

**EVALUACIÓN DE CEBADORES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA EN CONSORCIOS
METANOGENICOS.**

INDIRA YULEY MORA POLANCO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2013**

**EVALUACIÓN DE CEBADORES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA EN CONSORCIOS
METANOGENICOS.**

INDIRA YULEY MORA POLANCO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de

Bióloga

TUTOR:

JORGE LUIS FUENTES LORENZO, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph. D.

CO-TUTOR:

FRANCISCO JOSÉ MARTINEZ, M.Sc., Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2013

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
1. MARCO TEÓRICO	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1 <i>Extracción de DNA de células procariotas.....</i>	<i>21</i>
2.2 <i>Diseño de cebadores</i>	<i>25</i>
2.3 <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	<i>26</i>
2.4 <i>Clonación de las bandas amplificadas</i>	<i>27</i>
3 RESULTADOS	28
3.1 <i>Extracción de DNA genómico de procariotas.....</i>	<i>28</i>
3.2 <i>Diseño de cebadores del gen ribosomal 16S de metanobacterias.</i>	<i>31</i>
3.3 <i>PCR usando cebadores para el gen rRNA 16S en DNA extraído de co- cultivos de carbón</i>	<i>35</i>
3.4 <i>Clonación de productos amplificados</i>	<i>37</i>
4. DISCUSIÓN	38
5. CONCLUSIONES	38
6. RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especies representativas de metanógenos descritas hasta la fecha (Tomado de Narihiro y Sekiguchi, 2011).....19

Figura 2. Electroforesis correspondiente a las extracciones de las cepas de referencia, cepas aisladas de carbón y cultivo enriquecido. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: Ladder 100 bp; 1: *E. coli*; 2: *E. aerogenes*; 3: *C. braakii*; 4: *S. enterica*; 5: *S. aureus*; 6: *B. cereus*; 7: *P. vulgaris*; 8: *P. alcalifaciens*; 9: *S. mutans*; 10: *P. polimixa*; 11: *G. stearothermophilus* ; 12: *B. subtilis*; 13: *B. licheniformis*; 14: *B. sphaericus*; 15: *P. aeruginosa*; 16: *S. griseus*; 17: *C. bifermentas*; 18: *A. viscosus*. Del carril 19 al 26 se encuentran listados los aislados de carbón: 19: CB2; 20: CB3; 21: CB4; 22: CB5; 23: CB7; 24: CB8; 25: CB9; 26: CB10; 27: Co-cultivo productor de metano; C-: Control negativo; M: Ladder 100 bp.....28

Figura 3. Electroforesis de agarosa al 1% en buffer TBE correspondiente a las amplificaciones usando cebadores universales de bacterias y estirpes provenientes de mantos de carbón. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: Ladder 100 bp; C-: control negativo; C+: control positivo; 1: *E. coli*; 2: *E. aerogenes*; 3: *C. braakii*; 4: *S. enterica*; 5: *S. aureus*; 6: *B. cereus*; 7: *P. vulgaris*; 8: *P. alcalifaciens*; 9: *S. mutans*; 10: *P. polimixa*; 11: *G. stearothermophilus* ; 12: *B. subtilis*; 13: *B. licheniformis*; 14: *B. sphaericus*; 15: *P. aeruginosa*; 16: *S. griseus*; 17: *C. bifermentas*; 18: *A. viscosus*. Del carril 19 al 26 se encuentran listados los amplicones de los aislados de carbón: 19: CB2; 20: CB3; 21: CB4; 22: CB5; 23: CB7; 24: CB8; 25: CB9; 26: CB10; M: Ladder 100 bp.30

Figura 4. Estructura secundaria del RNA ribosomal. Los cebadores diseñados en este estudio se ubicaron en las regiones más conservadas del gen. Los

cebadores reportados por la literatura están señalados con flechas negras. Las regiones hipervariables están marcadas de V1- V9. Los tallos están enumerados del 1 al 50 (Modificado de Neefs *et al.*, 1993).....34

Figura 5. Electroforesis de agarosa al 0.8% en buffer TBE correspondiente a la amplificación usando los cebadores específicos para metanobacterias reportados por la literatura. M: Ladder 100 bp; C-: control negativo (*E. coli*); A: Co-cultivo productor de gas metano.36

Figura 6. Electroforesis de agarosa al 0.8% en buffer TBE correspondiente a las amplificaciones usando los cebadores específicos para metanobacterias diseñados en este estudio. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: Ladder 100 bp; C-: control negativo (*E. coli*); 1: UNMET2FAMFW151-172 /UNMET-RV947-969; 2: UNMETFW947-969/UNMET-RV1425-42; 3: UNMETFW1-26/UNMET-RV947-969; 4: UNMET2FAMFW151-172/UNMET-RV1425-42; 5: UNMETFW1-26/UNMET-RV1425-42. DNA proveniente del cultivo enriquecido con carbón fue utilizado para este fin.37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivos utilizados	23
Tabla 2. Relación de pureza y concentración de ADN	29
Tabla 3. Número de secuencias de genes rRNA 16S de metanobacterias descargadas de RDP II.....	31
Tabla 4. Características de los cebadores diseñados	35
Tabla 5. Cebadores utilizados en la amplificación del gen rRNA 16S de metanobacterias	35

ANEXOS

ANEXO A. Alineamiento de las familias de arqueobacterias metanogénicas.50

ANEXO B. Secuencia de nucleótidos de las regiones hipervariables del gen rRNA
16S de metanobacterias por familias.67

ANEXO C. Análisis en BLAST de los cebadores diseñados77

TITULO: EVALUACIÓN DE CEBADORES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA EN CONSORCIOS METANOGÉNICOS *

AUTOR: Indira Yuley Mora Polanco**

PALABRAS CLAVES: Cebadores específicos, arqueobacterias metanogénicas, bacterias, mantos de carbón, metano, extracción de DNA, amplificación por PCR.

DESCRIPCIÓN:

Entre las fuentes no convencionales de gas conocidas de nuestro país, se encuentran los reservorios de metano de origen biogénico asociado a mantos de carbón. Este hecho, abre nuevas oportunidades para el desarrollo de biotecnologías que nos permitan estudiar las poblaciones bacterianas asociadas a la producción de metano. El presente trabajo pretendió diseñar cebadores específicos para la identificación de arqueobacterias metanogénicas, empleando las secuencias del gen ribosomal 16S a partir de la base de datos Ribosomal Database Project, y posteriormente, evaluar su efectividad para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicho gen, en DNA extraído de co- cultivos de carbón y cepas aisladas de mantos de carbón. También se evaluó la calidad del DNA, además de la efectividad de los cebadores específicos para bacterias y arqueobacterias metanogénicas reportados en la literatura. 1166 secuencias fueron alineadas y utilizadas para el diseño de cinco sets de cebadores que flanquean las regiones hipervariables V1-V8. La especificidad de los cebadores fue examinada de manera teórica a través del programa BLAST y empíricamente, por medio de amplificación por PCR. Los resultados de la amplificación muestran que el uso combinado de la lisis celular química, enzimática y física nos permiten obtener ADN de óptima calidad para manipulaciones moleculares, y que al menos un juego de cebadores es adecuado para la detección de metanobacterias en co-cultivos de carbón, siendo necesaria la secuenciación de los productos de PCR para la identificación de arqueobacterias metanogénicas productoras de metano. Se recomienda evaluar los cebadores diseñados en cepas de metanobacterias de referencia para validar los resultados obtenidos en este estudio.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, Ph.D.). Codirector: Francisco José Martínez Pérez (M.Sc, Ph.D.).

TITLE: EVALUATION OF PCR PRIMERS FOR MICROBIAL IDENTIFICATION IN METHANOGENIC CONSORTIA. **

AUTHOR: Indira Yuley Mora Polanco**

KEY WORDS: Specific primers, methanogenic archaea, bacteria, coal beds, methane, extraction of DNA, amplification by PCR.

DESCRIPTION:

Among the unconventional sources of gas in our country, the reservoirs of biogenic methane associated with coal seams are found. This opens up new opportunities for the development of biotechnologies that allow us to study the microbial populations associated with the production of methane. The present study sought to design specific primers for the identification of methanogenic archaea, using the sequences of 16S rRNA gene from the Ribosomal Database Project, and then evaluate their effectiveness for Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification in DNA extracted from coal co- cultures and strains isolated from coal beds. We also tested the DNA quality, besides the effectiveness of the specific primers for bacteria and methanogenic archaeobacteria reported in the literature. 1166 sequences were aligned and used to design five primer sets flanking the hypervariable regions V1- V8. The specificity of the primers was tested theoretically using the software BLAST and empirically using Polymerase Chain Reaction (PCR). Amplification results show that the combined use of chemical, enzymatic and physical cellular lysis, allow us to obtain optimal DNA for molecular manipulations and at least one primer set is suitable for detecting metanobacteria in coal co-cultures, requiring the sequencing of PCR products for methanogenic archaea identification. It is recommended to test the designed primers in methanobacteria reference strains to value the obtained results in this work.

* Investigation

** Faculty of Science. Program of Biology. Advisor: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, Ph.D.).
Co-advisor: Francisco José Martínez Pérez (M.Sc, Ph.D.).

INTRODUCCIÓN

El interés por la explotación de fuentes de gas no convencionales que permitan compensar la creciente demanda energética se encuentra en aumento. En Colombia, las reservas de gas metano son actualmente de 17.5×10^{12} pies cúbicos de gas (17.5 TCF) y su consumo de 7×10^9 pies cúbicos por día. Se estima que con el ritmo de consumo actual, estas reservas de gas se agotarán en los próximos 10 años (García-González, 2010).

Entre las fuentes no convencionales de gas conocidas, se encuentran los reservorios de metano asociado a formaciones geológicas con mantos de carbón (Longwell *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1995; Beaton *et al.*, 2006). Recientemente, mediante un estudio de la composición isotópica (^{13}C y ^1D) del carbón (Martínez, 2009), se evidenció el origen biogénico de algunos de los reservorios de gas metano en las formaciones de Cerrejón y Cucunubá en Colombia. Este hallazgo, abre nuevas oportunidades para el desarrollo de biotecnologías que incrementen los volúmenes de producción de gas metano; las cuales pueden ser de particular importancia para Colombia considerando que el país posee las mayores reservas de carbón en Suramérica.

El conocimiento sobre los mecanismos de generación de gas metano en mantos de carbón, abre nuevos horizontes para el desarrollo de tecnologías de producción de gas metano con base en biotecnologías (Flores, 2008; Wang *et al.*, 2010). El uso de herramientas moleculares como las firmas genéticas basadas en el gen RNA ribosomal 16S, ha permitido conocer la composición de los consorcios microbianos involucrados en la producción de gas metano en mantos de carbón de diferentes formaciones geológicas; pero además, estas firmas genéticas constituyen una herramienta efectiva para medir las proporciones de los metanógenos bajo condiciones de laboratorio (Johnson *et al.*, 1994; Gupta y

Birendra, 2000; Case *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008); soportando así tecnologías *ex situ* para producción de metano a partir de carbón bituminoso de baja calidad comercial.

En tales tecnologías, el diseño de cebadores apropiados para la reacción de PCR es crítico dado que una unión inespecífica a la región blanco conduce a fallas en la reacción (Wang y Qian, 2009). En la actualidad, se conoce de la literatura la existencia de cebadores para grupos específicos de metanógenos tales como el 146f/1324r (Marchesi *et al.*, 2001) y el Met83F (Met86F)/Met1340R (Wright and Pimm, 2003). Adicionalmente, un número de nucleótidos específicos que detectan metanógenos a diferentes niveles taxonómicos han sido diseñados para resolver diferentes poblaciones en lodos de aguas residuales (Rocheleau *et al.*, 1999; Zheng and Raskin, 2000; Hori *et al.*, 2006; Ariesyady *et al.*, 2007; Franke-Whittle *et al.*, 2009a; Narihiro *et al.*, 2009a,b), en el rumen de rumiantes (Yanagita *et al.*, 2000; Skillman *et al.*, 2004), en sedimentos del subsuelo marino (Boetius *et al.*, 2000; Nercessian *et al.*, 2004), sedimentos anóxicos (Falz *et al.*, 1999), en el intestino humano (Armougom *et al.*, 2009) y en humedales (Bräuer *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008a,b). Sin embargo, la acumulación de polimorfismos en regiones conservadas del gen RNA ribosomal 16S hace que las tasas de cobertura de algunos cebadores disminuyan (Cole *et al.*, 2009), limitando la detección de dichos grupos en la población estudiada (Wang y Qian, 2009). Una estrategia muy usada para contrarrestar esta limitación, es el diseño iterativo de cebadores a medida que nuevas secuencias estén disponibles en las bases de datos. Los cebadores de metanobacterias diseñados hasta ahora merecen una revisión ya que se ha observado que los arqueobacterias metanógenas detectados por los mismos, hacen parte de las familias con mayores representantes y muchos de ellos excluyen secuencias a la hora del diseño, ya que son fabricados para ser usados en determinados metagenomas ambientales (Narihiro y Sekiguchi, 2011)

En el presente informe, se presentan los resultados obtenidos por la estudiante Indira Yuley Mora Polanco durante una pasantía de investigación en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental; la cual fue soportada por el proyecto: VIE-UIS 5187. Estudio de las poblaciones microbianas asociadas con mantos de carbón de la formación Guaduas en Colombia. El objetivo principal de la pasantía fue diseñar y evaluar la efectividad de cebadores PCR para la identificación de microorganismos en consorcios metanogénicos usando como blanco el gen ARN ribosomal 16S. Son objetivos específicos los siguientes: *i)* Establecer un procedimiento de extracción de ADN de microorganismos en consorcios metanogénicos, *ii)* Diseñar cebadores para la identificación de amplia cobertura de arqueobacterias metanogénicas empleando las secuencias del gen ARN ribosomal 16S disponibles en la base de datos “Ribosomal Database Project” y, *iii)* Evaluar la efectividad de los cebadores diseñados para la amplificación del mencionado gen en metagenomas obtenidos de mantos de carbón productores de gas biogénicos.

1. MARCO TEÓRICO

El gas metano asociado a mantos de carbón se clasifica en dos tipos principalmente: gas termogénico y gas biogénico. El primero se forma durante el proceso de carbonificación de la materia orgánica (turba) y se conoce, es consecuencia de las altas presiones y temperaturas que caracterizan estos procesos primarios de formación del carbón. El gas biogénico se sub-divide en dos tipos principales: gas primario y gas secundario. El primero, es generado por actividad microbiana en las primeras fases de formación de carbón a partir de la materia orgánica contenida en el. El segundo, es consecuencia también de la actividad microbiana pero ocurre a partir de la actividad metabólica de los microorganismos introducidos desde aguas meteóricas y/o subterráneas, que se filtra en los mantos de carbón o por rocas permeables adyacentes ricas en materia orgánica (Scott *et al.*, 1994).

La generación de metano biogénico a partir de carbón podría convertirse en una fuente renovable de gas metano como lo sugieren algunos autores (Faiz and Hendry, 2006; Kotarba, 2001; Thielemann *et al.*, 2004). Scott *et al.* (1994), fueron los primeros que introdujeron el concepto de metano de mantos de carbón microbiológicamente incrementado. Ellos propusieron la inyección de consorcios bacterianos y nutrientes en los mantos de carbón, con el fin de incrementar la cantidad de metano en el manto y facilitar su extracción. Otros investigadores plantean que la inyección de nutrientes que estimulen la actividad de producción de metano de los microorganismos nativos del manto de carbón, puede ser más efectiva que la introducción de nuevas estirpes microbianas (Wang *et al.*, 2010). Bajo condiciones de laboratorio, se ha demostrado que se puede producir metano usando consorcios microbianos y carbón de diferente origen (Johnson *et al.*, 1994; Gupta y Birendra, 2000; Green *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008);

soportando además la factibilidad de tecnologías *ex situ* para producción de metano a partir de carbón bituminoso de baja calidad comercial.

Lo que conocemos como carbón mineral, es un sistema complejo compuesto de materia orgánica (85-95%) y de materiales inorgánicos como aluminosilicatos y piritas que constituyen el peso restante del carbón (Levine *et al.*, 1982). La materia orgánica refleja la naturaleza del material vegetal precursor que puede incluir compuestos fermentados por bacterias como son: ligninas, ácidos grasos, alcoholes, cetonas, *n*-alcanos, isoprenoides, compuestos aromáticos y alifáticos (Cattcheside y Ralph, 1999; Ahmed and Smith, 2001; Formolo *et al.*, 2008). En tal sentido, un manto de carbón constituye, por su composición, un adecuado microambiente para el desarrollo de consorcios microbianos.

Para convertir los sustratos orgánicos complejos presentes en el carbón en metano se requiere, además de las bacterias metanogénicas, otras bacterias del tipo fermentativas y acetogénicas. Las bacterias fermentativas deben hidrolizar y fermentar los sustratos produciendo acetato, cadenas largas de ácidos grasos, CO₂, H₂, NH₄⁺ y HS⁻. Las bacterias acetogénicas pueden consumir H₂ y CO₂, dimetoxilar material de bajo peso molecular, o hidrolizar compuestos aromáticos, para producir acetato. Otras bacterias acetogénicas productoras de H₂, pueden convertir ácidos grasos, alcoholes y algunos compuestos aromáticos y aminoácidos, en H₂, CO₂ y acetato. Se ha indicado, que los principales compuestos del carbón degradados por actividad microbiana hasta acetato son *n*-alcanos, isoprenoides e hidrocarburos policíclicos y alifáticos. La actividad de los metanógenos (Arqueobacterias) constituye la última pero más importante etapa del proceso, donde H₂, CO₂, formato y acetato, son usados para producir metano (Formolo *et al.*, 2008; Strapoc *et al.*, 2008; Warwick *et al.*, 2008; Orem *et al.*, 2010; Wang *et al.* 2010).

La adopción de herramientas moleculares en estudios de ecología microbiana, ha ampliado nuestro conocimiento en cuanto a la abundancia, diversidad y función de los organismos procarióticos (Woese, 1987; Case *et al.*, 2007). Para explorar la importancia ecológica de las bacterias metanogénicas en ecosistemas naturales son indispensables ciertas técnicas de identificación y cuantificación para los diferentes grupos que las componen. Para ese propósito se han utilizado análisis de lípidos de membrana (Weijers *et al.*, 2004; Strapoc *et al.*, 2008), la autofluorescencia (Mochimaru *et al.*, 2007), la medición de diferentes tipos de actividad metabólica (Weijers *et al.*, 2004) y el *profiling* inmunoenzimático (Sorensen y Ahring, 1997). Además de los métodos mencionados anteriormente, se han adoptado técnicas cultivo-independientes basados en el análisis de ADN utilizando cebadores o sondas, tales como hibridación de membrana, hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés), la clonación de genes como el RNA ribosomal 16S, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), y método de escisión con ribonucleasa H (RNasa H). Estos métodos permiten detectar y cuantificar los metanógenos de manera más específica y precisa (Narihiro y Sekiguchi, 2011). Sin embargo, hay que señalar que los análisis de comunidades microbianas basados en la lisis celular, la extracción de ADN, PCR y clonación a menudo susceptibles de error, debido al sesgo implicado en cada uno de los pasos (Dahllöf, 2002).

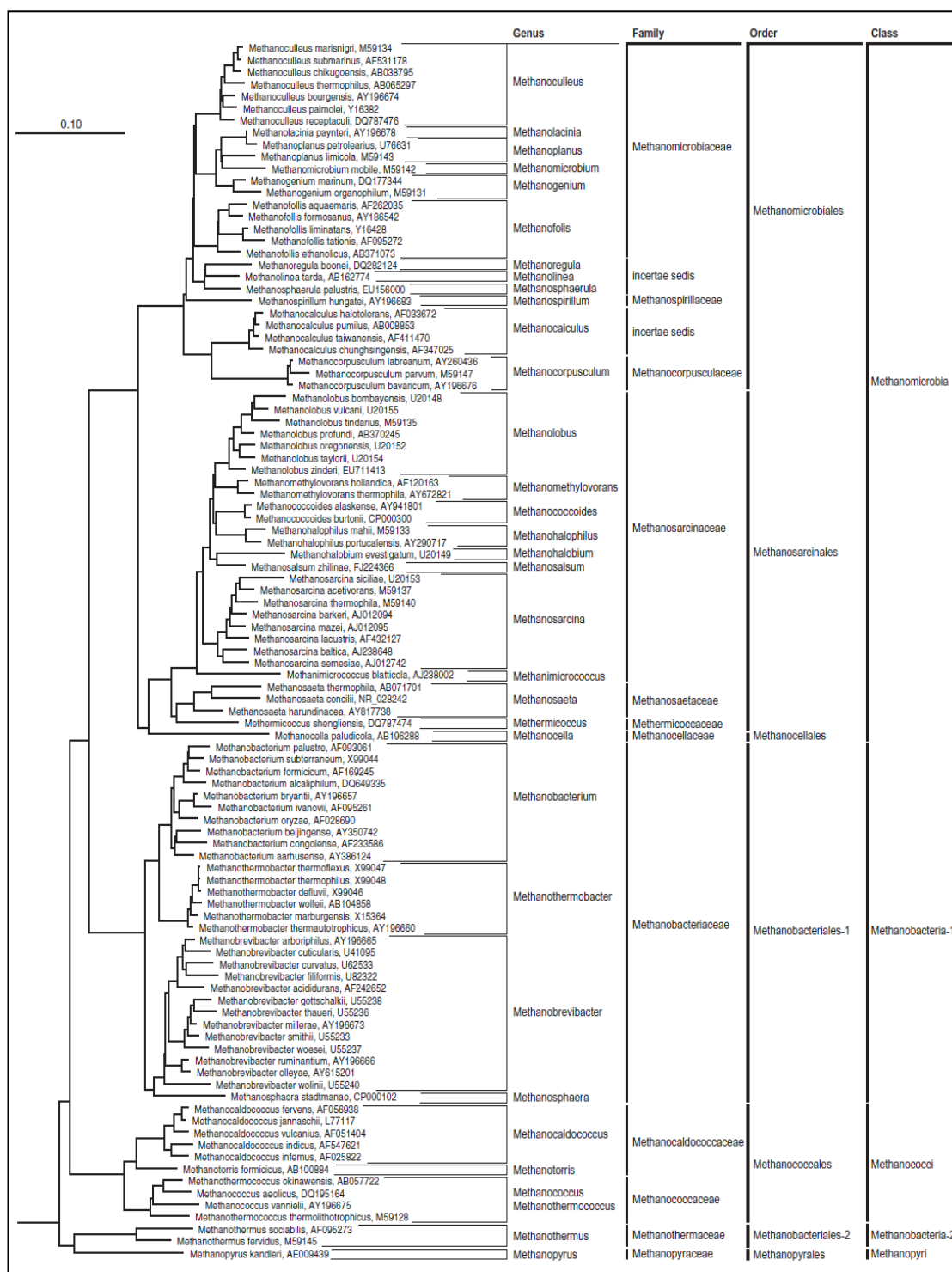
La mayor parte de los estudios efectuados para la caracterización de las poblaciones de metanobacterias en mantos de carbón han empleado la amplificación directa del gen RNA ribosomal 16S (Green *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2007; Strapoc *et al.*, 2008). Características tales como: tamaño, función esencial, ubicuidad y propiedades evolutivas; así como, la disponibilidad de sus secuencias génicas en bases de datos gratuitas y accesibles, han permitido que este gen sea el marcador molecular más utilizado (Case *et al.*, 2007).

Todos los metanógenos aislados y caracterizado hasta la fecha se clasifican en el *Phylum Euryarchaeota* dentro del dominio *Archaea* (Garrity *et al.*, 2007). Estos se asignan a 33 géneros pertenecientes a las clases *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanococci* y *Methanopyri* (Fig. 1).

Methanomicrobia es la clase más diversa filogenética y fisiológicamente. Esta contiene tres órdenes (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* y *Methanocellales*) con 7 familias y 23 géneros. Dentro del orden *Methanosarcinales* encontramos los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* que juegan un papel clave en la conversión de acetato en metano en diversos ambientes anaeróbicos, y los otros géneros restantes, son conocidos para metabolizar un amplios rangos de sustratos, tales como: hidrógeno, metanol y metilaminas (Garrity y Holt, 2001). Los miembros conocidos del orden *Methanomicrobiales* son todos hidrogenótrofos y algunos de ellos se observan a menudo en ambientes anaeróbicos como eliminadores de hidrógeno importantes (Liu y Whitman, 2008).

La clase *Methanobacteria* contiene a las familias *Methanobacteriaceae* y *Methanothermaceae*; las cuales son mayormente hidrogenótrofas. Por su parte, la clase *Methanococci* incluyen las familias *Methanococcaceae* y *Methanocaldococcaceae* que están ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales tales como: sedimentos marinos y de aguas geotérmicas del subsuelo profundo (Liu y Whitman, 2008). Por último, la clase *Methanopyri* contiene un solo género, *Methanopyrus*; cuyas especies son metanógeno hipertermófilos que también habitan aguas geotérmicas del subsuelo profundo (Takai *et al.*, 2008).

Figura 1. Especies representativas de metanógenos descritas hasta la fecha
(Tomado de Narihiro y Sekiguchi, 2011).



Sin embargo, muchos de los cebadores diseñados para la amplificación del gen RNA ribosomal 16S en metanógenos son específicos para familias o géneros de metanógenos, presentando restricciones respecto al número de familias que pueden detectar en muestras ambientales. Adicionalmente, varios de los cebadores diseñados datan de hace más de diez años (Narihiro y Sekiguchi, 2011) y en su diseño no se consideraron especies de metanógenos de géneros recientemente reportados como son: *Methanofollis* (Imachi *et al.*, 2009), *Methanolobus* (Doerfert *et al.*, 2009), *Methanospirillum* (Iino *et al.*, 2010) y *Methanobacterium* (Krivushin *et al.*, 2010; Shcherbakova *et al.*, 2010). Por tal motivo, se requiere revisar las entradas disponibles en las bases de datos con el fin de diseñar nuevos diseños de cebadores con mayor cobertura para la identificación de metanógenos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Extracción de DNA de células procariotas.

Para la obtención de ADN genómico en células procariotas se siguió básicamente el protocolo descrito por Maniatis *et al.* (1989) con las modificaciones propuestas por Liu (2009).

Muestras usadas

Con el fin de establecer un protocolo que permita la extracción eficiente de ADN genómico de una amplia variedad de especies bacterianas, se usaron 18 cepas de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, de sus siglas en inglés); las cuales fueron compradas a la casa comercial OXOID LTD (Basingstoke, Inglaterra). Las cepas utilizadas fueron: *Actinomyces viscosus* ATCC®15987™, *Bacillus cereus* ATCC®10876™, *Bacillus licheniformis* ATCC®12759™, *Bacillus sphaericus* ATCC®4525™, *Bacillus subtilis* ATCC®6633™, *Citrobacter braakii* ATCC®43162™, *Clostridium bifermentans* ATCC®10137™, *Enterobacter aerogenes* ATCC®35029™, *Escherichia coli* (JM101) ATCC®33876™, *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* ATCC®10149™, *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* ATCC®43865™, *Proteus vulgaris* ATCC®33420™, *Providencia alcalifaciens* ATCC®51902™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®10145™, *Salmonella enterica* (subsp. *enterica* serovar *typhimurium*) ATCC®13331™, *Staphylococcus aureus* (subsp. *aureus*) ATCC®33592™, *Streptococcus mutans* ATCC®25175™, *Streptomyces griseus* (subsp. *griseus*) ATCC®10137™.

Adicionalmente, un grupo de cepas microbianas (CB2, CB3, CB4, CB5, CB7, CB8, CB9, CB10) y co-cultivos productores de gas metano provenientes de mantos de carbón (Mayorga, 2012), que son conservadas en la colección microbiana del

Laboratorio de Microbiología (Escuela de Biología-UIS), fueron usados con el fin de comprobar la eficiencia del método de extracción para el estudio de estirpes microbianas de origen ambiental.

Cultivos celulares

Las estirpes microbianas antes mencionados, se crecieron en 20 mL de los medios indicados en cada caso en la Tabla 1. Los cultivos se desarrollaron durante toda la noche a una temperatura de 37°C y bajo condiciones de agitación (100 rpm); excepto en el caso de la especie *Streptococcus mutans* que precisó de tres días de crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis. En el caso del co-cultivo, aproximadamente 0.5g $\pm$ 0.2 de carbón, fueron sumergidos en etanol al 70% durante 20 minutos, secados y triturados en morteros estériles, y agregados en tubos Pirex conteniendo 20 mL de medio RCM carbonatado. Los tubos Pirex se sellaron con papel parafilm e incubados por 15 días a una temperatura de 37°C. Todos los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 min y el pellet conservado a -20°C hasta su uso en la extracción.

Tabla 1. Medios de cultivos utilizados

Código	Cepas o Cultivo enriquecido	Medio de cultivo
ATCC®33876™	<i>Escherichia coli</i> (JM101)	CN
ATCC®35029™	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CN
ATCC®43162™	<i>Citrobacter braakii</i>	CN
ATCC®13331™	<i>Salmonella</i> entérica	CN
ATCC®33592™	<i>Staphylococcus aureus</i>	CN
ATCC®10876™	<i>Bacillus cereus</i>	CN
ATCC®33420™	<i>Proteus vulgaris</i>	CN
ATCC®51902™	<i>Providencia alcalifaciens</i>	CN
ATCC®25175™	<i>Streptococcus mutans</i>	RCM
ATCC®43865™	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	T
ATCC®10149™	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	CN
ATCC®6633™	<i>Bacillus subtilis</i>	CN
ATCC®12759™	<i>Bacillus licheniformis</i>	CN
ATCC®4525™	<i>Bacillus sphaericus</i>	CN
ATCC®10145™	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P
ATCC®15987™	<i>Actinomyces viscosus</i>	CN
ATCC®10137™	<i>Clostridium bifermentans</i>	RCM
ATCC®10137™	<i>Streptomyces griseus</i>	CN
I37	Co-cultivo productor de metano	RCM
CB2	Aislado a partir de carbón	RCM
CB3	Aislado a partir de carbón	RCM
CB4	Aislado a partir de carbón	RCM
CB5	Aislado a partir de carbón	RCM
CB7	Aislado a partir de carbón	RCM
CB8	Aislado a partir de carbón	RCM
CB9	Aislado a partir de carbón	RCM
CB10	Aislado a partir de carbón	RCM

Medio de cultivo utilizado: **CN**: caldo nutritivo; **T**: Medio de crecimiento triptacasa; **P**: P agar; **RCM**: Reinforced Clostridium medium.

Lisis celular

Para la lisis celular, el pellet de cada muestra fue re-suspendido en 500 μ L de buffer de lisis (30 mM Tris- HCl pH 8.0, 30 mM EDTA pH 8.0 autoclavado, 150 mM NaCl, 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100) usando un Vórtex. La mezcla se sometió a ultrasonido utilizando un baño térmico ultrasónico de alta intensidad con una sonda estándar de 13mm durante 150 segundos. Las muestras fueron enfriadas en hielo y la sonicación se repitió una vez más. Posteriormente se adicionaron 20 μ L of lisozima (10 mg/mL) recién preparada y 5 μ L of RNase A (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por un espacio de 2 horas.

Extracción del DNA celular

El lisado celular se transfirió a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y se añadió igual volumen de fenol saturado a la fase acuosa recuperada ($\sim$ 500 μ L), se mezcló suavemente, y se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. En el caso de los co-cultivos se requirió un segundo tratamiento con fenol saturado con el fin de eliminar las impurezas provenientes del carbón. El sobrenadante obtenido del paso anterior, se transfirió a nuevos tubos Eppendorff y se les añadió igual volumen de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), y se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubo Eppendorff y se le añadió igual volumen de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) para eliminar los restos de fenol.

Precipitación de DNA

El sobrenadante obtenido del paso anterior, fue transferido un nuevo tubo Eppendorff y se le adicionó el mismo volumen de alcohol isopropílico frío y 20 μ L of NaCl 5 M (a una concentración final de 0.10–0.15 M), se mezcló, y se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm bajo condiciones de refrigeración (4°C). El sobrenadante obtenido fue descartado y el pellet fue lavado con 300 μ L de etanol

absoluto (70%) frío y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet de DNA se disolvió en 50 µL de TE.

Medición de la concentración de DNA

La concentración del ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260_{nm}. Para comprobar el estado de pureza del DNA obtenido, se midió la absorbancia del DNA a 280_{nm} y se calculó la relación de DO_{260/280}. Se consideró como criterio de pureza valores DO_{260/280} entre 1.8 y 2.0.

2.2 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores, se construyó una base de datos a partir del Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2009). Se agruparon aproximadamente 3600 secuencias nucleotídicas del gen ribosomal 16S, correspondientes a las once familias que hacen parte de las clases *Metanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobia* y *Methanopyri*; considerando como criterio de selección su longitud mayor a 1200 pares de bases.

Los conjuntos de secuencias se organizaron por especies y posteriormente por familias. Posteriormente, se efectuaron alineamientos mediante ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) para detectar las homologías. De las 3600 secuencias iniciales, se descartaron secuencias incompletas o únicas; las cuales generan brechas o gaps que causan problemas de alineamiento. Luego, se procedió a realizar un consenso por familias (ver Anexo 1) usando el editor de alineamientos Bioedit (Hall, 1999) y el programa Genedoc (Nicholas *et al.* 1997). El consenso sirvió para marcar o localizar en nuestra base de datos los cebadores previamente reportados y para el diseñar los nuevos cebadores en regiones conservadas del gen usando el programa Oligo v3.4 (National Biosciences Inc., USA).

Las diferentes combinaciones de cebadores diseñados (forward y reverse) se examinaron en el programa Blast (Altschul *et al.*, 2012) con el fin de evaluar su especificidad en los microorganismos blanco. Todos los cebadores fueron sintetizados en la compañía Bioneer (Daejeon, Corea del Sur).

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Cebadores o iniciadores de la síntesis

Para la amplificación del gen rRNA 16S de las estirpes bacterianas se utilizaron los cebadores universales 530F y 1490R propuestos por Wani *et al.* (2006). En el caso de la amplificación del gen rRNA 16S de archeobacterias metanogénicas en co-cultivos de mantos de carbón, se usaron los cebadores descritos por Marchesi *et al.*, (2001) y los diseñados en el presente estudio.

Mezcla de reacción para PCR

Para un total de 25 µl de mezcla de reacción se emplearon 2.5 µl de buffer 10x, 6.2 µl de dNTPs (2mM), 0.4 µl de primer forward y 0.4 µl de primer reverse (100 µM), 0.4 µl de DreamTaq™ DNA Polymerase (FERMENTAS), 10.1 µl de agua grado molecular y 5 µl de templado (5 ng/µL). Para la amplificación se utilizó el termociclador Mastercycler®Gradient de Eppendorf.

Termociclado

El programa de termociclado usado fue el siguiente: desnaturalización inicial 94°C por 3 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg, annealing 55°C por 30 seg y extensión 72°C por 45 seg; con un ciclo de extensión final de 72°C durante 5 min. En cada corrida, siempre se incluyó un control negativo para evidenciar amplificaciones no específicas. Para la amplificación de DNA bacteriano se utilizó como control positivo El ADN genómico de la cepa C600 de *Escherichia coli* ATCC® 23724™. En el caso de la amplificación del gen rRNA 16S

de metanógenos, se usó como control negativo el ADN del estirpe bacteriano C600 de *Escherichia coli* ATCC® 23724. Se desarrollaron un mínimo de dos corridas en cada experimento.

Visualización de los amplicones

Los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% usando el colorante fluorescente EZVISION (AMRESCO) y documentados usando un Sistema para Análisis de Geles (SYNGENE, USA).

2.4 Clonación de las bandas amplificadas

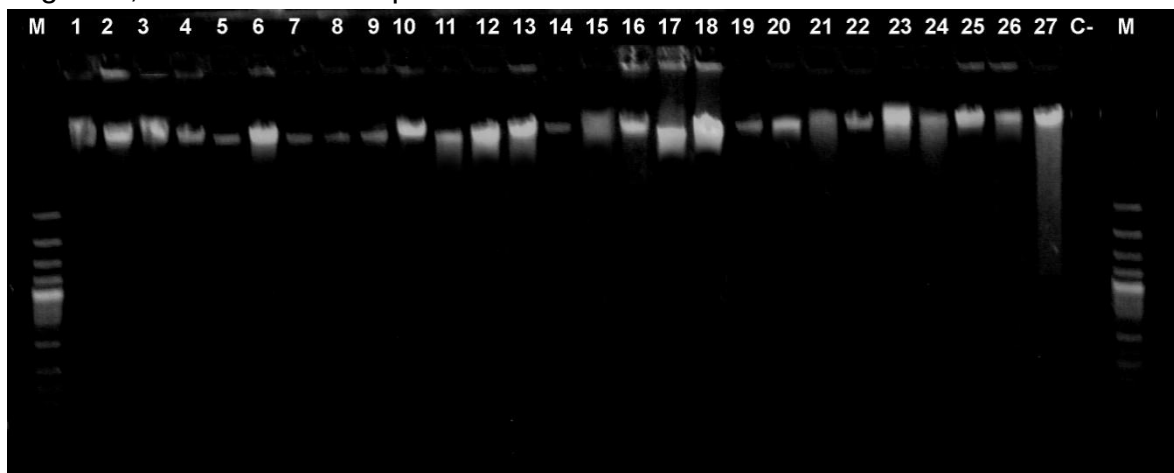
Se desarrolló la clonación de las bandas amplificadas a partir de cebadores específicos para metanobacterias (diseñados en este estudio y los ya reportados), usando el kit de clonación (Clone JET™PCR Cloning Kit) de la casa comercial FERMENTAS y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El vector de clonación usado fue el pJET1.2/blunt. Los clones fueron transformados en células competentes de *Escherichia coli* JM101 de la siguiente manera: se agregaron 5 µl (10-20 ng) de la mezcla de ligazón a 200 µl de células competentes y se dejaron 40 min a 0°C, luego se procedió a calentar las células a 42°C por 90 seg (choque térmico), sin agitación. Inmediatamente, se ubicaron los tubos sobre hielo por 2 min. Se agregaron 700 µL de medio LB frio a cada reacción de transformación y se dejó 1 hora a 37°C. Se resuspendió con cuidado la mezcla de células y se virió el contenido en una caja de Petri LB-agar + 100 µg /ml de ampicilina incubándose a 37 °C toda la noche. Las clonas obtenidas se recuperaron y conservaron para análisis posteriores.

3 RESULTADOS

3.1 Extracción de DNA genómico de procariotas.

Se estableció un procedimiento de extracción de ADN genómico adecuado que combina la lisis química (buffer de lisis) y mecánica (ultrasonido) de células procariotas; el cual permitió una extracción efectiva de ADN en un amplio grupo de especies bacterianas (Fig. 2).

Figura 2. Electroforesis correspondiente a las extracciones de las cepas de referencia, cepas aisladas de carbón y cultivo enriquecido. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: Ladder 100 bp; 1: *E. coli*; 2: *E. aerogenes*; 3: *C. braakii*; 4: *S. enterica*; 5: *S. aureus*; 6: *B. cereus*; 7: *P. vulgaris*; 8: *P. alcalifaciens*; 9: *S. mutans*; 10: *P. polimixa*; 11: *G. stearothermophilus*; 12: *B. subtilis*; 13: *B. licheniformis*; 14: *B. sphaericus*; 15: *P. aeruginosa*; 16: *S. griseus*; 17: *C. bifementas*; 18: *A. viscosus*. Del carril 19 al 26 se encuentran listados los aislados de carbón: 19: CB2; 20: CB3; 21: CB4; 22: CB5; 23: CB7; 24: CB8; 25: CB9; 26: CB10; 27: Co-cultivo productor de metano; C-: Control negativo; M: Ladder 100 bp.



En general, el protocolo establecido fue efectivo para la extracción de ADN de estirpes microbianas que habitan en mantos de carbón; ya sean en estado puro o en co-cultivos.

Tabla 2. Relación de pureza y concentración de ADN

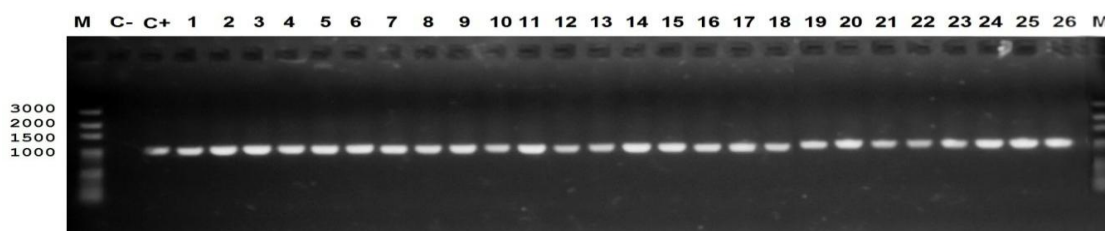
Código	Cepas o Cultivo enriquecido	Relación 260/280*	Concentración ADN (µg/mL)
ATCC®33876™	<i>Escherichia coli</i> (JM101)	1.84	342
ATCC®35029™	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.61	630
ATCC®43162™	<i>Citrobacter braakii</i>	1.76	830
ATCC®13331™	<i>Salmonella entérica</i>	1.051	610
ATCC®33592™	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.9	1330
ATCC®10876™	<i>Bacillus cereus</i>	1.92	2660
ATCC®33420™	<i>Proteus vulgaris</i>	1.5	560
ATCC®51902™	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2.02	1571
ATCC®25175™	<i>Streptococcus mutans</i>	1.2	440
ATCC®43865™	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	1.76	969
ATCC®10149™	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1.68	370
ATCC®6633™	<i>Bacillus subtilis</i>	1.66	550
ATCC®12759™	<i>Bacillus licheniformis</i>	2.14	611
ATCC®4525™	<i>Bacillus sphaericus</i>	1.88	1660
ATCC®10145™	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.7	514
ATCC®15987™	<i>Actinomyces viscosus</i>	1.25	100
ATCC®10137™	<i>Clostridium bifermentans</i>	1.25	3330
ATCC®10137™	<i>Streptomyces griseus</i>	1.92	342
I37	Cultivo enriquecido-Manto 11	1.2	234
CB2	Aislado a partir de carbón	1.72	344
CB3	Aislado a partir de carbón	1.85	370
CB4	Aislado a partir de carbón	1.44	288
CB5	Aislado a partir de carbón	1.71	342
CB7	Aislado a partir de carbón	1.67	334
CB8	Aislado a partir de carbón	1.71	342
CB9	Aislado a partir de carbón	1.74	348
CB10	Aislado a partir de carbón	1.33	266

*Valores menores a 1.8 indican contaminación con proteínas y valores por encima de 2 indican contaminación con RNA.

La extracción de ADN resultó difícil en algunas de las especies bacterianas estudiadas; en especial, estirpes de referencias como *Streptococcus mutans*, ATCC®25175™; posiblemente asociado con la presencia de cápsulas o estructuras con lipolisacáridos de estos tipos microbianos. La concentración y pureza estimada para cada muestra de DNA es presentada en la Tabla 2.

Como se mencionó en materiales y métodos, para la amplificación del gen rRNA 16S de las estirpes bacterianas se utilizaron los cebadores universales (530F/1490R) propuestos por Wani *et al.* (2006). Dichos cebadores permitieron la amplificación de bandas de aproximadamente 1000 pares de bases, en correspondencia con lo esperado. La robustez de las bandas amplificadas puede ser constatada en la Figura 3. Similares resultados, en término de la calidad de la amplificación, fueron obtenidos para estirpes bacterianas aisladas de mantos de carbón. Esto demuestra que el método de extracción de DNA estandarizado es de una calidad suficiente para lograr resultados positivos en una PCR a partir de muestras de carbón.

Figura 3. Electroforesis de agarosa al 1% en buffer TBE correspondiente a las amplificaciones usando cebadores universales de bacterias y estirpes provenientes de mantos de carbón. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: Ladder 100 bp; C-: control negativo; C+: control positivo *E. coli* C600; 1: *E. coli* JM101; 2: *E. aerogenes*; 3: *C. braakii*; 4: *S. enterica*; 5: *S. aureus*; 6: *B. cereus*; 7: *P. vulgaris*; 8: *P. alcalifaciens*; 9: *S. mutans*; 10: *P. polimixa*; 11: *G. stearothermophilus* ; 12: *B. subtilis*; 13: *B. licheniformis*; 14: *B. sphaericus*; 15: *P. aeruginosa*; 16: *S. griseus*; 17: *C. bifermentas*; 18: *A. viscosus*. Del carril 19 al 26 se encuentran listados los amplicones de los aislados de carbón: 19: CB2; 20: CB3; 21: CB4; 22: CB5; 23: CB7; 24: CB8; 25: CB9; 26: CB10; M: Ladder 100 bp.



3.2 Diseño de cebadores del gen ribosomal 16S de metanobacterias.

De la base de datos Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2009), se seleccionaron un total de 3598 entradas del gen rRNA 16S; los cuales mostraron diferencias en el número de nucleótidos (Tabla 2). Para obtener los genes rRNA 16S completos se utilizaron los siguientes criterios de selección: *i)* inclusión de secuencias del gen rRNA 16S mayores de 1200 pares de base, *ii)* la no existencia de huecos en las secuencias y, *iii)* la no presencia de secuencias indefinidas. Así, las 3598 secuencias genómicas iniciales se redujeron a 1166 secuencias; las cuales se ordenaron por familias (Tabla 3).

Tabla 3. Número de secuencias de genes rRNA 16S de metanobacterias descargadas de RDP II.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Secuencias descargadas del RDP	Secuencias usadas en el diseño de primers
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	757	270
			<i>Methanothermaceae</i>	0	0
	<i>Methanococci</i>	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanocaldococcaceae</i>	75	74
			<i>Methanococcaceae</i>	75	38
	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanocorpusculaceae</i>	116	46
			<i>Methanomicrobiaceae</i>	418	197
			<i>Methanospirillaceae</i>	66	27
			<i>Methanomicrobiales incertae sedis</i>	71	0
			<i>Sin clasificar</i>	58	0
		<i>Methanocellales</i>	<i>Methanocellaceae</i>	37	15
		<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaetaceae</i>	309	187
			<i>Methanosarcinaceae</i>	800	304
			<i>Methermicoccaceae</i>	393	6
	<i>Methanopyri</i>	<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>	5	2
Total				3598	1166

De cada familia, se obtuvo la secuencia consenso para todos los genes rRNA 16S. Con base en el modelo de la estructura secundaria del gen rRNA 16S (Neefs *et al.* 1993) y en los alineamientos de secuencias usando el modelo de pérdida DNA

(Martínez-Pérez *et al.*, 2007); se logró determinar los límites de las regiones variables y constantes para las especies estudiadas. Los alineamientos mostraron, que el gen rRNA 16S de metanobacterias comparte las regiones conservadas del gen de arqueobacterias; así como, las nueve regiones hipervariables y la secuencia de los 50 tallos que componen la estructura secundaria del gen. (Anexo 1).

El análisis de alineamiento de secuencias permitió constatar que las regiones variables del gen rRNA 16S de metanobacterias variaron en su tamaño como sigue: V2 (126-146 nucleótidos (nt)) > V3 (90-100 nt) > V7 (84-86 nt) > V9 (68-82 nt) > V4 (71-73 nt) > V8 (56 nt) > V6 (48-50 nt) > V1 (35-55 nt) > V5 (32-39 nt); siendo las de mayor índice de variación las regiones V1 y V2 y la de menor la región V8. Para mayor detalle, consultar el Anexo 2.

El mencionado análisis de alineamiento de secuencias permitió además, comprobar que algunos de los cebadores reportados en la literatura para la identificación de bacterias metanogénicas (Narihiro y Sekiguchi, 2011) se localizan dentro de las regiones hipervariables del modelo; mientras que otros, hibridan con las regiones conservadas (ver Anexo 1). Las regiones hipervariables se caracterizan por sus altas tasas mutacionales en relación a las regiones conservadas. Por ello, diseñar cebadores en dichas regiones incrementa la probabilidad de apareamientos erróneos; y por ende, el incremento de falsos negativos durante la detección de metanógenos. En este sentido, nosotros diseñamos todas las secuencias de cebadores para regiones conservadas. La especificidad de dichas secuencias cebadoras para metanógenos puede ser revisada en el Anexo 3; donde se presentan los resultados del análisis BLAST.

De los cuatro juegos de cebadores diseñados (Tabla 4), la combinación UNMETFW₁₋₂₆/UNMETRV₁₄₂₅₋₄₂ se espera produzca un fragmento de 1442 pb que contiene 8 regiones variables (V1-V8) del gen rRNA 16S. Una segunda

combinación (UNMETFW₁₋₂₆/UNMETRV₉₄₇₋₉₆₉) produciría un fragmento de 969 pb que contiene 5 regiones variables (V1-V5) del gen rRNA 16S. Un tercer juego de cebadores (UNMET2FAMFW₁₅₁₋₁₇₂/UNMETRV₁₄₂₅₋₄₂) se espera produzca un fragmento de 1291 pb que contiene 7 regiones variables (V2-V8) del gen rRNA 16S. Una cuarta combinación (UNMET2FAMFW₁₅₁₋₁₇₂/UNMETRV₉₄₇₋₉₆₉) debe producir un fragmento de 818 pb que contiene 4 regiones variables (V2-V5) del gen rRNA 16S. Por último, la combinación UNMETFW₉₄₇₋₉₆₉/UNMETRV₁₄₂₅₋₄₂ se espera produzca un fragmento de 495 pb que contiene 3 regiones variables (V6-V8) del gen rRNA 16S (Fig. 4).

Figura 4: Estructura secundaria del RNA ribosomal. Los cebadores diseñados en este estudio se ubicaron en las regiones más conservadas del gen. Los cebadores reportados por la literatura están señalados con flechas negras. Las regiones hipervariables están marcadas de V1- V9. Los tallos están enumerados del 1 al 50 (Modificado de Neefs *et al.*, 1993).

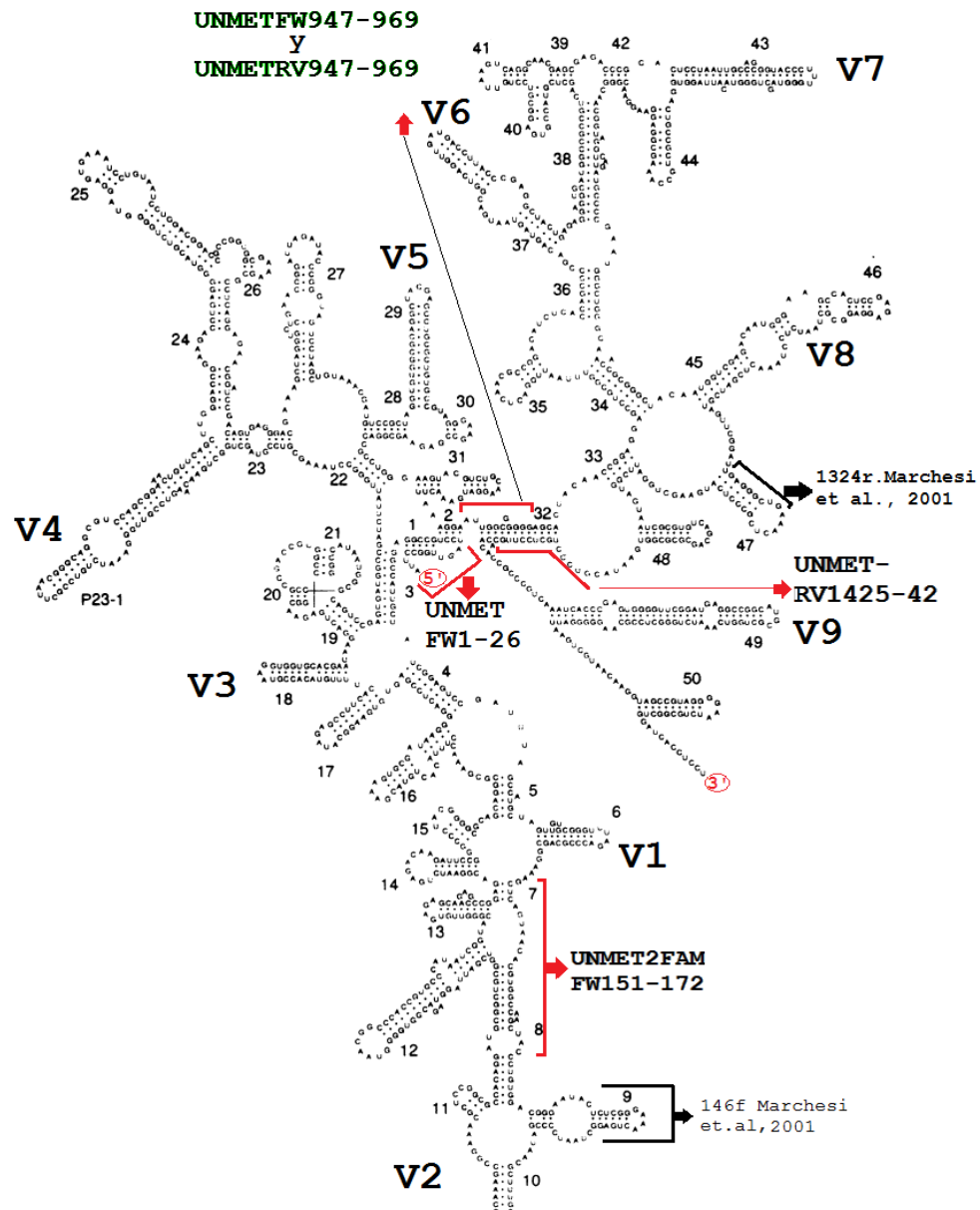


Tabla 4. Características de los cebadores diseñados

Nombre*	Posición	Secuencia	Longitud (pb)	GC%	TM
UNMETFW	1-26	5' ATT CCG GTT GAT CCT GGC G 3'	19	57.9	60.15
UNMET2FAMFW	151-172	5'CTC AGT AAC ACG TGG AYA AC 3'	19	47.7	60
UNMETFW	947-969	5'AAA CTT AAA GRA ATT GGC GGG GG 3'	23	45.7	60.5
UNMET-RV	947-969	5'CCC CCG CCA TTT YCT TTA AGT TT 3'	23	45.7	59.47
UNMET-RV	1425-42	5'TGT GCA AGG AGC AGG GAC 3'	18	61.1	58

3.3 Evaluación de cebadores para el gen rRNA 16S en metagenoma extraído de Co-cultivos de Mantos de Carbón

Los juegos de cebadores específicos para la amplificación del gen rRNA 16S de metanógenos mostraron resultados variables (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores utilizados en la amplificación del gen rRNA 16S de metanobacterias

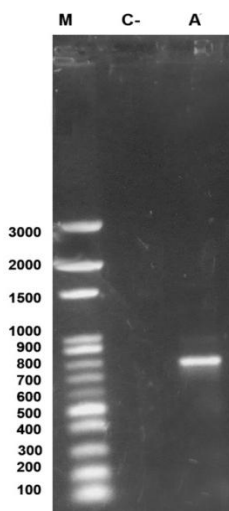
COMBINACIÓN DE CEBADORES	Tamaño esperado	Tamaño observado	Regiones hipervariables flanqueadas
146F/1324R	1178 pb	800 bp	V2- V8
UNMETFW1-26/UNMET-RV947-969	969 pb	NA	V1-V5
UNMETFW1-26/UNMET-RV1425-42	1442 pb	NA	V1- V8
UNMET2FAMFW151-172/UNMET-RV947-969	818 pb	800 pb	V2- V5
UNMET2FAMFW151-172/UNMET-RV1425-42	1291 pb	NA	V2- V8
UNMETFW947-969/UNMET-RV1425-42	495 pb	1000 pb	V6-V8

NA: No hubo amplificación

La combinación de cebadores 146f/1324r, recomendada para la detección de metagónenos (Marchesi *et al.* 2001), permitió la amplificación de un fragmento de

aproximadamente 800 bp (Fig. 5) a partir del metagenoma de un co-cultivo productor de gas metano (Mayorga, 2012) pero no en el control negativo (*E. coli* C600); evidenciando así su utilidad para la detección de metanobacterias en mantos de carbón.

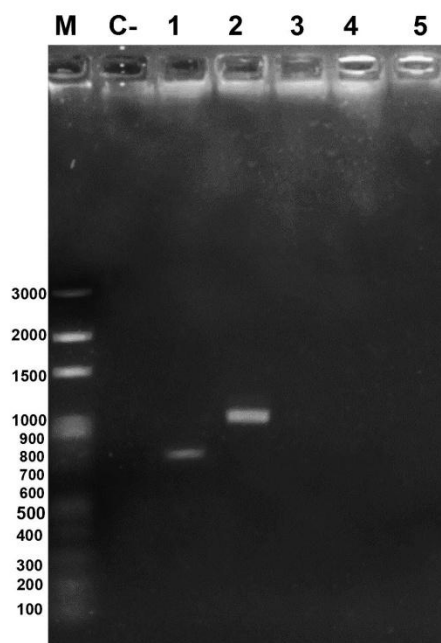
Figura 5. Electroforesis de agarosa al 0.8% en buffer TBE correspondiente a la amplificación usando los cebadores específicos para metanobacterias reportados por la literatura. M: Ladder 100 bp; C-: control negativo (*E. coli* C600); A: Co-cultivo productor de gas metano.



Por su parte, las combinaciones de cebadores diseñadas en este estudio UNMET2FAMFW151-172/UNMET-RV947-969 y UNMETFW947-969/UNMET-RV1425-42, produjeron amplicones con largos de 800 y 1000 bp, respectivamente (Fig. 6); indicando la presencia de metanobacterias en el co-cultivo productor de gas metano en concordancia con lo observado usando cromatografía de gases (Mayorga, 2012).

El control negativo (*E. coli* C600) y las restantes combinaciones de cebadores diseñados (UNMETFW1-26/UNMET-RV947-969, UNMET2FAMFW151-172/UNMET-RV1425-42 y UNMETFW1-26/UNMET-RV1425-42), no generaron productos amplificados visibles.

Figura 6. Electroforesis de agarosa al 0.8% en buffer TBE correspondiente a las amplificaciones usando los cebadores específicos para metanobacterias diseñados en este estudio. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: Ladder 100 bp; C-: control negativo (*E. coli* C600); 1: UNMET2FAMFW151-172/UNMET-RV947-969; 2: UNMETFW947-969/UNMET-RV1425-42; 3: UNMETFW1-26/UNMET-RV947-969; 4: UNMET2FAMFW151-172/UNMET-RV1425-42; 5: UNMETFW1-26/UNMET-RV1425-42. DNA proveniente del cultivo enriquecido con carbón fue utilizado para este fin.



3.4 Clonación de productos amplificados

Los productos amplificados usando cebadores del gen rRNA 16S de metanobacterias, fueron clonados exitosamente usando el vector de clonación pJET1.2/blunt. Aunque aún no se cuenta con los resultados de la secuenciación del ADN, si se logró producir aproximadamente unas 100 clonas por producto amplificado; los cuales fueron conservadas para la creación de librerías genómicas de metanógenos que habitan los mantos de carbón.

4. DISCUSIÓN

Extracción de DNA

Hasta la fecha, existen infinidad de protocolos para la purificación de DNA genómico microbiano, pero una de las limitantes es la lisis celular (Miller *et al.*, 1999). En el caso de ciertos metanógenos, la lisis celular puede ocurrir rápidamente, pero para otros puede resultar un reto el tener acceso a su material genético (Lange y Ahring, 2001). El uso de recursos físicos como la sonicación, la lisis química y enzimática en el proceso de extracción de DNA genómico de bacterias provenientes de mantos de carbón, nos permitió establecer un método para la obtención de ADN de procariotas y metagenoma de co-cultivos de carbón de buena calidad para PCR. A pesar que de algunas muestras de DNA presentaron valores A260/280 menores a 1.8; que indican contaminación con proteínas, el DNA obtenido fue amplificable, como se evidenció en los resultados. Para el caso del DNA genómico extraído de co-cultivos de carbón, también se obtuvo DNA amplificable, dadas las bandas obtenidas por medio de los cebadores específicos para metanobacterias. Dicho aspecto es resaltante, ya que se ha demostrado que los co-cultivos de carbón contienen usualmente contaminantes, los cuales interfieren con las subsecuentes manipulaciones moleculares (Yates *et al.* 1998).

Diseño de cebadores para la amplificación del gen rRNA 16S de metanobacterias.

En la actualidad, se considera el gen rRNA 16S como el marcador filogenético por excelencia (Narihito y Sekiguchi, 2011). La razón de su empleo es porque es considerado un gen presente en cualquier procarionte y que presenta regiones comunes para cada dominio y específicas para cada especie (Wang y Qian,

2009). Sin embargo, hasta el momento, las regiones conservadas e hipervariables del gen rRNA 16S para todas las familias de metanobacterias, no habían sido caracterizadas en detalle.

Por otro lado, se establecieron las posiciones de los cebadores para metanobacterias ya reportados, en los alineamientos de las secuencias consenso; y en caso necesario, diseñar cebadores que permitieran una mejor identificación. Para ello, se generó la primera base de datos de genes rRNA 16S completos para especies metanogénicas. Sorprendentemente, aun cuando el número de genes rRNA 16S fue alto, la cantidad de especies, así como el número de secuencias completas del gen rRNA 16S, mostraron ser escasas.

La base de genes rRNA 16S mostró que las familias *Methanosarcinaceae* y *Methanobacteriaceae* han sido las más caracterizadas, en comparación con *Methanopyraceae* y *Methanocellaceae*. Por ello, inicialmente se generaron las secuencias consenso de cada especie y posteriormente el consenso por familia. Lo anterior permitió que las secuencias mayoritarias no influyeran en la generación de los consensos por familia.

Los alineamientos subsiguientes también ayudaron a identificar los límites de las regiones constantes e hipervariables de los genes rRNA 16S de las metanobacterias, tal como se propone en el modelo universal del gen rRNA 16S de arqueobacterias propuesto por Neefs *et al.* (1993).

La revisión de las secuencias disponibles en la base de datos permitió el escrutinio de todas las familias, teniendo en cuenta la mayor cantidad de especies posibles para el diseño de cebadores que identifiquen las poblaciones de metanógenos presentes en una muestra ambiental.

Al evaluar el diseño de los cebadores reportados por Marchesi *et al.* (2001), teniendo en cuenta los alineamientos desarrollados en este trabajo, así como en el modelo propuesto por Neef *et al.* (1993), encontramos que uno de ellos flanquea la región hipervariable V2. Esta situación generaría la posible amplificación del gen rRNA 16S para algunas metanobacterias, sin embargo también podría omitir la detección de familias como *Methanospirillaceae*, *Methanocorpulaceae* y excluir miembros de las grandes familias como las *Methanomicrobiaceae* y las *Methanosarcinaceae*, como se evidencia en los alineamientos.

Por consiguiente, uno de los aspectos positivos de este estudio, es que los cebadores que se diseñaron consideran las regiones más conservadas del gen rRNA 16S que flanquean la mayoría de regiones hipervariables (V1-V8). Dichas regiones son utilizadas para la identificación de especies (Achtman and Wagner, 2008). Por lo tanto, con los cebadores diseñados en este trabajo, se tendría una mayor probabilidad de hibridación con genes rRNA 16S de las especies metanogénicas y por ende se posibilita la detección de metanógenos. En este sentido, a pesar de tratarse de secuencias altamente conservadas, los únicos grupos que generarían posibles falsos positivos en la PCR para detectar metanobacterias serían miembros de las familias *Halobacteriaceae* y *Thermococcaeae*, situación que también se presenta en varios cebadores descritos por la literatura (Narihiro y Sekiguchi, 2011). Las halobacterias requieren condiciones halofílicas extremas con una concentración mínima de NaCl 1.5 M para su crecimiento (Garrity y Holt, 2001b) lo que hace poco probable su presencia en los co-cultivos enriquecidos de carbón. Por otra parte, miembros de la familia *Thermococcaeae* en carbón solo han sido reportados por Li y colaboradores (2008). Sin embargo, es importante aclarar que el análisis de las librerías genómicas es imprescindible para generar conclusiones detalladas de las apreciaciones dadas en este trabajo.

Amplificación del gen rRNA 16 a partir de DNA genómico.

Para que la PCR sea exitosa es necesario contar con: una DNA polimerasa termoestable de alta fidelidad, una adecuada concentración de dNTPs, el buffer indicado, el cofactor de la enzima, un conjunto de cebadores específicos para el grupo de interés (eubacterias y arqueobacterias en nuestro caso) y por último DNA de buena calidad que servirá como sustrato para que la amplificación sea correcta. Sin estos parámetros una reacción de PCR no se lleva a cabo (Rodriguez-Herrera *et al.*, 2009).

En este trabajo se demostró que al menos un juego de los cebadores diseñados a partir de la base de datos de genes rRNA 16S, los cebadores indicados en la literatura y el DNA genómico obtenido por la metodología desarrollada, cubrieron todas los requerimientos que exige la reacción de PCR para la generación de amplicones. La calidad del DNA genómico pudo ser verificada al obtener productos de PCR del gen rRNA 16S de eubacterias, utilizando los cebadores universales diseñados por Wani *et al.* (2006). Este resultado confirmó que el DNA genómico obtenido es adecuado para la generación de amplicones.

La eficiencia de la PCR se corroboró de igual manera con los cebadores de la literatura y los diseñados en este trabajo. La obtención de amplicones del gen rRNA 16s de genomas de especies co-cultivables estuvo en función de la combinación de los mismos y es necesario que las combinaciones que no generaron amplicón sean re-examinadas, modificando las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo.

Los juegos de cebadores diseñados para metanobacterias que generaron un producto de PCR, comprenden regiones complementarias entre ellos que van desde la región hipervariable V2 a la V8. Esto ayudará a una identificación más precisa de las arqueobacterias metanógenas del consorcio formado en el cultivo

enriquecido de carbón, ya que estas regiones hipervariables dan información a cerca de la especie (Lane *et al.*, 1985; Wang y Qian, 2009).

Es evidente que la combinación de cebadores que amplifican de V6 a V8 generó un amplicón de distinto tamaño propuesto en el modelo, ya que el amplicón fue de un tamaño mayor al esperado. Para poder dar una explicación a la naturaleza de este resultado y determinar el origen del amplicón obtenido, es necesaria la secuenciación de las clonas, ya que ésta podría corresponder a una amplificación inespecífica.

Es de considerar que, para determinar el origen todos los productos de PCR obtenidos en este estudio, es totalmente necesario el análisis por secuenciación de las librerías genómicas creadas a partir de estos, para así establecer la efectividad real de los cebadores diseñados. Además, es imprescindible examinar su eficacia en las cepas de referencia disponibles para metanobacterias.

Los resultados del presente trabajo son un paso más que aporta al estudio de las metanobacterias asociadas a los mantos de carbón y potencialmente, a cualquier muestra ambiental con presencia de dicho grupo.

5. CONCLUSIONES

El uso combinado de la lisis celular química, enzimática y física nos permitió establecer un método de extracción de ADN genómico con calidad suficiente para la obtención de productos de PCR a partir de microorganismos que habitan en mantos de carbón.

El diseño de cebadores desarrollado en este estudio para regiones conservadas del gen rRNA 16S de metanobacterias resultó efectivo; por cuando se logró amplificar segmentos del gen a partir de al menos dos combinaciones.

Las condiciones de amplificación del gen rRNA 16S de metanobacterias requieren ser optimizadas para aquellas combinaciones que no mostraron producto amplificado.

6. RECOMENDACIONES

Evaluar los cebadores diseñados en cepas de metanobacterias de referencia para validar los resultados obtenidos en este estudio.

Las combinaciones que no resultaron en un producto de PCR visible necesitan ser examinadas nuevamente, modificando las condiciones experimentales.

Proceder a la identificación de los productos de PCR obtenidos mediante técnicas de secuenciación para constatar su procedencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Achtman M, Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews* 6:431-440.
2. Ahmed M, Smith JW. 2001. Biogenic methane generation in the degradation of eastern Australian Permian coals. *Organic Geochemistry* 32:809-816.
3. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
4. Beaton A, Langenberg W, Pană C. 2006. Coalbed methane resources and reservoir characteristics from the Alberta Plains, Canada. *International Journal of Coal Geology* 65:93-113.
5. Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:278–8
6. Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue): D141-145; doi: 10.1093/nar/gkn879 [PMID: 19004872].
7. Dahllöf, I. 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 13: 213–217.
8. Faiz, M., Hendry, P., 2006. Significance of microbial activity in Australian coal bed methane reservoirs — a review. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology* 54, 261–72.
9. Flores RM. 2008. Microbes, methanogenesis, and microbial gas in coal. *International Journal of Coal Geology* 76:1-2.
10. Formolo M, Martini A, Petsch S. 2008. Biodegradation of sedimentary organic matter associated with coalbed methane in the Powder River and San Juan Basins, U.S.A. *International Journal of Coal Geology* 76:86-97.
11. García-González M. 2010. Coalbed methane resources in Colombia. En: AAPG International Convention and Exhibition, Frontiers of Unconventional Thinking, Calgary, Alberta, Canada.
12. Garrity GM, Holt JG. 2001b. Phylum All. Euryarchaeota phy. nov. In: Boone DR, Castenholz RW, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition. New York: Springer. p 211– 355.
13. Green MS, Flanagan KC, Gilcrease PC. 2008. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, U.S.A. *International Journal of Coal Geology* 76:34-45.
14. Gupta A, Birendra K. 2000. Biogasification of coal using different sources of microorganisms. *Fuel* 79:103-105.

15. Harris SH, Smith RL, Barker CE. 2008. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *International Journal*.
16. Hook, SE., Northwood, K.S., Wright, A.D.G., and McBride, B.W. 2009. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Appl Environ. Microbiol* 75: 374–380.
17. Iino, T., Mori, K., and Suzuki, K. 2000. *Methanospirillum lacunae* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a puddly soil, and the emendation of the genus *Methanospirillum* and *Methanospirillum hungatei*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2563–2566.
18. Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A., and Harada, H. 2000. Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 66: 3608–3615.
19. Johnson ER, Klasson KT, Basu R, Volkwein JC, Clausen EC, Gaddy JL. 1994. Microbial conversion of high-rank coals to methane. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45/46:329-338.
20. Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14
21. Kotarba, M.J., 2001. Composition and origin of coalbed gases in the Upper Silesian and Lublin basins, Poland. *Organic Geochemistry* 32, 163–180.
22. Krivushin, K.V., Shcherbakova, V.A., Petrovskaya, L.E., and Rivkina, E.M. 2010. *Methanobacterium veterum* sp nov., from ancient Siberian permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 455–459.
23. Jonasson J, Olofsson M, Monstein HJ. 2002. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *APMIS* 115: 668–677.
24. Jones EJP, Voytek MA, Warwick PD, Corum MD, Cohn A, Bunnell JE, Clark AC, Orem WH. 2008. Bioassay for estimating the biogenic methano-generating potential of coal samples. *International Journal of Coal Geology* 76:138-150.
25. Klein DA, Flores RM, Venot C, Gabbert K, Schmidt R, Stricker GD, Pruden A, Mandernack K. 2008. Molecular sequences derived from Paleocene Fort Union Formation coals vs., associated produced waters: Implications for CBM regeneration. *International Journal of Coal Geology* 76:3-13.
26. Lane D, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, et al. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6955–6959.
27. Lange, M. and Ahring, B.K. 2001. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 553-555.
28. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and

- Higgins DG. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007 23(21): 2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
29. Levine DG, Schlosberg RH, Silbernagel BG, 1982. Understanding the chemistry and physics of coal structure (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 3365–3370.
 30. Li D, Hendry P, Faiz M. 2008. A survey of the microbial populations in some Australian coalbed methane reservoirs. *International Journal of Coal Geology* 76:14-24.
 31. Liu D. 2009. Purification of Nucleic Acids from Bacteria. In: *Handbook of Nucleic*.
 32. Longwell JP, Rubint ES, Wilson J. 1995. Coal: energy for the future. *Progress in Energy and Combustion Science* 21:269-360.
 33. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 34. Marchesi, J.R., Weightman, A.J., Cragg, B.A., Parkes, R.J., and Fry, J.C. 2001. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 34: 221–228.
 35. Martínez-Pérez F, Durán-Gutiérrez D, Delaye L, Becerra A, Aguilar G, Zinker S. 2007. Loss of DNA: a plausible molecular level explanation for crustacean neuropeptide gene evolution. *Peptides*. Jan; 28(1):76-82.
 36. Martínez YA. 2009. Determinación de la composición de los gases asociados a mantos de carbón en las áreas de Ubaté y Cerrejón por medio de cromatografía de gases. Tesis de grado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander (UIS).
 37. Mayorga CM. 2012. Caracterización microbiológica de consorcios microbianos asociados a la formación Guaduas (Cundinamarca, Colombia). Tesis de grado. Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander (UIS).
 38. Midgley DJ, Hendry P, Pinetown KL, Fuentes D, Gong S, Mitchell DL, Faiz M. 2010. Characterization of a microbial community associated with a deep, coal seam methane reservoir in the Gippsland Basin, Australia. *International Journal of Coal Geology* 82:232-239.
 39. Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*. Nov;65(11):4715-24.
 40. Mochimaru, H., Yoshioka, H., Tamaki, H., Nakamura, K., Kaneko, N., Sakata, S., *et al.* 2007. Microbial diversity and methanogenic potential in a high temperature natural gas field in Japan. *Extremophiles* 11: 453–461.
 41. Narihiro T, Sekiguchi Y. 2011. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic *Archaea*. *Microbial biotechnology* 4 (5), 585-602
 42. Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijk P, Chapelle S, De Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. 1993. *Nucleic Acids Res.* Jul 1;21(13):3025–3049.

43. Orem WH, Voytek MA, Jones EJ, Lerch HE, Bates AL, Corum MD, Warwick PD, Clark AC. 2010. Organic intermediates in the anaerobic biodegradation of coal to methane under laboratory conditions. *Organic Geochemistry* 41:997-1000.
44. Penner TJ, Foght JM, Budwill K. 2010. Microbial diversity of western Canadian subsurface coal beds and methanogenic coal enrichment cultures. *International Journal of Coal Geology* 82:81-93.
45. Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Ayala-Labarríos LA, Rocha-Revilla JC, Padilla-García V, Y Espinosa-Hernández TC. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. 2009. *Acta Química Mexicana*. 1:1.
46. Scott AR, Kaiser WR, Ayers WB. 1994. Thermogenic and secondary biogenic gases, San Juan Basin, Colorado and New Mexico: Implications for coalbed gas producibility. *The American Association of Petroleum Geologists Bulletin* 78:1186-1209.
47. Scott AR, Zhou N, Levine JR. 1995. A Modified Approach to Estimating Coal and Coal Gas Resources: Example from the Sand Wash Basin, Colorado. *The American Association of Petroleum Geologists* 79(9):1320-1336.
48. Shcherbakova, V.A., Rivkina, E.M., Pecheritsyna, S., Laurinavichuis, K., Suzina, N.E., and Gilichinsky, D. 2010. *Methanobacterium arcticum* sp.nov., methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* (in press): doi: 10.1099/ijls.1090.021311-021310.
49. Shimizu S, Akiyama M, Naganuma T, Fujioka M, Nako M, Ishijima Y. 2007. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology* 5:423-433.
50. Sorensen, A.H., and Ahring, B.K. 1997. An improved enzyme-linked immunosorbent assay for whole-cell determination of methanogens in samples from anaerobic reactors. *Appl Environ Microbiol* 63: 2001–2006.
51. Strapoc D, Mastalerz M, Eble C, Schimmelmann A. 2008. Characterization of the origin of coalbed gases in southeastern Illinois Basin by compound-specific carbon and hydrogen stable isotope ratios. *Organic Geochemistry* 38:267-287.
52. Thielemann, T., Cramer, B., Schippers, A. 2004. Coalbed methane in the Ruhr Basin, Germany: a renewable energy resource? *Organic Geochemistry* 35, 1537–1549.
53. Wang A, Qin Y, Wu Y, Wan B. 2010. Status of research on biogenic coalbed gas generation mechanisms. *Mining Science and Technology* 20:271-275.
54. Wang Y, Qian P-Y, 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE* 4(10): e7401. doi:10.1371/journal.pone.0007401
55. Wani, A.A., Surakasi, V.P., Siddharth, J., Raghavan, R.G., Patole, M.S., Ranade, D., Shouche, Y.S. 2006. Molecular analyses of microbial diversity

- associated with the Lonar soda lake in India: an impact crater in a basalt area. *Research In Microbiology* 57:928–937.
56. Warwick PD, Breland FC, Hackley PC. 2008. Biogenic origin of coalbed gas in the northern Gulf of Mexico coastal plain, USA. *International Journal of Coal Geology* 76:119-137.
 57. Weijers, J.W.H., Schouten, S., van der Linden, M., van Geel, B., and Damste, J.S.S. 2004. Water table related variations in the abundance of intact archaeal membrane lipids in a Swedish peat bog. *FEMS Microbiol Lett* 239: 51–56.
 58. Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221–271.
 59. Wright, A.D.G., and Pimm, C. 2003. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *J Microbiol Methods* 55: 337–349.
 60. Yeates C, Gillings M, Davison A, Altavilla N, Veal D. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online* 1:40-47.
 61. Yu, Z.T., Garcia-Gonzalez, R., Schanbacher, F.L., and Morrison M. 2008. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens denaturing by Archaea-specific PCR and gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 74: 889–893.

ANEXO A. Alineamiento de las familias de arqueobacterias metanogénicas.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Methanosaetaceae187      ATTTCCGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGGGTTCTGACTAAGC 50
Methanosarcinaceae304    -ATTCCGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGTGTTCTGACTAAGC 49
Methanocellaceae15       -ATTCTGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGTGTTCTGATTAAGC 49
Methanospirillaceae27    -ATTCCGGTTGATCCTGCCAGAGGCCACTGCTATCGGGGTTCTGACTAAGC 49
Methanomicrobiaceae197   -ATTCCGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGGGTTCTGATTAAGC 49
Methanocorpusculaceae46  -ATTCCGGTTGATCCTGCCAGAGGCCATTGCTATCAGGGTTTCTGACTAAGC 49
Methermicoccaceae6       --TTCCGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCAGAGTTCTGATTAAGC 48
Methanocaldococcaceae74  -TTTCCGGTTGATCCTGCCAGAGGCCACTGCTATCGGGGTTCTGACTAAGC 49
Methanococcaceae38       -ATTCCGGTTGATCCCGCCGAGGCCACTGCTATTGGGATTCGACTAAGC 49
Methanopyraceae2         -ACTCCGGTTGATCCTGCCGAGGCCACCGCTATCGGGGTTCTGACTAAGC 49
Methanobacteriaceae270   -ATTCCGGTTGATCCTGGCGAGGCTACTGCTATCGGGGTTCTGATTAAGC 49
H.halobium148798         -ATTCCGGTTGATCCTGCCGAGGCCATTGCTATCGGAGTCCGATTTAGC 49
    ** ***** *

```

UNMETFW1-26:ATTCCGGTTGATCCTGGC (Mora-Polanco et al.,TW)

A24F:TCYGKTTGATCCYGSCRG Yu et al. (2008)

v1

```

Methanosaetaceae187      CATGCGAGTCGAATGTNSKHNRH-----RNVC-AT 79
Methanosarcinaceae304    CATGCDAGTYAHATGTHCTTHGYC-----GGGRADAC-AT 83
Methanocellaceae15       CATGCGAGTCGAGAG-GCGTTAT-----GGCC-TC 77
Methanospirillaceae27    CATGCGAGTCGAGAG--GTKYMD-----GACC-TC 76
Methanomicrobiaceae197   CATGCGAGTYGAGAG--GKKTHV-----RRMCCTC 77
Methanocorpusculaceae46  CATGCGAGTCGAGAG--GKKTMR-----GMCC-TC 76
Methermicoccaceae6       CATGTTAGTYGAGGGTGCTCTTCTCCTTCGG-GAGGAGGAGTAACC--C 95

```


<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CATGCGAGTC-AAGGGG-ACTTTCYBYBBYYTTGGVRAGRKMRK-KSMVS	96
<i>Methanococcaceae</i> 38	CATGCGAGTC-TATGG--ACTT-----CGG-TCCAT	76
<i>Methanopyraceae</i> 2	CATGCAAGTC-GAGGGCCGCCC-----GGCAATGGGGGCGGCC	87
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CATGCGAGTNGNAHGNNNNHHYB-----NBNDdddntcrt	84
<i>H.halobium</i> 148798	CATGCTAGTTGTGCGG--GTTT-----AGACCCGC	77

**** *** *

	v1	v2	
<i>Methanosaetaceae</i> 187	RGCGNACTGCTCAGTAACACGTGG	ACAACCTVCCCTBNGGHBGGNATAA	129
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	RGCGNACBGCTCAGTAACACGTGG	ATAAYCTGCCCTHRGGHYNGGNATAA	133
<i>Methanocellaceae</i> 15	GGCGGACTGCTCAGTAACACGTGG	ATAACCTGCCCAAAGGTCCGGGATAA	127
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GGCGWACKGCTCAGTAACACGTGG	ACAATCTGCCCTGRAGWRGAGRATAA	126
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	RGCRNACBGCTCAGTAACACGTGG	ATAACCTRVCCCTRNGGNRGRGVATAM	127
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GGCATACTGCTCAGTAACACGTGG	TTAACCTGCCCTAAGGTGGWGVATAC	126
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GGCRGACGGCTCAGTAACACGTGG	ACAACCTACCCTTGGGACCGGGATAA	145
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	SGCRNACGGCTCAGTAACACGTGG	CTAACCTACCCTCRGGTGGGGGATAA	146
<i>Methanococcaceae</i> 38	GGCGGACGGCTCATTAACACGTGG	TTAACCTACCCTCAGGTGGGGSATAA	126
<i>Methanopyraceae</i> 2	GGCGGACGGCTCAGTAACACGTGG	GTAACCTACCCTCGGGACGGGGATAA	137
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GGCRDACGGCTCAGTAACACGTGG	ATAAYYTRMCCTTDGGACYGGBATAA	134
<i>H.halobium</i> 148798	AGCGGAAA	GCTCAGTAACACGTGGCCAAGCTACCCTGTGGACGGGAATAC	127

*** * ***** ***** ** * ** * * ***

UNMET2FAMFW151-172:CTCAGTAACACGTGGAYAA (Mora-Polanco et al., ET)

Met86F:ACKGCTCAGTAACAC (Wright and Pimm, 2003)

	v2	
<i>Methanosaetaceae</i> 187	NCCY-GGGAAACTGGGTATAATACCCGATADNNCANNVDNN-NCTGGAATG	177
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	CHCC-GGGAAACTGGGGATAATTCCGGATANNNCANNNNN-RCTGGAANT	181
<i>Methanocellaceae</i> 15	CCCC-GGGAAACTGGGGATAATACCGGATAGATCAHNNDT-RCTGGAAG-	174
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TCCC-GGGAAACTGGGGGTAATACTCCATAGTYCGKNNDT-RCTGGAAT-	173
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	YYYC-GGGAAACTGGGGATAATACCCTATAGNHTANNRNN-RCTGGAAT-	174

<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	TCCC-GGGAACTGGGGCTAATGCTCCATAGTGGATRYNT-SCTGGAAT-	173
<i>Methermicoccaceae</i> 6	CCCCTGGGAACTGGGGCTAATACCGGATAGAGCATTGACAGCTGGAAT-	194
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CCTCGG-GAAACTGAGGCTAATCCCCCATAGGGGRDGNRB-KCTGGAAB-	193
<i>Methanococcaceae</i> 38	CCTTGG-GAAACTGAGGATAATACCCCATARRRRAARMRG-TCTGGAAY-	173
<i>Methanopyraceae</i> 2	CCCCGGCGAAAGTGGGGCTAATCCCCGATAGGCGGGGCGG-CCTGGAAC-	185
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CYCYGG-GAAACTGGGGATAATACCGGATANNVRNDNND-CCTGGAATT	182
<i>H.halobium</i> 148798	TCTCGG-GAAACTGAGGCTAATCCCCGATAACGCTTTGCT-CCTGGAAG-	174
	* * * * * * * * * * * * *	

v2

<i>Methanosaetacea</i> 187	GBNYBNNGNNNNAADG----CTCCGGY-----GCCNN	205
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GYNYNNTGVNHNAANRNN-BNHNDY-----GCCYN	212
<i>Methanocellaceae</i> 15	GCBKKKTGGTTGAAAC----TTCCGGG-----GCCTT	202
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GYBHBCGRAYGAAAG----ATCCGTC-----GCTYC	201
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GYNYBNTANNYNAAAG----NTBHGNC-----GCCNY	202
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GSTRYATCCTCGAAAG----ATCCGTC-----GCCTT	201
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GCRCGATGCTCSAAAGCTGAGGCCGCC-----GCCAA	227
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GMYNCHYCCCCGAAAGG---CTCCGG-----GCGCGCCCG	225
<i>Methanococcaceae</i> 38	GATCCTTTTCTGAAAGS---AT-----ATGCGCCTG	201
<i>Methanopyraceae</i> 2	GGTCCTCCGCCGAAAGG---GCCCGGGCCCATGCCGCCGGGTCCGCCCG	232
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GGTNYNYBNNYNAAABR---NHHTCCG-----GGATGCGCCTA	217
<i>H.halobium</i> 148798	GGGCAAAGCCGGAACG---CTCCG-----GCGCCAC	203
	* * *	

v2

<i>Methanosaetacea</i> 187	AGGATGGGTCTGCGGCCTATCAGGGTAGTAGTGGGTGTAACGTACCTACT	255
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	AGGATGRRTCTGCGGCCTATCAGG-TAGTAGTGGGTGTAATGTACCTACT	261
<i>Methanocellaceae</i> 15	TGGATGGGTCTGCGGCGGATTAGG-TTGTTGCCGGTGTAACTACCGTCA	251
<i>Methanospirillaceae</i> 27	AGGATGAGTCTGCGGCCGATTAGG-TAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAACA	250
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	AGGATGGRTCTGCGGCCGATTAGG-TTGTTGTTGGGGTAACGGCCCAACA	251

<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	AGGATGGGA	CTGCGTCCGATTAGG-TTGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCA	250
<i>Methermicoccaceae</i> 6	AGGATAGGT	CTGCGGCCGATTAGG-TTGTTGTTGATGTAACGGATCAACA	276
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	AGGATGGGG	CTGCGGCGGATTAGG-TAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCA	274
<i>Methanococcaceae</i> 38	AGGATGGGA	CTGCGCTCGATTAGG-TAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCA	250
<i>Methanopyraceae</i> 2	AGGATGGGC	CTGCGGCCGATTAGG-TAGTTGGCGGGGTAACGGCCCGCCA	281
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	AGGATGGAT	CTGCGGCCGATTAGG-TAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCA	266
<i>H. halobium</i> 148798	AGGATGCGG	CTGCGGTCCATTAGG-TAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCG	252

<i>Methanosaetaceae</i> 187	AGCCTACGACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCT	305
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	AGCCTACGACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCT	311
<i>Methanocellaceae</i> 15	AGCCTGTAATCCGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCT	301
<i>Methanospirillaceae</i> 27	AGCCTGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCT	300
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	AGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCT	301
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	AGCCATTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGATCCCGGAGATGGATTCT	300
<i>Methermicoccaceae</i> 6	AGCCTCCGATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAATAGCCCAGAGATGGGTTCT	326
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	AGCCTACGATCCGTACGGGCCCTGAGAGGGGGAGCCCGGAGATGGACACT	324
<i>Methanococcaceae</i> 38	AGCCTACGATCGGTACGGGCCTTGAGAGAGGGAGCCCGGAGATGGGGACT	300
<i>Methanopyraceae</i> 2	AGCCGATAATCGGTACGGGCGGTGAGAGCCGGAGCCCGGAGACGGGGACT	331
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	AGCCGATGATCTGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGAACCT	316
<i>H. halobium</i> 148798	TGCCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCT	302

*** * ***** ** * * * * * * *

Yu et al. (2008) A329R:CGGAGATGGAACCT...

<i>Methanosaetaceae</i> 187	GAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGTGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACA	355
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GAGACATGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACA	361
<i>Methanocellaceae</i> 15	GAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTCTACA	351
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACC	350
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACA	351

<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GAGACATGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACTTTACA	350
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GAGAGAAGAACCCAGGTCTACGGGACGCATCAGGCGCGAAACTTTACA	376
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GAGACACGGGTCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCCGCA	374
<i>Methanococcaceae</i> 38	GAGACACGGCCCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCCGCA	350
<i>Methanopyraceae</i> 2	GAGACAAGGCCCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCCGCA	381
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GAGACAAGGTTCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCCGCA	366
<i>H.halobium</i> 148798	GAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACA	352

**** * * ** ** ***** *** ***** ** ** *

Yu et al. (2008) **GAGACA** A357F: **CCCTACGGGGCGCAGCAG** (Yu et al., 2008)

V3

<i>Methanosaetacea</i> 187	ATG CBGGVAACAGCGATAAGGGAACCTCGAGTG GCYRG-SWTAYAAW---B	401
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	ATG CGGGAAACCGTGATAAGGGGACACCGAGTG GCYVG-CAHVNWDT---G	407
<i>Methanocellaceae</i> 15	ATG CAGGCAACTGCGATAGGGGAACATCGAGTG GGTATTCATCTTG---G	397
<i>Methanospirillaceae</i> 27	ATG CGGGCAACCGTGATAAGGAAACCCGAGTG CCAG---CACAG---G	393
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	ATG CGGGMAACCGTGATAAGGGAACCTCGAGTG CCYG---TAHRN---N	394
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	ATG CGAGCAATCGTGATAAGGAAACCTGAGTG CCCTG---TCGAT---G	393
<i>Methermicoccaceae</i> 6	ATG TGCGAAAGCACGATAAGGGAACCTGAGTG CCGA---TCCAAA---G	420
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	ATG CGCGAAAAGTGCGACGGGGGGACCCCGAGTG CSCTCVCTCTTTTGGAG	424
<i>Methanococcaceae</i> 38	ATG CACGAAAAGTGCGACGGGGGGACCCCAAGTG CYYAYGYAM-----HK	394
<i>Methanopyraceae</i> 2	ATG CGGGCAACCGCGACGGGGGGACCCCGAGTG CCGTGCGGGCAAAGCCC	431
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	ATG CACGAAAAGTGCGACGGGGGGACCCCAAGTG YY-AYKCTTWW---HD	411
<i>H.halobium</i> 148798	CTG TACGAAAAGTGCGATAAGGGGACTCCGAGTG TGAAGGCATAG---AG	398

** * ** ** ** ** ****

V3

<i>Methanosaetacea</i> 187	YT--GGCTGTYSNRMTGCCTAAAAAGCAKYNBWTAGCAAGGGCCGGGCAA	449
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	YT--GGCTGTCCDBNTGYNTAAANNNCANVHGHTAGCAAGGGCCGGGCAA	455
<i>Methanocellaceae</i> 15	DK--GBCTGTCCAACCGYCTAAAAAACGGTTGTTAGCAAGGGCCGGGCAA	445

<i>Methanospirillaceae</i> 27	CT--GGCTGTCCRCCAGTKTAMAHAACTGGTGA-AGAAAGGGCC	GGGCAA	440
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	CR--GGCTGTYHVBVTGYNYAAADNNCABBBVR-AGAAAGGGCC	GGGCAA	441
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	CA--GGCTGTTCATATATCTAAATCATATGTGA-AGAAAGGGCA	GGGCAA	440
<i>Methermicoccaceae</i> 6	SATCGGCTGTTCAGRTGYTAAAAAGCATCTGA-AGTAAGGGCT	GGGCAA	469
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CNDBKGCTTTTNVRDAGTGTAACAGCTCCGGGAATAAGG-GCT	GGGCAA	473
<i>Methanococcaceae</i> 38	CRTRGGCTTTTATCAAGTGTAACAGCTTGAGGAATAAGG-GCT	GGGCAA	443
<i>Methanopyraceae</i> 2	CGGCGGCTGTACCGGGGTGTAAAAAGCCCCGGGTAGAAAGCGGC	GGGCAA	481
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GDRTRRCTTTTCTTAAGTGTAAGGCTTTTGGGAATAAGA-GCT	GGGCAA	460
<i>H. halobium</i> 148798	CCTTCACCTTTTGTACACCGTAAGGTGGTGCACGAATAAGG-ACT	GGGCAA	447

** *
*
*
*
*

<i>Methanosaetaceae</i> 187	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAACACCGGCGGCCCGAGTGGTAACCGTT	499
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAACACCGGCGGCCCGAGTGGTGATCGTG	505
<i>Methanocellaceae</i> 15	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGCCGAT	495
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGCCGCT	490
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGCCACT	491
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACT	490
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAACACCGGCAGCCCAAGTGGTGCCACT	519
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GTCCGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCGGCGGCCCAAGTGGTGCCACT	523
<i>Methanococcaceae</i> 38	GTTCGGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACCGACGGCCCGAGTGGTGCCACT	493
<i>Methanopyraceae</i> 2	GACCGCTGCCAGCCGCCGCGGTAATAGCGGCGCCGCAAGTGGTGCCGCT	531
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAACACCGGCAGCTCAAGTGGTGCCGTT	510
<i>H. halobium</i> 148798	GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCGAGTGATGGCCGAT	497

*

*
**
*
*

*

Met448F: GGTGCCAGCCGCCGC Wright and Pimm (2003)

V4

<i>Methanosaetaceae</i> 187	ATTATTGGGTCTAAAGGGTCTGTAGCCGG	SCCDDNTAAGTCYCTTGRGAA	549
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	ATTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGG	-TTYGRTCAGTYYYTYGGGAA	554
<i>Methanocellaceae</i> 15	ATTATTGAGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGG	-CTTTGCAAGTCTCTTGGGAA	544

<i>Methanospirillaceae</i> 27	ATTACTGGGCTTAAAGGGTCCGTAGCTGG-ATNNNHRDGTCTCYTTGAGAA	539
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	TTTATTGGGCTTAAAGCGTTCGTAGCTGG-DHHNHTAAGTCTCTKGGGAA	540
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	ATTACTGGGTTTAAAGCGTCCGTAGCTTG-ACTGHTAGGTCTCTTGGGAA	539
<i>Methermicoccaceae</i> 6	TTTACTGGGTCTAAAGCGTCCGTAGCCGG-CTAAGTAAGTTCCTTGGGAA	568
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGG-CCCGGTAAGTCCCTKBKKAA	572
<i>Methanococcaceae</i> 38	CTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGG-TCCAGTAAGTCCCTGTTTAA	542
<i>Methanopyraceae</i> 2	TTTATTGGGCCTAAAGGGGCCGTAGCCGG-TCCCGTGGGTCCCCGCCGAA	580
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	TTTATTGGGCCTAAAGCGTTCGTAGCCGG-TTTGATAAGTCTCTGGTGAA	559
<i>H. halobium</i> 148798	CTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGG-CTGAACAAGTCCGTTGGGAA	546

*** ** * ***** * ***** * ** **

A693R: GAAATCYTGTAATCC Yu et al. (2008)

V4

<i>Methanosaetaceae</i> 187	ATCYRGCADCTYAAB-TGTYRGGCTK--YYAGGRGATACTGNYN-GGCTC	595
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	ATCTGNNNGCTYAACAHVTYAGGCTT--YYRGDGRATACTDYR-GRCTT	601
<i>Methanocellaceae</i> 15	ATCCAGCGGCTTAAC-CGTTGGGCGT--CCAGGGGATACTACAT-TGCTT	590
<i>Methanospirillaceae</i> 27	ATCYRYCRGCTTAAC-YGVYRGGCGT--TCAGGGGAACTKBDD-TTCTA	585
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	ATCBNNCRGCTYAAC-YGDNRRGGCGT--YYVRGRGATACTGDBD-DHCTT	586
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	ATCTTMRYGCTYAAC-GTKAAGGCGT--CTAAGAGATACCGDCA-GTCTT	585
<i>Methermicoccaceae</i> 6	ATTTGACCGCTTAAC-GGTTAAGCTT--CCAGGGAATACTGCTT-GGCTT	614
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	ATCCTGCGGCTTAAC-CG-CAGGGCT-GGCAAGGGATACTGCCG-GGCTT	618
<i>Methanococcaceae</i> 38	ATCCTACGGCTTAAC-CG-TAGGACT-GGCA-GRGATACTGCTG-GACTT	587
<i>Methanopyraceae</i> 2	AGCCCCGCGGCTTAAC-CG-CGGGAGTCGGCG-GGGAACTGCGG-GACTT	626
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	ATCCCACAGCTTAAC-TG-TGGGAATTGCTG-GAGATACTATTATGACTT	606
<i>H. halobium</i> 148798	ATCTGTCCGCTTAAC-GGGCAGGCGT--CCAGCGGAAACTGTTC-AGCTT	592

* ** ** * * ** **

<i>Methanosaetaceae</i> 187	GAGGCCGGGAGAGGTGAGAGGTACTTCAGGGGTAGGGGTGAAATCCTTGTA	645
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GGAACCGGGAGAGGTAAGAGGTACTACAGGGGTAGGAGTGAAATCCTTGTA	651
<i>Methanocellaceae</i> 15	GGGACTGGGAGAGGTAGGAGGTACTCAGGGGTAGGAGTGAAATCCTTGTA	640
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GGGACCGGGAGAGGTGAGAGGTACTGCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTTGTA	635

<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GGAACC	GGGAGAGGTGAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTA	636
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GGRACT	GGGAGAGGTAAACCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCTTGTA	635
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GGGACC	GGGAGAGGTCAGAGGTACCTCAAGGGTAGGGGTGAAATCCGTTA	664
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GGGACC	GGGAGAGGCCGGGGGTACCCAGGGGTAGCGGTGAAATGCGTTG	668
<i>Methanococcaceae</i> 38	GGGACC	GGGAGAGGACAAGGGTACTTCAGGGGTAGCGGTGAAATGTGTTG	637
<i>Methanopyraceae</i> 2	GGGACC	GGGAGAGGCCGGAGGTACCCCCGGGGTAGGGGTGAAATCCTGTC	676
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GAGGTC	GGGAGAGGTTAGAGGTACTCCCAGGGGTAGGGGTGAAATCCTATA	656
<i>H. halobium</i> 148798	GGGACC	GGAAGACCTGAGGGGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTA	642
	*	** *** ***** *	

<i>Methanosaetacea</i> 187		ATCCTTGAAGGACCACCAGTGGCGAAGGCGTCTCACCAGAACGGACCTGA	695
<i>Methanosarcinaceae</i> 304		ATCCCTGTGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGTCTTACCAGAACGGGTTCGA	701
<i>Methanocellaceae</i> 15		ATCCTTTGGGGACCACCGGTGGCGAAGGCGTCTTACCAGAACAGGTCCGA	690
<i>Methanospirillaceae</i> 27		ATCCCGGTGGGACCACCTATGGCGAAGGCATCTCACCAGAACGGGTCCGA	685
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197		ATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCACCAGAACGGCTTCGA	686
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46		ATCCTCGAGGGACGACCTATGGCGAAGGCAGTTTACCAGAACAGCTTCGA	685
<i>Methermicoccaceae</i> 6		ATCCTTGGGGGACCACCAGTAGCGAAGGCGTCTGACCAGACCGGATCCGA	714
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74		ATCCCTGGGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCCGCCTGGACGGGGTCCGA	718
<i>Methanococcaceae</i> 38		ATCCTTGAAGGACCACCTATGGCGAAGGCACTTGTCTGGAACGGGTCCGA	687
<i>Methanopyraceae</i> 2		ATCCCGGGGGGACCGCCAGTGGCGAAGGCGTCCGGCTGGAACGGGTCCGA	726
<i>Methanobacteriaceae</i> 270		ATCCTGGGAGGACCACCTGTGGCGAAGGCGTCTAACTGGAACGAACCTGA	706
<i>H. halobium</i> 148798		ATCCTGGACGGACCGCCGGTGGCGAAGCGCCTCAGGAGAACGGATCCGA	692
	****	**** ** * ***** ** **	

<i>Methanosaetacea</i> 187		CGGTAAGGGACGAAAGCTAGGGGACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAG	745
<i>Methanosarcinaceae</i> 304		CGGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAG	751
<i>Methanocellaceae</i> 15		CGGTGAGGGACGAAAGCTAGGGGACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAG	740
<i>Methanospirillaceae</i> 27		CAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAG	735
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197		CAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAG	736
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46		CAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAG	735

<i>Methermicoccaceae</i> 6	CGGTGAGGGACGAAGGCTAGGGTAGCGAACC GGATTAGATAACCCGGGTAG	764
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CGGTGAGGGACGAAGGCCAGGGGAGCAAACC GGATTAGATAACCCGGGTAG	768
<i>Methanococcaceae</i> 38	CGGTGAGGGACGAAAGCCAGGGGGGCGAACC GGATTAGATAACCCGGGTAG	737
<i>Methanopyraceae</i> 2	CGGTGAGGGCCGAAAGCCGGGGGAGCAAACC GGATTAGATAACCCGGGTAG	776
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CGGTGAGTAACGAAAGCCAGGGGCGCGAACC GGATTAGATAACCCGGGTAG	756
<i>H.halobium</i> 148798	CAGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACC GGATTAGATAACCCGGGTAG	742

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Hook *et al.* (2009) MET630F: GGATTAGATACCCSGGTAG

<i>Methanosaetaceae</i> 187	TCCTAGCCGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTCDGBCACGGT-GCGA-CCGT	793
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	TCCCAGCCGTAAACGATGYTCGCTAGGTGTCTWGGNAYGGY-GYGA-CCGT	799
<i>Methanocellaceae</i> 15	TCCTAGCCGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTCA-CRACRRTCCTGAAYYGT	789
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TCCCAGCTGTAAACGATGYGCGTTAGGTGT-GTCAGTGACCACGTGTCAC	784
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	TCCCAGCCGTAAACGATGYGCGTTAGGTGT-RYYGRYGACCACGAGTYDY	785
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	TCCCAGCCGTAAACAATGTGCGTTAGGTGT-RTCGGTAACCACGHGTTAC	784
<i>Methermicoccaceae</i> 6	TCCTAGCTGTAAACGATGCKGGCYAGGTGTTAGGCATTACTGCGAGT-GA	813
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	TCCTGGCTGTAAACTCTGCGGACTAGGTGTCTG-VDYSBBCTTCGRGVBBR	817
<i>Methanococcaceae</i> 38	TCCTGGCCGTAAACTCTGCGAAGTACTAGGTGTCTG-BSTRGRCYYYGDGYCYA	786
<i>Methanopyraceae</i> 2	TCCCGGCTGTAAACGATGCGGACTAGGTGTTG-GGGCGGCCACGAGCCGC	825
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	TCCTGGCCGTAAACGATGTGGACTTGGTGTGTTG-GGATGGCTTCGAGCTGC	805
<i>H. halobium</i> 148798	TCCTAGCTGTAAACGATGTCCGCTAGGTGTGG-CGCAGGCTACGAGCCTG	791

*** ** ***** ** ***** *

v5

<i>Methanosaetaceae</i> 187	DDTYGGT	GCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCC	843
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	DTCHGGT	GCCGCAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCC	849
<i>Methanocellaceae</i> 15	YGY-GGT	GCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACTTGGGAAGTACGACC	838
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TG-AKGT	GCCGAAGGGAAACCGTGAAACGCGCCGCTGGGGAGTACGGTC	833
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	HG-RGGT	GCCGAAGGGAAACCGTGAAACGTGCCGCTGGGAAGTACGGTC	834
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	TG-ATGC	GCCGAAGAGAAATCGTGAAACGCACCACCTGGGAAGTACGGTC	833

<i>Methermicoccaceae</i> 6	TGCCAGT	GCCGAAGGGAAGCCGTTAAGCCCGCCATCTGGGGAGTACGGTC	863
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CG-CGGT	GCCGAAGGGAAGCCGTTAAGTCCGCCGCCTGGGGAGTACGGTC	866
<i>Methanococcaceae</i> 38	KS-YRGT	GCCGAAGGGAAGCCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTC	835
<i>Methanopyraceae</i> 2	CC-CAGT	GCCGTAGGGAAGCCGTTAAGTCCGCCGCCTGGGGAGTACGGCC	874
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CC-CAGT	GCCGAAGGGAAGCTGTTAAGTCCACCGCCTGGGAAGTACGGTC	854
<i>H.halobium</i> 148798	CG-CTGT	GCCGTAGGGAAGCCGAGAAGCGGACCGCCTGGGAAGTACGTCT	840
		* * * * * * * * * * * * *	

<i>Methanosaetaceae</i> 187	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACGGGTGGA	893
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACAACAACGGGTGGA	899
<i>Methanocellaceae</i> 15	GCAAGGTTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACGGGTGGA	888
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACGGGTGGA	883
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACAGGTGGA	884
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACAGGTGGA	883
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACGGGTGGA	913
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GCAAGACTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACGGGTGGA	916
<i>Methanococcaceae</i> 38	GCAAGACTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACGGGTGGA	885
<i>Methanopyraceae</i> 2	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACGGGTGGA	924
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACGCGTGGA	904
<i>H.halobium</i> 148798	GCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCGGAGGA	890
	***** *****	

UNMETFW947-969 (Mora-polanco et al.,TW) AAACCTTAAAGRAATTGGCGGGGG
UNMETRV947-969 (Mora-Polanco et al.,TW) CCCCCGCCATTTYCTTTAAGTTT

V6

<i>Methanosaetaceae</i> 187	GCCTGCGGTTTAATTGGATTCAACGCCGGAAATCTTACCGG	GDBCAGACAG	943
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGMAACTCACC	GGVMGACAG	949
<i>Methanocellaceae</i> 15	GCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGGAAGCTTACCGG	GATCGACAG	938
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GCCTGCGGTTTAATCGGACTCAACGCCGGAAATCTCACC	GGATAAGACAG	933
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGGAAGCTCACC	GGDTARGACAG	934

<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GCCTGCGGTTTAATTGGATTCAACGCCGGACATCTCACC	GGATAAGACAG	933
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GCCTGCGGTTCAATTGGATTCAACGCCGGAAACTCACC	GGAGGCGACAG	963
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GCCTGCGGTTTAATTGGATTCAACGCCGGGCATCTCACC	AGGGCGACRG	966
<i>Methanococcaceae</i> 38	GCCTGCGGTTTAATTGGATTCAACGCCGGGCATCTCACC	AGAGCGACAG	935
<i>Methanopyraceae</i> 2	GCCTGCGGTTTAATTGGATTCAACGCCGGAAACCTTACC	GGGCGACAG	974
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GCCTGCGGTTTAATTGGATTCAACGCCGGACATCTCACC	AGGGCGACAG	954
<i>H. halobium</i> 148798	GCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACC	AGCCCCGACAG	940

***** ** * * ***** * * * * *
MET803R: GTTGARTCCAATTAAACCGCA Hook et al. (2009)

V6

<i>Methanosaetacea</i> 187	CRA-TATGAAGGYCAGGCTGAAGACYTTRCCBBGATTMGCT	GAGAGGTGG	992
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	CAA-NATGTAGGBCARGCTDAAGRHYTTDCCNGAAT-CGCT	GAGAGGAGG	997
<i>Methanocellaceae</i> 15	TTG-TATGAAGGCCAGGCTGAAGACCTTGCCGGACT-AKCT	GAGAGGAGG	986
<i>Methanospirillaceae</i> 27	CTG-NATGATAGTCGGGATGAAGACTCTACTTGACT-AGCT	GAGAGGAGG	981
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	MNR-DATGATDRYCDGGCTGAAGACYTRYWTGAYB-AKCT	GAGAGGAGG	982
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	CTG-WATGATTGTCAATCTGAAGGTTTTACATGACT-AGCT	GAGAGGAGG	981
<i>Methermicoccaceae</i> 6	CGA-GATGAAGGTCAGGCTGAAGACCTTACCGGATT-AGCT	GAGAGGTGG	1011
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CAG-GATGAAGGCCAGGTTGACGACCTTGCCAGACGC-GCC	GAGAGGTGG	1014
<i>Methanococcaceae</i> 38	CAT-GATGACGGCCAGGTTGACGACCTTGCCGAAAGC-GCT	GAGAGGTGG	983
<i>Methanopyraceae</i> 2	CAG-GATGAAGGCCAGGTTGACGACCTTGCCGGACGA-GCT	GAGAGGAGG	1022
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CAG-TATGATAGCCAGGTTGATGACCTTGCTTGACAA-GCT	GAGAGGAGG	1002
<i>H. halobium</i> 148798	TAGTAATGACGGTCAGGTTGATGACCTTACCCGAGGCTACT	GAGAGGAGG	990

*** * * * * * *

<i>Methanosaetacea</i> 187	TGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGTTAAGTCAGGCA	1042
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	TGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGTTAAGTCAGGCA	1047
<i>Methanocellaceae</i> 15	TGCATGGCCGCCGTCAGTTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGCA	1036
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGTTTAGTCAGGCA	1031
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	TGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGTTAAGTCAGGCA	1032

<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	TGCATGGCCGTCGTCAGTTCGTACTGTGAAGCATCCTGTTAAGTCAGGCA	1031
<i>Methermicoccaceae</i> 6	CGCATGGCCGTCGGCAGTTCGTGTCGTGAAACATCCTGTTAAGTCAGGCA	1061
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	TGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGTA	1064
<i>Methanococcaceae</i> 38	TGCATGGCCATCGTCAGCTCGTACCGCGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGTA	1033
<i>Methanopyraceae</i> 2	TGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCCTGTTAAGTCAGGTA	1072
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	TGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGCA	1052
<i>H. halobium</i> 148798	TGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGCA	1040
	***** ** *** ***** * ** ***** ***** *	

v7

<i>Methanosaetacea</i> 187	ACGAGCGAGACCCACGYCCACAGTTGCCAGCRWDBBC---TCHGGRVHGR	1089
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	ACGAGCGAGACCCGTGCCCCACHGTTDCCAGCATNNYC---TYHGGRDNGA	1094
<i>Methanocellaceae</i> 15	ACGAGCGAGACCCATATCCACTGTTGCTAACRHBHSYM-GHRAKRVDTGG	1085
<i>Methanospirillaceae</i> 27	ACGAGCGAGACCCACGCSAVCARTTGCCAGCWTRACC---TTCGGGTTGA	1078
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	ACGAGCGAGACCCACGCCAACAGTTGCTYAGCWYRDYC---YCCGGRHYGR	1079
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	ACGAGCGAGACCCACGCCRACAATTGCCAGCAKCATC---TCCGGATGGM	1078
<i>Methermicoccaceae</i> 6	ACGGGCGAGACCCGCGCTCACAGTTGCCAGCATSTYY---KYMRRRASGA	1108
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	ACGAGCGAGACCCGTGCCCCATGTTGCCAGCCCTCCCC-TCCGGGGGAGC	1113
<i>Methanococcaceae</i> 38	ACGAGCGAGACCCGTGCCCTATGTTGCBASTWYTTCC--TCCGGGAGAA-	1080
<i>Methanopyraceae</i> 2	ACGAGCGAGACCCCGCCCCGAGTTGCCAGCGGGCCCC-GTAAGGGGCGC	1121
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	ACGAGCGAGACCCACGCCCTTAGTTACCAGCGGATCCTTTTTTGGGATGC	1102
<i>H. halobium</i> 148798	ACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCGGTACCC--TTTGGGTAGC	1088
	*** ***** ** * *	

v7

<i>Methanosaetacea</i> 187	BGGGTACWCTGTGGRGACCGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAATGGGCA	1139
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	TGGGTACTCTGTGGGGACCGCCGVTGBTAAANCVGAGGAAGGTGCGGGCT	1144
<i>Methanocellaceae</i> 15	TGAGTACACGGTGGAGACCGCTGGCGCTAAGTCAGAGGAAGGAGTGGTCG	1135
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TGGGGACAYYGYTSGGACCGCCTCTGCTAAAGGGGAGGAAGGAATGGGCA	1128
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	WGRGGACACTGTTGGGACCGCCTCTGCTAAAGRGAGGAAGGAATGGGCA	1129

<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	TGGGGACATTGTYGGGACCGCCTCTGCTAAAGRGGAGGAAGGAATGGGCA	1128
<i>Methermicoccaceae</i> 6	TGGGCACTCTGTGAGGACTGCCGCGCTAAGGTGGAGGAAGAAGCGGGCC	1158
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CGGGCACTCATGGGGGACCGCCGGCGCTAAGCCGGAGGAAGGTGCGGGCA	1163
<i>Methanococcaceae</i> 38	-AGGCACTCATAGGGGACCGCTGGCGCTAAGCCAGAGGAAGGAGCGGGCA	1129
<i>Methanopyraceae</i> 2	CGGGCACTCTGCGGGGATCGCCGCCGTTAAGGCGGATGAAAGTGGGGGCG	1171
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGAGTGGACG	1152
<i>H. halobium</i> 148798	TGGGTACATTAGGTGGACTGCCGCTGCCAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCA	1138

* * * * * * * * * * * * * * * * * *

<i>Methanosaetaceae</i> 187	ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATATCCCGGGCTACACGCGAGCTACAAT	1189
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATCTCCCGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1194
<i>Methanocellaceae</i> 15	ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATATCCCGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1185
<i>Methanospirillaceae</i> 27	ACGGTAGGTCAGCATGCCCCGAATTATCCCGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1178
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	ACGGTAGGTCAGCATGCCCCGAATTATCCCGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1179
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	ACGGTAGGTCAGCATGCCCCGAATTATCCCGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1178
<i>Methermicoccaceae</i> 6	ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATCCTCCCGGGCTACACGCGTGCTACAAT	1208
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	ACGACAGGTCCGCATGCCCCGAATCCCCTGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1213
<i>Methanococcaceae</i> 38	ACGATAGGTCCGCATGCCCCGAATCTCCTGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1179
<i>Methanopyraceae</i> 2	ACGGCAGGTCCGTATGCCCCGAAACCCCGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1221
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	ACGGTAGGTCCGTATGCCCCGAATCCCCTGGGCTACACGCGGGCTACAAT	1202
<i>H. halobium</i> 148798	ACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGGGCTGGGCAACACGCGGGCTACAAT	1188

*** ***** * ***** * ***** ***** *****

v9

<i>Methanosaetaceae</i> 187	GGTYGGBACAATGGGYATCKACCCCGARAGGGGWHGGNAATCYCYTAAAV	1239
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GGNNGGGACAATGGGNHHCTNCHCYGADARGDGNNGGNAATCTCHYAAAC	1244
<i>Methanocellaceae</i> 15	GGACAGGACAATGGGTAACCTACACCGAAAGGTGGCGTCAATCTCTTAAAC	1235
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GGWYAGGACAATGGGTTYCKACACCGARAGGTGADGRYAATCTCCTAAAC	1228
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GGDYRGGACAATGRGHAWCGACACYGDRARGTGADGCAATCYCYTAAAC	1229
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GGAYGGGACAATGGGTAACAMCACCAGAAAGGTGYMGTCATCTCCKAACC	1228

<i>Methermicoccaceae</i> 6	GGGTGGTACAATGGGTATCAACCCCGAAAGGGGAAGGTAATCTCCTAAAA	1258
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GGCCGGGACAATGGGATGCGACCCCGAAAGGGGGAGCGAATCCCCTAAAC	1263
<i>Methanococcaceae</i> 38	GGCTAGGACAATGGGATGCDACCCTGAAAAGGGACGCAAATCTCCTAAAC	1229
<i>Methanopyraceae</i> 2	GGCGGGGACAATGGGATCCGACCCCGAAAGGGGGAGGAAATCCCCTAAAC	1271
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GGCTAGGACAATGGGTTCCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAAC	1252
<i>H.halobium</i> 148798	GGTCGAGACAATGGGAAGCCACTCCGAGAGGAGGCGCTAATCTCCTAAAC	1238
	** ***** * * * * * * * ***** **	

<i>Methanosaetaceae</i> 187	CCRATCBTAGTTTCGGATTGAGGGCTGCAACTCGCCCTCATGAAGCTGGAA	1289
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	CCVNYCBTAGTTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCGTGAAGCTGGAA	1294
<i>Methanocellaceae</i> 15	CTGTCCCTTAGTTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGATGGAA	1285
<i>Methanospirillaceae</i> 27	CTRTCCBAAGTTTCGGATTGCGGGTTGTAACCTACCCGCATGAAGCTGGAA	1278
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	CYRYCCBWAGTTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGAA	1279
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	CCRYCCTTAGTTAGGATTGCGGGTTGCAACTCACCCGCATGAATCTGGAA	1278
<i>Methermicoccaceae</i> 6	CCATCCTCAGTTGGGATCGAGGGCTGCAACTCGCCCTCGTGAACCTGGAA	1308
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CCGGTCGTAGTCCGGATCGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCGTGAAGCCGGAA	1313
<i>Methanococcaceae</i> 38	CTAGTCGTAGTTTCGGATCGTGGGCTGTAACCTCGCCACGTGAAGCTGGAA	1279
<i>Methanopyraceae</i> 2	CCCGTCGTAGTTTCGGATTGCGGGCTGCAACTCGCCCGCATGAAGGTGGAA	1321
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	HHDGBCBTAGTTTCGGATTGAGGGCTGTAACCTCGCCCTCATGAAGCTGGAA	1302
<i>H.halobium</i> 148798	TCGATCGTAGTTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGAT	1288
	* *** **** * *** * ***** *** * ***** ***	

Marchesi et al. (2001)1324R: GCGAGTTACAGCCWCRA

<i>Methanosaetaceae</i> 187	TCCGTAGTAATCGCGTTTCAACAGAACGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCT	1339
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	TCCGTAGTAATCGCGTTTCAATATAGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCT	1344
<i>Methanocellaceae</i> 15	TCCGTAGTAATCGCATTTCAAAACAGTGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCT	1335
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TCCGTAGTAATCGCGTTTCAACATAGCGCGGTGAATATGTCCCTGCTCCT	1328
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	TCTGTAGTAATCGCGTTTCAAAATAGCGCGGTGAATATGTCCCTGCTCCT	1329
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	TCTGTAGTAATCGCGTTTCACTATAGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCT	1328
<i>Methermicoccaceae</i> 6	TCCGTAGTAATCGCCCCCTCAAAATGGGGCGGTGAATATGTCCCTGCTCCT	1358

<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	TCCGTAGTAATCGCGCCTCACCATGGCGCGGTGAATGCGTCCCTGCTCCT	1363
<i>Methanococcaceae</i> 38	TCCGTAGTAATCGCAGTTCATAATACTGCGGTGAATGTGTCCCTGCTCCT	1329
<i>Methanopyraceae</i> 2	TCGGTAGTAACCGTGCCTCAGAATGGCACGGTGAATACGTCCCTGCTCCT	1371
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	TGCGTAGTAATCGCGTGTCTATAATCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCT	1352
<i>H.halobium</i> 148798	TCGGTAGTAATCGCGTGTCTAGCAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCT	1338

* ***** ** *** * ***** *****

(Mora-Polanco et al., TW) **UNMET-RV1425-42: TGTGCAAGGAGC...**

v9

<i>Methanosaetaceae</i> 187	TGCACACACCGCCCGTCAAAACCACCCGAGTAGGGTCYGRATGAGRGYGYN	1389
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	TGCACACACCGCCCGTCAAAACCACCCGAGTGDGGTATGGGTGAGGGBNHN	1394
<i>Methanocellaceae</i> 15	TGCACACACCGCCCGTCAAAACCACCCGAGTGGGGTTTGAATGAGGGCCTC	1385
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TGCACACACCGCCCGTCAAAACCACCCGAGTGAGGTCTTGATGAGGHKRYR	1378
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	TGCACACACCGCCCGTCAAAACCACCCGAGTGRGGTYTNGATGAGSATATC	1379
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	TGCACACACCGCCCGTCAAAACCATCCTAGTGGGGTTTGGATGAG---TC	1374
<i>Methermicoccaceae</i> 6	TGCACACACCGCCCGTCAAGCCAGCCGAGTGGGGTTTAGGTGAGGCCATC	1408
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	TGCACACACCGCCCGTCAACGCCACCCGAGTTGAGCCCAAGTGAG---GCY	1410
<i>Methanococcaceae</i> 38	TGCACACACCGCCCGTCAACACCACCCGAGTTGGGTGAGGTGAG---GCC	1376
<i>Methanopyraceae</i> 2	TGCACACACCGCCCGTCAACGCCACCCGAGCCCCCGGGGGCAAG---CCC	1418
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	TGCACACACCGCCCGTCAACGCCACCCAAAAAGGGTTTGGATGAGACGGHN	1402
<i>H.halobium</i> 148798	TGCACACACCGCCCGTCAAAATCACCCGAGTGGGGTTTCGGATGAG-----G	1383

***** ** * * **

UNMET-RV1425-42:... GCAGGGAC (Mora-Polanco et al., TW)

v9

<i>Methanosaetaceae</i> 187	TN-----HNNHK-----SNGVBR-HDBBCGAATNBRVBTTBYGCRAAG	1425
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	NA-----NNNHAWWNTGNNNGNTK-BNTTCNAACCTNDDBTHYGCAAG	1437
<i>Methanocellaceae</i> 15	TT-----TCATT-----GRRR-GVHYBVAATYHHDBBYBKDAAG	1419
<i>Methanospirillaceae</i> 27	TC-----ADNY-----GRYR----TDDTCGAATCTGGGTTTYGCAAG	1411
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	TCTCAYYRBVGTN-----DWYGCBGCVGTCTGAATCTAGGTTTYBGCAAG	1423

<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	CC-----TGGTC-----TTTGCCG-GGGTCGAATCTAGGTTCCGTGAG	1411
<i>Methermicoccaceae</i> 6	TT-----TTT-----TGGGG-TGTTCGAACCTAAGTCTCGCAAG	1441
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	HYRY----CCGCA-----AGGGC-AGGGTCGAACCTTGGGTTTCAGCGAG	1448
<i>Methanococcaceae</i> 38	TTGG----CC-TT-----TGGCT-AGGGTCGAACCTGGGCTCAGCGAG	1413
<i>Methanopyraceae</i> 2	CCGGT---CCGCA-----AGGGCTGGGGGCGAGCCCCCGGGGGGTGAG	1458
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	NYNDH---NNNNN-----NNDBHNDNNGTCGAATCTGGGTTCTTTGAG	1442
<i>H. halobium</i> 148798	CCGG-----CA-----TGCGC--TGGTCAAATCTGGGCTCCGCAAG	1417

*

**

v9

<i>Methanosaetacea</i> 187	DGGGDTTAAAGT-CG-TAACAAGGTAACCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGAT	1473
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	GGGGGTTAAAGT-CGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGAT	1486
<i>Methanocellaceae</i> 15	GGGGGTWAAATTTCG--AAAAAGGGAACCTAGGGGAATCTGCGGCTGGAT	1467
<i>Methanospirillaceae</i> 27	GGGGGTTAAAGT-CG-TAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGAT	1459
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	GRGGGTTAAAGT-CG-TAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGAT	1471
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	GAGGGTTAAAGT-CG-TAACAAGGTAACCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGAT	1459
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GGGGGCT-----	1448
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	GGGGGCGAAGT-CG-TAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGAT	1496
<i>Methanococcaceae</i> 38	GGGGGTGAAGT-CG-TAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGAT	1461
<i>Methanopyraceae</i> 2	GGGGGCGAAGT-CG-TAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGAT	1506
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	GAGGGCGAAGT-CG-TAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGAT	1490
<i>H. halobium</i> 148798	GGGGATTAAAGT-CG-TAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGAT	1465

**

<i>Methanosaetacea</i> 187	CACCTCCTA	1482
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	CACCTCCTA	1495
<i>Methanocellaceae</i> 15	CACCTCCTT	1476
<i>Methanospirillaceae</i> 27	CACCTCCTT	1468
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	CACCTCCTT	1480
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	CACCTCCT-	1467

<i>Methermicoccaceae</i> 6	-----	
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CACCTCC--	1503
<i>Methanococcaceae</i> 38	CACCTCCT-	1469
<i>Methanopyraceae</i> 2	CACCTC---	1512
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CACCTCCT-	1498
<i>H.halobium</i> 148798	CACCTCCT-	1473

El número a lado derecho de cada familia indica el número de genes rRNA 16S utilizados para cada consenso. En cajas de color amarillo se muestra las regiones hipervariables de cada familia. En la parte inferior de cada bloque se muestran los cebadores de la literatura y los diseñados en este trabajo. Para nucleótidos no canónicos se utilizó la nomenclatura internacional en donde: K = G ó T; M = A ó C; R = A ó G; S = G ó C; W = A ó T; Y = C ó T; B = C ó G ó T; D = A ó G ó T; H = A ó C ó T; V = A ó C ó G; N = A ó C ó G ó T.

ANEXO B. Secuencia de nucleótidos de las regiones hipervariables del gen rRNA 16S de metanobacterias por familias.

V1

<i>Methanosaetacea</i> 187	CATGCGAGTCGAATGTNSKHNRHRNVCATRGCGNACT (37)
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	CATGCDAGTYAHATGTHCTTHGYCGGGRADACATRGCGNACB (42)
<i>Methanocellaceae</i> 15	CATGCGAGTCGAGAGGCGTTATGGCCTCGGCGGACT (36)
<i>Methanospirillaceae</i> 27	CATGCGAGTCGAGAGGKYMDGACCTCGGCGWACK (35)
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	CATGCGAGTYGAGAGGKKTTHVRRMCCTCRGCRNACB (36)
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	CATGCGAGTCGAGAGGKKTMRGMCCTCGGCATACT (35)
<i>Methermicoccaceae</i> 6	CATGTTAGTYGAGGGTGCTCTTCTCCTTCGGGAGGAGGAGTAACCCGGCRGACG (55)
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CATGCGAGTCAAGGGGACTTTTCYBYBBYTTGGVVRAGRKMRKSMVSSGCRNACG (55)
<i>Methanococcaceae</i> 38	CATGCGAGTCTATGGACTTCGGTCCATGGCGGACG (44)
<i>Methanopyraceae</i> 2	CATGCAAGTCGAGGGCCGCCGCGCAATGGGGGCGGCC (47)
<i>Methanobacteriaceae</i> 270	CATGCGAGTNGNAHGNNNNHHYBNBNDDDNTCRTCRTGGCRDACG (43)
<i>H. halobium</i> 148798	CATGCTAGTTGTGCGGGTTTAGACCCGCAGCGGAAA (36)

V8

<i>Methanosaetacea</i> 187	TYGGBACAATGGGYATCKACCCCGARAGGGGWHGGNAATCYCYTAAVCCRATCBT (56)
<i>Methanosarcinaceae</i> 304	NNGGGACAATGGGNHHCNTNCHCYGADARGDGNNGGNAATCTCHYAAACCCVNYCBT (56)
<i>Methanocellaceae</i> 15	ACAGGACAATGGGTAACTACACCGAAAGGTGGCGTCAATCTCTTAAACCTGTCCTT (56)
<i>Methanospirillaceae</i> 27	WYAGGACAATGGGTTYCKACACCGARAGGTGADGRYAATCTCCTAAACCTRTCCBA (56)
<i>Methanomicrobiaceae</i> 197	DYRGGACAATGRGHAWCGACACYGDRARGTGADGCAATCYCYTAAACCYRYCCBW (56)
<i>Methanocorpusculaceae</i> 46	AYGGGACAATGGGTAAACAMCACCAGAAAGGTGYMGTCATCTCCKAACCCCRYCCTT (56)
<i>Methermicoccaceae</i> 6	GTGGTACAATGGGTATCAACCCCGAAAGGGGAAGGTAATCTCCTAAACCATCCTC (56)
<i>Methanocaldococcaceae</i> 74	CCGGGACAATGGGTATGCGACCCCGAAAGGGGGAGCGAATCCCTAAACCCGGTCGT (56)
<i>Methanococcaceae</i> 38	CTAGGACAATGGGTATGCDACCCTGAAAAGGGACGCAATCTCCTAAACCTAGTCGT (56)

*Methanopyraceae*2 CGGGGACAATGGGATCCGACCCCGAAAGGGGGAGGAAATCCCCTAAACCCCGTCGT (56)
*Methanobacteriaceae*270 CTAGGACAATGGGTTCGACACTGAAAGGTGGAGGTAATCTCCTAAACHHDGBCBT (56)
*H. halobium*148798 TCGAGACAATGGGAAGCCACTCCGAGAGGAGGCGCTAATCTCCTAAACTCGATCGT (56)

V2

*Methanosaetaceae*187
GCTCAGTAACACGTGGACAACCTVCCCTBNNGHBBGGNATAANCCYGGGAAACTGGGTATAATACCCGATADNNCINNVDNNNCTGG
AATGGBNYBNNGNNNNAADGCTCCGGYGCCNNAGGATGGGT (127)

*Methanosarcinaceae*304
GCTCAGTAACACGTGGATAAYCTGCCCTHRGGHYNGGNATAACHCCGGGAAACTGGGGATAATTCCGGATANNNCANNNNNRCTGG
AANTGYNYNNTGVNHNAANRNNBNHNDYGCCYNAGGATGRRT (130)

*Methanocellaceae*15
GCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCAAAGGTCCGGGATAACCCCGGGAAACTGGGGATAATACCGGATAGATCAHNNDTRCTGG
AAGGCBKKKTGGTTGAAACTTCCGGGGCCTTTGGATGGGT (126)

*Methanospirillaceae*27
GCTCAGTAACACGTGGACAATCTGCCCTGRAGWRGAGRATAATCCCGGGAAACTGGGGGTAATACTCCATAGTYCGKNNDDRCTGG
AATGYBHHBCGRAYGAAAGATCCGTCGCTYCAGGATGAGT (126)

*Methanomicrobiaceae*197
GCTCAGTAACACGTGGATAACCTRVCCCTRNGGNRGRGVATAMYYYCGGGAAACTGGGGATAATACCCTATAGNHTANNRNNRCTGG
AATGYNYBNTANNYNAAAGNTBHGNCGCCNYAGGATGGRT (126)

*Methanocorpulaceae*46
GCTCAGTAACACGTGGTTAACCTGCCCTAAGGTGGWGVATACTCCCGGGAAACTGGGGCTAATGCTCCATAGTGGATRYNTSCTGG
AATGSTRYATCCTCGAAAGATCCGTCGCCTTAGGATGGGA (126)

*Methermicoccaceae*6

GCTCAGTAACACGTGGACAACCTTACCCTTGGGACCGGGATAACCCCTGGGAAACTGGGGCTAATACCGGATAGAGCATTGACAGCT
GGAATGCRCGATGCTCSAAAGCTGAGGCCGCCGCCAAAGGATAGGT (133)

*Methanocaldococcaceae*74

GCTCAGTAACACGTGGCTAACCTACCCTCRGGTGGGGGATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCCCCATAGGGGRDGNRBKCTGG
AABGMYNCHYCCCCGAAAGGCTCCGGGCGCGCCCGAGGATGGGG (130)

*Methanococcaceae*38

GCTCATTAACACGTGGTTAACCTACCCTCAGGTGGGGSATAACCTTGGGAAACTGAGGATAATACCCCATARRRRAARMRGCTCTGG
AAYGATCCTTTTCTGAAAGSATATGCGCCTGAGGATGGGA (126)

*Methanopyraceae*2

GCTCAGTAACACGTGGGTAACCTACCCTCGGGACGGGGATAACCCCGGCGAAAGTGGGGCTAATCCCCGATAGGCGGGGCGGCCTG
GAACGGTCCTCCGCCGAAAGGGCCCGGGCCCATGCCGCCCGGTCCGCCCGAGGATGGGC (146)

*Methanobacteriaceae*270

GCTCAGTAACACGTGGATAAYYTRMCCTTDGGACYGGBATAACYCYGGGAAACTGGGGATAATACCGGATANNNVNRNDNDCCTGG
AATTGGTNYNYBNYNAABRNHHTCCGGGATGCGCCTAAGGATGGATC (135)

*H. halobium*148798

GCTCAGTAACACGTGGCCAAGCTACCCTGTGGACGGGAATACTCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCCCGATAACGCTTTGCTCCTGG
AAGGGGCAAAGCCGGAAACGCTCCGGCGCCACAGGATGCGG (127)

V3

*Methanosaetaceae*187

ATGCBGGVAACAGCGATAAGGGAACCTCGAGTGCTYRGSWTAYAAWBYTGGCTGTYSNRMTGCCTAAAAAGCAKYNBWTAGCAAGGG
CCGGGCAA (94)

*Methanosarcinaceae*304

ATGCGGGAAACCGTGATAAGGGGACACCGAGTGCYVGCAHVNWDTGYTGGCTGTCCDBNTGYNTAAANNNCANVHGHTAGCAAGGG
CCGGGCAA (94)

*Methanocellaceae*15

ATGCAGGCAACTGCGATAGGGGAACATCGAGTGGTATTCATCTTGGDKGBCTGTCCAACCGYCTAAAAACGGTTGTTAGCAAGGG
CCGGGCAA (94)

*Methanospirillaceae*27

ATGCGGGCAACCGTGATAAGGAAACCCCGAGTGCCAGCACAGGCTGGCTGTCCRCCAGTKTAMAHAACTGGTGAAGAAAGGGCCGG
GCAA (90)

*Methanomicrobiaceae*197

ATGCGGGMAACCGTGATAAGGGAACCTCGAGTGCCYGTahrNNCRGGCTGTYHVBVTGYNYAAADNNCABBBVRAGAAAGGGCCGG
GCAA (90)

*Methanocorpulaceae*46

ATGCGAGCAATCGTGATAAGGAAACCTGAGTGCCGTGTCGATGCAGGCTGTTTCATATATCTAAATCATATGTGAAGAAAGGGCAGG
GCAA (90)

*Methermicoccaceae*6

ATGTGCGAAAGCACGATAAGGGAACCTGAGTGCCGATCCAAAGSATCGGCTGTTTCAGRTGYTTAAAAAGCATCTGAAGTAAGGGC
TGGGCAA (93)

*Methanocaldococcaceae*74

ATGCGCGAAAGTGCGACGGGGGGACCCCGAGTGCSCTCVCTCTTTTGGAGCNDBKGCTTTTNVRDAGTGTAACAGCTCCGGGAAT
AAGGGCTGGGCAA 99

*Methanococcaceae*38

ATGCACGAAAGTGCGACGGGGGGACCCCAAGTGCIYYAYGYAMHKCRTRGGCTTTTATCAAGTGTAACAGCTTGAGGAATAAGGGC
TGGGCAA (93)

*Methanopyraceae*2

ATGCGGGCAACGCGACGGGGGGACCCCGAGTGCCGTCGGGGCAAAGCCCCGGCGGCTGTACCGGGGTGTAAAAAGCCCCGGGTAG
AAAGCGGCGGGCAA (100)

*Methanobacteriaceae*270

ATGCACGAAAGTGCACGGGGGGACCCCAAGTGYAYKCTTWWHDGDRTRRCTTTTCTTAAGTGTA AAAAGCTTTTGAATAAGAG
CTGGGCAA (94)

*H. halobium*148798

CTGTACGAAAGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGTGAAGGCATAGAGCCTTCACTTTTGTACACCGTAAGGTGGTGCACGAATAAGG
ACTGGGCAA (95)

V4

*Methanosaetaceae*187

SCCDDNTAAGTCYCTTGRGAAATCYRGCADCTYAABTGTYRGGCTKY YAGGRGATACTGNYNGGCTCGAGGCC (73)

*Methanosarcinaceae*304

TTYGRTCAGTYTYTYGGGAAATCTGNNNGCTYAACAHVTYAGGCTTYRGRDGRATACTDYRGRCTTGGAACC (73)

*Methanocellaceae*15

CTTTGCAAGTCTCTTGGGAAATCCAGCGGCTTAACCGTTGGGCGTCCAGGGGATACTACATTGCTTGGGACT (72)

*Methanospirillaceae*27

ATNNNHRDGTCTCTTGAGAAATCYRYCRGCTTAACYGVYRGGCGTTCAGGGGAACTKBDDTTCTAGGGACC (72)

*Methanomicrobiaceae*197

DHHNHTAAGTCTCTKGGGAAATCBNNCRGCTYAACYGDNRRGGCGTY YVRGRGATACTGDBDDHCTGGAACCT (72)

*Methanocorpulaceae*46

ACTGHTAGGTCTCTTGGGAAATCTTMRYGCTYAACGTKAAGGCGTCTAAGAGATAACGDCAGTCTTGGRACT (72)

*Methermicoccaceae*6

CTAAGTAAGTTCCTTGGGAAATTTGACCGCTTAACGGTTAAGCTTCCAGGGAATACTGCTTGGCTTGGGACC (72)

*Methanocaldococcaceae*74

CCCGGTAAGTCCCTKBKKAAATCCTGCGGCTTAACCGCAGGGCTGGCAAGGGATACTGCCGGGCTTGGGACC (72)

*Methanococcaceae*38

TCCAGTAAGTCCCTGTTTAAATCCTACGGCTTAACCGTAGGACTGGCAGRGATACTGCTGGACTTGGGACC (71)

*Methanopyraceae*2

TCCCGTGGGTCCCCGCCGAAAGCCCGCGGCTTAACCGCGGGAGTCGGCGGGGAAACTGCGGGACTTGGGACC (72)

*Methanobacteriaceae*270

TTTGATAAGTCTCTGGTGAAATCCCACAGCTTAAGTGTGGGAATTGCTGGAGATACTATTATGACTTGAGGTC (73)

*H. halobium*148798

CTGAACAAGTCCGTTGGGAAATCTGTCCGCTTAACGGGCAGGCGTCCAGCGGAAACTGTTTCAGCTTGGGACC (72)

V5

*Methanosaetacea*187

TAGGTGTCDGBCACGGTGCGACCGTDDTYGGT (32)

*Methanosarcinaceae*304

YTCGCTAGGTGTCTWGGNAYGGYGYGACCGTDTCHGGT (37)

*Methanocellaceae*15

YCGCTAGGTGTCTACRACRRTCGTGAAYYGTGYGGT (36)

*Methanospirillaceae*27

YGCGTTAGGTGTCTCAGTGACCACGTGTCACTGAKGT (37)

*Methanomicrobiaceae*197

YGCGTTAGGTGTTRYGYRYGACCACGAGTYDYHGRGGT (38)

*Methanocorpusculaceae*46

TGCGTTAGGTGTCTCGGTAACCACGHGTTACTGATGC (38)

*Methermicoccaceae*6

CKGGCYAGGTGTCTAGGCATTACTGCGAGTGATGCCAGT (39)

*Methanocaldococcaceae*74

CGGACTAGGTGTCTGVDYSBBCTTCGRGVBBRCGCGGT (38)

*Methanococcaceae*38

CGAACTAGGTGTCTYRBSTRGRCYYYGDGYCYAKSYRGT (38)

*Methanopyraceae*2

CGGACTAGGTGTCTGGGGCGGCCACGAGCCGCCCCAGT (38)

*Methanobacteriaceae*270 TGGACTTGGTGTGGGATGGCTTCGAGCTGCCCCAGT (38)
*H. halobium*148798 TCCGCTAGGTGTGGCGCAGGCTACGAGCCTGCGCTGT (38)

V6

*Methanosaetacea*187 GDBCACAGCRATATGAAGGYCAGGCTGAAGACYTTRCCBBGATTMGCT (49)
*Methanosarcinaceae*304 GGVMGACAGCAANATGTAGGBCARGCTDAAGRHYTTDCCNGAATCGCT (48)
*Methanocellaceae*15 GATCGACAGTTGTATGAAGGCCAGGCTGAAGACCTTGCCGGACTAKCT (48)
*Methanospirillaceae*27 ATAAGACAGCTGNATGATAGTCGGGATGAAGACTCTACTTGACTAGCT (48)
*Methanomicrobiaceae*197 DTARGACAGMNRDATGATDRYCDGGCTGAAGACYYTRYWTGAYBAKCT (48)
*Methanocorpusculaceae*46 ATAAGACAGCTGWATGATTGTCAATCTGAAGGTTTTACATGACTAGCT (48)
*Methermicoccaceae*6 AGGCGACAGCGAGATGAAGGTCAGGCTGAAGACCTTACCGGATTAGCT (48)
*Methanocaldococcaceae*74 GGGCGACRGCAGGATGAAGGCCAGGTTGACGACCTTGCCAGACGCGCC (48)
*Methanococcaceae*38 GAGCGACAGCATGATGACGGCCAGGTTGACGACCTTGCCTGAAGCGCT (48)
*Methanopyraceae*2 GGGCGACAGCAGGATGAAGGCCAGGTTGACGACCTTGCCGGACGAGCT (48)
*Methanobacteriaceae*270 GGGCGACAGCAGTATGATAGCCAGGTTGATGACCTTGCTTGACAAGCT (48)
*H. halobium*148798 CCCCACAGTAGTAATGACGGTCAGGTTGATGACCTTACCCGAGGCTACT (50)

V7

*Methanosaetacea*187
ACGYCCACAGTTGCCAGCRWDBBCTCHGGRVHGRBGGGTACWCTGTGGRGACCGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAATGGGCA
(84)

*Methanosarcinaceae*304
GTGCCCACHGTTDCCAGCATNNYCTYHGGRDNGATGGGTACTCTGTGGGGACCGCCGVTGBTAAANCVGAGGAAGGTGCGGGCT
(84)

*Methanocellaceae*15
ATATCCACTGTTGCTAACRHBHSYMGHRAKRVDTTGGTGAGTACACGGTGGAGACCGCTGGCGCTAAGTCAGAGGAAGGAGTGGTCG
(86)

*Methanospirillaceae*27

ACGCSAVCARTTGCCAGCWTRACCTTCGGGTGATGGGGACAYYGYSGGACCGCCTCTGCTAAAGGGGAGGAAGGAATGGGCA
(84)

*Methanomicrobiaceae*197

ACGCCAACAGTTGCTYAGCWYRDYCYCCGGRHYGRWGRGGACACTGTTGGGACCGCCTCTGCTAAAGRGGAGGAAGGAATGGGCA
(84)

*Methanocorpusculaceae*46

ACGCCRACAATTGCCAGCAKCATCTCCGGATGGMTGGGGACATTGTYGGGACCGCCTCTGCTAAAGRGGAGGAAGGAATGGGCA
(84)

*Methermicoccaceae*6

GCGCTCACAGTTGCCAGCATSTYYKYMRRRASGATGGGCACTCTGTGAGGACTGCCGCCGCTAAGGTGGAGGAAGAAGCGGGCC
(84)

*Methanocaldococcaceae*74

GTGCCCCATGTTGCCAGCCCTCCCCTCCGGGGGAGCCGGGCACTCATGGGGGACCGCCGGCGCTAAGCCGGAGGAAGGTGCGGGCA
(84)

*Methanococcaceae*38

GTGCCCTATGTTGCBASTWYTTCCCTCCGGGAGAAAGGCACTCATAGGGGACCGCTGGCGCTAAGCCAGAGGAAGGAGCGGGCA
(84)

*Methanopyraceae*2

CCGCCCCGAGTTGCCAGCGGGCCCCGTAAGGGGCGCCGGGCACTCTGCGGGGATCGCCGCCGTTAAGGCGGATGAAAGTGGGGGCG
(84)

*Methanobacteriaceae*270

ACGCCCTTAGTTACCAGCGGATCCTTTTTTGGGATGCCGGGCACACTAAGGGGACCGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGAGTGGAC
G (84)

*H. halobium*148798

GCACTCCTAATTGCCAGCGGTACCCTTTGGGTAGCTGGGTACATTAGGTGGACTGCCGCTGCCAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCA
(84)

V9

*Methanosaetaceae*187

AACCACCCGAGTAGGGTCYGRATGAGRGYGYNTNHNHKSNGVBRHDBBCGAATNBRVBBTBYGCRAGDGGGDDT (75)

*Methanosarcinaceae*304

AACCACCCGAGTGDGGTATGGGTGAGGGBNHNHNNHAWWNNTGNNGNTKBNTTCNAACCTNDDDBTHYGCAAGGGGGGTT
(82)

*Methanocellaceae*15

AACCACCCGAGTGGGGTTTGAATGAGGGCCTCTTTCATTGRRRGVHYBVAATYHHDBBYBKDAAGGGGGGGT (73)

*Methanospirillaceae*27

AACCACCCGAGTGAGGTCTTGATGAGGHKRYRTCADNYGRYRTDDTCGAATCTGGGTTTYGCAAGGGGGGTT (72)

*Methanomicrobiaceae*197

AACCACCCGAGTGRGGTYTNGATGAGSATATCTCTCAYYRBVGTNDWYGCBCNVGTCGAATCTAGGTTYBGCAAGGRGGGTT
(81)

*Methanocorpusculaceae*46

AACCATCCTAGTGGGGTTTGGATGAGTCCCTGGTCTTTGCCGGGGTTCGAATCTAGGTTCCGTGAGGAGGGTT (72)

*Methermicoccaceae*6

AGCCAGCCGAGTGGGGTTTAGGTGAGGCCATCTTTTTTGGGGTGTTTCGAACCTAAGTCTCGCAAGGGGGGCT (72)

*Methanocaldococcaceae*74

CGCCACCCGAGTTGAGCCCAAGTGAGGCYHYRYCCGCAAGGGCAGGGTTCGAACTTGGGTTTCAGCGAGGGGGGCG (74)

*Methanococcaceae*38

CACCACCCGAGTTGGGTTGAGGTGAGGCCTTGGCCTTTGGCTAGGGTCGAACCTGGGCTCAGCGAGGGGGGTG (73)

*Methanopyraceae*2

CGCCACCCGAGCCCCCGGGGCAAGCCCCCGGTCCGCAAGGGCTGGGGGCGAGCCCCCGGGGGGTGAGGGGGGCG (76)

*Methanobacteriaceae*270

CGCCACCCAAAAAGGGTTTGGATGAGACGGHNNYNDHNNNNNNNDBHNDNNGTCGAATCTGGGTTCTTTGAGGAGGGCG (79)

*H. halobium*148798

AATCACCCGAGTGGGGTTCGGATGAGGCCGGCATGCGCTGGTCAAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGATT (68)

H. halobium fue utilizada como referencia. El número localizado al lado derecho de cada familia corresponde al número de genes rRNA 16S utilizados para los consensos. Los números entre paréntesis indican la longitud de la secuencia. El significado del código degenerado de nucleótidos se indica en el anexo 1.

ANEXO C. Análisis en BLAST de los cebadores diseñados

CEBADOR: UNMETFW1-26 5' ATT CCG GTT GAT CCT GGC G 3'		
--	--	--

AlignmentsDownloadGenBankGraphicsDistance tree of resultsShow/hide columns of the table
presenting sequences producing significant alignments

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402026.2
Uncultured bacterium clone 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	EU126851.1
Uncultured bacterium clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	EU126850.1
Uncultured bacterium clone 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	EU126849.1
Uncultured Methanobrevibacter sp. clone 26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	72.4	100%	1.1	100%	DQ402034.1
Uncultured Methanosphaera sp. clone 24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402032.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402030.1
Uncultured Methanobacteriales archaeon clone 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402029.1
Uncultured Methanobacteriales archaeon clone 20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402028.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402027.1
Uncultured Methanobrevibacter sp. clone 17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402025.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402024.1
Uncultured Methanobacteriaceae archaeon clone 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402020.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402019.1
Uncultured Methanobacteriales archaeon clone 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402018.1
Uncultured Methanosphaera sp. clone 8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402016.1
Uncultured Methanosphaera sp. clone 7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402015.1
Uncultured Methanobacteriaceae archaeon clone 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402014.1
Uncultured Methanobrevibacter sp. clone 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402012.1
Uncultured Methanosphaera sp. clone 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402011.1
Uncultured Methanobrevibacter sp. clone 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ402010.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ391278.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ372975.1

Uncultured methanogenic archaeon clone 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ372974.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ372973.1
Uncultured methanogenic archaeon clone 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	36.2	36.2	100%	1.1	100%	DQ372972.1
Uncultured bacterium clone ARC66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	JQ866879.1
Uncultured Methanoculleus sp. clone arc6.3-D6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	HQ290272.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 1_82_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332489.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 1_70_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332487.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 1_60_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332484.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 11_37_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332456.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 4_52_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332431.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 4_02_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332419.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 7_74_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332415.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 7_50_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332404.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 7_49_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332403.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 7_43_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332402.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 7_16_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332392.1
Uncultured Methanosaeta sp. clone 3_2_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	GU332369.1
Uncultured rumen archaeon clone T1PL03_A12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ587018.1
Uncultured rumen archaeon clone T1PL02_E10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586985.1
Uncultured rumen archaeon clone T1PL02_D05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586972.1
Uncultured rumen archaeon clone T1PL01_G10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586935.1
Uncultured rumen archaeon clone T2PL03_H08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586842.1
Uncultured rumen archaeon clone T2PL01_G10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586765.1
Uncultured rumen archaeon clone T4PL04_H11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586631.1
Uncultured rumen archaeon clone T4PL04_G09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586621.1
Uncultured rumen archaeon clone T4PL02_B09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586483.1
Uncultured rumen archaeon clone T4PL02_B04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586478.1
Uncultured rumen archaeon clone T3PL03_F09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586414.1
Uncultured rumen archaeon clone T3PL01_D06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	FJ586378.1
Uncultured Methanolinea sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	EU857626.1
Uncultured Methanogenium sp. isolate PSW32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	EF043533.1
Uncultured Methanobacterium sp. isolate PSW20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	EF043525.1
Uncultured Methanlobus sp. isolate PSW09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	EF043523.1
Uncultured Methanogenium sp. isolate PSW03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	94%	4.3	100%	EF043519.1

<u>Unidentified archaeon LMA137 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</u>	34.2	34.2	94%	4.3	100%	<u>U87518.1</u>
<u>Unidentified archaeon LMA229 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</u>	34.2	34.2	94%	4.3	100%	<u>U87519.1</u>
<u>Uncultured archaeon 2C130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	34.2	34.2	94%	4.3	100%	<u>AF015968.2</u>
<u>Uncultured archaeon 2C174 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	34.2	34.2	94%	4.3	100%	<u>AF015970.2</u>
<u>TPA: Pyrococcus abyssi GE5 complete genome</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>HE613800.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-370-1 gene for 16S rRNA, partial sequence >dbj AB372515.2 Halarchaeum sp. MH1-136-2 gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698665.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-243-1 gene for 16S rRNA, partial sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698661.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-243-3 gene for 16S rRNA, partial sequence >dbj AB698663.1 Halarchaeum sp. MH1-243-5 gene for 16S rRNA, partial sequence >dbj AB698664.1 Halarchaeum sp. MH1-243-6 gene for 16S rRNA, partial sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698662.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-224-1 gene for 16S rRNA, partial sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698659.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-224-3 gene for 16S rRNA, partial sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698660.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-194-3 gene for 16S rRNA, partial sequence >dbj AB372513.2 Halarchaeum sp. MH1-16-3 gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence >dbj AB729128.1 Halarchaeum sp. MH1-242-1 gene for 16S rRNA, partial sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698658.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-139-1 gene for 16S rRNA, partial sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698657.1</u>
<u>Halarchaeum sp. MH1-16-11 gene for 16S rRNA, partial sequence</u>	32.2	32.2	88%	17	100%	<u>AB698656.1</u>

CEBADOR: UNMET2FAMFW151-172 5'CTC AGT AAC ACG TGG AYA AC 3'

AlignmentsDownloadGenBankGraphicsDistance tree of resultsShow/hide columns of the table presenting sequences producing significant alignments

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Methanocella arvoryzae MRE50 strain MRE50 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	NR_074232.1
Aciduliprofundum boonei T469 strain T469 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	NR_074217.1
Methanosaeta thermophila PT strain P 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	NR_074214.1
Aciduliprofundum sp. MAR08-339, complete genome	40.1	40.1	100%	0.07	100%	CP003168.1
Methanobrevibacter smithii ATCC 35061, complete genome	40.1	120	100%	0.07	100%	CP003083.1
Methanosaeta sp. enrichment culture clone ASK_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452099.1
Methanosaeta sp. enrichment culture clone ASK_28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452097.1
Methanosaeta sp. enrichment culture clone ASK_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452095.1
Methanosaeta sp. enrichment culture clone ASK_29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452093.1
Methanosaeta sp. enrichment culture clone ASK_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452089.1
Methanosaeta sp. enrichment culture clone ASK_35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452087.1
Methanothermobacter sp. enrichment culture clone ASK_34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452085.1
Methanothermobacter sp. enrichment culture clone ASK_31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452083.1
Methanothermobacter sp. enrichment culture clone ASK_43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452081.1
Methanothermobacter sp. enrichment culture clone ASK_30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452079.1
Methanothermobacter sp. enrichment culture clone ASK_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452075.1
Methanothermobacter sp. enrichment culture clone ASK_6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.07	100%	JX452073.1

<u>Methanothermobacter sp. enrichment culture clone ASK_38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX452071.1</u>
<u>Uncultured archaeon clone IMCUGW13A26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX196214.1</u>
<u>Uncultured archaeon gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: HMET24</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>AB739326.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20533</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805075.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20532</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805074.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20531</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805073.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20526</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805068.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20525</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805067.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20523</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805066.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20522</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805065.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20517</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805061.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20515</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805060.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20513</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805059.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20510</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805057.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20508</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805055.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20505</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805052.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20502</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805050.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20500</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805049.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20495</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805044.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20490</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805039.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20488</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805037.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20485</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805035.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20481</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805032.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20480</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805031.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20479</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805030.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20478</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805029.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20476</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805027.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20475</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805026.1</u>

<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20473</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805024.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20472</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805023.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20468</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805019.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20460</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805011.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20459</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805010.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20458</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805009.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20457</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805008.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20455</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805006.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20454</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805005.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20453</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805004.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20452</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805003.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20449</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE805000.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20448</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE804999.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20447</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE804998.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20441</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE804993.1</u>
<u>Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone ATB-AR-20440</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>HE804992.1</u>
<u>Methanosaeta sp. enrichment culture clone LA_48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX088310.1</u>
<u>Methanosaeta sp. enrichment culture clone LA_49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX088306.1</u>
<u>Methanosaeta sp. enrichment culture clone LA_31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX088298.1</u>
<u>Methanosaeta sp. enrichment culture clone LA_24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX088296.1</u>
<u>Methanosaeta sp. enrichment culture clone LA_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX088294.1</u>
<u>Methanosaeta sp. enrichment culture clone LA_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX088286.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone SD_2 (5) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301663.1</u>
<u>Uncultured Methanosaeta sp. clone SD_1 (17) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301662.1</u>
<u>Uncultured Methanolinea sp. clone SR_11 (1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301661.1</u>

<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone SR_10 (1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301660.1</u>
<u>Uncultured Methanosaeta sp. clone SR_8 (1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301658.1</u>
<u>Uncultured Methanosaeta sp. clone SR_7 (4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301657.1</u>
<u>Uncultured archaeon clone SR_6 (2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301656.1</u>
<u>Uncultured Methanosaeta sp. clone SR_5 (4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301655.1</u>
<u>Uncultured Methanomethylovorans sp. clone SR_2 (2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX301652.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD338 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023246.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD337 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023245.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD336 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023244.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD335 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023243.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD334 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023242.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD333 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023241.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD257 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023216.1</u>
<u>Uncultured Methanomicrobiales archaeon clone UAD249 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023209.1</u>
<u>Uncultured Methanomicrobiales archaeon clone UAD248 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023208.1</u>
<u>Uncultured Methanomicrobiales archaeon clone UAD247 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023207.1</u>

<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023197.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD233 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023196.1</u>
<u>Uncultured Methanomicrobiales archaeon clone UAD232 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023195.1</u>
<u>Uncultured Methanomicrobiales archaeon clone UAD231 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023194.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023177.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD183 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023176.1</u>
<u>Uncultured Methanomicrobiales archaeon clone UAD180 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023173.1</u>
<u>Uncultured Methanomicrobiales archaeon clone UAD179 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023172.1</u>
<u>Uncultured archaeon clone UAD140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023144.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD138 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023142.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023141.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD132 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	0.07	100%	<u>JX023138.1</u>
<u>Uncultured Methanosarcinales archaeon clone UAD131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>						

Cebadores: UNMETFW947-969 5'AAA CTT AAA GRA ATT GGC GGG GG 3' y
UNMET-RV 947-969 5'CCC CCG CCA TTT YCT TTA AGT TT 3'

AlignmentsDownloadGenBankGraphicsDistance tree of resultsShow/hide columns of the table
[presenting sequences producing significant alignments](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Methanococcus maripaludis S2 strain S2 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_074094.1
Methanopyrus kandleri AV19 strain AV19 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	148	100%	6.00E-06	100%	NR_074539.1
Methanosphaera stadtmanae DSM 3091 strain DSM 3091 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074323.1
Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H strain Delta H 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074260.1
Methanocaldococcus infernus ME strain ME 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074258.1
Methanosarcina barkeri str. Fusaro strain Fusaro 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074253.1
Methanohalobium evestigatum Z-7303 strain Z-7303 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074251.1
Methanococcoides burtonii DSM 6242 strain DSM 6242 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074242.1
Methanohalophilus mahii DSM 5219 strain DSM 5219 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_074239.1
Methanobrevibacter smithii ATCC 35061 strain ATCC 35061; PS; DSMZ 861 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_074235.1
Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661 strain DSM 2661 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074233.1
Methanocella arvoryzae MRE50 strain MRE50 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074232.1
Methanocaldococcus sp. FS406-22 strain FS406-22 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074228.1
Methanosarcina mazei Go1 strain Go1 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074221.1
Methanosaeta thermophila PT strain P 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074214.1
Methanocaldococcus fervens AG86 strain AG86 16S ribosomal RNA, complete sequence	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_074207.1

<u>Methanosphaerula palustris strain E1-9c 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_044422.1
<u>Methanosaeta concilii strain Opfikon 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_028242.1
<u>Methanothermobacter thermautotrophicus strain Marburg 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_028241.1
<u>Methanolobus taylorii GS-16 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_028238.1
<u>Methanolobus oregonensis WAL1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_028237.1
<u>Methanosarcina semesiae MD1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_028182.1
<u>Methanocalculus strain MHT-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	NR_028148.1
<u>Methanohalophilus portucalensis FDF-1 strain FDF1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_042826.1
<u>Methanosalsum zhilinae DSM 4017 strain DSM 4017 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_044593.1
<u>Methanolobus zinderi strain SD1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_044558.1
<u>Methanolobus profundus strain MobM 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_041665.1
<u>Methanofollis ethanolicus strain HASU 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_041669.1
<u>Methanogenium marinum AK-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	NR_028225.1
<u>Methanoculleus receptaculi strain ZC-2 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_043961.1
<u>Methermicoccus shengliensis strain ZC-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_043960.1
<u>Methanobacterium alcaliphilum WeN4 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	56.5	100%	6.00E-06	100%	NR_028228.1
<u>Methanobacterium oryzae FPi 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_028171.1
<u>Methanococcus aeolicus Nankai-3 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_029140.1
<u>Methanobacterium aarhusense strain H2-LR 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_042895.1
<u>Methanocalculus chunghsingensis strain K1F9705b 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	NR_041828.1
<u>Methanocaldococcus indicus strain SL43 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	68.9	100%	6.00E-06	100%	NR_028861.1
<u>Methanospirillum hungatei JF-1 strain JF1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_042789.1
<u>Methanolacinia paynteri strain G2000 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_042788.1
<u>Methanocorpusculum bavaricum strain SZSXXZ 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	70.9	100%	6.00E-06	100%	NR_042787.1
<u>Methanococcus vannieli strain SB 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	NR_025718.1
<u>Methanoculleus bourgensis strain MS2 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_042786.1
<u>Methanobrevibacter millerae strain ZA-10 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	NR_042785.1
<u>Methanobrevibacter ruminantium M1 strain M1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	NR_042784.1

<u>Methanobrevibacter arboriphilus strain DH-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_042783.1</u>
<u>Methanothermobacter thermautotrophicus strain delta H 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_042782.1</u>
<u>Methanobacterium bryantii strain MOH 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_042781.1</u>
<u>Methanosarcina thermophila 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_044725.1</u>
<u>Methanosarcina acetivorans 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_044724.1</u>
<u>Methanogenium organophilum 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044721.1</u>
<u>Methanocorpusculum parvum 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	85.2	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044728.1</u>
<u>Methanoplanus limicola 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	68.9	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044727.1</u>
<u>Methanomicrobium mobile 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044726.1</u>
<u>Methanosphaera stadtmanae DSM 3091 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028236.1</u>
<u>Methanoculleus marisnigri 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044723.1</u>
<u>Methanothermococcus thermolithotrophicus 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_044720.1</u>
<u>Methanocorpusculum labreanum strain Z 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	70.9	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_029086.1</u>
<u>Methanocalculus halotolerans strain P2F9705; OCM 672 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_041843.1</u>
<u>Methanothermobacter wolfeii strain DSM 2970 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_040964.1</u>
<u>Methanosaeta harundinacea strain 8Ac 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_043203.1</u>
<u>Methanoculleus submarinus strain Nankai-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028856.1</u>
<u>Methanobrevibacter olleyae strain KM1H5-1P 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_043024.1</u>
<u>Methanosarcina lacustris strain ZS 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_041876.1</u>
<u>Methanofollis aquaemaris strain N2F9704 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_041801.1</u>
<u>Methanobrevibacter acididurans strain ATM 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028779.1</u>
<u>Methanobrevibacter woesei strain GS 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044788.1</u>
<u>Methanobrevibacter thaueri strain CW 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044787.1</u>
<u>Methanocella paludicola SANA E 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028164.1</u>
<u>Methanolinea tarda NOBI-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028163.1</u>
<u>Methanoculleus thermophilus CR-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028156.1</u>
<u>Methanotorris formicicus strain Mc-S-70 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028646.1</u>

<u>Methanobacterium formicicum strain DSMZ1535 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	56.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_025028.1</u>
<u>Methanobacterium congolense C 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028175.1</u>
<u>Methanobacterium formicicum strain DSMZ1535 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	56.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_025028.1</u>
<u>Methanolobus vulcani strain PL-12/M 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	50.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044768.1</u>
<u>Methanococcoides alaskense strain AK-5 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_029122.1</u>
<u>Methanomethylovorans thermophila strain L2FAW 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_043089.1</u>
<u>Methanobacterium beijingense 8-2 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	54.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028202.1</u>
<u>Methanofollis formosanus strain ML15 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_042767.1</u>
<u>Methanosaeta thermophila PT 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028157.1</u>
<u>Methanothermococcus okinawensis IH1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028155.1</u>
<u>Methanoculleus chikugoensis MG62 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028152.1</u>
<u>Methanomethylovorans hollandica DMS1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028174.1</u>
<u>Methanosarcina baltica strain GS1-A 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_041986.1</u>
<u>Methanocaldococcus vulcanius M7 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028701.1</u>
<u>Methanobacterium palustre strain DSM 3108; F 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	56.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_041713.1</u>
<u>Methanofollis liminatans GKZPZ 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028254.1</u>
<u>Methanoculleus palmolei DSM 4273 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028253.1</u>
<u>Methanofollis tationis strain DSM 2702 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_041717.1</u>
<u>Methanosarcina mazei strain DSM 2053, OCM 26 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_041956.1</u>
<u>Methanosarcina barkeri strain DSM 800 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_025303.1</u>
<u>Methanocaldococcus fervens strain AG86 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_037131.1</u>
<u>Methanocaldococcus infernus 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_041698.1</u>
<u>Methanobrevibacter smithii ATCC 35061 strain PS 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044786.1</u>
<u>Methanocalculus halotolerans strain SEBR 4845 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	66.9	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_024870.1</u>
<u>Methanobrevibacter filiformis strain RFM-3 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_044801.1</u>
<u>Methanobrevibacter cuticularis strain RFM-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044776.1</u>
<u>Methanobrevibacter curvatus strain RFM-2 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_044796.1</u>
<u>Methanoplanus petrolearius DSM 11571 strain SEBR 4847 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	52.5	100%	6.00E-06	100%	<u>NR_028240.1</u>
<u>Methanothermobacter thermophilus M 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028250.1</u>

Cebador: **UNMETRV 1425-42** 5'TGT GCA AGG AGC AGG GAC 3'

[Alignments](#)[Download](#)[GenBank](#)[Graphics](#)[Distance tree of results](#)[Show/hide columns of the table](#)
[presenting sequences producing significant alignments](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Methanococcus maripaludis S2 strain S2 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074094.1
Methanopyrus kandleri AV19 strain AV19 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074539.1
Staphylothermus hellenicus DSM 12710 strain DSM 12710 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074532.1
Metallosphaera sedula DSM 5348 strain DSM 5348 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074387.1
Thermosphaera aggregans DSM 11486 strain DSM 11486 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074380.1
Methanosphaera stadtmanae DSM 3091 strain DSM 3091 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074323.1
Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H strain Delta H 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074260.1
Methanocaldococcus infernus ME strain ME 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	58.5	100%	7.00E-05	100%	NR_074258.1
Methanosarcina barkeri str. Fusaro strain Fusaro 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074253.1
Methanohalobium evestigatum Z-7303 strain Z-7303 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074251.1
Methanococcoides burtonii DSM 6242 strain DSM 6242 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074242.1
Methanohalophilus mahii DSM 5219 strain DSM 5219 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074239.1
Haloterrigena turkmenica DSM 5511 strain DSM 5511 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074238.1
Methanobrevibacter smithii ATCC 35061 strain ATCC 35061; PS; DSMZ 861 16S ribosomal RNA, complete sequence	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074235.1

<u>Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661 strain DSM 2661 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074233.1
<u>Methanocella arvoryzae MRE50 strain MRE50 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074232.1
<u>Methanocaldococcus sp. FS406-22 strain FS406-22 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074228.1
<u>Methanosarcina mazei Go1 strain Go1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074221.1
<u>Haloferax volcanii DS2 strain DS2 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074218.1
<u>Halomicrobium mukohataei DSM 12286 strain DSM 12286 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074216.1
<u>Methanosaeta thermophila PT strain P 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074214.1
<u>Methanocaldococcus fervens AG86 strain AG86 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074207.1
<u>Halorhabdus utahensis DSM 12940 strain DSM 12940 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074206.1
<u>Halobacterium salinarum R1 strain DSM 671 = R1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074204.1
<u>Haloarcula marismortui ATCC 43049 strain ATCC 43049 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074201.1
<u>Haloquadratum walsbyi DSM 16790 strain DSM 16790 = HBSQ001 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074200.1
<u>Methanosphaerula palustris strain E1-9c 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_044422.1
<u>Sulfurisphaera ohwakuensis strain TA-1, IFO 15161 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_043432.1
<u>Metallosphaera sedula DSM 5348 strain IFO 15509 (DSM 5348) 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_043410.1
<u>Acidianus brierlevi strain IFO 15269 (DSM 1651) 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_043409.1
<u>Halosimplex carlsbadense 2-9-1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_040881.1
<u>Natronorubrum sulfidifaciens JCM 14089 strain AD2</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_029142.2
<u>Natronorubrum aibiense strain 7-3</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_029141.2
<u>Thermofilum pendens strain Hvv3, DSM 2475 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_029214.1
<u>Natrialba magadii ATCC 43099 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028243.1
<u>Methanosaeta concilii strain Opfikon 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028242.1

<u>Methanothermobacter thermautotrophicus strain Marburg 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028241.1
<u>Methanobolus taylorii GS-16 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028238.1
<u>Methanobolus oregonensis WAL1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028237.1
<u>Natronococcus amylolyticus strain Ah-36 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028217.1
<u>Halobacterium noricense A1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028187.1
<u>Methanosarcina semesiae MD1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028182.1
<u>Natronolimnobiuss innermongolicus N-1311 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028162.1
<u>Halobacterium salinarum strain 91-R6 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_025555.1
<u>Methanohalophilus portucalensis FDF-1 strain FDF1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_042826.1
<u>Methanosalsum zhilinae DSM 4017 strain DSM 4017 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_044593.1
<u>Haloferax mucosum ATCC BAA-1512 strain PA12 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_043988.1
<u>Haloferax elongans strain SA5 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_043987.1
<u>Desulfurococcus kamchatkensis 1221n strain 1221n 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_074374.1
<u>Methanobolus zinderi strain SD1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_044558.1
<u>Methanobolus profundi strain MobM 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_041665.1
<u>Haloterrigena salina XH-65 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028190.1
<u>Methanofollis ethanolicus strain HASU 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_041669.1
<u>Halorubrum kocurii strain : BG-1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_042672.1
<u>Halorhabdus tiamatea SARL4B strain SARL4B 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_044108.1
<u>Halomicrobium mukohataei DSM 12286 strain JCM9738 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_044337.1
<u>Haloarcula vallismortis strain CGMCC1.2048 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_044336.1
<u>Haloarcula japonica strain TR-1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028234.1
<u>Haloarcula argentinensis strain JCM9737 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_044335.1
<u>Halostagnicola larsenii XH-48 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028169.1
<u>Halococcus hamelinensis 100A6 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028168.1
<u>Halomicrobium katesii AI-5 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	NR_028233.1

<u>Halorubrum litoreum strain Fa-1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028230.1</u>
<u>Haloarcula amylolytica strain BD-3 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028229.1</u>
<u>Halorubrum tebenquichense strain ALT-6 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028232.1</u>
<u>Halorubrum lipolyticum strain 9-3 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028227.1</u>
<u>Halorubrum ejinorensis EJ-32 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028189.1</u>
<u>Haloterrigena hispanica strain : FP1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042532.1</u>
<u>Natrinema gari HIS40-3 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028167.1</u>
<u>Halorubrum californiense SF3-213 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028231.1</u>
<u>Halalkalicoccus jeotgali B3 strain B3 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_044072.1</u>
<u>Natronococcus jeotgali strain B1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_044071.1</u>
<u>Halorubrum chaoviator strain : HALO-G* 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042419.1</u>
<u>Haloferax prahovense TL6 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028165.1</u>
<u>Methanogenium marinum AK-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028225.1</u>
<u>Methanoculleus receptaculi strain ZC-2 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_043961.1</u>
<u>Methermicoccus shengliensis strain ZC-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_043960.1</u>
<u>Haloplanus natans strain RE 101 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_043803.1</u>
<u>Methanobacterium alcaliphilum WeN4 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028228.1</u>
<u>Halorubrum arcis strain AJ201 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028226.1</u>
<u>Halovivax ruber XH-70 strain :XH-70 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042522.1</u>
<u>Halopiger xanaduensis SH-6 strain : SH-6 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042521.1</u>
<u>Halobacterium jilantaiense strain NG4 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_043676.1</u>
<u>Methanobacterium oryzae FPi 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028171.1</u>
<u>Methanococcus aeolicus Nankai-3 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_029140.1</u>
<u>Halorubrum orientale strain : EJ-52 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042510.1</u>
<u>Natrinema ejinorensis EJ-57 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028188.1</u>
<u>Halorubrum xinjiangense strain BD-1 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028205.1</u>
<u>Haloferax sulfurifontis ATCC BAA-897 strain M6 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028204.1</u>
<u>Halog quadratum walsbyi C23 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028207.1</u>
<u>Halorubrum tibetense strain 8W8 16S ribosomal RNA, complete sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028198.1</u>

<u>Methanobacterium aarhusense strain H2-LR 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042895.1</u>
<u>Methanocaldococcus indicus strain SL43 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	58.5	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028861.1</u>
<u>Haloferax volcanii DS 2 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_028203.1</u>
<u>Methanospirillum hungatei JF-1 strain JF1 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042789.1</u>
<u>Methanolacinia paynteri strain G2000 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042788.1</u>
<u>Methanocorpusculum bavaricum strain SZSXXZ 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_042787.1</u>
<u>Methanococcus vanniellii strain SB 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	40.1	40.1	100%	7.00E-05	100%	<u>NR_025718.1</u>
<u>Methanothermobacter thermophilus M 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	38.2	38.2	100%	6.00E-06	96%	<u>NR_028250.1</u>