

## Informe final\* del Proyecto AE015

### Ecología de comunidades microbianas en las aguas subterráneas de Cuatrociénegas, Coahuila

- Responsable:** Dra. Valeria Souza Saldívar
- Institución:** Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Ecología  
Departamento de Ecología Evolutiva  
Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental
- Dirección:** Circuito Exterior Ciudad Universitaria, Copilco Universidad, Coyoacán, México, DF, 04510, México
- Correo electrónico:** [souza@servidor.unam.mx](mailto:souza@servidor.unam.mx)
- Teléfono/Fax:** Tel: 5622 9006
- Fecha de inicio:** Septiembre 13, 2002
- Fecha de término:** Octubre 5, 2004
- Principales resultados:** Hoja de cálculo, Informe final, Fotografías.
- Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Souza Saldívar, V. 2005. Ecología de comunidades microbianas en las aguas subterráneas de Cuatrociénegas, Coahuila. Universidad Nacional Autónoma de México. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. AE015** México D. F.
- Forma de citar hojas de cálculo:** Souza Saldívar, V. 2005. Ecología de comunidades microbianas en las aguas subterráneas de Cuatrociénegas, Coahuila. Universidad Nacional Autónoma de México. **Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. AE015** México D. F.

#### Resumen:

Los procariontes (Eubacterias y Archaeas) no solo son la base de todos los ecosistemas, sino que son el grupo de organismos más abundante, y diverso del planeta así como el más desconocido. No sólo son diversos genéticamente (un inmenso número de especies genéticamente muy diferentes) sino que su diversidad fisiológica es impresionante: las bacterias y Archaeas han conquistado todo el planeta. Se han encontrado a kilómetros de profundidad comiendo rocas, en el hielo alimentándose de hidrógeno y adentro de los volcanes comiendo azufre así como en el interior y exterior de todos los eucariontes ya sea como simbioses, comensales o parásitos. Por otra parte los microorganismos han resultado recientemente ser el recurso genético por excelencia ya que su enorme diversidad fisiológica les permite realizar cualquier función que el hombre requiera. Cuatro Ciénegas (CCC) está en medio del desierto de Chihuahua, en el estado de Coahuila. Está considerada como "Área de Protección de Flora y Fauna" por decreto presidencial desde noviembre de 1994. Para poder entender como proteger a la extraordinaria biota de CCC debemos comprender el origen y mantenimiento de su diversidad, la cual creemos esta profundamente ligada a su microbiota. El origen del agua es probablemente la clave de su diversidad y sobretodo es una incógnita interesante. A pesar de que existe abundante literatura acumulada durante más de 60 años sobre la historia natural de CCC y sobre sus diferentes ambientes, se sabe muy poco o nada sobre las comunidades bacterianas en general. Este proyecto se compromete a crear y mantener un cepario donde todos estos organismos se guardaran vivos (congelados) como referencia y para futuros usos. El objetivo es analizar la hiperdiversidad de Archaea y Eubacteria en los ecosistemas acuáticos subterráneos del Área Nacional Protegida de Cuatro Ciénegas, Coahuila (CCC).

- 
- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
  - \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

## **“Ecología de comunidades microbianas en las aguas subterráneas de Cuatrociénegas Coahuila”**

### **Institución solicitante:**

Instituto de Ecología, UNAM  
UNA 290722-7Y5  
Circuito Exterior s/n  
Deleg. Coyoacán  
México, D. F. C. P.04510

### **Responsable del proyecto:**

Dra. Valeria Souza Saldivar  
Departamento de Ecología Evolutiva  
Cargo: Investigador Titular B de TC.  
Dirección postal: CU. AP 70-275, Coyoacán 04510  
México D. F.  
Teléfono 5622 9006  
Correo: [souza@servidor.unam.mx](mailto:souza@servidor.unam.mx)

### **Colaboradores:**

Dr. Luis Eguiarte (UNAM), Dr. Larry Forney (Univ. Idaho), Dr. Jim Elser (Arizona State Univ), Dra. Carrol Tang (California Academy), Dr. Tom Dowling (Arizona State Univ), Tono De Vivo y Tullio Bernabei (La Venta).

**Ubicación del proyecto:** Ambiente acuático

**Duración del proyecto:** 18 meses

### **Nombre de la región prioritaria:**

Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatrociénegas, Coahuila.

**Monto total solicitado:** \$ 100,000 (cien mil pesos 00/100 M.N.)

## INFORME FINAL

### PROYECTO AE015 “ECOLOGÍA DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS DE CUATROCIÉNEGAS, COAHUILA”

#### **INTRODUCCIÓN**

El valle de Cuatro Ciénegas localizado en la zona central de Coahuila, se decretó como área natural protegida en la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna. El decreto se publicó en el Diario Oficial de la Federación el 7 de noviembre de 1994. Es considerado el humedal más importante dentro del Desierto Chihuahuense y uno de los humedales más importantes en México. En este valle subsisten una gran cantidad de especies endémicas, que son la justificación más importante del decreto.

Cuatro Ciénegas se encuentra orientado hacia al este de la región conocida como altiplano septentrional o como Desierto Chihuahuense, en la parte central del estado de Coahuila, a 80 km. al oeste de la ciudad de Monclova; y está localizado entre los dos macizos montañosos más grandes de México, al este de la Sierra Madre Oriental y al oeste la Sierra Madre Occidental. La humedad que viene tanto del Golfo de México como del Pacífico es bloqueada por ambas montañas, fenómeno que dio origen al desarrollo de este desierto. El valle está rodeado por montañas de hasta 3000 m de altura, y en promedio tiene una altitud de 740 m (Minckley 1969), con una extensión aproximada de 40 Km de este a oeste y 30 km de norte a sur (Minckley 1969), y está cortado en dos por la Sierra de San Marcos y Pinos.

El Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatro Ciénegas tiene una superficie de cerca de 85,000 ha, y se localiza entre las coordenadas 26° 45' 00" y 27° 00' 00" Latitud Norte; 101° 48' 49" y 102° 17' 53" Longitud Oeste. Es parte del municipio de Cuatro Ciénegas de Carranza, Coahuila, que cuenta con una población de 13,465 habitantes.

De los valles del Hundido y Calaveras, al oeste y al norte de Cuatro Ciénegas respectivamente, existe muy poca información. El valle del Hundido está formado por sierras y lomeríos, y es de topografía muy accidentada debido a la presencia de cañones profundos; se encuentra entre la Sierra La Fragua y los valles el Sobaco y Buenavista. El valle Calaveras, al norte de Cuatro Ciénegas (conocido también como Ocampo) a su vez se ubica entre la Sierra de la

madera y Potrero de Menchaca. Son regiones poco estudiadas, existe escasa información sobre la flora y fauna de estos valles y los recursos hídricos principales: presas, lagos salinos, bordos ganaderos y agrícolas, arroyos y ríos, han sido sobreexplotados, por lo que la escasa recarga de acuíferos ha llevado a la sobreexplotación del manto freático (CONABIO, página web).

El clima de la zona es muy árido, con una precipitación anual de menos de 200mm, sobre todo durante Mayo y Octubre (Shreve 1944), y temperaturas extremas de 44 grados en verano, y un mínimo de 0 grados centígrados en invierno (Minckley 1969).

Con tan poca precipitación anual, la gran cantidad de agua subterránea es la causa de la existencia de manantiales en el valle de Cuatro Ciénegas, que a su vez forman arroyos permanentes y áreas inundadas donde se concentra el agua de los manantiales. Los manantiales se llaman localmente pozas, las áreas inundadas se conocen como lagunas o lagos, algunos de los cuales son lagunas de desecación. Casi todos estos ambientes acuáticos tienen agua con pocos nutrientes y con altas concentraciones de minerales, sobre todo iones sulfato y calcio; que son el resultado de la evaporación y precipitación de carbonato de calcio, y en menor proporción se han encontrado iones de sodio, magnesio y cloro (Winsborough 1990).

Los cuerpos de agua tienen además un contenido bajo de fósforo en el agua y la pobreza de nutrientes no permite el desarrollo de algas, por lo que la base de la pirámide alimenticia parece estar formada principalmente por las bacterias. En muchas de las pozas y ríos tanto de agua salada como de agua dulce hay estromatolitos (depósitos de carbonatos contruidos por comunidades de bacterias) que son poco comunes en el mundo (Winsborough and Seeler, 1984, Winsborough 1990).

Los numerosos cuerpos de agua brotan de manantiales, sus diámetros van desde menos de un metro hasta más de cien, las profundidades de los mismos van desde 50 cm hasta 18 m, algunas de las pozas están comunicadas natural o artificialmente entre sí por un complicado sistema de drenaje.

La mayor parte de los manantiales se ubican en las faldas de la Sierra de San Marcos y Pinos, formando alrededor de 200 pozas dentro del valle de Cuatro Ciénegas. Las características físico- químicas de las pozas son muy variables, la temperatura varía en un rango de 18 a 35 °C, el pH es de 5.76 a 8.3, la

conductividad tiene valores entre 782 mS y 7.52 mS y los sólidos disueltos se encuentran en un rango que va de 292 mg/l a 3.77 g/l.

También se encuentran algunos arroyos, como el Río Mezquites, la mayoría de los cuales son permanentes, sin embargo, la mayor parte del agua es subterránea. Existen dos lagunas de mayor dimensión llamadas Playitas y Churince, la primera representa un sistema alterado al que llega agua procedente de un canal artificial y la segunda un sistema relativamente intacto dentro del valle.

Como resultado de la exportación del agua fuera del valle y su uso dentro del mismo, se provocaron serios disturbios, como son la interconexión artificial de los manantiales, la disminución de las áreas inundadas y cambios en los niveles de agua en muchas de las pozas (INE 2000).

La explotación de agua en otros valles de los alrededores de Cuatro Ciénegas (como son Hundido y Calaveras) ha sido motivo de preocupación, ya que la escasa información geológica o hidrológica de la zona no ha permitido determinar con claridad las rutas de flujo del agua subterránea, por lo que la sobreexplotación en los valles vecinos podría afectar seriamente a esta área natural protegida.

Hasta ahora no existen antecedentes de otros estudios con información sobre las comunidades bacterianas en ambientes acuáticos del valle de Cuatro Ciénegas y de los valles vecinos. Muchos de los estudios de bacterias que han sentado las bases para el desarrollo de la microbiología han sido sobre cultivos puros, pero hoy sabemos que las bacterias cultivables son sólo una pequeña parte de las bacterias que existen en la naturaleza. Los métodos moleculares desarrollados en la última década han permitido el estudio de comunidades bacterianas no cultivables que han mostrado un asombroso número de linajes filogenéticos, así como tipos ecológicos dominantes de bacterias y arqueas desconocidos para los estudios basados en cultivos. Gran parte de estos trabajos se basan en la secuencia del gen 16S ribosomal, que ha sido elegido para clasificar a distintos tipos de organismos gracias a que está presente en los tres dominios de la vida conocidas: Bacteria, Archaea y Eucarya (Woese *et al.* 1990). El 16S es una molécula que tiene regiones altamente conservadas y regiones con variación considerable en su secuencia (Woese 1987), con estas tasas de evolución diferentes se pueden establecer relaciones a diferentes

niveles jerárquicos en un análisis comparativo de secuencias (Hill *et al.* 2000) en prácticamente todos los seres vivos. Hasta ahora la clasificación de los organismos se ha basado principalmente en estas secuencias del 16S ribosomal, aunque hoy, el uso de esta molécula para definir especies en bacterias o determinar su diversidad es un tema controvertido y discutido (Rodríguez-Valera 2002),

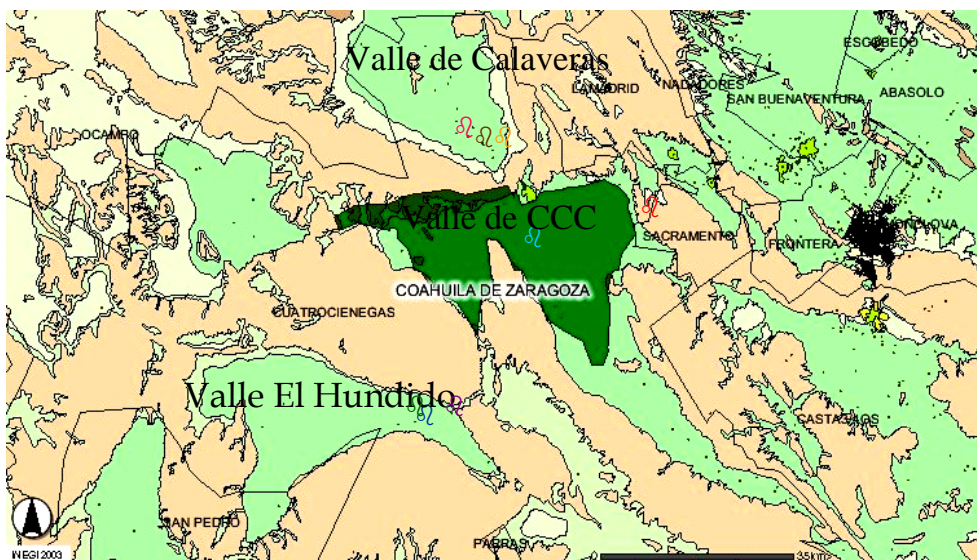
## OBJETIVOS

Describir las comunidades bacterianas de cuerpos de agua en el valle de Cuatro Ciénegas, Calaveras y el Hundido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En Octubre del 2002 se hizo la colecta de muestras de agua en los sitios indicados en el mapa. Se utilizaron galones de agua para beber, el agua se desechó en el momento y el bote se enjuagó primero con un poco de agua del sitio para después llenarla.

El día de la colecta filtramos el agua en filtros milipore de 0.45 mm, los cuales se guardaron congelados para procesarlos después.



- |                  |                 |
|------------------|-----------------|
| 16 Baño Escobedo | 27 Calaveras    |
| 26 El hundido    | 28 Calaveras    |
| ST Santa Teresa  | 24 Mina Rosario |
| TN Tanque Nuevo  | 29 Calaveras    |

Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo

## EXTRACCIÓN DE ADN AMBIENTAL

Cada uno de los filtros fue procesado con el Kit “Ultra Clean Water DNA” (MoBio Lab., Inc) de acuerdo al instructivo, con algunas modificaciones (apéndice 1)

## PCR

El gen del 16S rADN fue amplificado por PCR con los oligos 515F (5’GCGGATCCTCTAGACTGCAGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3’) y 1492R (5’-GGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGTTACCTTGTTACGACTT-3’)(Angert 1998) en las condiciones del apéndice 2

## CLONACIÓN

Para clonar los productos de PCR se utilizaron tres amplificaciones de cada muestra de ADN, las cuales se mezclaron y se extrajo la banda del tamaño correspondiente en geles de agarosa con el kit “quiaquick gel extraction” de Quiagen (apéndice 3).

La clonación de los productos se hizo en el vector pCR2.1 de acuerdo a las indicaciones del kit TOPO A Cloning de Invitrogene, también con algunas modificaciones (apéndice 4).

Las clonas con inserto se seleccionaron de acuerdo al tamaño del plásmido observado en un gel de agarosa al 1% (apéndice 4).

## SECUENCIACIÓN

Los plásmidos con inserto se aislaron con el kit “SNAP miniprep” (Invitrogen Corp, San Diego Calif, (apéndice 5), y fueron secuenciados en la Universidad de Arizona con los oligos M13F (para las secuencias parciales) y M13R.

## ANÁLISIS DE SECUENCIAS

En total se obtuvieron 98 secuencias parciales, las cuales se compararon con secuencias conocidas con el programa BLAST en MedLine. Con estos datos se asignó a cada clona su afiliación filogenética aproximada.

Se hizo una primera selección de 50 clonas representativas del resto, que se mandó a secuenciar en ambos extremos. Las secuencias fueron ensambladas en BioEdit y se trabajó con el cromatograma de cada una manualmente, para evitar errores en las bases. Una vez revisadas y ensambladas algunas fueron descartadas por mala calidad de la secuencia o la posibilidad de un origen

quimérico. Se hicieron tres tipos de análisis para detección de quimeras: con el programa Chimera\_Check del RDB (Cole *et al* 2003), utilizando el programa Bellerephon (Huber *et al* 2004) y por detección de incongruencias en el orden de las ramas, generando árboles filogenéticos inferidos en distintas zonas del alineamiento (533-873 y 874-1215, numeración de *E.coli*).

Se obtuvieron 38 filotipos únicos cuyas secuencias se analizaron nuevamente en BLAST (Atschul *et al* 1990) y Sequence Match en RDB (Cole *et al* 2003), y la secuencia más parecida de cada una de las bases de datos fue seleccionada y alineada para el análisis filogenético.

Se utilizaron 680 pb comunes a todas las secuencias (533 a 1215 numeración de *E.coli*) para generar árboles con Neighbor Joining y Máxima Parsimonia en el programa MEGA2.

#### ANÁLISIS DE ORIGEN Y SIMILITUD CON SECUENCIAS EN BLAST Y EN RDB

Para entender el origen de las secuencias que son más parecidas a las 38 clonas obtenidas investigamos de dónde fue obtenida la primera secuencia propuesta por cada una de las bases de datos (BLAST y RDB).

#### ANÁLISIS COMPARATIVO CON OTROS ARTÍCULOS

Para comparar nuestro estudio con otros estudios seleccionamos 9 artículos con las siguientes características: estudios con metodologías similares (principalmente que se hicieran clonas ambientales del 16S), con un registro en GenBank de las secuencias reportadas en los artículos, y que fueran representativos de de distintos hábitats: cuerpos de agua similares a Cuatro Ciénegas, y otros diferentes.

Se bajaron las secuencias reportadas para cada artículo, se les hizo un BLAST a cada una, y se formó una base de datos en la cual se incluyó: el número de acceso de las cinco primeras secuencias más parecidas, el porcentaje de similitud, el valor E y se investigó el origen de cada una de estas cinco secuencias.

El programa de BLAST despliega en orden ascendente las secuencias más parecidas que encuentra en su base de datos, por lo cual se trabajó principalmente con la primera secuencia y a se asignó un valor de uno si se le



encontró origen marino, o cero para las no marinas. Si el porcentaje de similitud y los valores de E son iguales entre la primera y las siguientes clonas, se les asignó valores también a las siguientes (cinco máximo), y después se hizo un promedio entre ellas. Se eliminaron del análisis las secuencias en las que se obtuvieron índices de similitud menores de 90%.

Para cada artículo se promediaron los valores asignados a cada una de sus secuencias, y se calculó la media y el error estándar. Con estos valores se calculó una prueba de T y ANOVA con los paquetes JMP y STATISTICA.

## RESULTADOS

Del muestreo de Cuatro Ciénegas en octubre del 2002 se obtuvieron 98 clonas. Además se secuenciaron 14 clonas de otros dos sitios independientes (un estanque y una muestra de agua de mar) que funcionaron como controles en algunos análisis. En la tabla de datos de este informe se muestran 88 secuencias obtenidas en el muestreo de Cuatro Ciénegas, junto con la geoposición y la clasificación de cada una, así como otros datos del muestreo requeridos. 10 secuencias que se obtuvieron con menor calidad no se reportan en esta tabla y las secuencias marcadas como quimeras no se incluyeron en los análisis de filogenias.

La diversidad total y por sitio de estas secuencias de bacterias no cultivables puede verse en la Figura 2. Las clonas pertenecen 10 linajes distintos de bacterias y uno de arqueas, siendo las gamma proteobacterias el grupo dominante (40%).

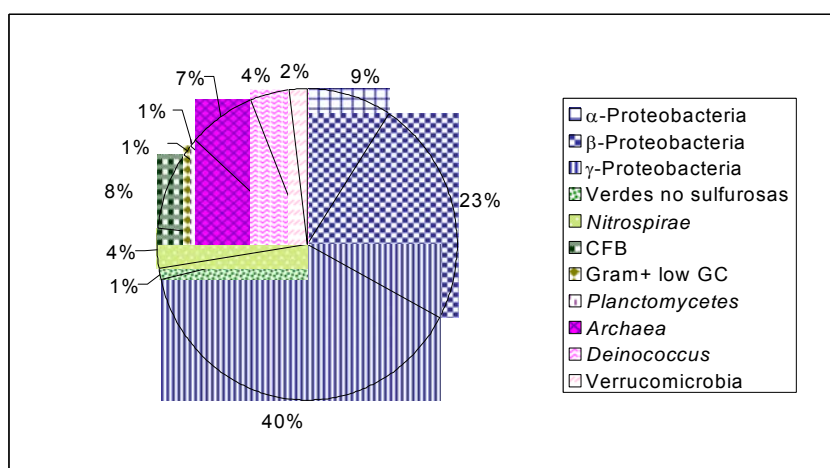


Figura 2 Distribución filogenética de las 96 clonas del estudio

Las distintas características de cada sitio forman una distribución diferente de bacterias por valles (Figura 3)

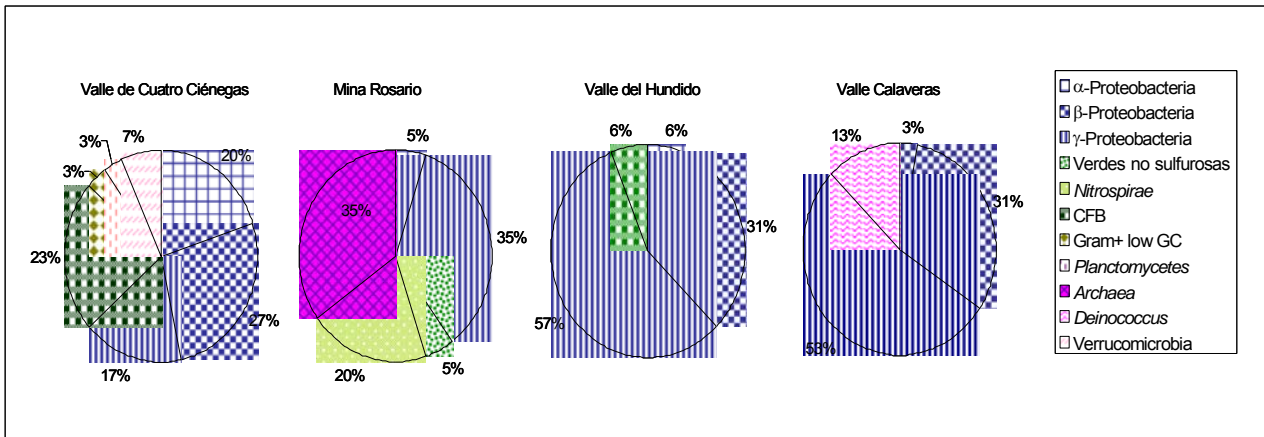


Figura 3 Distribución filogenética de las 96 clonas del estudio por valles.

De estas 98 secuencias se hizo una selección de las 38 clonas representativas del resto (filotipos), con las cuales se trabajó en el origen de las clonas y en las filogenias. En las tabla 1 se reporta para cada clona cuál es la secuencia más parecida propuesta por dos bases de datos independientes (RDB y BLAST).

Grupo filogenético	Clona	N	GenBank			RDB		
			Secuencia más parecida	Procedencia	PI	Secuencia más parecida	Procedencia	PI
α Proteobacteria	CC41P	1	AJ002565	Marino	97	AJ002565	Marino	97
	CC42P	1	AY442178	No reportado	98	AB026194	Marino	96
	CC37P	1	AY258088 <sup>5</sup>	Marino	97	X78315 <sup>22</sup>	Marino	93
	CC43P	1	AY258085 <sup>5</sup>	Marino	99	AF098495 <sup>23</sup>	Marino	95
	Rosario24.28	1	AJ567562	Marino	90	AF104473 <sup>24</sup>	Marino	88
	Hundido26.12	1	AY212600 <sup>7</sup>	Agua dulce	97	AJ227774 <sup>25</sup>	Lodos activados	95
β proteobacteria	CC16.24	6	AF236005	No reportado	98	AF078756 <sup>26</sup>	Agua destilada	98
	Hundido26.13	1	AJ556799	Agua dulce	99	AF089858	Agua dulce	97
	Hundido1tn6	1	AF422679 <sup>8</sup>	Sedimento, Lago Waiiau	95	AJ130765 <sup>27</sup>	No reportado	94
	Hundido2st6	1	AF011347 <sup>9</sup>	Raíces	99	AF011347 <sup>9</sup>	Raíces	99
	Hundido1tn4	1	AF035052 <sup>10</sup>	Agua dulce	99	AF035052	Agua dulce	99
	Calaveras27.3	2	AF522999	Agua dulce	100	Y10146	Raíces	94
γ Proteobacteria	Calaveras28.21	5	AF227863 <sup>11</sup>	No reportado	96	AB021385 <sup>28</sup>	Suelo	97
	CC30P	1	AY310506	Marino	95	U77478 <sup>29</sup>	Ventila hidrotermal	93
	CC38P	1	AF328198 <sup>12</sup>	Fango móvil	96	AJ240993 <sup>30</sup>	Marino	92
	CC45P	1	AY171368	Marino	97	AJ240993 <sup>30</sup>	Marino	94
	CC44P	1	D89929 <sup>13</sup>	Marino	93	AF172991 <sup>31</sup>	Marino	92
	CC32P	1	AJ514914	Marino	99	X74716 <sup>32</sup>	Marino	99
	Rosario24.17	5	AY499915	Marino	95	L25711 <sup>33</sup>	Marino	94
	Hundido26.20	2	AY328792 <sup>14</sup>	Agua dulce	99	AJ002813 <sup>34</sup>	Estómago de microartrópodo	94
	Hundido26.11	2	AY493941	Suelo	99	AJ002006 <sup>35</sup>	Marino	96
	Hundido26.7	3	AY212677 <sup>14</sup>	Agua dulce	98	AB010858 <sup>36</sup>	Marino	97
	Calaveras29.29	14	AY028398 <sup>15</sup>	Marino	95	Z31658	Marino	96
	Calaveras29.17	1	AY095889	Marino	99	U70696 <sup>37</sup>	Marino	97
	Calaveras29.1	1	AY345489	Sedimento, Lago Waiiau	99	Y18228 <sup>38</sup>	Marino	99
Verdes no sulfurosas	Rosario24.49	1	AF524023 <sup>16</sup>	Humedal reforestado	91	AF050608 <sup>39</sup>	Agua profunda contaminada	88
<i>Nitrospirae</i>	Rosario24.38	1	AY493920	Suelo	95	Z95707 <sup>40</sup>	Suelo	93
CFB	CC16.31	1	AY258122 <sup>6</sup>	Marino	90	M58792	Suelo	85
	CC31P	1	AJ567581	Marino	93	AB015524 <sup>41</sup>	Marino	92
	CC36P	1	AF521195 <sup>17</sup>	Marino	91	M62799 <sup>42</sup>	Marino	86
	CC26P	1	AB116508	Marino	95	AF170779	Marino	87
	CC50P	1	AF188173 <sup>18</sup>	Marino	89	M58792	Suelo	90
	CC27P	1	AY345434	Agua del Lago Kauhako	94	M62799 <sup>42</sup>	Marino	91
Gram + bajo GC	CC16.23	1	AB011057 <sup>19</sup>	Composta	91	X71847 <sup>43</sup>	Pasto en proceso de composta	92
<i>Planctomycetes</i>	CC16.22	1	AJ519649	Depósitos de molienda de uranio	90	AJ131819 <sup>44</sup>	Biofilm	85
Verrucomicrobia	CC29P	2	AY114325 <sup>20</sup>	Marino	98	AJ000726 <sup>45</sup>	Pozo petrolero	87
<i>Deinococcus</i>	Calaveras28.5	2	AB022911	No reportado	98	AB022911	No reportado	98
<i>Archaea</i>	Rosario24.44	6	AJ347776	Marino	94	AB019730 <sup>46</sup>	Ventila hidrotermal	93

Tabla 1. PI= Porcentaje de Identidad

El rango de similitud de las secuencias está en 90% para algunas de las clonas, y es posible que las tres clonas con este valor sean bacterias endémicas, por lo menos hasta que no exista el reporte de otra secuencia de esta clase en las bases de datos mundiales.

También tenemos valores hasta 100% para *Limnobacter*, una bacteria de agua dulce.

Es interesante notar que una gran parte (casi el 50%) de las secuencias propuestas por ambas bases de datos fueron obtenidas en ambientes marinos (Figura 4). También hay secuencias que han sido aisladas de ambientes volcánicos como ventilas hidrotermales o lagos formados en cráteres de volcanes.

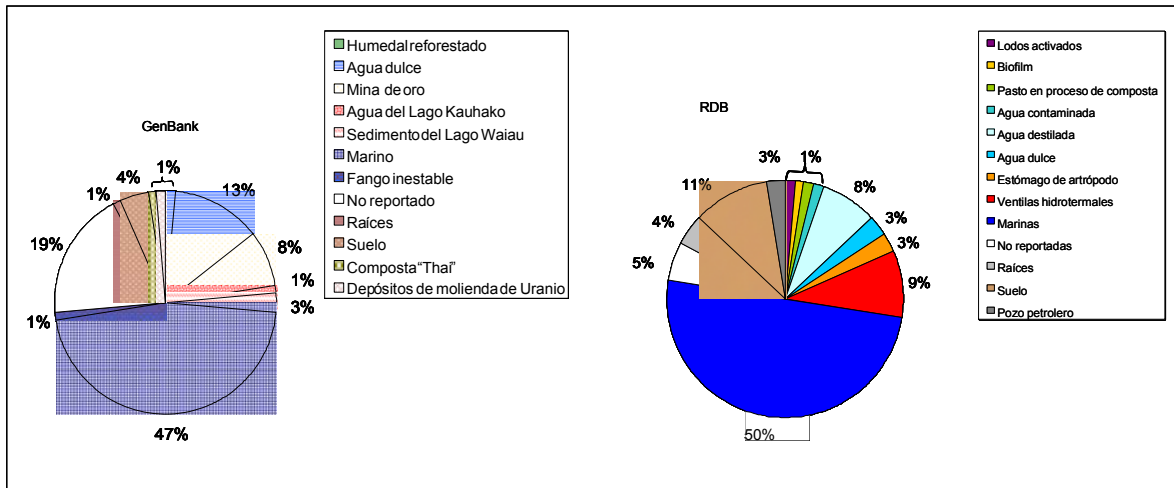


Figura 4. Origen de las clonas más parecidas obtenidas en BLAST y RDB (n=76)

### ANÁLISIS COMPARATIVO CON OTROS ARTÍCULOS

La presencia de taxones marinos en Cuatro Ciéngas nos hace preguntarnos si en otros cuerpos de agua salados y alejados del mar también existen bacterias de origen marino, para lo cual investigamos el origen de otras clonas, reportadas en artículos con características similares a nuestro trabajo, en cuerpos de agua parecidos a Cuatro Ciéngas y también en hábitats distintos. Los resultados de este análisis pueden verse en la Figura 5.

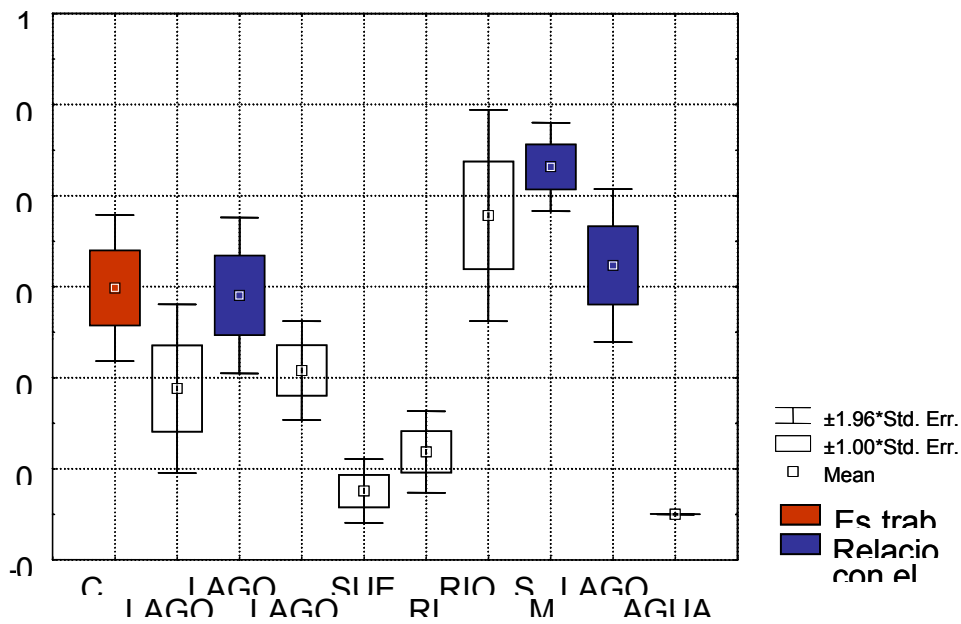


Figura 5. Análisis comparativo: promedios de los valores marino (1) o no marino (0) de las secuencias reportadas en 9 artículos (ver métodos).

Recordemos que valores de 0 se asignaron a las clonas con origen distinto al mar, y de 1 para las marinas, y obtuvimos que los artículos enfocados al estudio de bacterias marinas quedan agrupados junto con nuestro estudio, con valores cercanos a 1 (excepto el artículo en río subterráneo, con una desviación estándar mayor), y son significativamente distintos del grupo de artículos en sitios no marinos (incluidos aquí lagos salados), con valores cercanos a 0. Los datos referentes a cada artículo se muestran en la Tabla 2

Autor	N clonas analizadas	Lugar de estudio
Souza 2004 (CCC)	35	Cuatro Ciénegas Coahuila
Casamayor 2000 (LAGOSAL1)	21	Lagos sulfurosos: Lago Cisó y Vilar, España
Demergasso 2004 (LAGOSAL2)	31	Lagos en el desierto de Atacama, Norte de Chile
Humayoun 2002 (LAGOSAL3)	63	Mono Lake, California
Kuske 1997 (SUELO)	39	Suelos áridos en el sudoeste de EUA
Sekigushi 2002 (RIO)	27	Río Changjiang, China
Angert 1998 (RIO SUBT)	16	Río sulfuroso, parker cave, Kentucky
Madrid 2001 (MAR)	68	Cariaco Basin
Bowman 1999 (LAGOANT)	30	Lagos hipersalinos de la antártida
Williams 2004 (AGUA DUL)	17	Agua potable

Tabla 2.

En las filogenias se utilizaron métodos distintos para hacer los árboles filogenéticos: Neighbor Joining, Máxima Parsimonia y Máxima verosimilitud. En todos los casos obtuvimos filogenias similares, con una distribución de las clonas en los árboles muy parecida, por lo cual sólo presentamos uno de ellos (Figura 6). En todas las filogenias hemos notado que se forma un grupo de gamma proteobacterias constituido por bacterias reductoras de azufre que permanece asociado con las beta proteobacterias. Se ha reportado que las beta proteobacterias son un subgrupo de las gamma proteobacterias, tal como lo hemos observado en nuestras filogenias (Woese CR), y aún así se las considera un grupo externo por sus propiedades metabólicas distintas.

Todos los tipos de bacterias están distribuidos en forma uniforme en el árbol, y no se observa alguna correlación entre los tipos de bacteria con el valle de donde proceden.

Las posibles seis clonas endémicas (marcadas con flechas en el árbol), que tuvieron menor índice de similitud, valor E y “score (bits)” en el BLAST, y/o que en todos los árboles formaron filotipos únicos están marcadas con flechas (CC50P, CC36P, CC16.22, CC16.23, Rosario24.28, y Rosario24.49).

También en las filogenias puede observarse la asociación de nuestras clonas de Cuatro Ciénegas con secuencias de referencia que tienen un origen marino, y además podemos notar que las clonas de Cuatro Ciéngas se asocian más a las secuencias propuestas en BLAST, que a las propuestas por RDB.

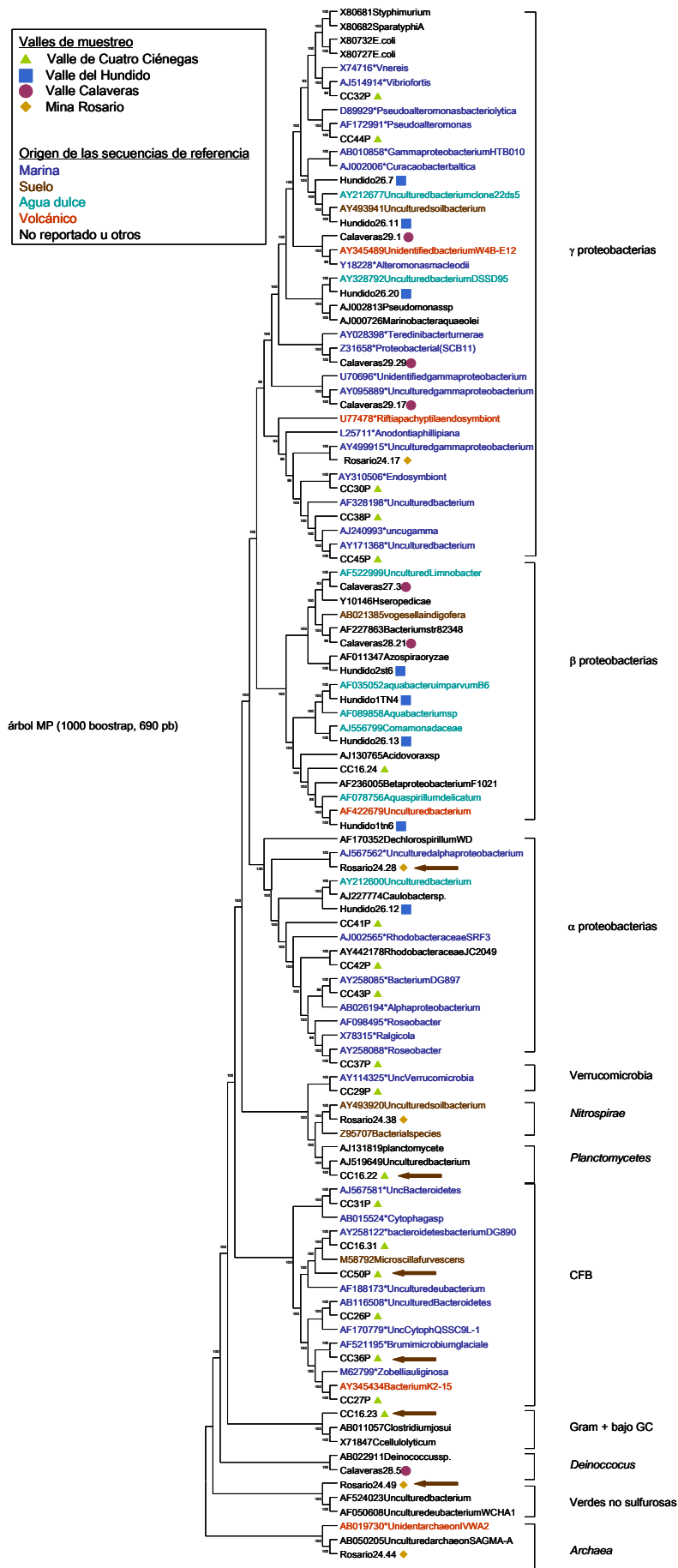


Figura 6. Árbol filogenético de 38 clonas representativas, con las secuencias de referencia propuestas en BLAST y RDB.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Con estos datos podemos sugerir de la presencia de especies únicas (endémicas), aunque en este punto es necesario aclarar que hasta hoy no ha podido definirse con claridad si es posible la existencia del endemismo para el caso de las bacterias. Nosotros consideramos que sí es posible, y que es necesario un mayor desarrollo de las técnicas moleculares que permitan un refinamiento de los análisis para demostrarlo. Por ahora con la herramienta del 16S no es suficiente, incluso se ha comprobado que para definir biogeografía de bacterias es necesario utilizar otros métodos moleculares (Cho y Tiedje 2000, Papke 2004), por lo tanto consideramos que será necesario otro tipo de análisis para poder demostrar con claridad el endemismo en los sitios analizados.

La diversidad que hemos encontrado en las muestras de agua analizadas es similar a otros cuerpos de agua reportados. No hemos querido describir con mayor precisión el tipo de bacterias a nivel de género o especie, pues ha sido un tema controvertido el utilizar únicamente la molécula del 16S para hacerlo. Gran parte de las secuencias que nos sirven como referencia son, al igual que las nuestras, clonas sin identificar y de muestras no cultivables. Es por esto que la definición de género o especie en bacterias debe hacerse en forma cuidadosa y con apoyo de herramientas moleculares más finas, que seguramente se desarrollarán en un futuro muy próximo.

Hemos demostrado que es posible rastrear el origen de las bacterias utilizando para ello análisis genéticos como el que aquí presentamos. La presencia de bacterias características de ambientes marinos en el valle de Cuatro Ciénegas y en los valles colindantes es similar únicamente en zonas que también existe un origen marino, como el desierto de Atacama o los lagos de la Antártida. Esto, junto con los datos geológicos de la zona son evidencias que sugieren un origen marino.

El hallazgo de bacterias marinas dentro del Desierto Chihuahuense y a 300 km de la costa más cercana, enfatiza la importancia de conservar no sólo el valle de Cuatro Ciénegas, sino también los valles colindantes, en los que también encontramos secuencias de origen marino. Las condiciones para explotar los recursos naturales de Cuatro Ciénegas y valles vecinos deben de ser



cuidadosamente controladas, si queremos preservar esta increíble riqueza ecológica para las generaciones futuras.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Angert E.R, Northup D.E., Reysenbach A.L., Peek A.S., Goebel B.M y Pace N.R. (1998). Molecular phylogenetic análisis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogists* 83:1583-1592.
2. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. Myers, and D. J. Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 522-529
3. Bowman JP, McCuaig RD. (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol* 69:2463-83.
4. Casamayor EO, Schafer H, Baneras L, Pedros-Alio C, Muyzer G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66:499-508.
5. Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM. (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31: 442-443
6. CONABIO página web ([http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp\\_049.htm](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp_049.htm)).
7. Demergasso C, Casamayor EO, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Pedros-Alio C. (2004) Distribution of prokariotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microb Ecol* 48: 57-69.
8. Hill G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke A., Maldonado-Ramírez, S., Lynch, S.T. y Nelson, E.B. (2000). Methods for assesing the composition of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology.* 15: 25-36.
9. Huber, T., Faulkner, G. and Hugenholtz, P. (2004). Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* in press
10. INE. (2000 ) Programa de manejo del área de protección de flora y fauna cuatrociénegas México. México, Febrero 166 pp
11. Humayoun SB., Bano N. Y Hollibaugh JT. (2003). Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromitctic soda lake in California. *Appl Envirom Microbiol.* 69: 1030-1042.
12. Kuske C.R., Barns S.M. y Busch J.D (1997). Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Envirom Microbiol* 63: 3614-3621.
13. Madrid VM, Taylor GT, Scranton MI, Chistoserdov AY. (2001) Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the

- anoxic zone of the Cariaco Basin. *Appl Environ Microbiol* 67:1663-74.
14. Minckley, W.L. and G.A. Coles. (1968) Preliminary limnologic information on waters of the Cuatro Ciénegas basin Coahuila México. *West. Nat* 4: 421-431.
  15. Minckley, W. L. (1969). Environments of the Bolsón of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México, with special reference to the aquatic biota. University of Texas El Paso Science Series. El Paso: Texas Western Press
  16. Papke R. T., and David M. Ward (2004) The importance of physical isolation to microbial diversification *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 293-303
  17. Rodríguez-Valera F. (2002). Approaches to procaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Envirom. Microbiol.* 4: 628-633.
  18. Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B, Uchiyama H. (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol.* 68 :5142-50.
  19. Shreve, Forest. (1944). Rainfall of northern México. *Ecology* 25:105-111.
  20. Williams MM, Domingo JW, Meckes MC, Kelty CA, Rochon HS. (2004) Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J Appl Microbiol* 96: 954-64.
  21. Winsborough, B.M. And J.S. Seeler 8th Diatom Symposium (1984). Diatom Epiflora, Limnic Stromatolites and Microbial Mats The relationship of diatom epiflora to the growth of limnic stromatolites and microbial mats. 395-407 Plates 1-4
  22. Winsborough, B.M. (1990). Some ecological aspects of modern freshwater stromatolites in lakes and streams of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, México. Doctoral Dissertation, University of Texas, Austin.
  23. Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
  24. Woese, C.R., Kandler, O. y Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4576-4579.
  25. Woese C. R. "How We Do, Don't and Should Look at Bacteria and Bacteriology" in M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.14, Agosto 13, 2004, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1

#### KIT MO BIO

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

### APÉNDICE 2

#### CONDICIONES DEL PCR 16S RDNA

Para 50  $\mu$ l:

Concentración inicial de cada reactivo	Concentración final	Cantidad en $\mu$ l
Buffer 10X	1X	5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2.75mM	5.5
dNTPs 10mM	0.2mM	1
Oligos 10 $\mu$ M	0.06 $\mu$ M	0.3 de cada uno
Taq polimerasa (ABI) 5U/ $\mu$ l	1U	0.2
DMSO 100%	5%	2.5
Agua		35.2

Los ciclos del PCR fueron las siguientes: 94°C x 4 min; 35 ciclos de: 92°C x 1.5 min, 50°C 1.5 min, 72°C x 2 min; 72°C x 30 min de extensión final para asegurar una mejor adenilación.

## APÉNDICE 3

### EXTRACCIÓN DE BANDAS DE GEL CON EL KIT "QIAQUICK GEL EXTRACTION"

Procesar un máximo de 400mg de agarosa por columna. Todos los pasos de centrifugación son a 10 000 x g ó 13,000 rpm.

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

## APÉNDICE 4

### TOPO TA CLONING

Preparación de la clonación

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

100 a 200 ng del producto en 22 µl

3 µl buffer 10X con magnesio ya incluido

5 µl dATP a 1mM

0.2µl Taq

Esta reacción se incuba a 72° por 10-15 mn

## 2. Para empezar a clonar tener listos

- Tubos estériles
- Baño a 42 grados
- 2 Cajas con LB con 50  $\mu\text{g/ml}$  ampi o 50  $\mu\text{g/ml}$  kanamicina por cada vial de bacterias competentes
- 40mg/ml de xgal en DMF
- Incubadora a 37 grados

## 3. Antes de empezar el experimento

- Prender baño a 42 grados
- Calentar medio SOC a TA
- Calentar cajas de LB a 37 grados por 30 mn
- Después de los 30 mn esparcir 40  $\mu\text{l}$  de x gal en cada caja, incubar a 37 grados hasta que se usen
- Descongelar en hielo, un vial de bacterias por cada transformación.

## Ligación del producto

### 1. Hacer la mezcla siguiente

- Poner 0.5 a 4  $\mu\text{l}$  del producto de PCR a ligar (para productos ambientales se usaron 4  $\mu\text{l}$ , unos 10 a 20 ng)
- Agregar 1  $\mu\text{l}$  de SALT SOLUTION
- Añadir agua estéril para completar 5  $\mu\text{l}$
- En estos 5  $\mu\text{l}$  añadir 1  $\mu\text{l}$  del vector TOPO

### 2. Mezclar suavemente e incubar a TA 5 mn (para productos más grandes (>1kb) o si es una mezcla de productos, incubar 30 mn)

### 3. Poner la reacción en hielo y empezar a transformar. (La reacción se puede guardar a $-20\text{ ON}$ ).

## Transformación

1. Añadir 2  $\mu\text{l}$  de la reacción de ligación en un vial de bacterias competentes.  
NO MEZCLAR PIPETEANDO
2. Incubar en hielo de 5 a 30 mn (para clonar PCRs grandes o mezclas de productos es mejor dejarlo 30 mn)
3. Poner las bacterias a 42 grados por 60 seg. para inducirles a Heat-shock
4. Transferir el tubo en hielo inmediatamente
5. Añadir 250  $\mu\text{l}$  de medio SOC a TA
6. Tapar el tubo y agitarlo horizontalmente a 200 rpm a 37 grados por una hora
7. Sembrar 10 a 50  $\mu\text{l}$  de cada reacción de transformación en las cajas de medio precalentadas. Se recomienda sembrar dos volúmenes distintos de bacterias para asegurar una correcta cantidad de colonias. Para clonación de productos ambientales sembrar 100  $\mu\text{l}$  y 200  $\mu\text{l}$ .

8. Una reacción de clonación eficiente producirá cientos de colonias. Elegir unas 10 blancas o azules claras para analizar. No elegir las colonias azul oscuro.

Selección de clonas positivas

1. Con un palillo se tomó una pequeña muestra de la colonia y se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua limpia, se incubó a 96° por una hora en un tubo de PCR y se cargaron los 25  $\mu$ l en un gel de agarosa al 1% para visualizar el tamaño de los plásmidos.

2. Las colonias con inserto fueron crecidas ON en LB con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina o ampicilina , y se congelaron en 1 ml de LB con glicerol al 15%.

## APÉNDICE 5

### SNAP MINIPREP KIT

Lisis y precipitación

1. Centrifugar 1-3 ml de cultivo ON (1 a 1.5 x10<sup>9</sup> células /ml; yo uso generalmente 1 ml).
2. Resuspender el precipitado en 150  $\mu$ l de **Resuspension Buffer** con vortex o con la pipeta.
3. Añadir 150  $\mu$ l de **Lysis Buffer** y mezclar suavemente invirtiendo 5 a 6 veces. Incubar 3 min a TA.
4. Añadir 150  $\mu$ l de **Precipitation Salt** frío e invertir 6 a 8 veces.
5. Centrifugar a TA 14,000 g por 5 min. Mientras se centrifuga poner la mini columna en el tubo de 2 ml del kit.

Pegado del plásmido

6. Pasar el SN a un tubo estéril. Tirar el precipitado gelatinoso.
7. Añadir 600  $\mu$ l de **Binding Buffer** y mezclar invirtiendo 5 a 6 veces. Pasar todo esto a la mini columna.
8. Centrifugar la mini columna con el tubo a TA a 1,000 – 3,000 g por 30 seg
9. Tirar lo que se centrifugue.
10. Añadir 500  $\mu$ l de **Wash Buffer**.
11. Centrifugar la mini columna con el tubo a TA a 1,000 – 3,000 g por 10 a 30 seg.
12. Añadir 900  $\mu$ l de **1X Final Wash** y centrifugar igual que el paso anterior.
13. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min para secar la resina.

Elución del plásmido

14. Poner la minicolumna en un tubo estéril y añadir 60  $\mu$ l de agua estéril directamente en la resina. Incubar 3 mn a TA.
15. Centrifugar a TA a máxima velocidad por 30 seg. Guardar el eluído y tirar la columna.