

FILOGENIA BACTERIANA MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL rRNA 16S

J. MAURICIO M. HERRERA CUADRA

Carrera de Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México 54090, México

INTRODUCCIÓN A LA FILOGENIA MOLECULAR

La filogenia es el estudio de la evolución y desarrollo de las especies. La comparación de secuencias de algunas macromoléculas, es la forma más precisa y confiable para inferir en las relaciones filogenéticas. Estos datos, son preferibles sobre de otros métodos moleculares por poseer cercanías evolutivas, debido a que permiten interpretaciones cuantitativas y directas, además que van conformando una creciente base de datos para subsecuentes referencias.

Nos encontramos en un nuevo periodo para la microbiología (y, en especial, para la microbiología ambiental) y esto es debido a la gran información que encontramos cuando utilizamos los nuevos métodos en biología molecular a la hora de caracterizar los microorganismos. A pesar de que se sabe que un gran porcentaje del balance total de la biosfera depende de los microorganismos, sólo se conocían alrededor del 1% del total. Esto es debido a las deficiencias que propiciaban los estudios usados que estaban basados en caracteres morfológicos, fisiológicos (necesidad de nutrientes) y estructurales (diferencias entre lípidos de membranas). Para todos ellos era prerequisite esencial el cultivo, pero los medios actuales de cultivo no dejaban cultivar ni una mínima parte de los microorganismos existentes (por distintas razones como pueden ser desconocimiento de los nutrientes requeridos, de las condiciones de la atmósfera, etc.).

Las técnicas del DNA recombinante nos ayudan a subsanar estos problemas y a clasificar a los organismos de un modo más correcto, de acuerdo a su filogenia. Estos estudios podemos hacerlos estudiando la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo, pero actualmente se utilizan los estudios del rRNA 16S o 18S, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos.

Antes del desarrollo de los métodos de secuenciación de bases, era imposible conocer las relaciones evolutivas que conectaban todas las formas de vida, así como dibujar un árbol evolutivo general.

Hace más o menos dos décadas los organismos celulares se dividían en 5 reinos: Animalia, Plantae, Fungi, Protista y Monera. Adicionalmente los constituyentes de estos cinco reinos eran caracterizados en dos grupos eucariotas o procariotas, de acuerdo a si poseían una membrana rodeando a su material genético (membrana nuclear). Se creyó que la máxima diversidad estaba en los eucariotas, y se le concedió a los procariotas el galardón de uniformes en cuanto a sus propiedades.

El paso principal llegó con Carl Woese, quién comparando secuencias de rRNA estableció un árbol filogenético que puede ser usado para relacionar todos los organismos, así como para reconstruir la historia de la vida. Así se reconocieron las tres líneas primarias de evolución, denominadas dominios: Eucarya (eucariotas), Bacteria (inicialmente eubacterias) y Archeae (inicialmente arqueobacterias).

manipulación de pequeñas moléculas y su interacción con el medio, no suelen coincidir con las versiones basadas en el rRNA 16S. Las incongruencias en los árboles filogenéticos elaborados con distintas moléculas reflejan transferencias o mezclas genómicas en el curso de la evolución.

Para la construcción de árboles moleculares a partir de métodos taxonómicos basados en secuencias, solamente una secuencia de genes y no una célula funcional, es requerida para identificar el organismo en términos de su tipo filogenético y además, el análisis por este método de ecosistemas microbianos es más que un ejercicio taxonómico, ya que las secuencias proporcionan herramientas experimentales (por ejemplo, sondas de hibridación molecular) que pueden ser usadas para identificar, observar y estudiar los habitantes microbianos de los ecosistemas naturales.

En tres décadas de estudios de filogenia molecular, los investigadores han recopilado un robusto mapa de la evolución de la diversidad, enseñando que la principal fuente de la diversidad de vida es la microbiana, distribuida entre los tres grupos o dominios. Las propiedades generales de los representantes de los tres dominios indican que la vida inicial estaba basada en la nutrición inorgánica, y que la fotosíntesis y el uso de compuestos orgánicos, y el metabolismo energético vinieron comparativamente después. Las aplicaciones de los métodos de la filogenia molecular para el estudio de los ecosistemas naturales microbianos, sin el requerimiento tradicional del cultivo, han originado el descubrimiento de linajes evolutivos inesperados; miembros de algunos de estos linajes están sólo lejanamente relacionados con organismos conocidos, pero son suficientemente abundantes, por lo que es probable que hayan impactado en la química de la biosfera.

Los organismos microbianos ocupan un lugar particular en el punto de vista humano de la vida. Los microbios reciben poca atención en nuestros análisis generales de biología. Son, en gran parte, ignorados por la mayoría de los biólogos profesionales, y desconocidos por el público, salvo en el contexto de enfermedades y fenómenos de putrefacción. Sin embargo, los procesos de la biosfera dependen totalmente de las actividades microbianas. Nuestros análisis estudian la diversidad en el contexto de los grandes organismos: sólo en torno a cinco mil organismos no eucariotas han sido formalmente descritos (en contraste al medio millón de especies de insectos descritos). Sabemos muy poco de la biología microbiana, a pesar de que es una parte importante en la subsistencia en la vida de este planeta.

La existencia de vida microbiana ha sido un reconocimiento relativamente reciente, hace cerca de trescientos años, con el invento del microscopio por Leeuwenhoek. No fue hasta finales del siglo XIX, con el desarrollo de las técnicas de cultivo puro, cuando los microbios pudieron ser estudiados en modelos individuales, así como caracterizados con amplitud, principalmente por criterios nutricionales. El acercamiento de los cultivos puros al estudio del mundo microbiano condicionó fuertemente la visión de la diversidad de estos. Los criterios morfológicos y nutricionales usados para describir los microbios fallaron en proveer la taxonomía natural, ordenada de acuerdo con las relaciones evolutivas. Los instrumentos moleculares y las perspectivas basadas en la secuenciación génica están aliviando estos impedimentos en alguna medida.

No se puede describir a los microorganismos como hemos venido haciendo con los organismos grandes, es decir, por sus propiedades morfológicas. Por tanto, a la hora de distinguir distintos tipos de microorganismos pronto se recurrió a las propiedades metabólicas de estos. La taxonomía microbiana acumuló descripciones metabólicas y morfológicas de distintos tipos de organismos que esencialmente no estaban relacionados. Ahora la filogenia molecular aporta una organización a partir de la cual podemos relacionar objetivamente distintos organismos, así como interpretar la corriente evolutiva de la maquinaria metabólica que constituye la diversidad del metabolismo.

Los registros fósiles moleculares abarcan un buen número de constituyentes celulares: casi todos los marcadores quimiotaxonómicos pueden ser utilizados en este sentido. La química de la membrana o

pared celular, y la composición de los sistemas de transporte electrónico son sólo los ejemplos más sobresalientes. Sin embargo, la evaluación cronológica de las relaciones filogenéticas requiere la utilización de moléculas con contenido informativo codificado, un cronómetro molecular ha de ser necesariamente un ácido nucleico o una proteína.

La hipótesis del cronómetro molecular asume que el número de cambios en las secuencias de estas moléculas es, a grosso modo, equivalente al tiempo transcurrido desde la divergencia de dos líneas evolutivas que comparten la molécula. Tanto proteínas como ácidos nucleicos han sido ampliamente utilizados como cronómetros moleculares en la resolución de filogenias de muy distintos grupos de seres vivos, pero son los ácidos nucleicos los que han tenido una especial incidencia en la elaboración del árbol evolutivo de los procariotas. Además, presentan la ventaja de que los cambios mutacionales quedan en su totalidad reflejados en la secuencia, evento que no ocurre en las proteínas, debido al carácter degenerado del código genético.

Un cronómetro molecular que permita detectar las relaciones evolutivas más amplias ha de cumplir las siguientes condiciones:

- Debe tener una distribución universal.
- No debe estar sujeto a transmisión horizontal.
- Ha de poseer una constancia funcional, de modo que la presión selectiva que actúe sobre la molécula sea mínima.
- La longitud de la secuencia debe ser suficiente para que las estimaciones de semejanza tengan validez estadística.
- La tasa de cambio, al menos en una parte de la molécula, debe ser lo suficientemente baja como para permitir la detección de las relaciones evolutivas lejanas.
- Desde el punto de vista metodológico interesa que no sea excesivamente larga para poder aplicar técnicas de secuenciación.

La enzima citocromo *c* es un componente de la cadena respiratoria de todos los eucariotes y muchos procariotes. De este modo, ha sido particularmente útil para la construcción de árboles filogenéticos. Algunas de las bacterias más interesantes y peculiares carecen de citocromo *c*; sin embargo, aun en aquellos géneros que poseen la enzima, las proteínas son a menudo muy diferentes como para establecer relaciones confiables entre ellas.

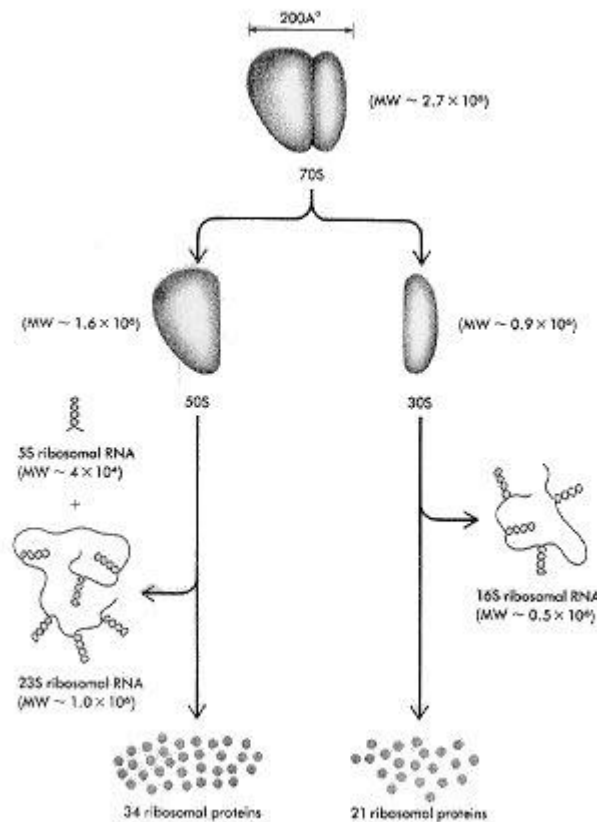
Aunque la secuenciación de ácidos nucleicos es, comparativamente hablando, un método nuevo dentro de los estudios de sistemática, ha demostrado ser uno de los métodos más útiles para inferir la historia filogenética de los organismos. El mayor atractivo de esta técnica se basa en que los caracteres analizados (nucleótidos) son las unidades básicas de información, y que el banco de datos que se puede obtener en estos análisis es inmenso. Para utilizar las secuencias nucleotídicas en estudios filogenéticos éstas deben ser alineadas. El número y tamaño de las secuencias que deben ser alineadas depende del nivel de comparación elegido.

LA IMPORTANCIA DEL RRNA

Los ribosomas fueron vistos por primera vez por Albert Claude a finales de los años 30, en homogenizados celulares por microscopía de campo oscuro. Sin embargo, a mediados de los años 50 George Palade los observó en las células mediante microscopía electrónica. En 1955, Paul Zamecnik demostró que los ribosomas son el sitio de síntesis de proteínas.

El nombre ribosoma, deriva del hecho de que estas partículas en *Escherichia coli* consisten de $\frac{2}{3}$ de RNA y $\frac{1}{3}$ de proteína. El ribosoma de *E. coli*, que posee una masa de 2.5×10^6 D y un coeficiente de sedimentación de 70S, es una partícula esferoidal que mide 250 Å de largo.

El ribosoma 70S se compone de dos subunidades desiguales en tamaño, con valores de sedimentación (Svedbergs) de 30S y 50S. La subunidad pequeña (30S) consiste de una molécula de rRNA 16S y 21 proteínas diferentes, mientras que la subunidad grande (50S) contiene una de rRNA 5S y otra de rRNA 23S, con 31 proteínas diferentes. El rRNA 16S de *E. coli* consiste de 1542 nucleótidos, de los cuales el 46% están apareados entre sí. Esta molécula posee 4 dominios en su estructura secundaria.



Debido a que los ribosomas son críticos para la función celular e interactúan con un gran número de otras moléculas, incluyendo el RNA mensajero (mRNA) y el RNA de transferencia (tRNA), las secuencias de las moléculas de rRNA están altamente obligadas y se han conservado notablemente a través de la evolución. Además, las secuencias de los genes que codifican para el rRNA, se encuentran dentro de las más altamente conservadas ya identificadas.

Estas estructuras primarias están compuestas por regiones alternadas de alta y baja variabilidad. Las regiones con secuencias variables contienen información de bajo nivel filogenético, mientras que las regiones con secuencias preservadas contienen información de los eventos evolutivos más tempranos. Así mismo, existe una gran cantidad de copias de rRNA en una bacteria que esté en fase de crecimiento. De esta forma, el rRNA es un excelente marcador molecular para la reconstrucción de la mayoría de las relaciones filogenéticas.

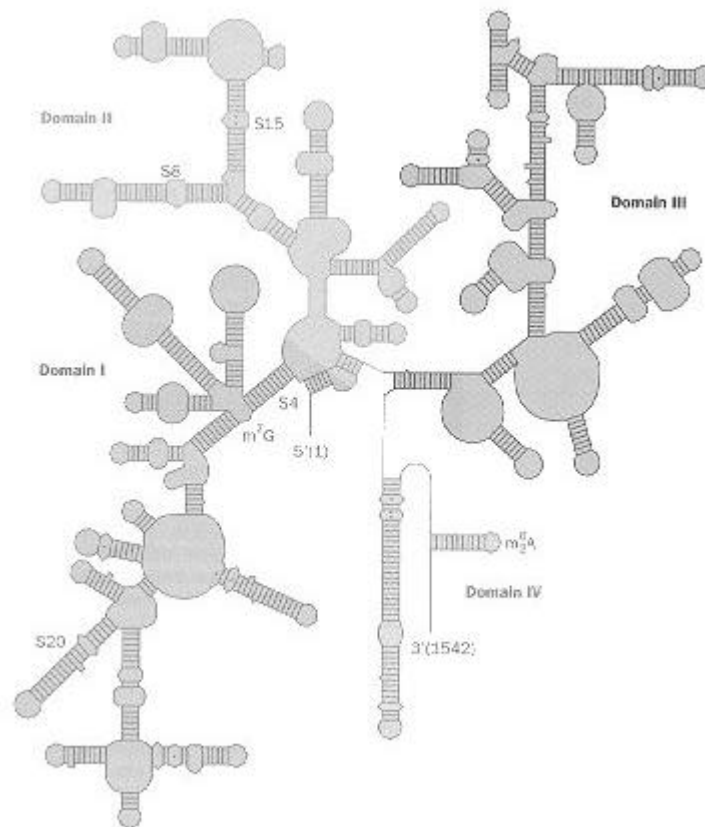
Los métodos de estudios más empleados son la secuenciación del rRNA 5S, 16S y 23S, y la hibridación DNA-rRNA. Con la hibridación DNA-rRNA se pueden comparar secuencias nucleotídicas pertenecientes a distintos taxones debido a que los genes que las forman son más conservativos que los genes del genoma.

LAS TÉCNICAS MOLECULARES

En 1969, Carl Woese y sus colegas decidieron examinar la secuencia del rRNA 16S de muchos organismos, con especial énfasis en bacterias inusuales que previamente eludieron colocación filogenética. Woese escogió el rRNA 16S para la construcción de un árbol filogenético, debido a su universalidad y su alta conservación en estructura y función. Después propuso que los procariotes fueran divididos en 2 grupos, llamados arqueobacterias y eubacterias, los cuales son tan diferentes uno de otro, como cualquiera de ellos lo es de los eucariotes.

La comparación de las secuencias del rRNA 16S, ha facilitado grandemente la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, y la elucidación de sus relaciones naturales. Consecuentemente, estas pueden ser utilizadas para determinar relaciones taxonómicas entre especies que presentan poca interrelación en su DNA.

Inicialmente se comenzaron a realizar estudios de secuenciación del rRNA 16S. Posteriormente, los estudios se extendieron al rRNA 23S. Las secuencias nucleotídicas constantes del rRNA 16S presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los cebadores y así aplicar de forma más fácil la técnica de secuenciación.



La secuenciación completa del rRNA 5S, debido a su pequeño tamaño, es más rápida y económica que las anteriores, e incluso la secuenciación de determinados fragmentos del rRNA 5S puede proporcionar una información adecuada. Dos miembros pertenecientes a un mismo género pueden poseer entre 114-116 p.b. comunes de 118-120. Actualmente existe un debate sobre cuál es el análisis más adecuado para establecer relaciones filogenéticas. El análisis del rRNA 16S parece ser el más adecuado con seres procariotas, ya que contiene aproximadamente 1550 p.b. frente a los 75-120 del

rRNA 5S, por lo que pequeñas diferencias en los nucleótidos del rRNA 5S afectan mucho más al resultado final que en el caso del rRNA 16S.

Además de su utilidad en los estudios taxonómicos, la secuenciación del rRNA se ha aplicado en identificación bacteriana. Mediante el análisis de las secuencias parciales del rRNA 16S es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. Para la identificación de los microorganismos a ese nivel, se han desarrollado pequeñas sondas específicas de la región variable del rRNA 16S. Las diferencias en las regiones conservativas proporcionan así mismo secuencias para el diagnóstico de grupos de organismos relacionados y pueden ser usadas como dianas para sondas específicas de oligonucleótidos. Sondas específicas de rRNA 16S y 23S han sido aplicadas para establecer diferentes grupos y especies, así como en la identificación de bacterias.

La hibridación con sondas específicas permite la identificación rápida de un gran número de aislados, al mismo tiempo que posibilitan la detección directa de microorganismos concretos en las muestras, usando un extracto de ácidos nucleicos como diana. La sensibilidad de las pruebas puede ser aumentada *in vitro* aplicando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A partir de un pequeño fragmento de DNA, es posible amplificar una secuencia diana hasta unos cuantos microgramos, los cuales pueden ser secuenciados directamente o pueden ser utilizados como diana de una sonda específica. El uso combinado de sondas universales y específicas permite también estimar la fracción de determinados microorganismos dentro de un conjunto. Por último, se pueden realizar estimaciones de unidades formadoras de colonias utilizando métodos de hibridación de colonias *in situ* (FISH).

La precisión de las inferencias filogenéticas de las secuencias del rRNA, depende en el número de bases comparadas; y para ser completamente efectivas, al menos deben ser consideradas 1000 bases para cada organismo.

Incluso se han realizado estudios en el ámbito evolutivo, intentando delimitar el origen de las mitocondrias en los eucariotes, logrando descubrir que estas derivaron por endosimbiosis, de la subdivisión α de las eubacterias púrpuras. Sin embargo, la organelogénesis no ha sido exclusiva de este grupo. Las cianobacterias también presentaron relaciones simbióticas con los eucariotes, y su linaje dio origen a los cloroplastos.

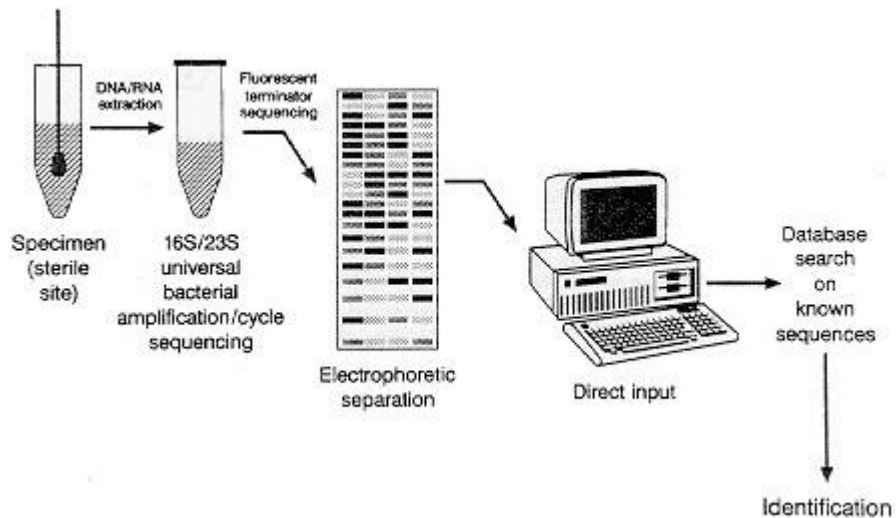
En cuanto a la metodología de este análisis, el rRNA 16S es secuenciado utilizando una modificación de la técnica de Sanger (1977) de dideoxinucleótidos, en la que conocidos primers complementarios a las regiones conservadas del rRNA 16S, son elongados utilizando una transcriptasa inversa. Las pequeñas cadenas de DNA producidas pueden ser amplificadas mediante la PCR o por clonación, y después secuenciadas mediante un proceso automatizado por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Anteriormente, la metodología utilizada para estudiar estas secuencias, recaía en el aislamiento exitoso del rRNA, seguido de la secuenciación directa utilizando transcriptasa inversa. Actualmente, estas secuencias pueden ser clonadas y detectadas por hibridación, con genes que codifican para sondas de rRNA (rDNA) de un organismo diferente. La utilización del PCR, permite amplificar específicamente la región a secuenciar, utilizando una corta selección de primers. Estas secuencias amplificadas específicamente, pueden ser subclonadas para secuenciarse por métodos convencionales.

Se usan dos estrategias a la hora de aislar genes de rRNA del total de los ácidos nucleicos. Una aproximación es clonar fragmentos al azar de DNA del medio ambiente y analizar aquellos que contienen genes de rRNA. Como la cantidad de DNA clonado que contiene genes de rRNA es pequeña, el segundo paso, casi obligado, es la utilización de la PCR para amplificar este rRNA. Como el rRNA está altamente conservado en la naturaleza los investigadores utilizan primers universales para los tres dominios de organismos (eucariotas, bacterias y arqueobacterias), desde todos los puntos parece

aconsejable el uso de la PCR pues se necesita amplificar el rRNA que antes sólo formaba una pequeña parte del total.

La manera más rápida de obtener los constituyentes de los ecosistemas microbianos es pues mediante el uso de la PCR. En principio la PCR realizada con estos primers amplifica los genes de RNA de todos los tipos de organismos presentes en un ambiente. Los tipos individuales de genes en la mezcla son separados en principio por clonación y posteriormente son secuenciados.



Existen bases de datos como el Ribosomal Database Project, el GenBank y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), las cuales contienen miles de secuencias de rRNA, pertenecientes a una gran cantidad de microorganismos. Estas bases de datos pueden consultarse libremente, para realizar una comparación estadística de las secuencias obtenidas de un aislamiento, contra las que ya están publicadas, y así poder elaborar dendrogramas, en los que se indique la posición del nuevo microorganismo recién identificado.

Así mismo, existe un gran número de métodos y programas computacionales que se encuentran disponibles para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas, a partir de las secuencias obtenidas.

LAS APLICACIONES DEL ANÁLISIS DEL rRNA 16S

La secuenciación del rRNA es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas (arriba del nivel de género). Debido a que la molécula de rRNA 16S contiene regiones altamente variables, es usualmente posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias.

La caracterización filogenética de los organismos es más que un ejercicio de taxonomía, puesto que las relaciones evolutivas están establecidas en una forma creíble y cuantitativa. Se espera que los organismos cercanamente relacionados sean similares en sus propiedades bioquímicas generales; por el contrario, la diversidad en las secuencias de rRNA indica diferencias bioquímicas potenciales.

Los métodos moleculares pueden ser usados para obtener esencialmente cualquier gen directamente del medio ambiente sin cultivar el organismo en cuestión que lo posee. Así, se puede obtener genes de una comunidad total de DNA con la ayuda de genes ya conocidos de organismos que ya se conocen. Y los genes nuevos pueden también seleccionarse del DNA clonado del medio ambiente por sus actividades, usando vectores diseñados para activar promotores extraños. Por ejemplo, las

comunidades de organismos termófilos nos podrían ofrecer nuevas proteasas termófilas, DNA polimerasas u otras enzimas. La tecnología molecular hace innecesario el cultivo de estos organismos para su estudio.

Nuestra comprensión del mundo microbiano natural es muy rudimentaria, pero los análisis basados en la secuenciación genómica, nos ofrecen una vía, rápida y eficaz de encaminar nuestros estudios hacia un mayor conocimiento. Los genes del rRNA tomados del ambiente son como "fotografías" de los organismos, representativos de diferentes tipos de genomas, los cuales serán blanco de nuevas caracterizaciones si son interesantes o utilizables. Si queremos entender la biosfera, parece importante que emprendamos un análisis representativo de la diversidad microbiana en el ambiente. Las secuencias del rRNA nos dan una serie de puntos de partida y objetivos en los diferentes organismos, lo que resulta importante, incluso esencial, si se pretende un estudio representativo de la diversidad biológica del mundo microbiano. ¿Con qué clase de organismos compartimos el planeta? ¿Cuál es su papel en la biosfera? ¿Qué modelos son los convenientes en los estudios de laboratorio de los procesos medioambientales? ¿Qué recursos podemos obtener de tal diversidad?

Es necesario un completo catálogo de la biota de la Tierra. Un extenso y representativo estudio, pero que sin embargo debe ser tomado desde un punto de vista de un modesto esfuerzo, usando la tecnología adecuada de secuenciación de genomas. Es un proyecto que trae un a multitud beneficios y en el que deben estar incluidos un estudio de los filotipos del ambiente, incluyendo un mapa cuantitativo de la evolución de la diversidad y librerías de esta diversidad genética.

Las oportunidades para el descubrimiento de nuevos organismos y el desarrollo de los recursos basados en la diversidad microbiana son mayores que antes. Las secuencias moleculares finalmente han dado a los biólogos microbianos un camino para definir su campo de estudio, mediante la filogenia molecular. Las secuencias también son las bases de las herramientas que permitirán a estos biólogos explorar la distribución y el papel de los organismos en el ambiente. La microbiología puede ahora ser una ciencia completa; los organismos pueden ser estudiados en el ecosistema. Es la edad dorada para el descubrimiento de nuevos organismos así como para su conocimiento tanto del organismo en sí como de su labor en el medio ambiente.

Finalmente, podemos decir que la utilización del análisis del rRNA 16S posee múltiples aplicaciones, desde lo molecular hasta lo ambiental, y al parecer es un método que perdurará todavía muchos años más, sobretodo en estudios en el ámbito de la evolución.

BIBLIOGRAFÍA

- DAMS, E., HENDRICKS, L., VAN DE PEER, Y., NEEFS, J., SMITS, G., VANDENBEMPT, I., y DE WACHTER, R. 1988. *Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences*. Nucleic Acids Research. 16, Suplemento: r87-r175.
- EISEN, J., SMITH, S., y CAVANAUGH, C. 1992. *Phylogenetic Relationships of Chemoautotrophic Bacterial Symbionts of Solemya velum Say (Mollusca: Bivalvia) Determined by 16S rRNA Gene Sequence Analysis*. Journal of Bacteriology. 174, 3416-3421.
- FRY, N., WARWICK, S., SAUNDERS, N., y EMBLEY, T. 1991. *The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae*. Journal of General Microbiology. 137, 1215-1222.
- LANE, D., FIELD, C., OLSEN, G., y PACE, N. 1988. *Reverse Transcriptase Sequencing of Ribosomal RNA for Phylogenetic Analysis*. Methods in Enzymology. 167, 138-144.
- LANE, D., PACE, B., OLSEN, G., STAHL, D., SOGIN, M., y PACE, N. 1985. *Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82, 6955-6959.

- MONASTERSKY, R. y MAZZATENTA, O. 1998. *El Origen De La Vida Sobre La Tierra*. National Geographic. 2 (3), 50-77.
- MORELL, V. 1997. *Microbiology's Scarred Revolutionary*. Science. 276, 699-702.
- MURRAY, P., BARON, E., PFALLER, M., TENOVER, F., y YOLKEN, R. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. 6^{ta} Edición. ASM Press.
- PACE, N. 1996. *New Perspective On The Natural Microbial World: Molecular Microbial Ecology*. ASM News. 62 (9), 463-470.
- PACE, N. 1997. *A Molecular View Of Microbial Diversity And The Biosphere*. Science. 276, 734-740.
- PACE, N., OLSEN, G., y WOESE, C. 1986. *Ribosomal RNA Phylogeny and the Primary Lines of Evolutionary Descent*. Cell. 45, 325-326.
- SAYLER, G., y LAYTON, A. 1990. *Environmental Application of Nucleic Acid Hybridization*. Annual Review of Microbiology. 44, 625-648.
- SPEEDING, G. 1990. *Ribosomes and Protein Synthesis*. The Practical Approach Series. Oxford University Press.
- STEFFAN, R., y ATLAS, R. 1991. *Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology*. Annual Review of Microbiology. 45, 137-161.
- UNTERMAN, B., BAUMANN, P., y MCLEAN, D. 1989. *Pea Aphid Symbiont Relationships Established by Analysis of 16S rRNAs*. Journal of Bacteriology. 171, 2970-2974.
- VOET, D., y VOET, J. 1995. *Biochemistry*. 2^{da} Edición. John Wiley & Sons, Inc.
- WATSON, J., HOPKINS, N., ROBERTS, J., STEITZ, J. y WEINER, A. 1987. *Molecular Biology of the Gene*. 4^{ta} Edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- YANG, D., OYAIZU, Y., OYAIZU, H., OLSEN, G., y WOESE, C. 1985. *Mitochondrial Origins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82, 4443-4447.