconocen un predominio de limos seguido por arcillas y prácticamente la ausencia de las arenas, que corresponden a sitios mas alejados del volcán de asfalto (Tabla 7, Fig. 7). Sobre el asfalto el sedimento está ausente y no representan valores para estas localidades donde la abundancia de holoturias es mayor.

Tabla 7 Distribución porcentual del tamaño de grano de las localidades con sedimento.

Sitio	Porcentaje (%)			
	ARENA	LIMO	ARCILLA	TOTAL
06R (1)	16.93	65.79	17.28	100
12-2R (2)	5.93	64.78	29.29	100
13R (3)	3.33	55.62	41.06	100
14-1R (4)	0.12	54.69	45.20	100
19R (5)	0.15	55.56	44.29	100
25-22 (6)	0.07	53.65	46.28	100

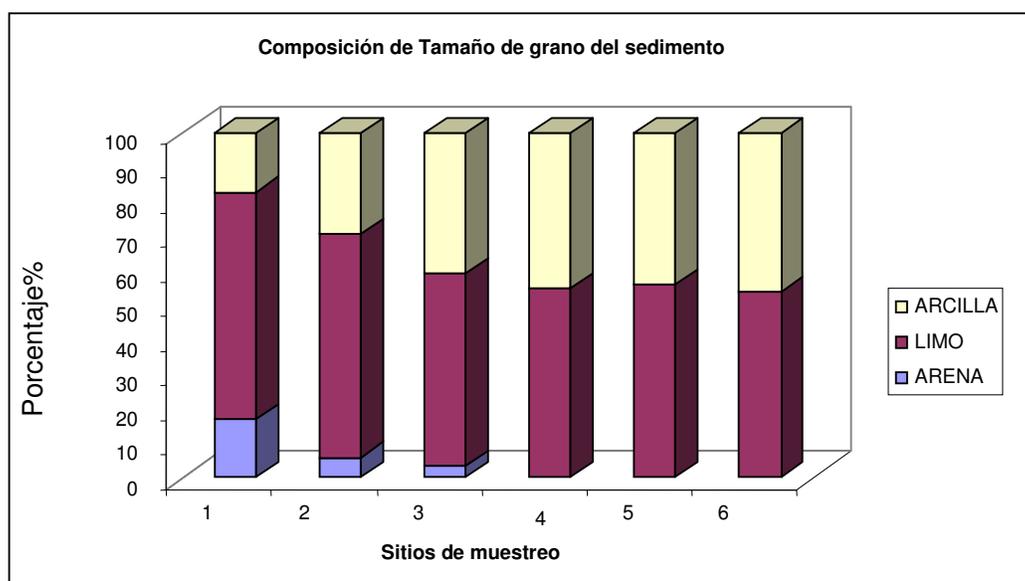


Fig. 7 Distribución del tamaño de grano encontrado en fondos con sedimento suave donde ocurre *Chiridota heheva*.

Composición elemental del sustrato de los sitios de muestreo. La composición elemental del sedimento superficial varió ampliamente de una localidad a otra. Los valores de N variaron de 0.14 a 0.34% (Fig. 8) y los valores de C org se registraron en un intervalo de 1.31 a 22.53% (Fig.9), en cada una de estas localidades el azufre estuvo presente en un intervalo de 0.53 a 3.35. La proporción C/N varió de 8.96 a 70.22 (Tabla 8). Las diferencias entre localidades de sedimentos blandos para las concentraciones del N fueron significativas [$F_{(5, 38)}=12.899$, $p = .0000002$] al igual que para el caso del carbono orgánico [$F_{(5, 38)}=49.727$, $p=.00000$]. La relación entre *Chiridota heheva* y los valores elementales de C y N presentes en la localidad donde fueron recolectadas las holoturias se caracteriza por tener sedimentos lodosos con un 53% limo, 46.2% de arcillas y 0.06% de arenas. Para esta localidad el porcentaje de C_{org} fue 1.83%, para N de 0.17%, el S de 1.68% y la relación C:N fue de 11.05 (Fig. 10)

Tabla 8 Porcentajes de C, N y S orgánicos, proporción C:N en sedimentos del volcán de asfalto.

Sitio	%C	Des Est.	% N	Des Est.	C:N	Des Est.	%S	Des Est.	Prof. (m)
06R (1)	1.31	0.98	0.14	0.01	8.96	6.46	0.97	1.10	2296
12-2R (2)	1.83	0.45	0.25	0.07	7.45	1.91	0.14	0.23	2943
13R (3)	5.01	0.75	0.16	0.01	32.23	3.52	1.04	0.13	2902
14-1R (4)	2.79	0.38	0.20	0.04	14.34	2.37	0.53	0.28	2897

19R	(5)	22.53	7.47	0.34	0.10	70.22	24.56	3.35	1.22	2875
25-22	(6)	1.83	0.06	0.17	0.01	11.05	0.36	1.68	2.62	2916

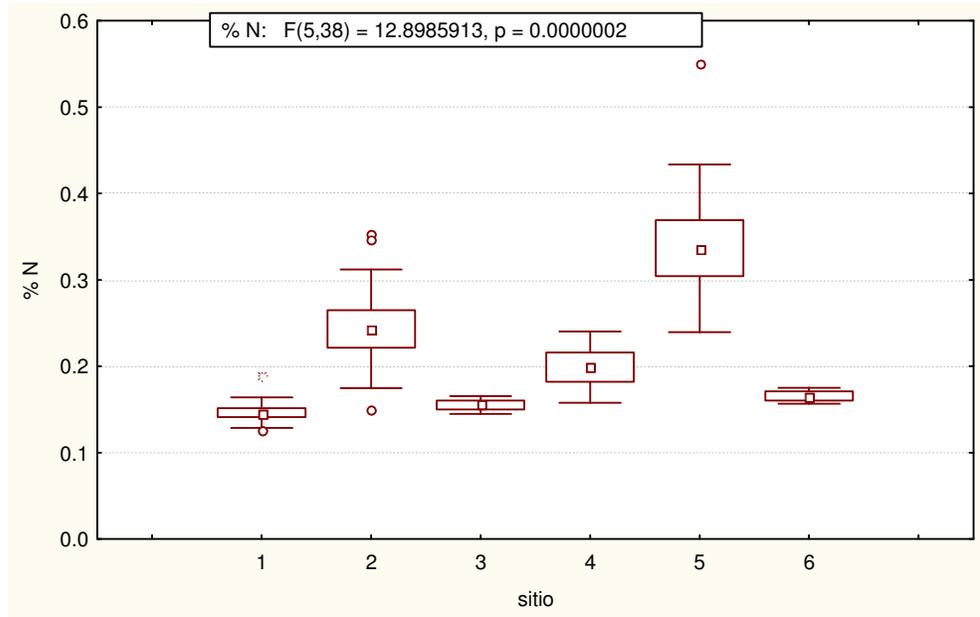


Fig. 8 Diferencias en la concentración del porcentaje de Nitrógeno en el sedimento superficial para las localidades de sedimentos suaves. Revisa, creo que las figuras no coinciden como se citan en el texto.

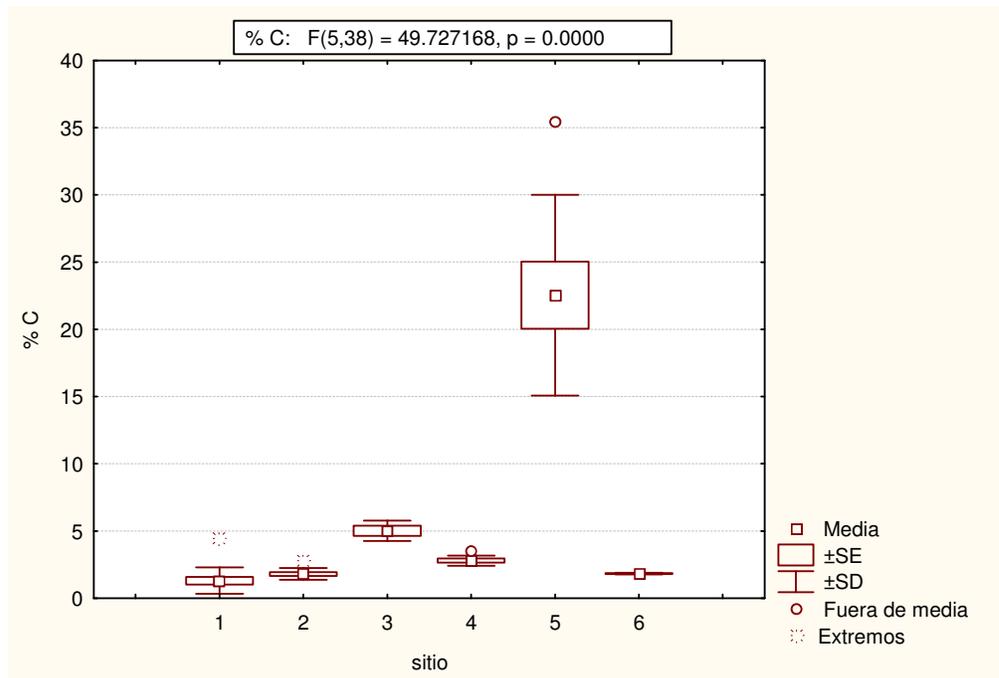


Fig.9 Diferencias en la concentración del porcentaje de Carbono orgánico en el sedimento superficial para las localidades de sedimentos suaves.

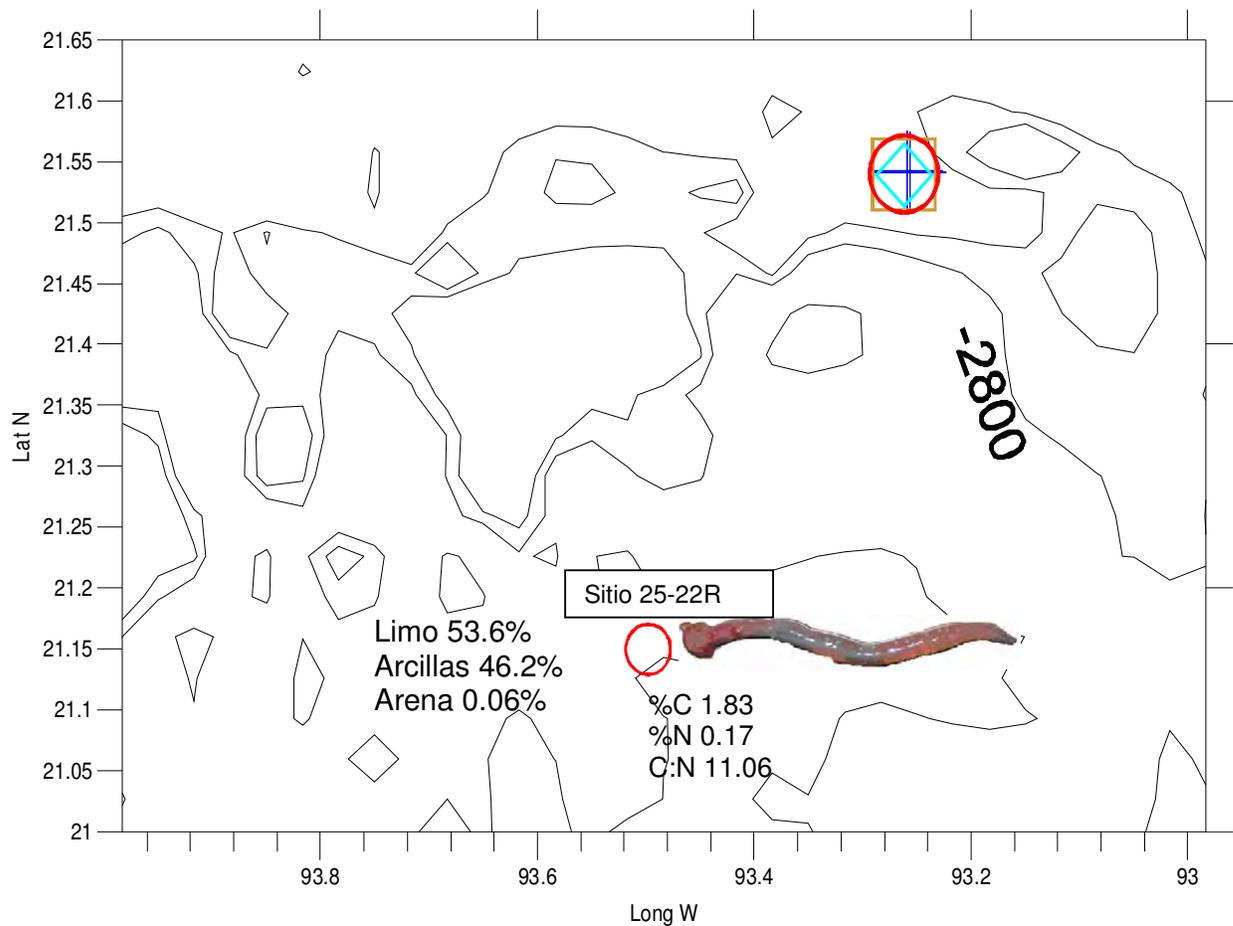


Fig. 10 Mapa donde se ilustran los datos de sedimento en el sitio de colecta de las Holoturias *Identificación del hábitat con video e imágenes.*

Preferencia del hábitat de la holoturia *Chiridota heheva*. Los hábitats en los cuales ocurren las holoturias son fondos suaves y fondos duros con asfalto (Tabla 9) En éstos la presencia de bacterias establece la presencia de actividad quimiosintética sobre el fondo y se considero un tercer tipo de fondo, así mismo se menciona el número de holoturias observadas en cada imagen.

Tabla 9 Clasificación de las imágenes por tipo de fondo, abundancia de la holoturia *C. heheva* y tipo de distribución para cada inmersión y campaña.

Campaña	Inmersión	ID Imagen	Tipo de fondo	Número de holoturias	Tipo de distribución	Observaciones	
SO-174	OFOS 13	13134	Abisal	2	Agregados	Actividad biológica	
		13138	Abisal con concha	2	Agregados	Con algo de asfalto. Gusanos de tubo	
		13140	Abisal con concha	1	Solo	Con algo de asfalto	
		13141	Abisal con concha	1	Solo	Con algo de asfalto, cangrejos y gusanos de tubo	
		13142	Abisal con concha	6	Agregados	Con algo de asfalto, cangrejos y gusanos de tubo	
		13143	Abisal con concha	14	Agregados	Con asfalto y actividad biológica, cangrejos	
		13144	Abisal con concha	4	Disperso	Con asfalto y actividad biológica, cangrejos	
		13145	Abisal con concha	1	Solo	Con asfalto y actividad biológica, cangrejos	
		13146	Abisal con concha	9	Agregados	Con asfalto y actividad biológica, cangrejos	
		13147	Abisal con concha	7	Agregados	Con asfalto y actividad biológica, cangrejos	
		13148	Abisal con concha	2	Agregados	Con asfalto y actividad biológica, cangrejos	
		13149	Abisal con concha	10	Agregados	Con asfalto y actividad biológica, cangrejos	
		13277	Abisal con concha	5	Agregados	madrigueras, un cangrejo	
		13278	Abisal con concha	15	Agregados	madrigueras, un cangrejo	
		13279	Abisal con concha	18	Agregados	madrigueras, un cangrejo	
		13280	Abisal con concha	22	Agregados	madrigueras, 4 cangrejos	
		13281	Abisal con concha	1	Solo	madrigueras, 3 cangrejos	
		13282	Abisal con concha	1	Solo	madrigueras, 1 bivalvo	
		13283	Abisal con concha	12	Agregados	madrigueras, un cangrejo	
		13284	Abisal con concha	16	Agregados	madrigueras, asfalto	
		13285	Abisal con concha	4	Disperso	con asfalto y detrito costero	
		13286	Abisal con concha	4	Agregados	con asfalto, conchas, madrigueras, tapete bacteriano	
		13287	Abisal con concha	1	Solo	con asfalto, conchas, madrigueras, tapete bacteriano	
		13288	Abisal con concha	1	Solo	con asfalto, gusanos de tubo, cangrejos	
		13289	Abisal con concha	1	Solo	con asfalto	
		13328	Abisal con concha	12	Agregados	con actividad y bivalvos	
		13329	Abisal con concha	11	Agregados	con actividad y bivalvos	
		13330	Abisal con concha	11	Agregados	con actividad y bivalvos	
		13331	Abisal con concha	6	Agregados	con actividad y bivalvos, cangrejo	
		13350	Abisal con concha	3	Disperso	asfalto, gusanos, tapete, estrella	
		OFOS 14	14263	Tapete bacteriano	6	Disperso	suave, oscuro
			14075	Grava de asfalto	1	Solo	gusanos de tubo
			14167	Flujo de asfalto	1	Solo	líneas de bacterias
14169	Flujo de asfalto		2	Disperso	líneas de bacterias		

		14170	Flujo de asfalto	3	Disperso	gusanos de tubo
		14172	Flujo de asfalto	3	Disperso	gusanos de tubo, cangrejo
		14173	Flujo de asfalto	4	Disperso	Cangrejo
M67/2b	ROV 8x D81	6504	Flujo de asfalto	1	Solo	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía
		6507	Flujo de asfalto	29	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias
		6508	Flujo de asfalto	37	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias
		6512	Flujo de asfalto	5	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias
		6513	Flujo de asfalto	6	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía
	ROV 8xD83	6692	Flujo de asfalto	1	Solo	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía
6697		Flujo de asfalto	21	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias	
6698		Flujo de asfalto	7	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias	
6699		Flujo de asfalto	6	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias	
6700		Flujo de asfalto	21	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , Lago de bacterias	
6701		Flujo de asfalto	19	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , Lago de bacterias	
6702		Flujo de asfalto	12	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , Lago de bacterias	
6703		Flujo de asfalto	25	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , Lago de bacterias	
6704		Flujo de asfalto	20	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , Lago de bacterias	
6705		Flujo de asfalto	22	Agregados	gusanos de tubo. Cangrejos , Lago de bacterias	
6706		Flujo de asfalto	5	Disperso	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía	
6707		Flujo de asfalto	2	Disperso	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía	
6711		Flujo de asfalto	1	Solo	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía	
6717		Flujo de asfalto	1	Solo	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía	
6718		Flujo de asfalto	3	Disperso	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía	
6721		Flujo de asfalto	1	Solo	gusanos de tubo. Cangrejos , bacterias topografía	
6761		Lago de bacteria	30	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos	
6762		Lago de bacteria	51	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos	
6763		Lago de bacteria	14	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos	
6764		Lago de bacteria	15	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos	
6765		Lago de bacteria	25	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos	
6766		Lago de bacteria	22	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos	
6767		Lago de bacteria	19	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos	
6768	Lago de bacteria	9	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos topografía		
6769	Lago de bacteria	15	Agregados	gusanos de tubo y cangrejos		

Los fondos finos, más típicamente abisales, se subdividieron a la vez en los subtipos fondos con actividad y conchas, fondos abisales típicos con madrigueras, fondos con tapetes bacterianos y fondos con gravas de asfalto (Fig.11).

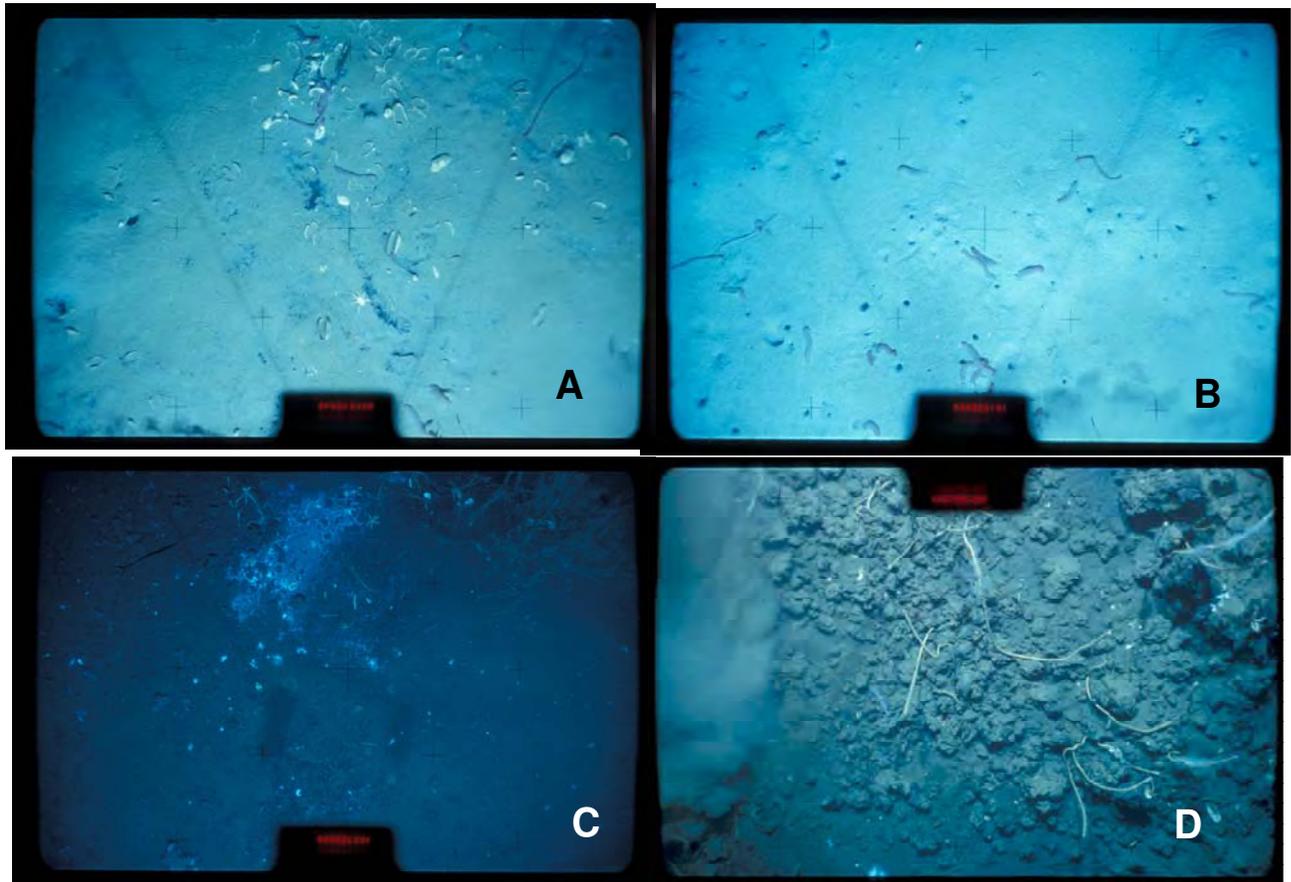


Fig.11 a) fondos con actividad y conchas, b) fondos abisales típicos con madrigueras, c) fondos con tapetes bacterianos y d) fondos con gravas de asfalto. Imágenes Sonne 174

Los fondos duros se caracterizaron por flujos de asfalto los cuales presentaron en algunos casos topografía con elevaciones, domos o bien carecieron de estas elevaciones y en presentaron contraste canales cuando la morfología fue del tipo de “ropy lava” y las bacterias se presentan como cordones bacterianos, bandas amplias y hasta extensiones a manera de lagos (Fig. 12).

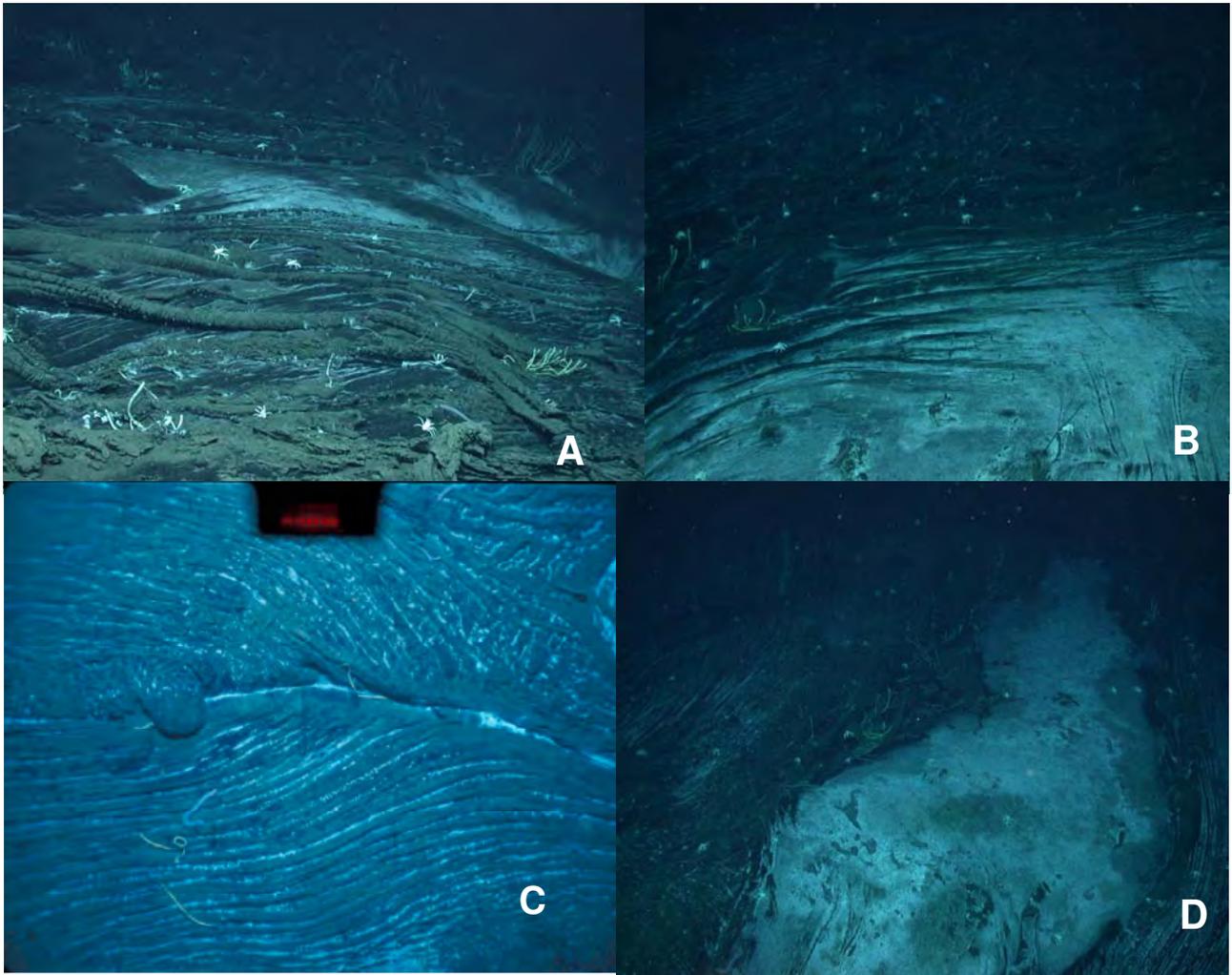


Fig. 12 A) Fondos con elevaciones topográficas, B y C) Fondos con canales bacterianos; C) lago de bacterias. Meteor 2006

Abundancia de *C. heheva*

La abundancia de holoturias es menor en sedimentos suaves (1 a 22 ind. \bar{x} 6.9; σ 6.0) que en fondos duros (de 9 a 52; \bar{x} 9.9 y σ 10.5). La abundancia fue más elevada en fondos con flujo de asfalto comparado con los fondos de sedimento suave abisal (Fig. 13). Estos flujos forman estructuras laminares determinadas por la densidad y velocidad de emanación, que van rellenando los paisajes bajos y los alrededores del punto de emanación, presentando una variedad de relieves y texturas en función de las condiciones de flujo. En éstos la presencia de bacterias en sus diversas modalidades (manchones, cordones y extensiones) agregó al número mayor de holoturias (9 a 51 ind \bar{x} 12.5 y σ 22.2) mostrando diferencias significativas entre los tres tipos de fondos en los cuales se registraron las holoturias *C. heheva* (ANOVA, $F_{(2,64)}= 10.7977$, $p=0.00009$) (Fig.13)

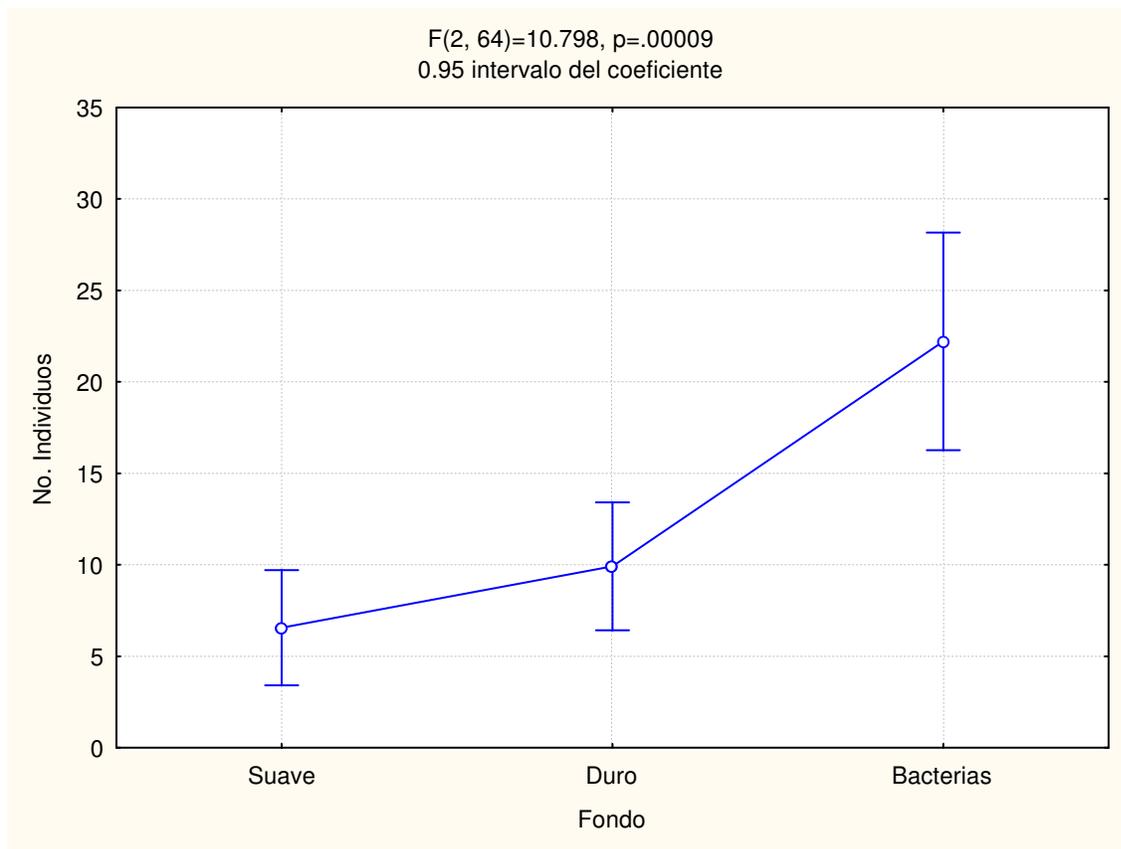


Fig.13 Análisis ANOVA donde se muestran las diferencias entre los hábitat donde se observa la presencia de holoturias

Sedimentos abisales suaves. Los hábitats con conchas mostraron de 1 a 14 individuos con organismos dispersos con la mayoría de holoturias solitarias.

Los hábitats abisales con madrigueras mostraron valores de abundancia variables ocurriendo de 1 a 22 individuos. Los hábitats de los fondos abisales suaves con actividad (huellas-*tracks* y bioturbación) mostraron a las holoturias en patrones tanto agregados como disperso de las holoturias con abundancias variables de 1 a 22 individuos así como sus promedios (Tabla 10). Las diferencias entre los hábitats reconocidos en los fondos abisales suaves asociados al volcán de asfalto fueron significativas (ANOVA $F_{(2,28)}=3.7374$, $p=0.2238$) (Fig. 14)

Tabla 10.-Muestra promedio desviación estándar de la abundancia de Chiridota heheva en hábitats con fondo suave

Fondo Suave Abisal	Abundancia		N
	Promedio	Desviación estándar	
1 Con actividad y marcas	8.4	2.3	5
2 Con actividad y asfalto	4.2	1.3	17

3 Con madrigueras	11.3	1.9	8
4 Negro con tapete bacteriano	3.5	3.7	2

En los fondos suaves otros hábitats reconocidos incluyen fondos con grava de asfalto, sedimentos suaves negros con tapete bacteriano (Fig. 14). En estos sitios la abundancia varió de 1 a 6 individuos con holoturias que ocurren tanto solas y en pequeños grupos distribuidos en forma azarosa.

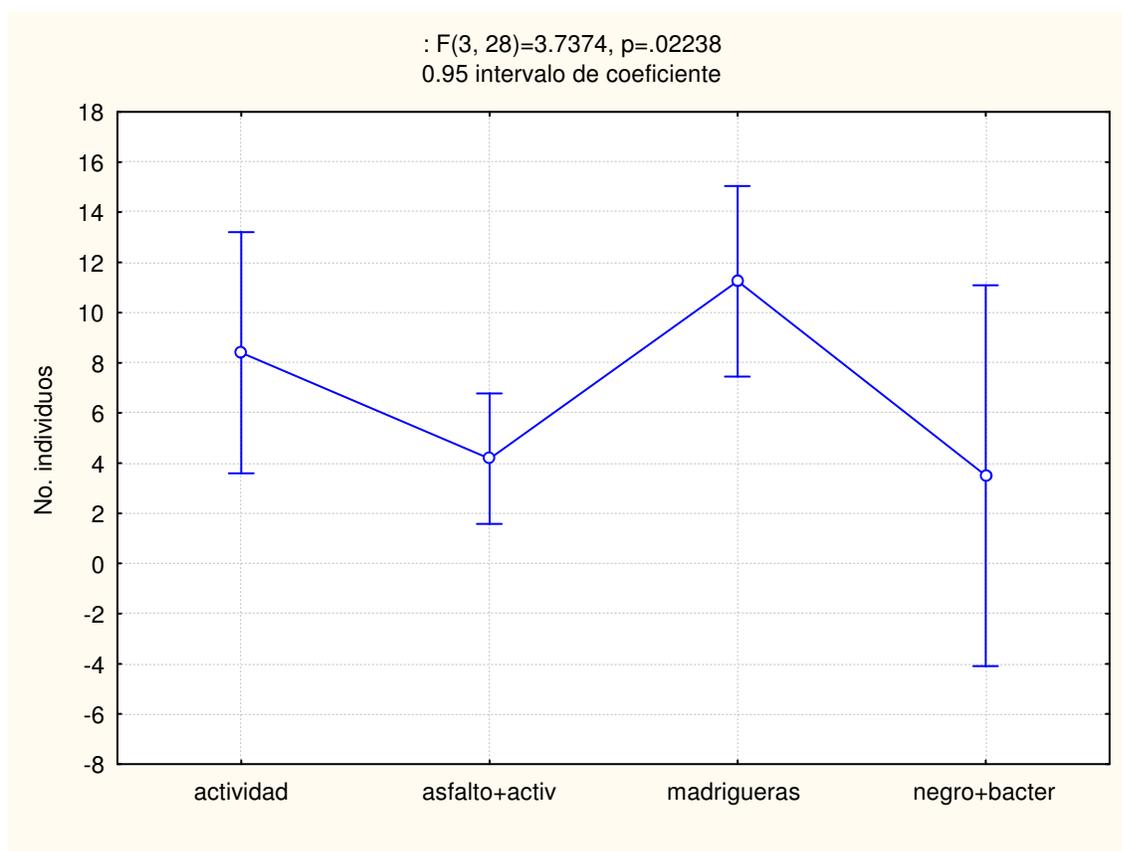


Fig. 14 Variación de la abundancia de la holoturia *C. heheva* en los hábitat reconocidos en los fondos suaves.

Los sitios de flujo de asfalto con tapete bacteriano representan una abundancia mayor con 5 a 29 individuos, mayoritariamente en forma agregada, así como la presencia de gran cantidad de gusanos de tubo y cangrejos asociados.

En los fondos con flujos de asfalto donde existe topografía vertical con grandes montículos o cerros caracterizados por las formaciones de almohada y lóbulos bulbosos con gusanos de tubo y cangrejos (Fig.15) la abundancia de las holoturias es baja con 1 a 6 individuos comúnmente en forma agregada; Las diferencias entre los diferentes hábitats de fondos duros asociados al volcán de asfalto fueron significativas (ANOVA $F_{(2,32)}= 10.23$,

p=0.00037) como se muestra en la Fig. 15 con la mayor abundancia asociada a fondos duros con bacterias. La tabla 11 muestra valores relativos a los hábitats de fondo duro con diferente topografía.

Tabla 11. Valores promedio de la abundancia para cada tipo de hábitat en los fondos duros asociados al volcán de asfalto.

Fondo Duro	Abundancia		
	Promedio	Des. Est.	n
Macrotopografía	2.8	2.8	12
Microtopografía	18	2.4	17
Bacterias	19.8	4	6

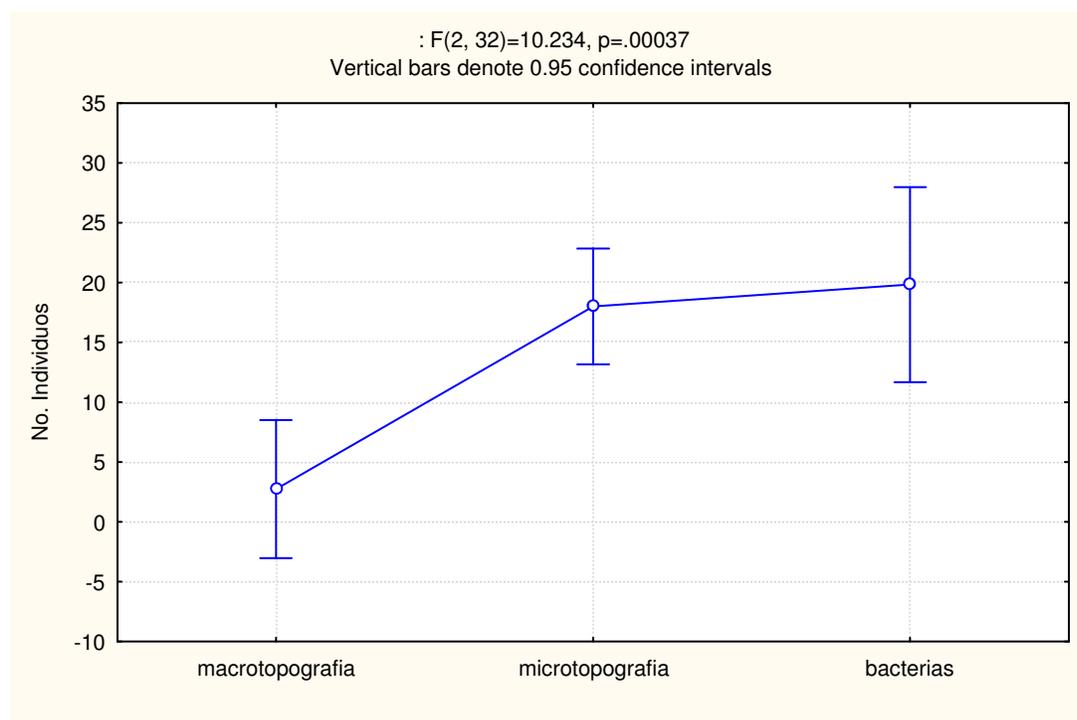


Fig. 15 Variación de la abundancia de la holoturia *C. heheva* en los hábitats de los fondos con flujo de asfalto

Contenido estomacal. En una primera aproximación con microscopía óptica se reconocieron restos de algas, de organismos de la macrofauna, así como foraminíferos, diatomeas y fragmentos de asfalto. Se logró contabilizar un total de 336 foraminíferos que representan un 21%, 1265 partículas de fitodetritus que representan un 78%, 19 restos de metazoarios que representan un 1% (Tabla 12; Figs.16-18), también se muestra la presencia de bacterias mediante imágenes de microscopia fluorescente (Fig.19).

Tabla 12 Resumen de la revisión con microscopía óptica

Muestra	Réplicas por preparación	N° de campos revisados	Fitodetritus	Foraminíferos	Restos de
					Metazoarios
R5	5	119	494	122	8
R7	5	116	405	88	4
R8	5	113	366	126	7
Totales	15	348	1265	336	19
		Porcentajes	78%	21%	1%

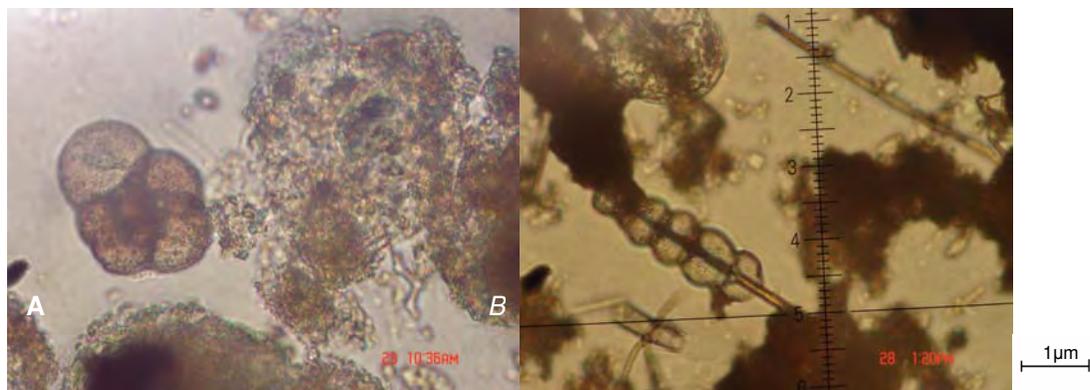


Fig. 16 A Foraminíferos y fitodetritus en el contenido estomacal de *Chiridota heheva* y B Foraminíferos, fitodetritus, espículas y frústulas de *Chaetoceros* (Ehrenberg 1844). Imagen Ramón Velázquez

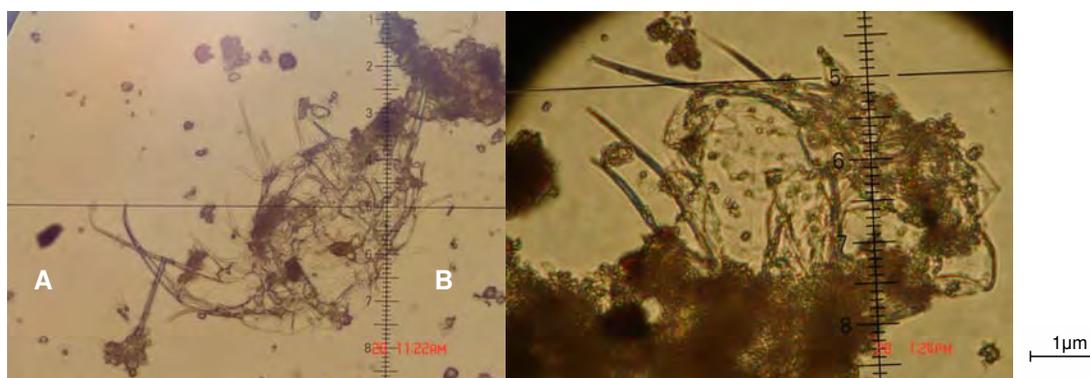


Fig. 17 A y B Restos de metazoarios sin identificar. Imagen Ramón Velázquez

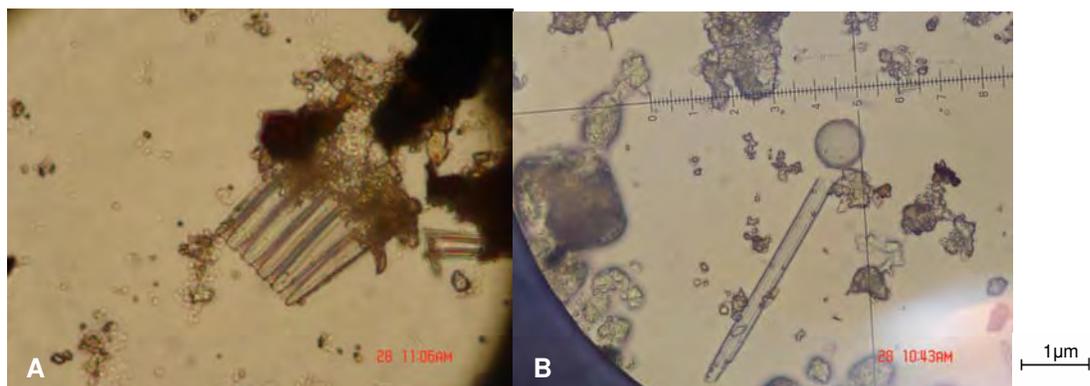


Fig. 18 A y B Restos de componentes de fitodetrito. Imagen Ramón Velázquez

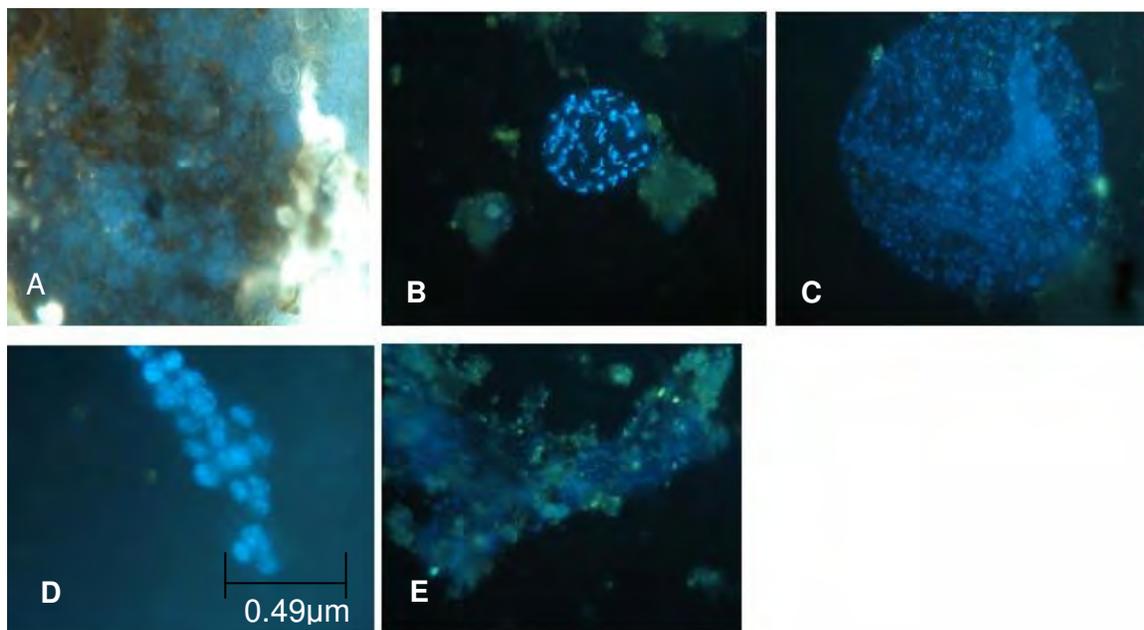


Fig. 19 Imágenes de microscopia de epifluorescencia en muestras del contenido estomacal de la especie *Chiridota heheva*, de la localidad Chapopote en el SW del Golfo de México preparadas con DAPI. A. Fitodetrito; B. Bacterias en detrito, C y D. Ensamblaje de bacterias, E. Detrito. Imágenes tomadas con cámara Cannon con un aumento 100x microscopio Leica DMLB (unidad de rejilla 0.49 μ m) Imagen Ramón Velázquez

Caracterización isotópica estable. El tejido de los organismos recolectados en el volcán de asfalto se caracterizó por valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ enriquecidos para el músculo y empobrecidos para el contenido estomacal y son presentados en la tabla 13, en la Fig. 20 se muestra la relación isotópica de componentes potenciales de su dieta y bacterias asociadas en infiltraciones frías.

Tabla 13 Resultados de Isotopía realizada en Músculos y tejido intestinal de la holoturia

Muestra	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$
R5 Músculo	6.17	-37.66
R7 Músculo	6.67	-33.15
R8 Músculo	7.82	-36.26
R7 Tejido de intestino	3.08	-35.98

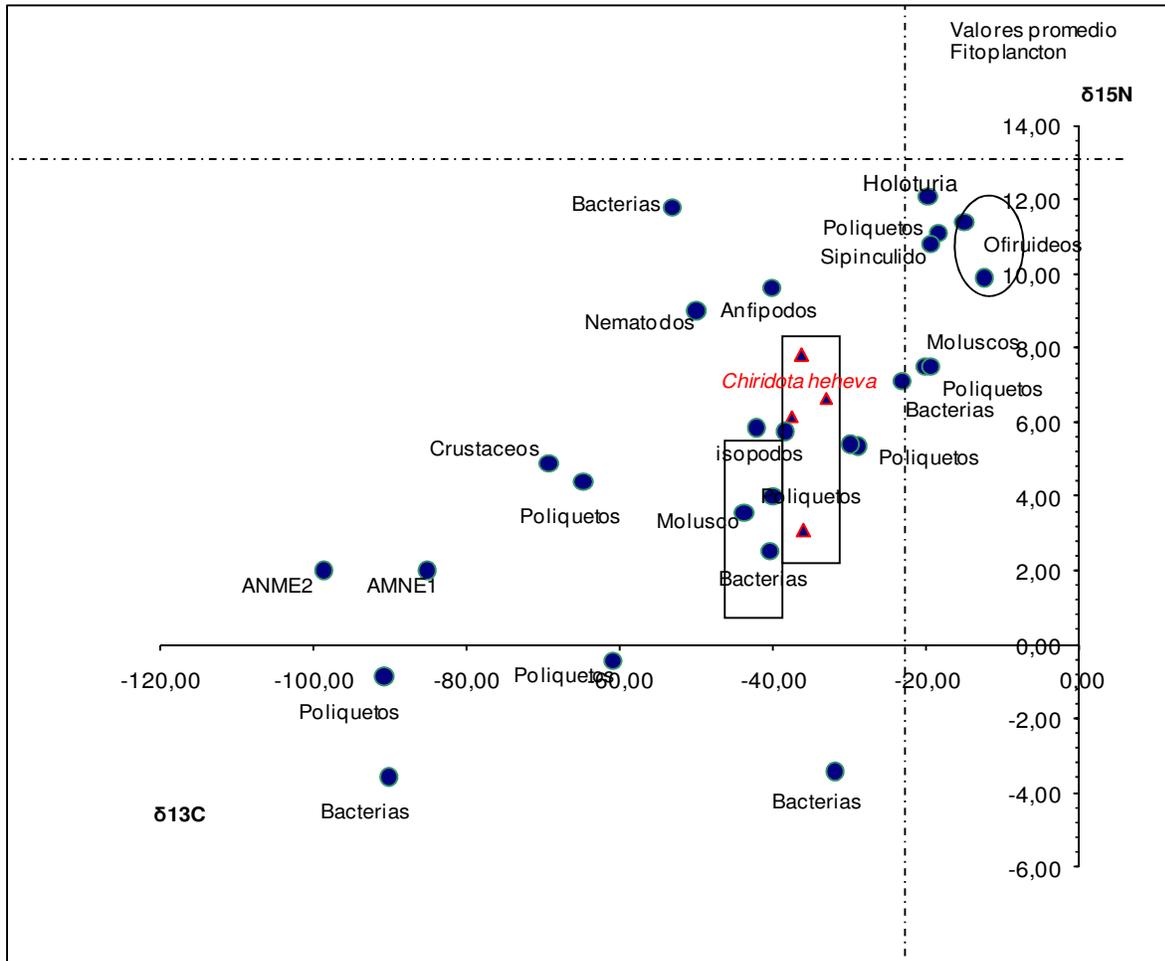


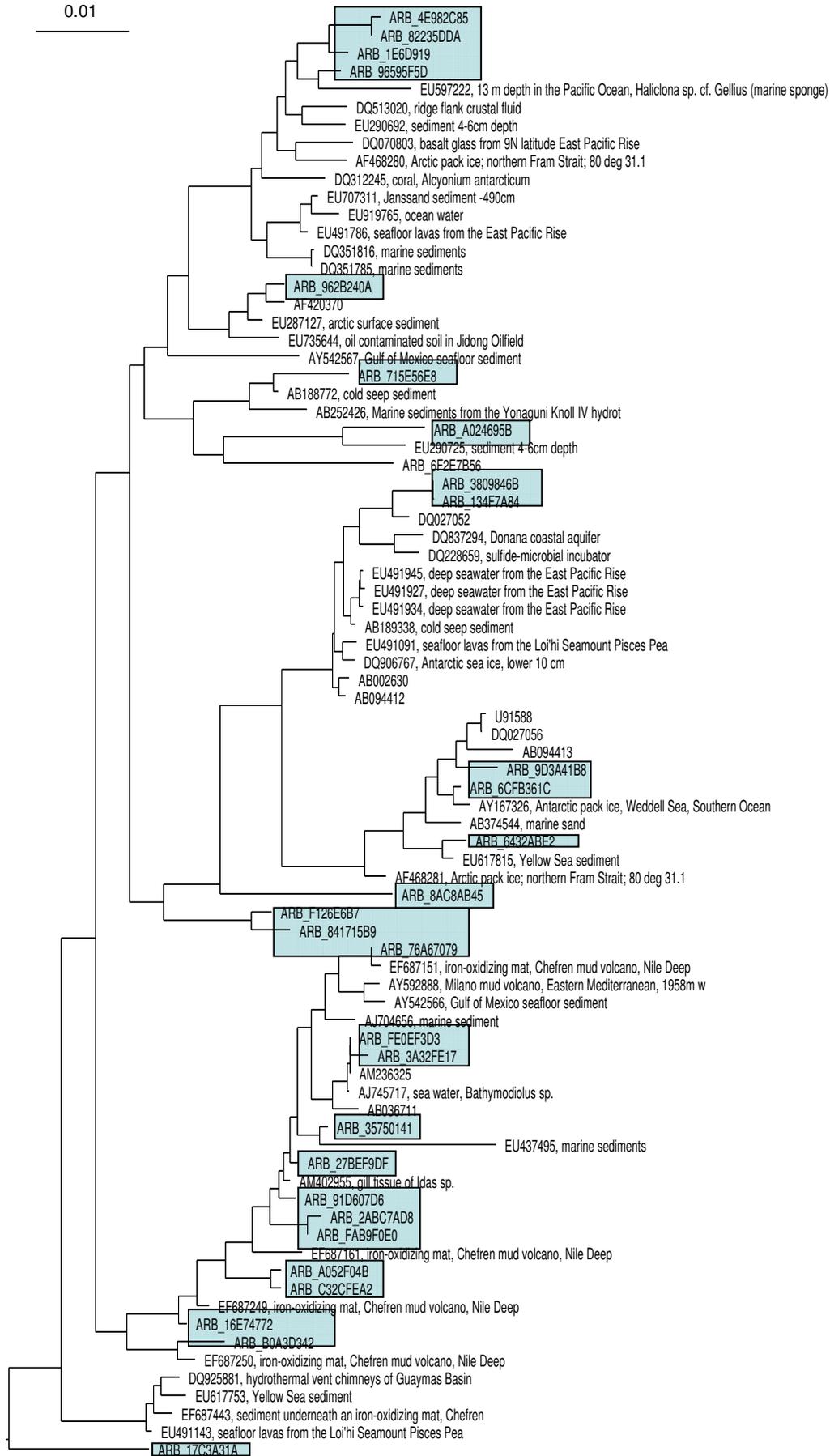
Fig. 20 Relación isotópica estable de los componentes dietéticos potenciales de *Chiridota heheva* con base en organismos y tipos de bacterias reconocidos en infiltraciones de metano en el Golfo de México.

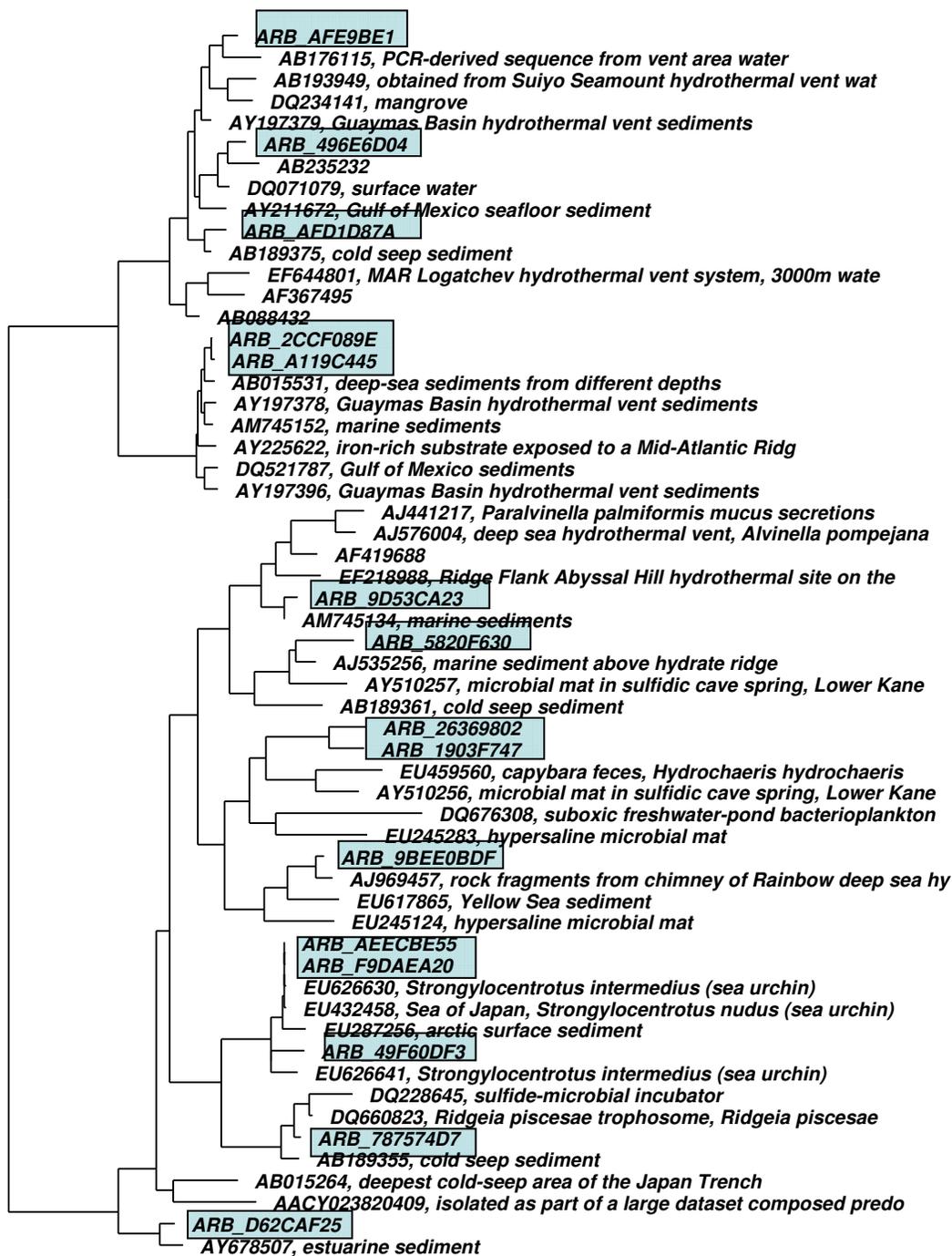
Secuencias de contenido estomacal de Chiridota heheva. El 26% de las secuencias del contenido estomacal de la holoturia pertenecen al phylum γ -proteobacterias siendo éstas las de mayor presencia, en un 9% se reconocieron Bacterias no cultivables no clasificadas, en un 7% se reconocieron Bacterias Metanotróficas, Verrucomicrobiales, y δ -proteobacterias, con un 4% se reconocieron Bacterias Firmicutes no cultivables, ϵ -proteobacterias, *Bdellovibrio* y *Metilobacteria luteus*, y finalmente con un 2% se reconocieron *Planctomycetes*, *Geobacter sp.*, *Psicromonas sp.*, *Sulfiromonas sp.*, *Shewanella sp.*, *Metilobacter sp.* y *Halomonas sp.* (Tabla 14), Análisis filogenético de las secuencias obtenidas del contenido estomacal, presentan las mayores similitudes con ambientes de infiltraciones de metano o presencia de hidrocarburos, por otra parte algunas de las secuencias encontradas se han reportado como bacterias presentes en megafauna de infiltraciones frías (Fig.21).

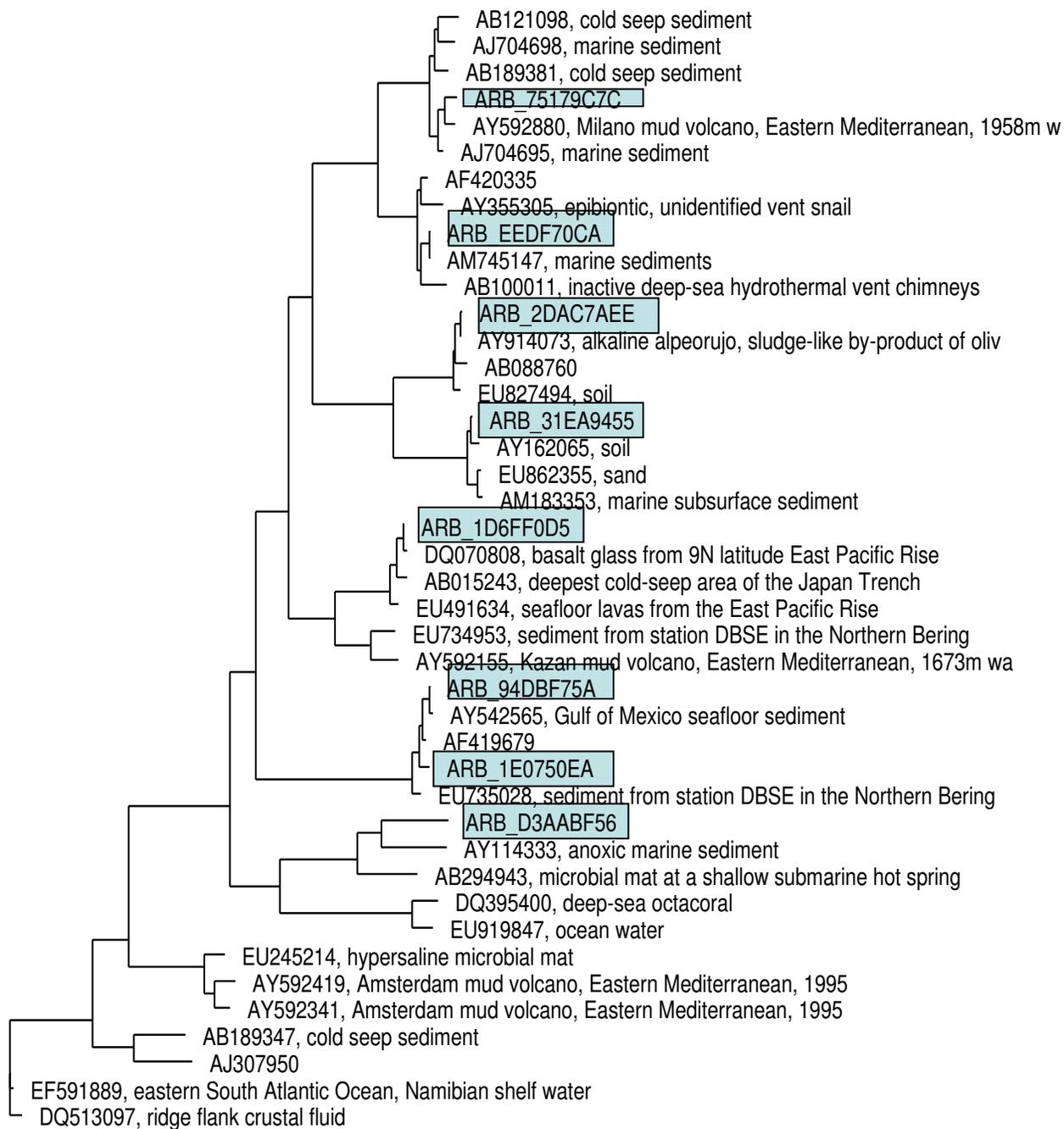
Tabla 14 Clasificación de las secuencias de las clonas obtenidas. La *secuencia más parecida* es el número de acceso de la secuencia más cercana encontrada en las bases de datos GenBank. El taxon asignado es el grupo al que pertenece la secuencia más parecida. IS es el índice de similitud que asignó GenBank.

Nombre de la secuencia	Acceso Genbank	Referencia	Proveniencia	IS (índice de similitud) Genbank	N° de Secuencias
Cytophagales	AJ535257.1	Knittel,K., <i>et al.</i> 2003	Margen Cascadia , Oregon	97%	
y proteobacterias	DQ351807	Gillan y Pernet. 2007		95%	
y proteobacterias	AB239061	Arakawa., <i>et al.</i> 2006	Mar de Japón	92%	
y proteobacterias	AY542557	Martínez <i>et al.</i> , 2006	Golfo de México	94%	
Bacterias	AB176030	Hara. <i>et al.</i> , 2004	Arcos Izu-Ogasawara Japón	93%	
Bacterias Metanótrofas	AM236325	Hara. <i>et al.</i> , 2004	Arcos Izu-Ogasawara Japón	99%	
Bacterias Metanótrofas	AM236325	Duperron <i>et al.</i> 2007	Golfo de México	99%	
Verrucomicrobiales Sva0700	AJ297462	Ravenschlag <i>et al.</i> , 2000	Sedimento de infiltración fría	90%	
Metylobacter luteus	AF304195	Ahmad <i>et al.</i> , 2001		97%	
Bacterias	AB424853	Kato <i>et al.</i> , 2008	Trinchera Mariana	96%	
Bacterias metanótrofas	AM236325	Duperron <i>et al.</i> 2007	Golfo de México	99%	
y proteobacterias	AY542571	Martínez <i>et al.</i> , 2006	Golfo de México	98%	
ε proteobacterias	AY211658	Mills <i>et al.</i> , 2003	Golfo de México	96%	2
y proteobacterias	AY197379	Dhillon <i>et al.</i> , 2003	Cuenca de Guaymas	97%	
Bacterias	AF419688	Teske <i>et al.</i> , 2002	Cuenca de Guaymas	91%	
y proteobacterias	AJ535221	Knittel <i>et al.</i> , 2003	Margen Cascadia , Oregon	97%	
Bacterias	AB293009	Oba <i>et al.</i> , 2007	Trinchera Mariana	94%	2
δ proteobacterias	AJ535236	Knittel <i>et al.</i> , 2003	Margen Cascadia , Oregon	99%	
y proteobacterias	AJ704661	Losekann 2007	Mar de Barents	96%	
Bacterias	AF419679	Teske 2002	Cuenca de Guaymas	99%	
ε proteobacterias	AY542610	Martínez <i>et al.</i> , 2006	Golfo de México	98%	
y proteobacterias	AJ704666	Losekann 2007	Mar de Barents	91%	2
y proteobacterias	AB188772	Fang 2006	Bahía Sagami , Japón	95%	
Shewanella sp. Proteobacterias	AM111038	Zeng (sin publicar)	Pacifico Este	93%	
Metylobacter sp	AB294954	Hirayama <i>et al.</i> , 2007	Sistema hidrotermal, Japón	92%	
Verrucomicrobiales	AJ297462	Ravenschlag <i>et al.</i> , 1999	Infiltraciones frías	90%	
Sulfurimonas sp.ε- proteobacteria	AB189362	Arakawa y Kato 2005	Trinchera de Japón	96%	2
δ proteobacterium	AB015243	Li,L., <i>et al.</i> ,1999	Trinchera de Japón	98%	
Bacteroidetes bacterium	EU626662	Balakirev (sin publicar)		94%	2
Bdellovibrio sp.	AY876908	Ng <i>et al.</i> 2006	Taiwán	92%	4
Halomonas sp. Mp4	AJ551118	Wang <i>et al.</i> (sin publicar)	Antártica	93%	2
Firmicutes bacterium	AM706659	Muhling <i>et al.</i> 2008		94%	
Psychromonas sp.	AF424154	Bowman <i>et al.</i> 2003	Antártica	91%	2
Geobacter sp.	AM712168	Blothe <i>et al.</i> 2008		87%	
Metylobacter luteus	AF304195	Gulledge <i>et al.</i> 2001		95%	
Planctomicetes no cultivables	DQ289921	Hunter <i>et al.</i> 2006		96%	

0.01







0.10

Fig. 21 Análisis filogenético de las secuencias obtenidas del contenido estomacal, las muestras de este estudio se identifican con las siglas ARB (en recuadro azul), se muestra la similitud de secuencias encontradas en otros estudios. En las relaciones filogenéticas que se presentan las mayores similitudes coinciden con ambientes de infiltraciones de metano o presencia de hidrocarburos, por otra parte algunas de las secuencias encontradas se han reportado como bacterias presentes en megafauna de infiltraciones frías.

Discusión

Qué sabemos sobre C. heheva en el Golfo de México. En este trabajo se reconoce la presencia de las holoturias *Chiridota heheva* sobre tapetes bacterianos evidenciada en las imágenes tomadas por ROV, Se sugiere que es una especie común para las infiltraciones de metano que se ha reportado para la base del Escarpe de Florida en la parte oriental del Golfo de México, infiltraciones frías en el Atlántico occidental donde el ambiente es rico en sulfuros y aguas hipersalinas al parecer es un organismo oportunista pues coloniza efímeramente áreas que presentan un enriquecimiento en nutrientes, también se ha reportado en América Central en una variedad de sustratos donde se observó madera en descomposición y sedimentos suaves, también se ha encontrado en camas de mejillones en los diapiros de "Black Ridge" en comunidades asociadas a infiltraciones de metano (Van Dover *et al.*, 2003). Pawson y Vance (2004) describen su modo de alimentarse como selectivo al poseer tentáculos con terminaciones como una especie de dedos con los que ondea despacio el agua y captura partículas suspendidas o bien puede obtener su alimento directamente del sedimento obteniendo sus nutrientes de una variedad de fuentes posibles Herdendorf (1995) describe su conducta alimenticia en América central, sobre detrito de madera y materia orgánica presente en el sedimento de las infiltraciones.

Qué estudios hay sobre holoturias en sitios quimiosintéticos abisales.- *Chiridota heheva* es una de las holoturias que se ha reportado en varias infiltraciones frías en el Golfo de México (Van Dover *et al.*, 2003; Pawson y Vance 2004). La presencia de holoturias como *Chiridota hidrotermica* del genero *Ophioctenella*(Tyler *et al.*, 1995)

Aunque la presencia de holoturias se ha reportado más frecuentemente para ventilas hidrotermales como el genero *Ophioctenella* se han reportado más frecuentemente para ventilas hidrotermales por Smirnov *et al.*, (2000), el genero *Synaptide* fue observado en la cordillera Este del Pacifico (Desbruyeres y Segonzac, 1997). El genero *Chiridota* se ha mencionado como especie dominante en la cuenca Manus (Southward y Galkin, 1997), este mismo genero se observó también con una gran densidad asociada a mejillones al norte de Fiji (Desbruyeres, *et al.*, 1994) y en la comunidad "Snake pit" *Chiridota laevis* (Segonzac, 1992). La presencia de holoturias también ha sido reportada en sitios con infiltraciones frías (Sibuet y Olu, 1998). Se ha sugerido que estos organismos son detritívoros errantes, aunque también algunos pueden ser colonizadores

como *Peniagone elongata* y *Scotoplanes sp* en Japón (Juniper y Sibuet, 1987, Sibuet *et al.*, 1998) y *Scotoplanes sp.* en la trinchera de Perú (Olu *et al.*, 1996). Pawson y Vance (2004) describen una nueva especie colectada en infiltraciones de hidrocarburos *Rynkatorpa felderi* para el Golfo de México y el Atlántico y en cadáveres de Ballena (Rouse *et al.*, 2004) reporta una nueva especie de holoturia, *Scotoplanes globosa*.

¿Qué estudios existen sobre dietas en holoturias en ambientes abisales?. Estudiar el contenido estomacal provee información sobre el tipo de alimento específico que ingieren los animales bénticos; algunos estudios han examinado la dieta las holoturias para conocer sobre sus preferencias alimenticias (Hudson 2004, Khripounoff y Sibuet, 1980, Tyler *et al.*, 1995; Manship, 1995); Al examinar las estrategias de alimento y la manera en que utilizan la materia orgánica, puede proporcionar un entendimiento del funcionamiento del bentos, algunas cuestiones al respecto pueden ser: ¿Si las holoturias se alimentan de la misma manera o se alimentan de manera distinta?

Las holoturias se pueden alimentar de partículas en suspensión o sedimentadas, que pueden seleccionar entre el sedimento al reacogerlas con sus tentáculos, los cuales emplean para explorar el sustrato o sedimento en el que se encuentran, las partículas alimenticias quedan pegados a ellos gracias a la presencia de unas papilas adhesivas que poseen; el tentáculo cargado de comida es introducido en la faringe y al salir se desprenden en ella las partículas hay especies que no seleccionan las partículas del sedimento sino que literalmente ingieren este, por lo cual han sido señalados como importantes procesadores del sustrato béntico marino, siendo capaces de asimilar microorganismos asociados tanto al material orgánico como al inorgánico (hongos, bacterias, algas) adheridos al sedimento, también pueden ingerir micro invertebrados de la fauna intersticial, los cuales podrían ser una fuente importante de nutrientes para ellos o incluso los mismos paquetes fecales producidos por las holoturias u otros organismos de pertenecientes a la megafauna (Yingst 1976)

La ingesta de las holoturias incluye materia orgánica disuelta (MOD), materia orgánica particulada (MOP), microorganismos, meiofauna, restos de conchas de moluscos, restos de algas, osciles de equinodermos foraminíferos bénticos y diatomeas (Hauksson, 1979). Esto concuerda con otros estudios realizados por Sibuet (1987; Roberts y Moore 1997). Por otra parte las holoturias han mostrado preferencia por “pellets” fecales asociadas a bacterias. Las holoturias de aguas poco profundas ingieren partículas de

diferentes tamaños lo que implica diferencias en la selectividad en la alimentación con las especies abisales que ingieren partículas más pequeñas al tamaño de grano de los sedimentos que son más sencillas de ingerir y aprovechar (Hudson *et al.*, 2004).

Las proporciones relativas del material ingerido determina el valor nutritivo, un problema para las holoturias es que el valor nutricional del sedimento declina con la distancia de la fuente del material orgánico, la cual generalmente es la zona eufótica. Estudios como los realizados por Ginger *et al.* (2001) mencionan que algunas holoturias (*Oneirophanta mutabilis*, *Holothuria tubulosa*, *Amperima rosea*) son altamente selectivas con su alimento teniendo preferencia por depósitos con altos contenidos orgánicos. Esta selectividad se da estacionalmente al ser dependientes de la exportación de material nuevo de la superficie (Hedenforf *et al.*, 1995). Aún cuando la entrada de materia orgánica hacia el sedimento varía significativamente con la estacionalidad y esto se refleja con la biomasa tanto de bacterias como de megafauna, se ha reconocido una buena cantidad de bacterias en el esófago como al interior del intestino de las holoturias sugiriendo que las bacterias del sedimento pueden jugar un papel importante en su nutrición (Roberts *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2001)

Con excepción de las ventilas hidrotermales y las infiltraciones frías, los organismos que habitan en el mar profundo dependen para su nutrición esencialmente de la entrada de materia orgánica de la columna de agua, se ha sugerido que la calidad de materia orgánica entrante controle la estructura de la comunidad béntica, en partículas a las holoturias por el supuesto que estos organismos juegan un papel importante en el reciclamiento de nutrientes y la redistribución de los mismos (Carney, 1989). La importancia de la calidad de alimento para los animales de mar profundo es muy importante pues los requisitos reproductores pueden ser específico para cada especie por lo que la calidad de alimento proporciona un mecanismo regulador en la estructura de una comunidad y esta puede verse alterada dependiendo de la composición del alimento disponible, es probable que diferencias sutiles en el cambio de recursos por ejemplo para las holoturias abisales en el Atlántico nordeste y sus eslabones íntimos subsecuentes a las historias de vida y la reproducción de las especies individuales pueda crear los cambios en la densidad y estructura de las comunidades del mar profundo. (Wigham *et al.*, 2003).

Para este trabajo el análisis al microscopio reveló la presencia de fitodetritus, restos de diatomeas, restos de organismos no identificados, foraminíferos y se pudo apreciar la

presencia de bacterias asociadas a fragmentos de asfalto, lo cual coincide con lo reportado en otros estudios (Roberts, *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2006). Los organismos observados en estos estudios eran moluscos, gasterópodos y bivalvos, foraminíferos, Otros grupos taxonómicos estaban escasamente representados. Muy pocos de los organismos ingeridos presentaron todas sus partes blandas, lo que sugiere una baja proporción de organismos vivos al momento de la ingesta. Muchas holoturias utilizan sus tentáculos bucales para tomar el sedimento y llevarlo a la boca en una forma eminentemente mecánica (Roberts, 1979). En este contexto las observaciones de las imágenes de *Chiridota heheva* muestran que algunas se encuentran en las hendiduras creadas en el asfalto, algunas otras se aprecian sobre los tapetes bacterianos con cierto movimiento de tal que combina las estrategias de alimentación. Aunque podríamos considerar los tapetes bacterianos como su fuente primaria de nutrición, al ingerir masiva y pasivamente sedimentos, los organismos ingeridos no lo serían como presa *per se*, sino como partículas inertes así, estas holoturias actuarían más como forrajeadores que como depredadores. Los microorganismos ingeridos se encuentran en el tamaño de grano del sedimento superficial externo el cual tiende a ser más frecuentemente ingerido por estas especies es muy posible que aquellos organismos que pueden aislarse del medio usando una protección, como opérculos, valvas, etc. pasen a través del tracto digestivo y sobrevivan evitando así la acción de los catabólitos del tracto, por lo que es muy probable que su contribución al total de materia orgánica digerible no sea muy importante. Las estrategias de partición de recursos de las holoturias son bastante variadas (Hammond, 1982; Sambrano *et al.*, 1990; Goldbeck *et al.* 2005)

Qué se ha hecho en los estudios de dietas usando isotopía estable. El estudio con isotopía se utiliza como un trazador para tener un acercamiento sobre la posición trófica de los organismos en las redes alimentarias, los valores encontrados en este estudio presentan intervalos reportados para otro tipo de megafauna que se presentan en infiltraciones de metano (Levin *et al.*, 2000; Iken *et al.*, 2001; Levin y Mendoza 2007); el tipo de alimento presente en el ambiente es determinante para la sobre vivencia de los organismos y Se reflejan esas diferencias cualitativas y cuantitativas de la dieta en la composición bioquímica y fisiología de los consumidores (Schmidt *et al.*, 2006).

La asimilación del alimento por los consumidores contribuye a su crecimiento y desarrollo a través de vías anabólicas y si no son utilizados se pierden por medio de la

respiración o su excreción, por lo tanto su dieta reflejara parte del ambiente donde el organismo se este alimentando en una comparación de los valores reportados en este trabajo y datos de holoturias que se reportan para un ambiente sin infiltración de metano la diferencia de señales es notoria pues estos organismo presentan valores en un intervalo de -24.8 a -12.9 ‰ (Levin y Mendoza., 2007), mientras que las encontradas en el volcán de asfalto presentan valores de -37.66 a -33.15 ‰; reflejando un ambiente mayormente quimiosintético, lo que sugiere que la presencia de metano, hidrocarburos y la producción de H₂S es aprovechada por microorganismos que sirven de base alimenticia para la macrofauna errante como el caso de las holoturias. (Werner *et al.*, 2004)

La fauna residente en los sedimentos de las infiltraciones obtiene su alimento de una variedad de recursos de materia orgánica con diferentes señales isotópicas, esto incluye material como fitodetritus derivado de material fotosintético posiblemente fitoplancton, materia orgánica generada por procesos quimiosintéticos tales como la oxidación o reducción de sulfatos o la oxidación anaerobia de metano que es de particular importancia en los sedimentos de infiltraciones (Valantine 2002), produciendo señales isotópicas específicas, el metano origina un intervalo de señal que va de -100 a -45 ‰ o menos y los lípidos de arqueas del Escarpe de Florida y sedimentos de las Aleutianas muestran una valores de ≤ -100 ‰ (Elvert *et al.*, 2003, Zhang *et a.*, 2002).

Los datos de las emanaciones en los distintos sitios de infiltración al ser oscilatorios y de distinto origen, presentan diferencias en las señales isotópicas lo cual se ve reflejado en la comunidad existente en dichos sitios, los distintos tipos de actividad bacteriana presentes en cada sitio contribuye de manera diversa a la cadena alimenticia presente influyendo de esta manera en las señales isotópicas específicas de cada especie. Un ejemplo de lo anterior se presenta en el Escarpe de Florida donde la diferencia en la señal de $\delta^{13}\text{C}$ entre tapetes bacterianos “blanco y Negro” es en promedio de 15‰ y la diferencia entre el $\delta^{15}\text{N}$ es de 5‰, lo cual refleja procesos microbianos distintos. (Levin y Mendoza 2007).

Qué conocemos a partir de observaciones directas en campo. La mayoría el conocimiento de estrategia del alimento es basado en el estudio de animales coleccionado por métodos tradicionales (por arrastre y trampas) donde se hacen inferencias de los volúmenes del intestino, morfología del tentáculo, morfología del intestino y locomoción de las especies coleccionados (Roberts y Bryce, 1982; Billett, 1991, Roberts y Moore, 1997,

Roberts *et al.*, 2000). Pocos estudios se han realizado con observaciones directas en aguas poco profundas y con estas se han deducido algunos comportamientos de especies abisales, estas observaciones sugieren que las holoturias recogen partículas de alimento del lecho marino usando la fuerza adhesiva de sus tentáculos (Cameron y Fankboner, 1984; Billett, 1991). Se cree que las especies abisales seleccionan partículas más pequeñas de una manera similar esa selección puede estar aunada al nivel y fuerza de la mucosidad basada en las proteínas secretadas por células específicas que se encuentran en los tentáculos (Khripunoff y Sibuet, 1980).

Así mismo la observación directa en campo de la actividad de la megafauna revela la importancia de esta, pues su actividad al remover, bombear, remineralizar lo contenido en el sedimento influye en la composición de la comunidad microbiana, en la distribución de otras especies, la actividad en específico de las holoturias se ha podido registrar la utilización de sus tentáculos primeramente para seleccionar su alimento removiendo el sedimento o tomándolo directamente de la columna de agua (Hudson *et al.*, 2004).

Herdendorf (1995) describe que *Chiridota heheva* presente en América central la permanencia de las holoturias sobre la materia orgánica en el sedimento de las infiltraciones y que con sus tentáculos seleccionaba partículas pequeñas que se introducía a la boca y que partículas mayores las rechazaba y caían al piso, estimaron que el tamaño aproximado de las partículas era de 1mm, lo cual sugiere la selectividad del alimento por parte de la holoturia. Sin embargo en este estudio se reconoce que *Chiridota heheva* no solo se alimenta de materia particulada sino que al parecer su fuente nutricia primaria serían los tapetes bacterianos pues constantemente se observan en pequeñas congregaciones sobre este material además que se encuentran cerca de los gusanos de tubo y otros organismos característicos del volcán de asfalto.

Qué ejemplos existen en el uso de secuencias para caracterizar contenidos estomacales y vincularlos al hábitat. A la fecha pocos estudios ha reportado secuencias del contenido estomacal de holoturias, de los estudios ejemplo de lo anterior es la descripción de géneros alfa, gama proteobacterias, Citofaga–Flavobacterium–Bacteroidetes, vibrio utilizando secuencias 16s (Ward-Rainey, Stackebrandt, 1996); En este estudio las secuencias encontradas se compararon con las secuencias antes mencionadas y las reportadas por otros autores pero en estudios con sedimentos marino. De las bacterias reportadas en este estudio algunas de las secuencias

encontradas como: γ , β , α , ϵ , δ -proteobacterias, Verrucomicrobiales, Firmicutes, Planctomycetales son similares a las reportados en otras infiltraciones de metano en el Golfo de México como en el Escarpe de Florida (Hecker, 1985; Martínez *et al.*, 2006) o en la trinchera de Japón (Li *et al.*, 1999; Akarawa 2006) entre otros.

La presencia de proteobacterias es característica de trabajos en sedimento marino en los cuales se ha analizado el gen del 16s presencia de delta-proteo-bacterias sugiere la presencia de una gran población de organismos sulfato-reductores (Martínez *et al.*, 2006; Duperron, *et al.*, 2007), que suministran azufre reducido al hábitat y gracias a ellas tenemos presencia de H₂S en este sedimento. Las bacterias sulfato reductoras se correlacionan con la presencia de petróleo e hidrocarburos (Mills *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2004) y de hecho son capaces de oxidar alcanos, compuestos aromáticos y ácidos grasos (Phelps *et al.*, 1998). De las ϵ -proteo-bacterias ambientales se sabe poco, pero tienen potencialmente la capacidad de oxidar sulfuros anaeróbicamente (como epibiontes) (Li *et al.*, 1999; Todorov *et al.*, 2000), la presencia de las ϵ -proteobacterias 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 (Sassen *et al.*, 1993; Lanoil *et al.*, 2001) 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 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.

La composición microbiana es determinada por una combinación de disponibilidad de recursos (Rowe *et al.*, 1991; Torsvik *et al.*, 2002); Los hidrocarburos presentes en los sedimentos proporcionan una fuente de enriquecimiento químico que es utilizada por bacterias de vida libre y por organismos que presentan simbiosis con bacterias quimioautótroficas (Jannasch 1984; Childress *et al.*, 1986). Se ha mencionado que los microbios están consumiendo directamente los hidrocarburos, tomándolos como una fuente de carbono y energía (Sassen *et al.*, 1993; Lanoil *et al.*, 2001).

Las condiciones ambientales y la fuente de energía no sólo dictan la composición de la comunidad microbiana y su riqueza sino también las características fisiológicas, pues los organismos presentes en el sitio de estudio de este trabajo, tienen que estar adaptados a alta presión, temperatura baja, a la anoxia o hipoxia y sobrevivir eventos de alta perturbación como son eventos de erupción (al estar en un volcán de asfalto), por lo que la adaptación de los microorganismos debe ser rápida siendo la base nutricia de la red trófica presente en este lugar; la oxidación biológica de metano en hidratos de gas se ha observado previamente que sirve como sustrato para el metabolismo microbiano y esta oxidación puede ocurrir bajo condiciones anaerobias (Hoehler *et al.*, 1994 Boetius *et al.*, 2000); se sabe que metanógenos forman un consorcio con bacterias sulfató-reductoras la actividad de estas puede cambiar potencialmente la composición y en la diagénesis del sedimento (Hinrichs y Boetius, 2002). Adicionalmente, un grupo de bacterias (AT425 EubD9) en AT425 se relaciona estrechamente a un grupo de γ -Proteobacteria que se ha encontrado en estos mismos sistemas de OAM (oxidación anaerobia de metano) y puede ser importante en el proceso de AOM. Además, se han mostrado muestras de hidrato de gas del área del Cañón Verde cercana del Golfo previamente para ser afectado por actividad de AOM (Lanoil *et al.*, 2001).

Se han encontrado organismos filogenéticamente relacionados con los géneros *Syntrofobacter*, *Desulfotomaculum*, pertenecientes al grupo Cytofagos-Flexibacter. El estudio sugiere que los hidrocarburos alicíclicos pueden ser degradados por este tipo de bacterias bajo condiciones de sulfato reducción en ambientes de infiltraciones frías o sitios donde hay presencia de hidrocarburos (Ríos-Hernández *et al.*, 2003).

Descripción del hábitat abisal y su variabilidad en infiltraciones de metano. La mayor parte del sistema de dorsales oceánicas y los márgenes continentales de nuestro planeta todavía no han sido explorados un número limitado de fuentes hidrotermales y frías han sido estudiadas, las infiltraciones frías se presentan en una amplia distribución geográfica y batimétrica a lo largo de los márgenes tanto pasivos como activos, ricos en fluidos de metano de origen termogénico o biológico siendo la principal fuente de energía en donde la producción de sulfatos juega un rol determinante en la biogeoquímica de los sedimentos circundantes que suelen ser limosos con arcillas, es decir tamaños de grano muy fino que coadyuva a una acumulación de los fluidos y materia orgánica lo que provee cierta estabilidad permitiendo el establecimiento de numerosos consorcios y tapetes bacterianos

los cuales sirven como base de la red trófica (MacAvoy *et al.*, 2002; Van Dover 2003), tal como sucede en el volcán de asfalto donde se ha podido observar grandes tapetes bacterianos, así como creación de pequeños montes, permitiendo el establecimiento de comunidades de mejillones, almejas, gusanos de tubo directamente sobre las salidas de los fluidos y donde las concentraciones de metano y sulfatos es muy abundante con una temperatura promedio de 3.2 °C lo que permite la formación de hidratos de gas y que a su vez sirve de refugio para comunidades de holoturias, camarones, cangrejos, bivalvos (Vardaro *et al.*, 2005).

La interfase sedimento-agua es un ambiente vital para muchas especies bénticas y esencial si es de tipo quimiosintético por la oxidación de metano que se lleva a cabo, la ruptura y reorganización de la interfase podría tener un impacto sustancial en los procesos bioquímicos de la comunidad de las infiltraciones, la resuspensión de sedimento por la emanación de gas, movimiento de agua o actividad de la megafauna podría aumentar la disponibilidad de alimento para las especies filtradoras, el transporte de material orgánico tanto de columna de agua como por las emanaciones de gas, distribución de tapetes bacterianos que ayudan al establecimiento de las comunidades, empezando por el establecimiento de los de gusanos de tubo junto con la producción de sulfatos promueve la simbiosis creando comunidades extensas que proveen refugio y alimento para otros organismos (Rice, 1989, Olafsson, 2003, Dattagupta, 2007). Hay una amplia gama de posibles eventos turbulentos que influyen en la biología y geología de los afloramientos de los hidratos de gas que son de los procesos medioambientales más observados e importantes en los sitios de infiltración, dichos eventos determinan la fisiología y otros rasgos ecológicos para todos los organismos presentes en las infiltraciones. (Wigham *et al.*, 2003, Robinson *et al.*, 2004)

Preferencias de Hábitat. El Flujo de forma lineal laminar que se genera cuando el asfalto fundido sale de debajo del borde de una corteza sólida puede producir una depresión la cual se coloniza de bacterias dando lugar a extensos tapetes bacterianos (www.pmel.noaa.gov). Como es el caso del “lago de bacterias” donde se observaron la mayor cantidad de holoturias (entre 9 y 51 ind. \bar{x} 12.5±22.2). Estas se encuentran en hendiduras y estrías en la superficie superior del asfalto, en paralelo a la dirección del flujo de asfalto los cuales se encontraron preferentemente en forma agregada además de gran cantidad de cangrejos y gusanos de tubo.

Chiridota heheva se presenta en una variedad de hábitats, lo que sugiere que puede desplazarse en busca de una variedad de fuentes nutricias (Pawson, Vance 2004). En este estudio se observó la presencia de la holoturia en distintos hábitats, en sedimentos suaves que coincide con lo descrito con Hendendorf *et al.*, (1995) y asociada a camas de mejillones que se encuentra sobre las emanaciones de metano como en el Escarpe de Florida (Van Dover *et al.*, 2003). En este estudio se encontró en fondos con grava de asfalto y en los flujos de asfalto y en tapetes bacterianos como nuevos registros. Estas ocurrencias podrían sugerir oportunidad por parte de la holoturia como lo describe Hecker, (1985) al mencionar que coloniza efímeramente las zonas donde hay mayor disponibilidad de alimento. Sin embargo el predominio en estos hábitats sugiere selectividad dada por la presencia de los tapetes de bacterias. Cordes *et al.* (2007) reportan la presencia de cuatro holoturias para el cañón de Alaminos. Turnispseed *et al.* (2004) reportan 37 individuos en el Escarpe de Florida. Otros registros se dan en Black Ridge Savahna, Georgia, al este de Puerto Rico en intervalos de profundidad entre 2178 a 3998m. La profundidad media en este estudio fue 2990m contabilizando en total 668 holoturias (tabla 15).

Tabla 15.- Resumen de estudios que reportan presencia de *Chiridota heheva*

Localidad	Profundidad m	Tipo de fondo	Actividad quimiosintética	Abundancia	Referencia
Volcán de asfalto	2990	duro con asfalto	si	668	Este Estudio Pawson y Vance 2004
Puerto Rico Savanna	2178	suave	si	12	Pawson y Vance 2004
Georgia	3998	suave	si	15	Juniper y Sibuet 1987
Black Rige Escarpe de Florida	2200	suave	si	12	Van Dover <i>et al.</i> 2003
Escarpe de Florida	3303	suave	si	12	Turnispseed <i>et al.</i> 2004
Cañón Alaminos	3000	suave	si	37	
	2200	suave	si	4	Cordes <i>et al.</i> 2007

¿Qué tan factible es que las bacterias encontradas en la holoturia sean simbiotes o comensales? parte de la flora intestinal. Las bacterias encontradas en el contenido estomacal de *Chiridota heheva* han sido reportadas para otras infiltraciones de metano o

infiltraciones de hidrocarburos incluso en derrames petroleros, así mismo algunas bacterias se reportan como simbiotes de equinodermos u otros organismos asociados a estos ambientes, sugiriendo que son parte importante de la flora intestinal de los organismos que habitan en dichos sitios, presumiblemente la presencia de bacterias en el tracto digestivo se realiza a través de la ingesta de material con asociación de bacterias o forrajeo directo de tapetes bacterianos, siendo una transmisión individual y no tanto una transmisión heredada (por ej. vía tránsovarica a través de las larvas) (Sawabe *et al.*, 1995), al ingerir materia orgánica particulada o fitodetritus las holoturias ingieren además las bacterias asociadas que degradan estas fuentes nutricias volviéndose parte de esta, muchas de las bacterias ingeridas crearan ensambles a lo largo del tracto digestivo lo que ayudara a la holoturia a una mejor asimilación de nutrientes. Sin embargo esto no implica que sean simbiotes específicos o que las bacterias tengan un hospedero específico, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Vibrio* son géneros que se han encontrado frecuentemente en otros invertebrados marinos como cnidarios, moluscos, artrópodos entre otros (Sawabe *et al.*, 1995, Harris,1993, Plante y Shriver 1998; Thorsen 1998) así mismo la contribución a la nutrición de las holoturias por parte de las bacterias de infiere por la reducción de en su número a lo largo del tracto digestivo, para este estudio se hace referencia al trabajo de determinación de fosfolípidos los cuales revelan que de lo que asimila *Chiridota heheva* en una buena proporción son bacterias sultatoreductoras, metanótrofas lo cual coincide con lo antes mencionado (Schubotz *et al.*, en prensa).

Conclusiones

En este estudio se identificó la holoturia *Chiridota heheva* la cual ocurre en otros sitios de infiltraciones frías siendo considerada una especie recurrente en este tipo de ambientes.

La dieta reconocida en la revisión microscópica fue de fitodetritus, algas, foraminíferos, restos de organismos, pellets fecales y se encontraron trozos de asfalto con asociación de bacterias.

La señal isotópica de las holoturias fue en promedio de -35‰ para el $\delta^{13}\text{C}$ y para el $\delta^{15}\text{N}$ de 5.93‰ lo cual sugiere que la dieta de *Chiridota heheva* es materia orgánica producida *in situ*. La señal isotópica de la holoturia corresponde a un ambiente quimiosintético, si bien los valores no son tan negativos como se esperaría de un organismo que dependa exclusivamente de la producción del lugar e infiere que las bacterias encontradas son importante fuente de nutrición para la holoturia, además que se encontraron mayoritariamente en hábitats con alta presencia de tapetes bacterianos.

En relación a las señales isotópicas con otros organismos de sitios de infiltración hay cierta correlación al estar dentro del rango de valores reportados para estos sitios, en relación a organismos alejados del volcán es decir típico de mar profundo se presentan ciertas diferencias.

Las secuencias encontradas en el contenido gástrico sugieren una ingesta de una amplia variedad de bacterias como α δ ϵ -proteobacterias, Verucromicrobiales, que son típicas de sedimentos de infiltración de metano e hidrocarburos. Indican que en el sedimento ocurre actividad sulfató reductora, oxidadoras anaerobias de metano pues se encontraron géneros típicos de infiltraciones de metano e hidrocarburos.

La ingesta de bacterias juega un papel importante en la nutrición de *Chiridota heheva* pues además de servir como fuente nutricia es muy posible que le sirvan como flora intestinal que le ayude a aprovechar la materia orgánica que ingiere.

Los valores de abundancia en los hábitats no quimiosintéticos del volcán de asfalto son similares a otros fondos abisales con actividad quimiosintética en la región; las abundancias en los fondos con bacterias sobrepasan los valores reportados en la literatura.

Referencias.

Abeliovich, A., 2001. The nitrite oxidizing bacteria. In M. Dworkin *et al.*, eds., The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, III edition, release 3.7, 2/11/2001, Springer-Verlag, Nueva York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>.

Arakawa, S., Sato, T., Sato, R., Zhang, J., Gamo, T., Tsunogai, U., Hirota, A., Yoshida, Y., Usami, R., Inagaki, F., Kato, C., 2006. Molecular phylogenetic and chemical analyses of the microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the northeastern Japan Sea; *Extremophiles* 10:4, 311-319.

Arvidson, R. S., Morse J. W; Joye, S.,B., 2004. The sulfur biogeochemistry of chemosynthetic cold seep communities, Gulf of Mexico, USA. *Mar Chem* 87: 97-119.

Azam, F., Fjznche T. I, Gray J. G., Meyer-Reil L. A., Thomgstad T., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.

Balsam L. W., Payne B. J., 2003. Sea-floor sediment distribution in the Gulf of Mexico; *Deep-Sea Research I*, 50:1421-1444.

Billett, D. S. M., 1991. Deep-sea holothurians. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 29:259-317.

Boetius, A., Ferdelman, T., Locote, K., 2000. Bacterial activity in sediments of the deep Arabian Sea in relation to vertical flux; *Deep-Sea Research II* 47:2835-2875.

Botello V. A., Villanueva S., Mendelewichz M., 1987. Programa de vigilancia de los hidrocarburos fósiles en sedimentos del Golfo de México y Caribe Mexicano: 1978-1984. *Caribbean Journal Science*, 23, 1:29-39.

Botello V.A; Castro G., 1980. Chemistry and natural weathering of various crude oil fractions from the Ixtoc-1 oil spill. Proceeding of symposium on "Prelimimenary result from the September 1979 Research/Pierce Ixtoc-1 cruise, held at key Biscayne, Florida, June 9-10, 1980, National Oceanic and Atmospheric Administration, Boulder, Co Office of Marine Pollution Assessment, Dec 1980, 387-407.

Bowen, R. 1988. *Isotopes in the Earth Sciences*. En: Applied Science. Elsevier Publishers Ltd; New York: pp 647.

Bowman, J.P., McCuaig, R.D. (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Envir Microbiol* 69: 2463-2483.

Brusca, R. C., Brusca, G.J., 1990. *Invertebrates*. Sinauer Assoc Inc Pub Sunderland MA

Cameron, J.L., Fankboner, P.V., 1984. Tentacle structure and feeding processes in life stages of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 81, 193-209.

Carney R.S; 1989. Examining relationships between organic carbon flux and deep-sea deposit feeding. In G. Lopez, G. T. Taghon, & J. Levinton (Eds.), *Ecology of Marine Deposit Feeders* (pp. 24–58). New York: Springer Verlag.

Carney, R. S., 1994. Consideration of the oasis analogy for chemosynthetic communities at Gulf of Mexico hydrocarbon vents. *Geo-Marine Letters* 14, 149–159.

Childress J. J., Fisher C. R, Brooks, J. M., Kennicutt, M. C., Bidigare, R., Anderson, A., 1986. A methanotrophic marine mullusean symbiosis: mussels fueled by gas. *Science* 233:13. 16-1308.

Cifuentes, L, J., Torres, G. M., Frias, M. M., 1998. *El Océano y sus Recursos VII, flujos de Energía en el mar producción y migraciones*; FCE México.

Criss, R. E. 1999. *Principles of Stable Isotope Distribution*. New York, Oxford: Oxford University Press. 254 pp

Cordes, E. E., 2007. Cold Seeps Of The Deep Gulf Of Mexico: Community Structure And Biogeographic Comparisons To Atlantic Equatorial Belt Seep Communities; *Deep-Sea Research I* 54:637–653.

Danovaro, R., Luna, G. M., Dell'Anno, A., Pietrangeli, B., 2006. Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. *applied and environmental microbiology*. 5982–5989

Dattagupta, S., Martin, J., Shu-min, L., Carney, R. S., Charles, R., Fisher, C. R., 2007. Deep-sea hydrocarbon seep gastropod *Bathynnerita naticoidea* responds to cues from the habitat-providing mussel *Bathymodiolus childressi*; *Mar Ecol.*,28:193-198

Dawson T.E., Brooks P.D., 2001. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. En Unkovich M, Pate J. McNeill A. Gibbs D.J.,(Eds) *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes And Funtioning of Ecosystem*. Kluwer.Dordrech, Holanda. Pp 1-18

De la Lanza E. G. ;(comp.) 1991. *Oceanografía de Mares Mexicanos*. AGT Editores S.A. México, 569pp.

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

Deming, J. W., Colwell, R. R., 1982. Barophilic bacteria associated with digestive tracts of abyssal holothurians. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1222-1230.

DeNiro, M. J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochemical Et Cosmochimica Acta* 42: 495-506.

DeNiro, M.J., Epstein, S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 45: 341-351.

Desbruyeres, D., Segonzac, M., 1997. Handbook of Deep-Sea Hydrothermal Vent Fauna. Editions IFREMER, Brest. 279 pages.

Desbruyères, D., Alayse-Danet A. M., Ohta S., 1994. Deep-sea hydrothermal communities in southwestern Pacific back-arc basins (the North Fiji and Lau Basins): Composition, microdistribution and food web. *Marine Geology* 116:227–242.

Duperron, S., Sibuet, M., Macgregor, B.J., Kuypers, M.M., Fisher, C.R., Dubilier, N.; 2007. Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico; *Environ. Microbiol.* 9:6, 1423-1438.

Duursma, E., Dawson, R; 1981. Marine organic chemistry: evolution, composition, interactions and chemistry of matter in seawater. Elsevier Sci. Publ., New York, p 31-86.

Dworkin M., 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>.

Edgcomb, V., Kysela, D., Teke, A., Vera, A. Y Sogin, M., 2002. Benthic Eukaryotic Diversity In The Guaymas Basin Hydrothermal Vent Environment. *Pnas* 99 (11) 7658-7662.

Edwards, K. J., Bond P.L., Gihring T.M., Banfield J.F; 2000. "An archaeal ironoxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage." *Science* 287(5459): 1796-1799.

Eltringham, S. K., 1991. Life in mud and sand. The English Universities Press, Ltd. London.

Elvert M., Boetius A., Knittel K., Jorgensen B. B., 2003. Characterization of specific membrane fatty acids as chemotaxonomic markers for sulfate-reducing bacteria involved in anaerobic oxidation of methane. *Geomicrobiology Journal* 20(4), 403-419.

Eppley, R., Peterson, B., 1979. Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature* 282 :677- 680.

Escobar-Briones. E., Tamez S. 2006. Variación espacial de la densidad de crustáceos de la meiofauna en fondos con infiltraciones naturales de metano de la zona batial en la cuenca de San Clemente, Pacífico Oriental. Contribución al estudio de los Crustáceos del Pacífico Este Vol.4 (1):85-99.

Escobar Briones, E .G, 2004. Base de datos de fauna batial abisopelagica y abisal del golfo de México. Universidad nacional autónoma de México. Instituto de ciencias del mar y limnología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto N0. BE013. México D.F.

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.

Fabiano, M., Danovaro, R., 1998. Enzymatic Activity Bacterial Distribution and Organic Matter Composition in Sediment of the Ross Sea (Antartica); *Applied and Enviromental Microbiology* (64)10:3838-3845.

Fisher, M. M., Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4630–4636.

Folk, R. L., 1974. *Petrology of sedimentary rocks*. Hemphill Publishing Company, pp 190.

Fry, B., Parker, P. L., 1979. Annual diet in Texas seagrass systems : 13C evidence for the importance of benthic plants. *Estuarine Mar.Sci* . 8 :499-509 .

Fry, B. 1991 Stable isotope diagrams of freshwater food webs. *Ecology* 72, 2293–2297.

Gage, D. J., Tayler, P. A., 1991. *Deep sea biology a natural history of organisms at the deep sea floor*. Cambrige University Press. pp. 504.

Gannes, L. Z., O'Brien, D. M. and Martinez del Rio, C. 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. – *Ecology* 78: 1271–1276.

García-Villalobos, F. J., Escobar-Briones, E., 2008. Distribución espacial de carbono orgánico total en el sedimento superficial de la Planicie Abisal del Golfo de México. En: Gaxiola, C.G. y Hernández B. *Carbono en ecosistemas acuáticos de México*. Instituto Nacional de Ecología, En prensa.

Garrity G.M. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, Nueva York, II edición.

Gearing, P., Newman J., Lytle T., 1976. Hydrocarbons in 60 northeast Gulf of Mexico Shelf sediments a preliminary survey. *Geochimica et Cosmichimica Acta* 40,9:1005-1017.

Ginger, M. L., Billett, D. S. M., Mackenzie, K. L., Kiriakoulakis, K., Neto, R. R., Boardman, D. K., Santos, V. L. C. S., Horsfall, I.M., Wolff, G.A., 2001. Organic matter assimilation and selective feeding by holothurians in the deep sea: some observations and comments. *Progress in Oceanography* 50, 407–421.

Giovannoni, S. J., Britschgi, T. V., Moyer, C. L., Field, K. G., 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 344: 60–63.

Goering, J., Alexander, V. Haubenstein, N. 1990 Seasonal variability of stable carbon and nitrogen isotope ratios of organisms in a north pacific bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 30, 239–260.

Goffredia, S.K., Paull, C.K., Fulton-Bennett, K., Hurtado, L.A., Vrijenhoek, R.C., 2004. Unusual benthic fauna associated with a whale fall in Monterey Canyon, California. *Deep-Sea Research I* 51, 1295–1306.

Goldbeck E.J., Houben C., Longer R.M., 2005. Survival of foraminifera in the gut of holothurians from Elba Island (Mediterranean Sea); *Revue de micropaleontology*;169-174.

González O. M., 2004. Composición y Caracterización isotópica $\delta^{13}\text{C}$ de partículas de Carbono orgánico en estratos Batimétricos de aguas Oceánicas del Suroeste del Golfo de México, Tesis de Maestría, ICML. UNAM, 82 pp.

González, M. C., 1997. Análisis de la Comunidad bentónica en una Chapopotera del Golfo de México y su relación crónica de hidrocarburos del petróleo. Tesis de Maestría, Fac. de Ciencias-UNAM,75pp.

Gray J. S., 1974. Animal-sediment relationship. *Oceanog. Marine Biology*. 12:223-261.

Guerrero, R., Berlanga, M., 2000. Isótopos estables: Fundamento y aplicaciones. *Boletín de la Iedad Española de Microbiología, Revista Actualidad SEM*. 30:17-23.

Guzmán V.A., Mello, M., 1999. Origin of oil in the Surest Basin, Mexico. *The American Association of Petroleum Geologist* 83:1068-1095.

Hammond, L. S. 1982. Analysis of grain size selection by deposit-feeding holothurians and echinoids (Echinodermata) from a shallow reef lagoon, Discovery Bay, Jamaica. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8, 25-36.

Hauksson, E., 1979. Feeding biology of *Stichopus tremulus*, a deposit feeding holothurian. *Sarsia*, 65, 155– 160.

Hansen, B., 1975. Systematics and biology of the deep-sea holothurians. *Galathea Report* 13, 1-262.

Harris J.M., 1993. The presence nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: synthesis *microb.ecol.* 25:19.

Hecker B.; 1985. Fauna from a cold sulfur-seep in the Gulf of Mexico: comparison with hydrothermal vent communities and evolutionary implications. *Btdletin of the Biology Society of Washington*, 6, 465-474. 93 pp.

Herdendorf E., Thompson T.G., Evans R.D.; 1995. Science on a deep-ocean shipwreck. *Ohio Jour. Sci.* 95:1-224.

Hershey, A.E. Peterson B.J. 1996. Stream food webs. En: F. R. Hauer, and G. A. Lamberti (Comp). *Methods in stream ecology*. Academic Press, San Diego, California: 511-529.

Hewson I., Fuhrman J.A., 2007. Covariation of viral parameters with bacterial assemblage richness and diversity in the water column and sediments. *Deep-Sea Research part I* *ocea-Res.54* (4), pp811-830

Hinrichs K.-U. Boetius A., 2002. The anaerobic oxidation of methane: New insights in microbial ecology and biogeochemistry. In *Ocean Margin Systems* (ed. G. Wefer, D. Billett, and D. Hebbeln), pp. 457-477. Springer-Verlag, Berlin.

Hoehler T.M., Alperin M.J., Albert D.B., Martens C.S., 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in a anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium; *Global Biogeochem Cycles* 8:451-463.

Hoefs, J. 1980. *Stable Isotope Geochemistry*. Springer-Verlag. 208 pp.

Hudson, R I, Benjamin, D, Tyler P. A., 2004. The feeding behavior of a deep-sea holothurians, *Stichopus tremulus* (Gunnerus) based on in situ observations and experiments using a Remotely Operated Vehicle *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 301:75– 91.

Hudson R I, Benjamin D, Wigham D, Billet S.M., Tyler P. A., 2003. Seasonality and selectivity in the feeding ecology and reproductive biology of deep-sea bathyal holothurians *Progress in Oceanography* 59:81–407.

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

Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H. y Bohannon, B.J.M. 2002. Counting the uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4399-4406.

Iken K., Brey T.,Wand U., Voigt J., Junghans P., 2001. Food web structure of the benthic community at the Porcupine Abyssal Plain (NE Atlantic): a stable isotope analysis, *Progress in Oceanography* 50:383–405.

Jacob, U., Mintenbeck, K., Brey, T., Knust, R., Beyer, K., 2005. Stable isotope food web studies: a case for standardized sample treatment. *Mar Ecol Prog Ser.* 287: 251–253.

Jannasch, H. W. 1984. Chemosynthesis : the nutritional basis for life at deep-sea vents . *Oceanus* 27(3) 7:3-7.

Jaspers E., Overmann J., 2004. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4831–4839.

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.

Juniper S. K., Sibuet M.; 1987. Cold Seep benthic communities in Japan subduction zones: spatial organization, trophic strategies and evidence for temporal evolution. *Marine Ecology Progress Series*, 40, 115-126.

Juniper S.K., Cambon M.A., Lesongeur F., Barbier G., 2001. Extraction and Purification of DNA for organic rich subsurface sediments (ODP Leg 1692); *Marine Geology* 174:241-247.

Kang, C-K, Kim, Jeong B., Lee, K-S, Jong, B., Lee, P-Y., Hong, J-S. 2003. Trophic importance of benthic microalgae to macrozoobenthos in coastal bay systems in Korea: dual stable C and N isotope analyses. *Marine Ecology Progress Series*, 259: 79-92.

Kesters K., DeVos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme. P., Stackebrandt, E., 2003. Introduction to the Proteobacteria. In M. Dworkin *et al.*, eds., *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, III edition, release 3.12, 3/28/2003, Springer-Verlag, Nueva York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>.

Khripounoff, A., Sibuet, M., 1980. The nutrition of abyssal echinoderms: 1. Feeding holothuroids. *Mar. Biol.* 60 (1), 17– 26.

Kotelnikova, S., 2002. Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface; *Earth-Science Reviews* 58:367–395.

Krebs, C. J., 1985. *Ecología estudio de la distribución y abundancia*. Harla México 753pp.

Krüger, M., Treude, T., Wolters, H., Nauhaus, K., Boetius, A., 2005. *Palaeogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol*; 227, 6.

Lajtha, K., Michener, R.H., 1994. Introduction. en. *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Scientific Publications, London, U.K.

Lanoil Brian 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 And Environmental Microbiology, Nov., P. 5143–5153.

Legendre, L., Rasoulzadegan, F., 1996. Food- web mediated export of biogenic carbon in oceans: hydrodynamic control. *Mar Ecol Prog Ser* 145:179-193.

Levin, L.A., Mendoza, G.F., 2007. Community structure and nutrition of deep methane-seep macrobenthos from the North Pacific (Aleutian) Margin and the Gulf of Mexico (Florida Escarpment); *Mar. Ecol.*,28:131-151.

Levin, L.A., James, D.W., Martin, C.M., Rathburn, A., Harris, L., Michener, R. 2000. Do methane seeps support distinct infaunal assemblages? Observations on community structure and nutrition from the northern California slope and shelf. *Marine Ecology Progress Series* 208, 21–39.

Li, L., Kato,C., Horikoshi,K., 1999. Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. *Marine Biotechnology* 1, 391-400.

Lopez-Veroni 1998. The dynamics of dissolved and particulate nitrogen in the northwest Gulf of Mexico. Doctoral dissertation of philosophy, Texas A&M University. Dep. of Oceanography.

Luna, G. M. Dell'Anno A., Giuliano, L., Danovaro, R., 2004. Bacterial diversity in deep Mediterranean sediments: relationship with the active bacterial fraction and substrate availability; *Environmental Microbiology* 6:7, 745–753.

Macavoy S.E., Macko S.A., Joye S.B. 2002. Fatty Acid Carbon Isotope Signatures In Chemosynthetic Mussels And Tube Worms From Gulf Of Mexico Hydrocarbon Seep Communities *Chemical Geology* 185:1-8.

Macdonald, I. R., William, W.S., Michael, B.P., 2003. Gas hydrate and chemosynthetic biota in mounded bathymetry at mid-slope hydrocarbon seeps: Norther Gulf Of Mexico. *Marine Geology* 198:133-158.

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., J.M. Martinko y J. Parker 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Falta NY USA. IX edición.

Macko S. A., Entzeroth L., Parker P. L., 1984. Regional differences in nitrogen and carbon isotopes on the Continental Shelf of the Gulf of Mexico. *Naturwissenschaften*, 71: S 374

Mango D.F., Elrod W. L., 1999. The carbon isotopic composition of catalytic gas: A comparative analysis with natural gas, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63,7/8:1097-1106.

Manship, B.A.D., 1995. The feeding ecology of deposit-feeding holothurians. PhD Thesis, Belfast, Queens University.

Manzini G., Xodo L., Barcellona M. Quadrifoglio F., 1985. Interaction of DAPI with double-stranded ribonucleic acids, *Nuceic Acids Research*, 13,24:8955-8967.

Martinez, F., Taylor, B., Baker, E.T., Resing, J. A., Walker S. L., 2006. Opposing trends in crustal thickness and spreading rate along the back-arc Eastern Lau Spreading Center: Implications for controls on ridge morphology, faulting, and hydrothermal activity. *Earth and Planetary Science Letters* 245:665–672.

Massin, C.; 1984. Structures digestives d'holothuries Elaspoda (Echinodermata): *Benthogone rosea* Koehler, 1896 et *Oneirophanta mutabilis* Theel, 1879. *Archives de Biologie (Bruxelles)*, 95, 153–185.

Meyers, P. A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine organic geochemistry-an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 20:867-900.

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.

Minagawa, M., Wada, E. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. – *Geochim. Cosmochim. Acta* 48: 1135–1140.

Monreal, M.A. y Salas, D.A., 1997. Circulación y estructura termohalina del Golfo de México. En: Lavin, M.F. (ed). *Contribuciones a la oceanografía física de México. Monografía 3. Unión Geofísica Mexicana*, 183 – 199.

Mouneé S., Caumette P., Matheron R., Willison C.J., 2003. Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the anoxic sediments underlying cyanobacterial mats of two hypersaline ponds in Mediterranean salterns, *FEMS Microbiology Ecology* 44:117-130.

Neto R.R., Wolff G. A., David S.M. Billett D.S. Mackenzie K.L., Thompson A., 2006. The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians; *Deep-Sea Research I* 53 : 516–527.

Newman, G. J. 1991. The study of Diet and Trophic Relationship through Natural Abundance ^{13}C , p. 201-218. In D. C. Coleman and B. Fry (eds), *Carbon isotope techniques Academic press Inc.*

Olafsson, E. 2003. Do macrofauna structure meiofaunal assemblages in marine soft bottoms? *Vie Milieu* 53, 249–265.

Olsen G.J., Woese C.R., 1993: Ribosomal RNA:a key to phylogeny. *FASEB Journal* 1,7 13-23.

Olu, K, Duperret, A., Sibuet, M., Foucher, J. P., Fiala-Medoni, A., 1996. Structure and distribution of cool seeps communities along the Peruvian active margin: relationship to geological and fluid patterns, *Marine Ecology Progress Series*, 132:109-125.

Orphan V. J., Hinrichs K. U., Ussler W., Paull C. K., Taylor L. T., Sylva S. P., Hayes J. M., Delong E. F; 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4, 1922-1934.

Ostrom E.N., Macko A., Diebel D., Raymond T.J., 1997. Seasonal variation in the stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry of a coastal cold ocean environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61:14, 2929-2942.

Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.L., Olsen, G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9, 1-55.

Parkes, R.J., Cragg, A.B., Wellsbury, P., 2000. Recent Studies on Bacterial population and processes in subseafloor sediments: a Review. *Hydrogeology Journal* 8:11-28.

Parsons, T., Takahashi, M., Hargrave, B., 1996. *Biological Oceanographic processes*. Butterworth Heinemann, Great Britain.

Paull, C.K. Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R.P., Neumann, C., Corso, W.P., Golubic, S., Hook, J.E., Sikes, E., Curray, J.; 1985. Biological communities at the Florida Escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science*, 226 965-967.

Pawson D.L., Vance D. J., 2004. *Chiridota heheva*, new species, from Western Atlantic deep-sea cold seeps and anthropogenic habitats (Echinodermata : Holothuroidea : Apodida); *Zootaxa* 534:1-12.

Pella, E., 1990. Elemental organic analysis. Part 1. Historical developments. *American Laboratory*, 22 (2): 116-125.

Peterson, B.J. y Fry B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18: 293-320.

Pettersson, K.J., Ephraim, B., Allard, B., Boren, H., 1990. Characterization of humic substances from deep groundwaters in granitic bedrock in Sweden. In: Pettersson, K.J. (Ed.), *SKB Technical Report 90-29*. SKB, Stockholm, pp. 22– 30.

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

Plante y Shriver 1998; Plante C.J., Shriver A.G., 1998. Patterns of differential digestion of bacteria in deposit-feeders :a test of resources partitioning; *Mar. Ecol Prog. Ser.* 163:253-258.

Raggi H. L., 2005. *Diversidad Bacteriana en el Sedimento de Mar profundo de Chapopote, Golfo de México: una Zona contigua a un volcán de Asfalto*, Tesis de Lic. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Ravenschlag, K., Sahm, K., Amann, R., 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 387–395.

Raz-Guzmán A, Sánchez A.J. 1996. Trophic structure related to seagrass habitat complexity. En: Kuo J, Phillips RC, Walker DI, and Kirkman H (eds) *Seagrass Biology*. Proc. Internationalorkshop. Rottneest Island, Western Australia. Univ. Western Australia: 241-248pp.

Redondo O. P. 2005. *Fundamentos teóricos y técnicos de los isótopos estables en: nuevas técnicas metodológicas aplicadas al estudio de sistemas ambientales UAM*. Madrid 325pp.

Rice, D. L., Rhoads, D. C., 1989. Early diagenesis of organic matter and the nutritional value of sediment. In: Lopez G, Taghon G, Levinton J (eds) Ecology of marine deposit-feeders. Lecture notes on coastal and estuarine studies. Springer-Verlag, New York, 60–97.

Rios-Hernandez L. A., Gieg L. M., Suflita J. M., 2003. Biodegradation of an Alicyclic Hydrocarbon by a Sulfate-Reducing Enrichment from a Gas Condensate-Contaminated Aquifer; Applied And Environmental Microbiology, Jan, 434–443.

Roberts D., Moore H.M., Berges J., Patching J.W., Carton M.W., Eardly D.F., 2001. Sediment distribution, hydrolytic enzyme profiles and bacterial activities in the guts of *Oneirophanta mutabilis*, *Psychropotes longicauda* and *Pseudostichopus villosus*: what do they tell us about digestive strategies of abyssal holothurians?, Progress in Oceanography 50 443–458.

Roberts D., Moore M.H., 1997. Tentacular diversity in deep-sea deposit-feeding holothurians: implications for biodiversity in the deep sea Biodiversity and Conservation 6, 1487-1505.

Roberts, D. Bryce, C.; 1982. Further observations on tentacular feeding mechanisms in holothurians. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 59, 151-63.

Roberts, D., Gebruk, A., Levin, V., Manship, B. A. D., 2000. Feeding and digestive strategies in deposit-feeding holothurians. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, 38, 257–310.

Roberts, D., 1979. Deposit-feeding mechanisms and resource partitioning in tropical holothurians. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 37, pp. 43-56.

Robinson C.A., Bernhard J., M., Levin L.A., Mendoza G.F., Blanks J. K.; 2004. Surficial Hydrocarbon Seep Infauna from the Blake Ridge (Atlantic Ocean, 2150m) and the gulf of México (690-2240m), *Mar. Ecol.*, 25:4, 313-336.

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.

Rouse G.W., Goffredi S.K., Vrijenhoek R.C.; 2004. Osedax: bone-eating marine worms with dwarf males. *Science*, 305, 668–671.

Rowe, G., Sibuet, M., Deming, J., Khripounoff, A., Tietjen, J., Macko, S., and Theroux, R. 1991. 'Total' sediment biomass and preliminary estimates of organic carbon residence time in deep-sea benthos. *Mar Ecol-Prog Ser* 79: 99–114.

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.

Sambrano A., 1987. Actividad sedimentivora de *Holothuria mexicana* e *Isostichopus badionotus* (Echinodermata: Holothuroidea) en bajos de *Thalassia*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Simon Bolivar, Caracas, Venezuela. xvi + 131.

Sambrano, A., Diaz H., Conde E., J., 1990. Caracterización de la Ingesta en *Isostichopus badionotus* (Salenka) y *Holothuria mexicana* Ludwig (Echinodermata: Holoturoidea); Caribbean Journal of Science, 26:1-2, 45-51.

Sassen, R., Robert, H.H., Aarón, 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.

Sassen, R., Roberts, H.H., Carney, R., Milkov, A.V., DeFreitas, D.A., Lanoil, B., Zhang, C.L., 2004. Free hydrocarbon gas, gas hydrate, and authigenic minerals in chemosynthetic communities of the northern Gulf of Mexico continental slope: relation to microbial processes. Chemical Geology 205 (3–4), 195–217.

Sawabe T., Oda Y., Shiomi Y., Ezura Y., 1995. Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones; Microb. Ecol. 30:193-202.

Schmidt K., Atkinson A, Jürgen K. P, Voss M., Pond D. W.; 2006. Protozoans As A Food Source For Antarctic Krill, *Euphausia Superba*: Complementary Insights From Stomach Content, Fatty Acids, And Stable Isotopes; Limnol. Oceanogr., 51:5,2409–2427.

Segonzac, M., 1992. Les peuplements associes "a l'hydrothermalisme oceanique du Snake Pit (dorsale medio-atlantique; 231N, 3480 m): composition et microdistribution de la megafaune. Comptes Rendus de l'Academie de Sciences de Paris t.314 Serie III, pp. 593–600.

Selje N., Simon, M., Brinkhoff, T., 2004. A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. Nature 427: 445–448.

Sergeeva N. G., Gulin M.B; 2007. Meiobenthos from an active methane seepage area in the NW Black Sea, Mar.Ecol. 28:152-159.

Shiller A. M., 1999. An Overview of the Marine Chemistry of the Gulf of Mexico. En: Kumpf H, Steidinger K, Sherman K. The Gulf of Mexico Large Marine Ecosystem. Blackwell Science. Pp: 151–170.

Southward, E.C., Galkin S.V., 1997. A new vestimentiferan (Pogonophora: Obturata) from hydrothermal vent fields in the Manus Backarc Basin (Bismarck Sea, Papua New Guinea, Southwest Pacific Ocean). *Journal of Natural History* 31:43–55.

Sibuet, M., Juniper, S. K., Pautot, G., 1988. Cold seep benthic communities in the Japan subduction zones: geological control of community development. J. mar. Res. 46:333-348.

Sibuet, M., Olu, K., 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography 45: 517.

Sibuet, M., 1987. Structure des peuplements benthiques en relation avec les conditions trophiques en Milieu Abyssal dans l'Océan Atlantique. Cas particulier des Echinodermes. These de Doctorat d'état's Science Naturelles, Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Sibuet M., Olu-Le Roy K. 2002. Cold seep communities on continental margins: structure and quantitative distribution relative to geological and fluid venting patterns. In: Wefer G.D.B., Hebbeln D., Jorgensen B.B., Van Weering T. (Ed.) Ocean Margin Systems. Springer-Verlag, Berlin: pp. 235–251.

Smirnov, A. V., Gebruk A.V., Galkin, S.V., Shank, T., 2000. New species of holothurian (Echinodermata: Holothuroidea) from hydrothermal vent habitats. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 80(2):321-328.

Sorensen K.B., Lauer A., Teske A., 2004. Archeal phylotypes in metal-rich and low activity deep subsurface sediment of the Peru Basin, ODP Leg 201; Geobiology 2, 151-161.

Soto, L. A., Sánchez, G. S., López, V. D., 2004. Ambientes influidos por emanaciones naturales de hidrocarburos y gas en el suroeste del Golfo de México; Universidad y Ciencia, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa México 51-58.

Soto, L. A., Escobar, B. E.; 1995. Biology and ecology of shallow coastal waters. En: Eleftheriou A, Ansell AD, Smith CJ (eds) Coupling mechanisms related to benthic production in the SW Gulf of Mexico. 28th EMBs symposium, Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark: 233-242.

Soto, L. A., 1980. Crustáceos Decapodos del noroeste del Golfo de México Annu. Centro Cienc. Mary Limnol. Univ. Nac. Autón., México 7:79-110.

Störhr S., Segonzac M., 2005. Deep-sea ophiuroids (Echinodermata) from reducing and non-reducing environments in the North Atlantic Ocean; J Mar. Biol 84:1-20.

Strong, J., Dsimstoff, D. R., Abele, L. G., Wistle, A. B., 1984. Ecological communities conceptual issues and the evidence. Pringston, University Press, p 613.

Suess, E, Bohrmann, G, Huene, V. R, Linke, P, Wallmann, K, Lammers, S, Sahling, H, Winckler, G., Lutz, R. A., Orange, D; 1998. Fluid venting in the eastern Aleutian subduction zone. J Geophys Res 103:2597–2614.

Sweeney E.R., Haddad I.R., 1980. Tracing the dispersal of the Ixtoc-1 oil using C,H,S and N stable isotopes ratios. Proceedings of a symposium on "preliminary result from the September 1979 Research/Pierce Ixtoc-1 cruise, held at Key Biscayne, Florida, June 9-10 1980. National Oceanic and Atmospheric Administration, Boulder, Co. office of Marine Pollution Assessment, Dec. 1980, 89-114.

Thorsen M.S., 1998. Abundance and biomass of the gut-living microorganisms (bacteria, protozoa and fungi) in the irregular sea urchin *Echinocardium cordatum* (Spatangoida: Echinodermata). Mar. Biol. 133:353-360.

Tiedje, J.M., 1995. Approaches to the comprehensive evaluation of prokaryote diversity of a habitat., 73-87 En: D. Allsopp D.L. Hawksworth y E.R. Colwell (eds), CAN International, Microbial Diversity and Ecosystem Function. Wallingford, UK.

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.

Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.F.; 2002. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064–1066.

Turnipseed, M., Jenkins, C.D., Van Dover, C.L., 2004. Community structure in Florida Escarpment seep and Snake Pit (Mid-Atlantic Ridge) vent mussel beds. *Marine Biology* 145, 121–132.

Turley, C.M., Dixon, J.L., 2002. Bacterial numbers and growth in surficial deep-sea sediments and phytodetritus in the NE Atlantic: Relationship with particulate organic carbon and nitrogen; *Deep-Sea Research I* 49:815-826.

Turley, C.M., Lochte, K. Lampitt, R.S., 1995. Transformations of biogenic particles during sedimentation in the northeastern Atlantic Ocean. *Phil Trans R Soc Lond B* 348,179–189.

Tyler P.A., Paterson G.J.I., Sibuet M., Guille A., Murton B.J., Segonzac M; 1995. A new genus of ophiuroid (Echinodermata, Ophiuroidea) from hydrothermal mounds along the Mid-Atlantic Ridge. *Jour. Of Mar. Biol. Ass. UK* 75: 977-986

Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada K., 1999. Microbial diversity in Marine Sediments from Sagami bay, Japan as determined by 16s rRNA gene analysis; *Microbiology* 145:3305-3315

Valentine D.L. 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antoine van Leeuwenhoek*, 81, 271–282.

Van Dover C.L., Aharon P., Bernhard J.M., Caylor E., Doerries M., Flickinger W., Gilhooly W., Goffredi S.K., Knick K.E., Mack S.A., Rapoport S., Raulfs E.C., Ruppel C., Salerno J.L., Seitz R.D., Gupta B.K., Shank T., Turnipseed M., Vrijenhoek R.; 2003. Blake Ridge methane seeps: characterization of a soft-sediment, chemosynthetically based ecosystem; *Deep-Sea Research I* 50: 281–300.

Vanderklift, M.A., Ponsard, S., 2003. Sources of variation in consumer diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: A meta analysis. *Oecologia* 136, 169–182.

Vardaro M., F., MacDonald I., R., Bender C., L., Guinasso Jr., 2005. Dynamic processes observed at a gas hydrate outcropping on the continental slope of the Gulf of Mexico. *Geo-Mar*, Sep. 10pp.

Vegas V. Manuel, 1971. Introducción a la ecología del bentos marino, Washington D. C. OEA, 91pp.

Vetriani,1999. Population structure and phylogenetic characterization of Marine Benthic Archaea in Deep-sea Sediment.

Voss M.,Altabet M.A, Bodungen B. 1996. $\delta^{13}\text{N}$ sedimenting particles as indicator of euphotic zone processes. *Deep-Sea Research* 43, 1:33-47.

Wada E., Kabaya y., Tsuru K., Ishiwatari R., 1990. ^{13}C and ^{13}N abundance of sedimentary organic matter in estuarine areas of Tokyo Bay, Japan Mass spectroscopy, 38,6:307-319.

Wade T., Kennicutt M.C., Brooks M.J., 1989. Gulf of Mexico hydrocarbons seep communities: Aromatic Hydrocarbon concentration in organism, sediments and water. *Marine environment Research* 27:19-30.

Wakeham, S. G., Canuel, E. A., 1988. Organic geochemistry of particulate matter in the eastern tropical North Pacific Ocean: Implications for particle dynamics. *J Mar Res* 46:183-213.

Ward-Rainey N, Rainey FA, Stackebrandt E.,1996. A study of the bacterial flora associated with *Holothuria atra*. *J exp mar Biol Ecol* 203: 11-26.

Werne J. P., Haese R. R., Zitter T., Aloisi G., Bouloubassi L., Heijs S., Fiala-Medioni A., Pancost R. D., Damste J. S. S., de Lange G., Forney L. J., Gottschal J. C., Foucher J. P., Mascle J., and Woodside J., 2004. Life at cold seeps: a synthesis of biogeochemical and ecological data from Kazan mud volcano, eastern Mediterranean Sea. *Chemical Geology* 205(3-4), 367-390.

Wigham, B.D., Hudson, I.R., Billett, D.S.M., Wolff, G.A., 2003. Is long-term change in the abyssal northeast Atlantic driven by qualitative changes in export flux? Evidence from selective feeding in deep-sea holothurians. *Prog. Oceanogr.* 59:409– 441.

Wiseman WJ, Sturges W., 1999. Physical Oceanography of the Gulf of Mexico: Processes that Regulate its Biology. En: Kumpf H, Steidinger K, Sherman K. *The Gulf of Mexico Large Marine Ecosystem*. Blackwell Science. pp: 77-91.

Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–271.

Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *PNAS* 87: 4576–4579.

Wolfgang L., Strunk O., Westram R, Richter L, Meier H., Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart A, Gross O., Grumann S, Hermann W, Jost R, König A., Liss T., Lüßmann R, May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R, Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M, Ludwig M, Bode M., Schleifer K; 2004; ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research.* 32:4, 1363-1371.

www.pmel.noaa.gov

Yingst, J. V., 1976. The utilization of the organic matter in shallow marine sediment by an epibenthic deposit feeding holothurian. *J. exp. mar. Biol Ecol.* 23:55-69.

Zhang L., Li Y., Wall D.J., Larsen L., Sassen R., Huang Y., Wang Y., Peacock A., White C.D., Horita J., Cole R.D., 2002. Lipid and Carbon isotopic evidence of methane-oxidizing and sulfate-reducing bacteria in association with gas hydrates from the Gulf of Mexico; *Geology*; 30(3)239-242.

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. 13th Annual Research Conference. pp.123-133.

Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M., 1996, DNA Recovery from soil of Diverse Composition; *Applied and Environmental Microbiology*; Feb 62:2, 316-322.

Anexo 1

Resumen de los grupos o phyla del dominio Bacteria y del Archaea, la clasificación que se utilizó en este proyecto con base en el manual de Bergey (Garrity *et al.*, 2004).

Dominio Bacteria

Phylum Proteobacteria: Es el grupo más grande y diverso conocido, está dividido en cinco clases: α -proteobacteria, β -proteobacteria, γ -proteobacteria, δ -proteobacteria y ϵ -proteobacteria es tan extenso este grupo que se encuentra en casi todos los ambientes desde los más comunes hasta los más extremos, han reportado distribuciones globales en regiones de todo el mundo, aquí se incluyen la mayoría de Gram negativas de interés médico, industrial y agrícola (Kerstens *et al.*, 2003) (Rappé y Giovannoni 2003)

α -proteobacteria: esta clase cuenta con seis ordenes: *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*, *Rhizobiales*, *Caulobacterales* y *Parvularculales*, la mayoría de estas bacterias son bacilos aunque se encuentran de todas las formas bacterianas, algunas son quimiolitótrofas o quimiorganótrofas (Selje *et al.*, 2004).

γ -proteobacteria: es la clase mas grande del phylum proteobacteria, se han descrito 20 familias, en este grupo se encuentran las bacterias fotosintéticas púrpuras sulfurosas (*Chromatiaceae* y *Ectothiorhodospiraceae*) también grupos quimiorganótrofos como *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Pasteurllaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae* y también quimiolitótrofos como los oxidadores de azufre y hierro. Así mismo están incluidos los patógenos de humanos y animales como *Vibrio spp.* y *V.cholerae*. (Selje *et al.*, 2004)

δ -proteobacteria: Sus principales subgrupos son: A) myxobacterias, b) bdellovibrios, c) bacterias disimilatorias de sulfato y sulfuro reductoras y d) sintróficas que fermentan propionato o benzoato a acetato, CO₂ e hidrógeno, sintróficamente en co-cultivo con consumidoras de hidrógeno, Ddellovibrios y myxobacterias son aerobias estrictas, las sulfato y sulfuro reductoras, y sintróficas son anaerobias (Kerstens *et al.*, 2003) Bdellovibrio spp. Se caracteriza por constar de bacterias Gram negativas (Jukevitch, 2000)

ϵ -proteobacteria: se encuentra en ambientes asociados a contaminantes y a las subsuperficies y como entomopatógenos-Campylobacter y Helicobacter- en animales,

crecen anaeróticamente, se ha detectado que son capaces de oxidar azufre y se sugiere que participan en el ciclo de éste compuesto (Hugenholtz, 1998; Wirsén *et al.*, 2002)

Phylum Nitrospira: Se caracterizan por oxidar NO_2^- a NO_3^- al igual que las proteobacterias nitrificadoras, pero no cuentan con la misma membrana interna que éstas últimas poseen. Se encuentran en ambientes como suelo, mar, agua dulce, y plantas de tratamiento de aguas residuales (Abeliovich, 2001)

Phylum Chloroflexi., o bacterias verdes no sulfurosas, formado por bacterias metabóticamente tan distintas como *Chloroflexus* (anoxifotótrofos termofílicas), *Thermomicrobium* (quimioheterótrofos hipertermofílicos) y *Herpetosiphon* (mesofílicos quimioheterótrofos) ; se han encontrado en sedimentos marinos y de lagos. (Giovannoni, 1996).

Phylum Bacteroidetes: en este phylum se encuentran los géneros *Cytophaga*, *Bacteroides* y *Flavobacterium*, se han encontrado en el mar, en sistemas eutróficos _lagunas costeras y son poco abundantes en aguas oligotróficas -(Jaspers 2002)

Phylum acidobacter : es uno de los tipo de bacteria que paso de ser desconocido a uno de los más comunes , tras la utilización de los métodos de identificación independientemente de cultivos, encontrándose en todos los ambientes.

Phylum Planctomycetes y Chlamydiae: son únicos por presentar paredes celulares que no están compuestas por peptidoglicano. El phylum *Planctomycetes* esta formado por bacterias que se encuentran en suelos, sedimentos, en el mar ventilas hidrotermales y en suelos. (Woese, 1987)

Phylum Verrucomicrobia: Está conformado por bacterias de agua dulce y suelo, casi toda aeróbica, heterótrofa y tienen pared celular característica que las protege de factores ambientales (prosteca)

Phylum Firmicutes. 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 hábitat mas estudiado son las cavidades humanas (Ezaki *et al.*, 2001)] en el ambiente se encuentran en el sedimento de lagos y sistemas de tratamiento anóxico de aguas negras. Son organismos saprofitos de suelo y tienen la habilidad de producir endoesporas, son principalmente fermentadoras (Madigan *et al.*, 2003)

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). El dominio de las arqueas se divide en tres phyla; mencionaremos al denominado Crenarchaeota, que es el que tiene relación con este trabajo; 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). Muchos de los Crenarchaeota se especializan en metabolizar azufre, las secuencias del gen 16S RNAr que se han podido obtener indican que este grupo podría ser ecológicamente importante en distintos ambientes (Dworking, 2004).

Anexo 2

Fundamentos teóricos y técnicos de los isótopos estables en estudios de dietas

La espectrometría de masas, fue la que permitió el descubrimiento de los isótopos. En 1898 Wien mostró que un haz de estos iones podía ser deflectado mediante el empleo de campos eléctricos y magnéticos. En tanto que el estudio de los rayos catódicos en el tubo de Thomson condujo al descubrimiento de los electrones, el análisis de los denominados rayos canales fue también muy valioso para comprender la naturaleza interna del átomo. Los rayos canales son corrientes de iones gaseosos cargados positivamente. (Redondo, 2005)

La idea de que algunos elementos podían estar constituidos por mezclas de átomos con diferentes pesos ya se había conjeturado unos años antes, Soddy (1913) les asignó el nombre de isótopos, que significa en griego “mismo lugar”, y se refiere al hecho de que todos los neones de diferente peso atómico ocupan el mismo lugar en la tabla de los elementos (Redondo, 2005)

El número atómico de un elemento se define por el número de protones que están en el núcleo, el numero masa es igual a la suma de protones y neutrones que se encuentran en el núcleo, los átomos que tienen diferentes masas atómicas pero el mismo numero atómico se llaman isótopos (Guerrero y Berlanga, 2000), que son átomos cuyo núcleo tiene el mismo numero de protones pero un diferente numero de neutrones (Bowen, 1991; Hoefs, 1997). Una definición estándar para isótopos puede ser: isótopos = núclidos donde un simple elemento tiene diferentes pesos atómicos, la palabra nuclido se refiere a un distintivo tipo de átomo

Isótopos naturales (estables e inestables)

Isótopos inestables

Un isótopo inestable se transforma en un átomo de otro elemento. El decaimiento radioactivo es la transformación espontánea de un isótopo inestable a un átomo de otro elemento, en este proceso se libera energía, hay emanaciones radioactivas como partículas alfa, beta y gama. Los nuclidos radiactivos tienen diferentes tasas de decaimiento llamados “hijos” estas tasas son estadísticamente predecibles. El nuclido radioactivo “padre” decae en otro átomo de otro elemento “hijo” a una tasa de decaimiento constante (Criss, 1999).

Isótopos estables

Los nuclidos estables no decaen estos átomos han estado presentes desde el “bing bang” y su abundancia total no ha cambiado con el tiempo, importantes ejemplos de ello son ^{13}C ^{12}C etc. la variación en la abundancia de los patrones en estos nuclidos pueden ser causados por ciertos procesos fisicoquímicos (Criss, 1999).

Los isótopos estables más utilizados son los correspondientes a los elementos químicos H, C, N, O y S, cuyas características principales se resumen en la Tabla 1. Su importancia radica en que son elementos muy abundantes en la corteza terrestre y a que toman parte en numerosos procesos naturales. Las relaciones isotópicas que más se emplean son: (Redondo, 2005)

^1H - ^2H (D)

^{12}C - ^{13}C

^{14}N - ^{15}N

^{16}O - ^{18}O

^{34}S - ^{32}S

Tabla 1. Características isotópicas fundamentales de los elementos ligeros. No se incluyen los isótopos radiactivos como el tritio o el ^{14}C , cuyas abundancias relativas, además, son muy pequeñas.

Símbolo	Número Atómico	Número Masa	Abundancia (%)	Peso Atómico (uma)
H	1	1	99.985	1.007825
D	1	2	0.015	2.01410
^{12}C	6	12	98.89	12.00000000
^{13}C	6	13	1.11	13.00335
^{14}N	7	14	99.63	14.00307
^{15}N	7	15	0.37	15.00011
^{16}O	8	16	99.759	15.99491
^{17}O	8	17	0.037	16.99914
^{18}O	8	18	0.204	17.99916
^{32}S	16	32	95.0	31.97207
^{33}S	16	33	0.76	32.97146
^{34}S	16	34	4.22	33.96786
^{36}S	16	36	0.014	35.96709

Estos isótopos poseen algunas características destacables que los hacen especialmente útiles:

- 1.- Tienen bajos pesos atómicos. Se considera que en los elementos con un número atómico (Z) superior a 16, el denominado “fraccionamiento isotópico” es inapreciable.
- 2.- Tienen diferencias de masa relativamente grandes. Por ejemplo, el D (deuterio) y el ^1H tienen un 100 % de diferencia de masa y el ^{34}S un 6,25 % respecto al ^{32}S .
- 3.- Corresponden a elementos que son muy abundantes en la naturaleza. Por ejemplo, el oxígeno en la corteza terrestre representa el 47 % de su peso y el 92 % en volumen.
- 4.- Los elementos C, N y S presentan, de modo natural, varios estados de oxidación.
- 5.- Estos elementos forman enlaces con diversos caracteres, que van desde iónicos a fuertemente covalentes. El fraccionamiento isotópico es mayor entre las fases que tienen más marcados los diversos tipos de enlace (por ejemplo el Mg o el Al prácticamente no sufren fraccionamiento porque siempre presentan enlaces de características similares).
- 6.- En los cinco elementos citados, la abundancia del isótopo más común (el ligero) es mucho mayor que la del isótopo (o isótopos) más escaso (el pesado). Las excepciones a esta norma (He, B) no pertenecen a los elementos referidos. Esta característica exige que los equipos que analizan las relaciones isotópicas (IRMS) posean una gran precisión analítica. (Redondo, 2005)

Fraccionamiento isotópico

Numerosos procesos cinéticos y en equilibrio, muestran el denominado “efecto isotópico”, capaz de producir una relativa separación o fraccionamiento entre los isótopos ligeros y los pesados. Es la diferencia en la composición isotópica como resultado de procesos físicos o químicos. La distribución de isótopos entre dos sustancias o dos fases de la misma sustancia con diferentes proporciones es llamada fraccionamiento isotópico (Hoefs, 1997). El fraccionamiento isotópico frecuentemente se acompaña de procesos dinámicos que son más rápidos, incompletos o unidireccionales, varios procesos diferentes nos pueden dar una elevación de estos efectos (Criss, 1999).

La extensión en que se distribuyen los isótopos estables entre dos fases (o especies) coexistentes A y B viene determinada por el “factor de fraccionamiento”

$$\alpha = \frac{R_A}{R_B},$$

Donde RA y RB son los ratios isotópicos en ambas especies. Los factores de fraccionamiento están comprendidos generalmente entre 1,0000 y 1,0040.

La ecuación que relaciona el factor de fraccionamiento α con los valores de las dos especies en δ es:

$$\delta A - \delta B \cong \Delta A-B \cong 10^3 \ln \alpha_{A-B}$$

Los efectos isotópicos que dan lugar al fraccionamiento, se producen como consecuencia de que algunas propiedades termodinámicas de los compuestos dependen de las masas de los átomos que los componen, cuya diferencia es muy grande entre los isótopos de los elementos ligeros de la tabla periódica. Sin embargo, la alta diferencia relativa entre las masas no es condición suficiente para provocar fraccionamiento isotópico. (Redondo, 2005)

Los principales fenómenos que produce fraccionamiento son: 1) Reacciones de intercambio de isótopos (Criss, 1999; Dowson y Brooks, 2001) en donde suceden procesos con diferentes mecanismos fisicoquímicos. Este término es usado para todas las situaciones en las cuales no hay una reacción neta, pero en las que hay cambios en la distribución de isótopos en diferentes sustancias químicas, o entre diferentes fases o entre moléculas. Ejemplo de ello son los procesos de evaporación-condensación (Hoefs, 1997).

Evaporación. La evaporación es un proceso unidireccional que causa el fraccionamiento isotópico, las moléculas que contienen los isótopos más ligeros pueden permitirle a los isótopos preferencialmente romperse a través de la superficie de los líquidos y escapar hacia la atmósfera. En un cierto plazo el líquido residual se volvería progresivamente enriquecido en isótopos pesados. (Criss, 1999)

2) Procesos cinéticos, que dependen principalmente de las diferencias en las tasas de reacción de las moléculas isotópicas con una única composición isotópica, como la difusión y los efectos metabólicos (Hoefs, 1997; Criss, 1999; Dowson y Brooks, 2001)

Difusión. La difusión puede producir abundancia en las variaciones entre los isótopos de cualquier elemento que pueden ser nuclidos estables o no, simplemente porque la variación de isótopos tiene diferentes masas, un importante ejemplo es la difusión de las moléculas de los gases (Criss, 1999).

Efectos metabólicos. Los organismos comúnmente también producen fraccionamiento isotópico. Como nosotros cuando respiramos, usamos preferencialmente ^{16}O para la combustión mientras que ^{17}O y ^{18}O empiezan a ser progresivamente más abundantes en el aire residual de nuestros pulmones.

Patrones y estándares de referencia

Los patrones son un aspecto crítico en la técnica de isótopos estables. En el trabajo habitual de laboratorio, se comparan los gases que provienen de las muestras (CO_2 , H_2 , N_2 , SO_2 o SF_6) con un gas de idéntica naturaleza que se denomina estándar de trabajo. Como ya se ha señalado, los IRMS logran mayor precisión a través de las comparaciones más o menos repetidas del gas procedente y representativo de la muestra con respecto a un gas de referencia. Idealmente, ambos gases deben tener una composición química e isotópica parecida. Junto a las muestras, se introducen a diario series de estándares de composición conocida, que en la mayoría de los casos son patrones o estándares internos establecidos por cada laboratorio. El empleo de estándares internos en los laboratorios de isótopos se hace necesario a causa de la escasez de patrones internacionales, que en algunos casos se agotaron hace varias décadas (caso del PDB).

Los patrones internacionales tienen una importancia fundamental, sobre todo en determinaciones isotópicas a escala de abundancia natural, puesto que definen convencionalmente el valor $\delta = 0$ (que no significa que esté ausente el isótopo pesado) frente al cual se comparan el resto de relaciones isotópicas. De este modo, cuando un material tiene un valor de δ positivo, es porque está “enriquecido” en el isótopo pesado respecto al patrón internacional. Del mismo modo, si el valor es negativo, implica que está “empobrecido” y que su composición es más ligera que el patrón. Sin embargo, la elección de algunos de los patrones internacionales fue desafortunada. Así, el estándar de $\delta^{13}\text{C}$ es un pequeño fósil de belemnite de la formación Pee Dee situada en Carolina (EE.UU.). Algo similar sucedió con el patrón del azufre, ya que el elegido fue un meteorito caído en el Cañón del Diablo (Wyoming). Al contrario, el patrón de $\delta^{15}\text{N}$ es el nitrógeno del aire, muy abundante y de composición homogénea. Estas dificultades han supuesto que los laboratorios de isótopos tengan disponible muy poco o nada de patrón internacional - dependiendo del elemento- y que éstos sean, en el mejor de los casos, distribuido en pequeñas cantidades y con escasa frecuencia (cada tres años). De esta actividad se encarga, previa petición, el OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica, IAEA en

inglés) y el NBS norteamericano (actualmente denominado NIST). Algunos de los patrones agotados se han sustituido por otros (SMOW por V-SMOW o PDB por V-PDB, este último con un valor δ algo diferente al original), y se han ido estableciendo estándares de buena calidad como sustitutos de los originales (Tabla 2).

La abundancia natural de los isótopos puede ser usada para buscar patrones y mecanismos que operen en los procesos globales que se dan en la naturaleza o en un único organismo, pudiendo ser utilizados para reconstruir paleodietas, para estudiar el reciclado de los elementos en ecosistemas terrestres o marinos y también a la escala de la red trófica (Redondo, 2005)

Tabla 2. Características isotópicas de los patrones internacionales y listado de los principales materiales de referencia.

Patrones de Isótopos Estables (Definidos como $\delta = 0$)			
Patrón	Isótopos	Ratio	Materiales de referencia
Standard Mean Ocean Water (SMOW) y Viena - SMOW	$^2\text{H}/^1\text{H}$	$0.00015576 \pm 0.00000010$	GISP, SLAP, IAEA-OH1 a IAEA-OH4
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	$0.00200520 \pm 0.00000043$	
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	0.0003799 ± 0.0000015	
Fósil "Pee Dee Belemnite" (PDB)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0.0112372 ± 0.00000090	NBS-18, NBS-19 y 22, IAEA-CH-6 y CO-1, USGS-24, etc
	$^{16}\text{O}/^{14}\text{C}$	0.0020671 ± 0.0000021	
	$^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$	0.0003859 ± 0.0000016	
Nitrógeno atmosférico	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0.0036765 ± 0.0000018	Aire, IAEA-N-1 a IAEA-N-3, NSVEC
Meteorito "Canyon Diablo Troilite" (CDT)	$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	0.0450045 ± 0.00000093	NIST-8557, IAEA-S3

La utilidad de las proporciones isotópicas estables para los ecólogos, se basa en que existe una discriminación isotópica entre los materiales biológicos y las no biológicas basadas en reacciones físicas predecibles y enzimáticas que conducen a unas composiciones isotópicas diferentes. Poseen la capacidad tanto de aportar información del origen (equilibrio) como de los procesos (fraccionamiento) (Peterson y Fry, 1987) y, poco a poco se han ido implementando, cada vez más, su uso para rastrear y cuantificar los flujos de energía en los ecosistemas (Gannes *et al.*, 1997). Las proporciones naturales de los isótopos estables muestran rápidamente cómo se cicla la materia orgánica en los distintos ecosistemas y, por ejemplo, en los ecosistemas acuáticos, con unas pocas medidas de las composiciones isotópicas de los nutrientes disueltos, y de los animales, se puede realizar un esquema de la estructura química de la red trófica (Minawada y Wada, 1984; Fry, 1991).

Los isótopos estables más utilizados en los estudios ecológicos son los del carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) y azufre ($^{34}\text{S}/^{33}\text{S}$). A partir de los valores $\delta^{13}\text{C}$ se pueden conocer las fuentes de materia orgánica, y con los valores $\delta^{15}\text{N}$, se puede identificar la posición de los distintos organismos en las redes tróficas de los ecosistemas (Quesada en Redondo, 2005)

Unidades de medida

Existen varias formas de expresar la composición isotópica de una muestra, las cuales suelen adaptarse a los hábitos que predominan en cada área de actividad.

En el caso de muestras enriquecidas artificialmente, es habitual emplear el porcentaje de abundancia relativa del isótopo sobre el total del elemento. Por ejemplo, para el nitrógeno se tendría:

$$\text{Abundancia A} = \frac{\text{Número átomos } ^{15}\text{N}}{\text{Número átomos } ^{15}\text{N} + \text{Número átomos } ^{14}\text{N}} \times 100 \quad (\text{en } \%)$$

En el caso de trabajar a escala de abundancias isotópicas naturales, es bastante arduo tener que manejar porcentajes con cuatro cifras decimales, que es precisamente en donde se encuentran las variaciones naturales de los isótopos ligeros (y, por supuesto, la precisión analítica requerida para poder detectarlas). Por ello, se desarrolló una unidad específica, denominada δ , que además posee la ventaja de incorporar en su formulación la composición isotópica de una referencia. Esto es muy adecuado, puesto que, los espectrómetros isotópicos miden con mayor precisión las relaciones isotópicas por comparación que estrictamente en términos absolutos. (Redondo, 2005)

La unidad δ , la más aceptada cuando se manejan abundancias isotópicas naturales, se define como:

$$\delta x = 1000 \left(\frac{R_x - R_{std}}{R_{std}} \right) \text{‰} \quad (\text{en tantos por mil}),$$

donde R_x es la relación molar entre el isótopo pesado y el ligero en la muestra y R_{std} en la referencia o patrón.

Conviene aquí destacar una fórmula útil, aunque poco difundida, que transforma cualquier relación isotópica expresada en δ ‰ en abundancia (%):

$$A = \frac{100}{\frac{1}{\left(\frac{\delta}{1000} + 1\right) R_{std}} + 1} \quad \text{atomos \%}$$

El uso directo de R no es muy adecuado, porque sus valores son bajos (D/H promedio ~0,00015) y sus variaciones naturales son muy pequeñas (D/H en rango natural 0,00004 – 0,00018). Sin embargo, en la práctica, las medidas isotópicas en los espectrómetros se hacen por contaje electrónico y comparando intensidades entre los picos de la muestra y una referencia de composición conocida, de forma que el software de los equipos usa R en sus cálculos. Es por ello, que se encuentran algunos trabajos donde se emplea directamente la relación R expresada en partes por millón. (Redondo, 2005)

ANEXO 3

El análisis ARISA es una técnica utilizada ampliamente por los ecólogos como una buena estimación de la biodiversidad bacteriana presente en un medio dado (Danovaro *et al.*, 2006)

La mezcla base del PCR para ARISA se preparó con la siguiente combinación:

	Concentración final	1 X
5X buffer (promega)		10 μ L
MgCl ₂ (25mM, promega)	2.5nM	5 μ L
Mezcla dNTP (40mM,promega)	0.25mM	1.25 μ L
BSA (3mg/ml, sigma7030)	0.4mM	1.5 μ L
Primer 1 ITSf label (40 μ M)	0.4 μ M	0.5 μ L
Primer 2 ITS R (40 μ M)	0.4 μ M	0.5 μ L
GoTaq (promega 5U/ μ L)	0.05U	0.5 μ L
H ₂ O		29.75 μ L
DNA	0.05ng/ μ L	x μ L

Ésta se mezcló gentilmente trabajando en todo momento en hielo.

Condiciones del termociclador

94 °C	3min	
94 °C	45sec	
55 °C	45sec	30 veces
72 °C	90sec	
72 °C	5min	
4 °C	mantener a esta temperatura	

Comprobación en gel: 1.5% de agarosa en 1 X TAE puso dos marcadores, corrió a 70 volts por 30 min. La purificación de las reacciones siguió el procedimiento estándar del Sephadex para la purificación de productos de PCR, antes de secuenciar y después de cuantificar utilizando nano-drop. Se realizó la limpieza de DNA por medio de Sephadex en la cual se siguieron los pasos siguientes:

- Preparación para Electroforesis Capilar (EC)
- Preparación de mezcla maestra para cada reacción
- Map Marker 0-5 μ L (mantener a 4 °C)
- Tracking dye 0.5 μ L (mantener a 4 °C)
- HiDi formamida deionizada14 μ L (mantener a -20 °C)
- X μ L del producto de PCR-ARISA (se calculó el volumen de cada muestra necesario para obtener una concentración final de 150ng)
- Se mezcló suavemente, quedando toda la solución en el fondo del tubo.
- Se desnaturalizó a 95 °C por tres mins usando el termociclador.
- Colocó en hielo por 5mins. y se mantuvo en refrigeración.
- Se analizaron los fragmentos largos (>700bp) empleando el secuenciador (Dr. Alban Ramette, MPI-Bremen Ale.-comunicación personal)

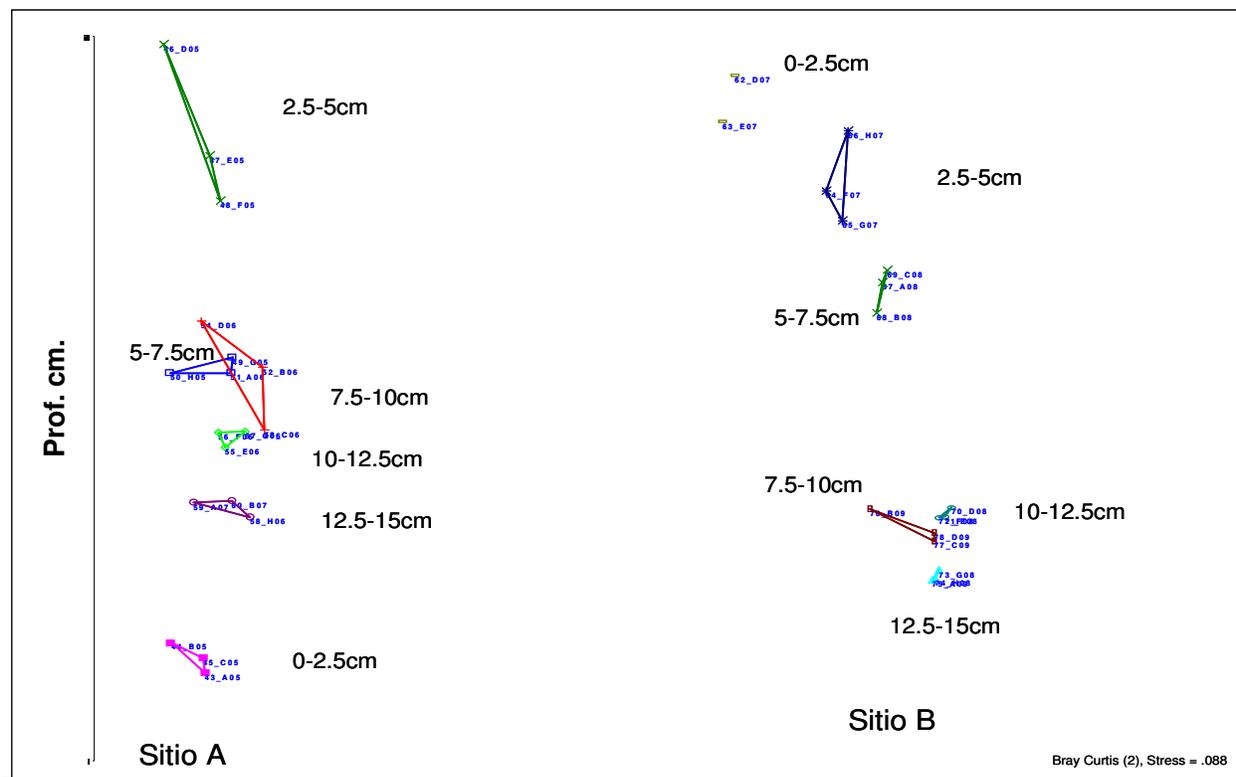
Resultados Análisis ARISA

El resumen del número de las muestras de ARISA y relación de los estratos analizados del sedimento en las localidades A y B se presenta en la Tabla 1. La mayor diferencia entre las poblaciones de bacterias presentes en el sedimento se presenta en el sitio A en el intervalo de profundidad de 2.5-5cm como se muestra arriba a la izquierda (Fig. 1). La diferencia fue menor en el intervalo de 7.5-10cm, en el resto de los intervalos de profundidad del sedimento las diferencias fueron menores y por ende presentaron mayor similitud (Fig. 1). La diferencia mayor en el sitio B se presentó en el intervalo de 2.5-5cm de profundidad del sedimento (Fig. 1). En el resto de de las muestras se presentó mayor similitud entre el tipo y número de las secuencias encontradas (Fig. 1). El sitio A presentó mayor influencia de infiltración de hidrocarburos con respecto al sitio B con características abisales.

Tabla 1. Relación de las muestras replicadas y la subdivisión en estratos al interior de sedimento que se usó para el análisis ARISA (Análisis íntergénico ribosomal automático)

Sitio A	Prof. Int. Sed. (cm.)	muestra ARISA	Sitio B	Prof. Int. Sed.(cm.)	muestra ARISA
1	0 - 2.5	43, 44, 45	1	0 - 2.5	62,63
2	2.5 - 5.0	46, 47, 48	2	2.5 - 5.0	64,65,66
3	5.0 - 7.5	49, 50, 51	3	5.0 - 7.5	67,68,69
4	7.5 - 10.0	52, 53, 54	4	7.5 - 10.0	70,71,72

Fig. 1 Análisis de similitud con índice Bray-Curtis con valor de 0.08. Similitud significativa entre muestras con intervalo de confianza de 95% .



Discusión

La mayor diversidad bacteriana así como la mayor biomasa de microflora ocurre en los 10 primeros centímetros del sedimento. Este estudio siguió un patrón similar a otros descritos donde la mayor diversidad presente en la interfase sedimento-agua se reduce hacia el interior del sedimento (Turley 2000). En un análisis comparativo Hewson *et al.*, (2007) reconocieron mayor similitud en comunidades de la superficie del sedimento que hacia los estratos interiores del sedimento de manera diferente a este estudio y que en este caso interpretamos como una baja de diversidad. Lo anterior podría deberse a distintos factores y aunque las variaciones en la estructura comunitaria en ecosistemas marinos varía a micro escala dependiendo de los nutrientes (Azam y Long, 2001; Bowman y McCuaig, 2003).

El uso de técnicas como ARISA si bien son de las más usadas por su confiabilidad y buena estimación para un análisis ecológico clásico requiere de una serie de pasos que podrían crear un sesgo (Li *et al.*, 1999) por lo que los resultados de este análisis deben interpretarse como una idea generalizada del ambiente. Aún los métodos moleculares son técnicas sensibles que permiten describir la composición compleja de las comunidades microbianas (Li *et al.*, 1999). Si bien ARISA no determina las especies presentes, si da una estimación aproximada de una abundancia relativa de los taxa presentes, y puede resaltar la necesidad de un estudio taxonómico y su interrelación biogeoquímica. (Danovaro *et al.*, 2006)

Conclusiones

La composición microbiana entre los sitios A y B es diferente reconociendo que el sitio A tiene mayor efecto de la infiltración de hidrocarburos con respecto al sitio B donde predominan características abisales.

El conocer las diferencias en cuanto a la composición de bacterias en sedimento marino es importante pues esto contribuye a la caracterización del ambiente donde habitan en este caso las holoturias que son el objeto de estudio de este trabajo.