



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PRODUCCIÓN DE METANO EN AMBIENTES
HIPERSALINOS: DIVERSIDAD MICROBIANA,
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA COMUNIDAD DE
ARQUEAS METANÓGENAS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

JOSÉ QUINATZIN GARCÍA MALDONADO

La Paz, Baja California Sur, Enero de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 06 del mes de Enero de 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Producción de metano en ambientes hipersalinos: Diversidad microbiana, estructura y función de la comunidad de arqueas metanógenas"

Presentada por el alumno:

José Quinatzin García Maldonado

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

 _____ DR. ALEJANDRO LÓPEZ CORTÉS DIRECTOR DE TESIS	 _____ DRA. LOURDES BERENICE CELIS GARCÍA CO-TUTOR
 _____ DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ CO-TUTOR	 _____ DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA DE LEÓN CO-TUTOR
 _____ DR. BRAD MAURICE BEGOUT CO-TUTOR	
 _____ DRA. ELISA SERVIERE ZARAGO, DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO	

Comité tutorial

Dr. Alejandro López Cortés. Director de tesis. CIBNOR

Dr. Francisco Javier García de León. Co-tutor. CIBNOR

Dr. Pedro Cruz Hernández. Co-tutor. CIBNOR

Dra. Lourdes Berenice Celis García. Co-tutor. IPICYT

Dr. Brad Maurice Bebout. Co-Tutor. NASA Ames Research Center

Comité revisor de tesis

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Francisco Javier García de León

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dra. Lourdes Berenice Celis García

Dr. Brad Maurice Bebout

Jurado de examen de grado

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Francisco Javier García de León

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dra. Lourdes Berenice Celis García

Dr. Brad Maurice Bebout

Suplentes

Dra. Luz Estela González de Bashan

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

RESUMEN

La producción biológica de metano ha sido bien documentada en comunidades microbianas de ambientes hipersalinos. Sin embargo, poco es conocido acerca de la diversidad filogenética de arqueas productoras de metano, capaces de realizar su metabolismo energético bajo condiciones altas de salinidad y sulfatos. Actualmente existen varios linajes de arqueas metanógenas (AM) que carecen de miembros cultivables o aislados, indicando que aún existe grupos por elucidar dentro de estos linajes filogenéticos. En el presente estudio se caracterizó la composición de la comunidad de AM en tapetes microbianos de cinco distintos ambientes hipersalinos de Baja California Sur, México. Se encontraron dos nuevos linajes de secuencias del gen *mcrA*, correspondiendo con AM putativamente hidrogenotróficas. Análisis filogenéticos mostraron que son diferentes de organismos cultivables, pero relacionados con AM estrictamente hidrogenotróficas del Orden Methanomicrobiales. Su contribución al funcionamiento del ecosistema fue detectada a través de la cuantificación de transcritos del gen *mcrA* de muestras naturales. Incrementos de producción de metano en condiciones bajas de salinidad y sulfatos, también sugieren la presencia de AM hidrogenotróficas. Sin embargo, análisis de clonas del *mcrA* y de patrones de bandas de DGGE de secuencias del 16S ARNr y *mcrA*, revelaron que la comunidad de AM estuvo dominada por miembros metilotróficos del género *Methanohalophilus*. A través de herramientas moleculares y geoquímicas, se mostró que la limitación de sustrato y valores de salinidad y sulfatos mayores de 3% y 25mM respectivamente, pueden ser considerados como potenciales limitantes ambientales para la metanogénesis en los sitios estudiados. Este estudio provee nueva información acerca de AM no cultivables y no previamente descritas de ambientes hipersalinos, cuyos papeles ecológicos y evolutivos no han sido claramente comprendidos.

Palabras clave

Arqueas metanógenas, tapetes microbianos hipersalinos, Baja California Sur, *mcrA*.

ABSTRACT

Biological methane production has been well documented at microbial communities from hypersaline environments. However, little is known about phylogenetic diversity of methanogenic archaea capable of performing their energetic metabolisms under conditions of high salinity and sulfate. Currently, there are several strains of methanogenic archaea (MA) lacking of cultivable or isolated members, indicating that there are yet methanogenic groups for elucidating inside of these phylogenetic lineages. In this study we characterized the community composition of MA in microbial mats from five different hypersaline environments in Baja California Sur, Mexico. Two new lineages of *mcrA* sequences corresponding with putative hydrogenotrophic methanogens were found. Phylogenetic analysis showed to be different to cultivable organisms, but related with strictly hydrogenotrophic MA of the order Methanomicrobiales. Their contribution to the function of the system was detected through the quantification of *mcrA* transcript in natural samples. Increases in methane production under low conditions of salinity and sulfate, also suggest the presence of hydrogenotrophic MA in nature, however clone library analysis of *mcrA* sequences and DGGE band patterns of 16S rRNA and *mcrA* sequences revealed that the MA community is dominated by methylotrophic members of the genus *Methanohalophilus*. Through molecular and geochemical approaches, we showed that substrate limitation and salinity and sulfate values higher than 3% and 25mM, respectively, could be considered as potential environmental constraints for methanogenesis in the studied sites. This study provides information about uncultivable and non previously described MA for hypersaline environments, which ecological and evolutionary role have not been clearly understood.

Keywords

Methanogenic archaea, hypersaline microbial mats, Baja California Sur, *mcrA*

A las dos personas que proporcionan mi mayor felicidad e inspiración en la vida:

Ana Dalia y Matías Esteban

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. y en particular al Programa de Estudios de Posgrado por el apoyo proporcionado para mi formación académica. Este trabajo fue desarrollado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Beca de Manutención para nivel doctorado 212242; a la Beca Mixta de CONACYT para la realización de estancias en el extranjero; al Proyecto 105969 “Bioprospección de genes y actividades de metanogénesis e hidrogénesis en ecosistemas hipersalinos. Biocombustibles” de la convocatoria 2008-01 de ciencia básica SEP-CONACYT; y al proyecto fiscal del CIBNOR PC0.18 “Análisis de la diversidad de cianobacterias”.

Expreso mi especial e infinito agradecimiento al Dr. Alejandro López Cortés, por todas sus enseñanzas y experiencias compartidas conmigo a través de todos los años en su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Pedro Cruz Hernández, Dr. Francisco García de León, Dra. Lourdes Berenice Celis García y Dr. Brad M. Bebout por sus importantes aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de Exobiología de “Ames, Research Center, National Aeronautics and Space Administration (NASA)”, Brad Bebout, Leslie Prufert-Bebout, Angela Detweiler; Erich Fleming, Adrienne Frisbee, Craig Everroad, Jackson Z. Lee y Mike Kubo, por toda su asistencia técnica y fraternal durante mis estancias de trabajo. A la Dra. Cheryl Kelley de la Universidad de Missouri, Columbia por su gran ayuda para las determinación de las tasas de producción de metano.

A Santiago Cadena por toda su ayuda en el laboratorio, e Ignacio Leyva por contribuir con el trabajo de bioinformática.

A Exportadora de Sal S.A., por su autorización para tener acceso a sus instalaciones y por su ayuda logística para el trabajo de campo.

Quiero agradecer a mis padres y hermana por ser siempre mis guías y soporte en la vida.

Finalmente, agradezco a mi esposa por haber estado a mi lado y haberme apoyado en todo momento; y a mi hijo por haberme cambiado la vida.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
Metano, abundancia en el planeta Tierra y su importancia	13
Ocurrencia del metano	13
Metanogénesis por Arqueas Metanógenas	15
Metanogénesis en ambientes hipersalinos.....	20
Sustratos no competitivos	22
Competencia entre Bacterias Sulfato Reductoras y Arqueas Metanógenas.....	23
Interacciones entre Bacterias Sulfato Reductoras y Arqueas Metanógenas.....	24
Diversidad de Arqueas Metanógenas.....	25
Arqueas Metanógenas no cultivables.....	29
Trabajos previos.....	29
OBJETIVOS	32
General	32
Particulares	32
HIPÓTESIS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Sitios de estudio	34
Determinaciones fisicoquímicas y cuantificación del porcentaje de metano en muestras de gas ambiental	36
Experimentos de microcosmos	36
Determinación del uso de sustratos metanogénicos.....	36
Valoración del efecto de la salinidad, concentración de sulfatos y adición de trimetilamina.....	38
Análisis estadísticos	39
Obtención de cultivos enriquecidos de arqueas metanógenas.....	39
Extracciones de ácidos nucleicos.....	40
Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	41
Separación de productos de PCR por DGGE y clonación	42
Diseño de iniciadores específicos de grupos (linajes filogenéticos) de Arqueas Metanógenas para la amplificación por PCR en tiempo real PCRc.....	43
Generación de ADNc a partir de ARN por transcripción reversa (RT).....	44
Curvas estándar para qPCR.....	44
Análisis de PCRc	45
Análisis filogenéticos.....	46
RESULTADOS.....	49

Metanogénesis en ambientes hipersalinos: parámetros fisicoquímicos y concentraciones de metano.....	49
Caracterización de la respuesta metanogénica en experimentos de microcosmos...50	
Valoración del uso de sustratos metanogénicos	50
Efecto de la salinidad, concentración de sulfato y de la adición de TMA sobre la producción de metano en experimentos de microcosmos	51
Composición de la comunidad de arqueas metanógenas a través del aislamiento de cultivos enriquecidos (estrategia cultivo dependiente)	52
Composición de la comunidad de arqueas metanógenas a través de la recuperación de secuencias de ADN que codifican para los genes 16S ARNr y mcrA de muestras intactas y manipuladas experimentalmente (estrategia cultivo independiente)	54
Cuantificación del número de copias del gen mcrA por qPCR.....	63
Análisis de la comunidad de Bacterias Sulfato Reductoras de muestras naturales y manipuladas, a través de patrones de bandas de DGGE del gen 16S ARNr.....	66
Análisis de la comunidad de cianobacterias de muestras naturales y manipuladas, a través de patrones de bandas de DGGE del gen 16S ARNr.....	69
DISCUSIÓN	70
Factores que intervienen en la producción de metano en ecosistemas hipersalinos	70
Estimulación de la producción de metano en experimentos de microcosmos.....	72
Diversidad de Arquea en ambientes hipersalinos.....	75
Metanogénesis hidrogenotrófica en ambientes hipersalinos	77
CONCLUSIONES	79
Perspectivas	81
REFERENCIAS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Metanogénesis a partir de H ₂ /CO ₂ , metanol y acetato	18
2. Secuencia de la degradación microbiana de macromoléculas orgánicas en ambientes anóxicos	20
3. Procesos de formación de trimetilamina en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos	23
4. Localización geográfica de los sitios de estudio	35
5. Métodos utilizados en el presente trabajo	48
6. Tasas de producción de metano de muestras de tapetes microbianos hipersalinos	50
7. Tasas de producción de metano obtenidas en experimentos de microcosmos	52
8. DGGE del 16S ARNr y del gen <i>mcrA</i> de 5 cultivos enriquecidos de arqueas metanogénicas	53
9. Dendograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del gen 16S ARNr del Dominio Arquea	55
10. Árbol construido con el método de neighbor-joining (NJ), basado en comparaciones de secuencias de ADN del gen 16S ARNr recuperadas a partir de bandas de DGGE	57
11. Análisis de patrones de bandas de DGGE de productos de PCR del gen <i>mcrA</i> , obtenidos a partir de muestras manipuladas experimentalmente (microcosmos) de los sitios LSI-H7 y LSI-H8	58
12. Análisis de patrones de bandas de DGGE de productos de PCR del gen <i>mcrA</i> , obtenidos a partir de muestras intactas y manipuladas experimentalmente (microcosmos) de los sitios ESSA-A1, LSI-H7, LSI-H8 y LSI-S3	59
13. Composición de la comunidad de arqueas metanógenas de ambientes hipersalinos de Baja California Sur, México, basándose en los resultados de similitud de análisis de BLAST (>97 %)	61

Figura	Página
14. Árbol filogenético construido con Máxima Verosimilitud (Maximum-likelihood; ML), basado en comparaciones de secuencias inferidas de aminoácidos del gen <i>mcrA</i> de arqueas metanógenas de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos	63
15. Cuantificación del número de copias del gen <i>mcrA</i> en muestras naturales y manipuladas del sitio LSI-H7	65
16. Cuantificación del número de copias del gen <i>mcrA</i> en muestras naturales de ADN y ADNC del sitio ESSA-A1	66
17. Dendrograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del 16S ARNr amplificado con primers específicos para Bacterias Sulfato Reductoras	68
18. Dendrograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del 16S ARNr amplificado con primers específicos para bacterias sulfato reductoras	68
19. Dendrograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del 16S ARNr amplificado con primers específicos para Cianobacterias, de muestras naturales e incubadas, de cuatro sitios de estudio	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Energía libre de Gibbs para las reacciones metanogénicas mas comunes	19
2. Límites superiores de tolerancia a la salinidad que han sido publicados a partir de experimentos de cultivos para valorar la metanogénesis con sustratos específicos	21
3. Órdenes, familias y géneros de arqueas metanógenas, basado en secuencias del gen 16S ARNr	28
4. Concentraciones de salinidad y sulfato utilizadas en experimentos de incubación	39
5. Secuencias de los iniciadores diseñados en este estudio para la cuantificación del número de copias del gen <i>mcrA</i> de distintos linajes filogenéticos de arqueas metanógenas, a través de PCRc	44
6. Condiciones fisicoquímicas asociadas con metanogénesis en cinco sitios hipersalinos de Baja California Sur, México. Se muestran las desviaciones estándar	49
7. Número de secuencias de ADN del gen 16S ARNr específico del Dominio Arquea, que componen cada uno de los 8 linajes filogenéticos detectados	56
8. Número de secuencias del gen <i>mcrA</i> que conforman los 13 linajes filogenéticos obtenidos con la herramienta CD-HIT	62

INTRODUCCIÓN

Metano, abundancia en el planeta Tierra y su importancia

El metano fue reconocido y aislado por el físico italiano Alessandro Volta en 1766, cuando estudiaba los gases presentes en un lago de los Alpes italianos (Ferry y Kastead, 2007). El metano es el hidrocarburo más sencillo, cuya fórmula química es CH₄. Cada uno de los átomos de hidrógeno está unido al carbono por medio de un enlace covalente. Es una sustancia no polar que se presenta en forma de gas en condiciones estándar de temperatura y presión (0°C, 100kPa). El metano es la forma más reducida del carbono y tiene una importante función en varios procesos geoquímicos en el planeta Tierra como por ejemplo en el del ciclo biogeoquímico del carbono (Schoell, 1988).

Recientemente, las investigaciones relacionadas con el metano han cobrado relevancia debido a las siguientes características: a) por ser el tercer gas más abundante de efecto invernadero en la atmósfera del planeta Tierra, después del CO₂ y del vapor de agua (IPCC, 2007; Heimann, 2010); b) por su uso como biocombustible (Demirbas, 2008); y c) porque durante la década pasada se detectaron concentraciones de metano en el planeta Marte (~10 partes por billón), que podría ser evidencia potencial de actividad biológica (Formisano *et al.*, 2004). Sin embargo, recientemente se reportó la ausencia de metano en la atmósfera del planeta Marte, lo cual reduce la probabilidad de existencia de actividad metanogénica microbiana en dicho planeta (Webster *et al.*, 2013).

Ocurrencia del metano

El gas metano en la atmósfera del planeta Tierra puede ser producido a través de la transformación de la materia orgánica con altas temperaturas y altas presiones (metano termogénico) (Schoell, 1988), o por actividad microbiana (metano biogénico). Estudios previos han demostrado que el 80 – 90 % del metano atmosférico proviene de fuentes microbianas a través de procesos anaeróbicos (Whiticar, 1999). Por más de tres millones de

años la formación biológica de metano ha sido asociada exclusivamente con ambientes anóxicos y con actividad metanogénica, por microorganismos del dominio Arquea, denominadas Arqueas Metanógenas (AM) (Balch *et al.*, 1979), los cuales poseen un metabolismo distintivo por su perfil único de coenzimas (Jones *et al.*, 1987). Sin embargo, existen evidencias convincentes de rutas alternativas de producción de metano a partir de metabolismos aeróbicos, por lo que es esencial la identificación y comprensión de las fuentes aeróbicas productoras de metano, para completar nuestra comprensión de los ciclos biogeoquímicos que controlan el metano atmosférico y su influencia como gas de efecto invernadero (Keppler *et al.*, 2009).

Existen bacterias “mini productoras” de metano (*Clostridium* spp.), que emplean rutas metabólicas distintas, como aquellas que utilizan el grupo S-metil de la L-cisteína (Rimbault *et al.*, 1988). Recientemente, se descubrió que cianobacterias del tipo *Synechococcus* sp. pueden utilizar sustratos orgánicos (fosfonatos) para crecer heterotróficamente en oscuridad, y que en presencia de luz y oxígeno algunas cepas liberan metano o etano dependiendo de la disponibilidad de fosfonatos (Teske *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que el metano puede ser fácilmente generado por plantas terrestres *in situ* bajo condiciones aeróbicas, por un proceso desconocido hasta el momento. Emisiones importantes de metano se producen a partir de plantas intactas y de experimentos de incubación en laboratorio con hojas desprendidas de las plantas, sugiriendo que esta nueva fuente puede tener implicaciones importantes para el balance global de metano y puede llevar a una reconsideración del papel de las fuentes naturales de metano en cambios climáticos del pasado (Keppler *et al.*, 2009).

Bajo condiciones anaeróbicas, los hidrocarburos pueden ser degradados a metano por consorcios microbianos metanogénicos. Este proceso de degradación es común en la geósfera, y ha sido responsable de la formación de vastos depósitos mundiales de petróleo pesado. La degradación metanogénica es un proceso que disminuye la contaminación por hidrocarburos. Estudios de microorganismos, relaciones sintróficas (colaboración de varias

especies microbianas para realizar una reacción química, que de otra manera sería desfavorable energéticamente), mecanismos y firmas geoquímicas asociadas con la degradación metanogénica de hidrocarburos, han identificado temas en común para dicho proceso en ambientes sub-superficiales. Estos estudios, también han identificado el potencial de diseñar procesos metanogénicos para mejorar la recuperación de bienes energéticos, como el metano biogénico a partir de aceites residuales asociados a sistemas petroleros (Gray *et al.*, 2010). Los resultados previamente obtenidos sugieren que los procesos terminales de oxidación de hidrocarburos sub-superficiales a menudo pueden implicar oxidación sintrófica de acetato y que la degradación metanogénica de alcanos podría estar dominada por una reducción de CO₂ (Jones *et al.*, 2008).

La producción de metano también ha sido asociada con el proceso de tratamiento de aguas residuales. En la mayoría de las grandes plantas de tratamiento de aguas residuales, los lodos son estabilizados generalmente por medio de la digestión anaeróbica. Dicho proceso genera biogás, que está compuesto de varios gases, pero principalmente de metano (60-70%) (Osorio y Torres, 2009).

Metanogénesis por Arqueas Metanógenas

La producción biológica de metano por AM está determinada por una interacción compleja entre factores bióticos y abióticos. Las AM solo se desarrollan y crecen en hábitats anaeróbicos, y pueden ser encontradas en varios ambientes extremos, a menudo viviendo en altas temperaturas y salinidades (Jones *et al.*, 1987). Las AM también se pueden encontrar en sedimentos marinos, manantiales geotérmicos y tractos digestivos de animales. Los humedales también son una importante fuente y reservorio de CH₄, pero los factores que controlan la producción y emisión de este gas no han sido completamente elucidados (Amaral y Knowles, 1994).

La degradación o remineralización de la materia orgánica es favorecida termodinámicamente; los microorganismos obtienen energía a partir de la reducción de aceptores de electrones. El aceptor de electrones, con el rendimiento energético más alto, cuando es acoplado con la oxidación de la materia orgánica, será primeramente utilizado hasta su agotamiento. Las reacciones de degradación subsecuentes utilizarán los aceptores de electrones progresivamente menos energéticamente favorables. Los aceptores de electrones más comunes, ordenados en orden decreciente de rendimiento energético son: $O_2 > NO_3^- > Mn(IV) > Fe(III) > SO_4^{2-} > CO_2$ (Reeburgh, 2007). La metanogénesis ocurre solo después de que todos los aceptores de electrones se han agotado.

La bioquímica y fisiología que involucra la producción de metano por Arqueas ha sido ampliamente estudiada a partir de cultivos puros, sedimentos incubados (microcosmos) e *in situ* (Hedderich y Whitman, 2006). Las AM hacen uso de un limitado rango de sustratos para su metabolismo energético. La utilización de sustratos puede ser dividida en tres grupos, de los cuales todos resultan en la producción de metil coenzima M (metil-CoM) (Lessner, 2009) (Fig. 1). En el último paso de la metanogénesis, el cual es común en los tres grupos; la metil-CoM es reducida en metano por la metil coenzima M reductasa (Mcr). El donador directo de electrones es la Coenzima B (CoB), y la CoB oxidada forma un heterodisulfuro con la CoM (CoM-S--S-CoB). Este heterodisulfuro es reducido con electrones de la coenzima F_{420} a una CoM-SH regenerada y CoB-SH (Fig. 1). La transferencia del grupo metil a CoM y la reducción del heterodisulfuro están involucrados en la conservación de energía. Las rutas metabólicas para la producción de metano pueden ser ampliamente categorizadas en tres grupos, cada uno de los cuales resultan en la formación de un grupo metil (Liu y Whitman, 2008) (Tabla 1). La reducción de dióxido de carbono por hidrógeno es la reacción más favorable energéticamente, mientras que la menos favorable es la fermentación de acetato (Tabla 1). Los valores de energía libre que se muestran en la Tabla 1 fueron calculados para condiciones estándar (pH neutro, 25 °C y concentraciones 1 molar de productos y reactantes). A continuación se detallan los tres tipos de rutas metabólicas para la metanogénesis:

Tipo 1. Reducción de CO₂. El dióxido de carbono es reducido a un grupo metil utilizando electrones provenientes del donador de electrones, que generalmente es el hidrógeno (Lessner, 2009). La mayoría de las AM hidrogenotróficas también pueden utilizar formiato como donador de electrones en un proceso donde cuatro moléculas de formiato son oxidadas a dióxido de carbono antes de que una molécula de CO₂ sea reducida a metano (Tabla 1). Algunos alcoholes secundarios como el 2-propanol, 2-butanol y el ciclopentanol, también pueden ser utilizados por algunas AM para proveer electrones para la reducción del CO₂. Dichos compuestos primero son oxidados a cetonas por la coenzima F₄₂₀ dependiente de deshidrogenasas de alcoholes secundarios (Adf). El etano también puede ser utilizado y oxidado a acetato a través de una nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) dependiente de deshidrogenasas de alcohol (Fig. 1A).

Tipo 2. Dismutación de compuestos metilados. Los compuestos metilados incluyen metanol, aminas metiladas (metilamina, dimetilamina, trimetilamina y tetrametilamonio), y sulfuros metilados (metanetiol y dimetilsulfuro). Los grupos metilos se transfieren a una proteína carrinoide y luego a CoM para formar metil-CoM (Lessner, 2009). La activación y transferencia del grupo metilo requieren metiltransferasas específicas de cada sustrato. Los electrones requeridos para la reducción de los grupos metilos a metano, son obtenidos de la oxidación de grupos metilos adicionales a dióxido de carbono (el reverso de la metanogénesis hidrogenotrófica). Los tres grupos metilos son reducidos a metano por cada molécula de dióxido de carbono formado (Tabla 1). Eso es una reacción de dismutación ya que la oxidación de una molécula de sustrato es utilizada para reducir otra molécula de sustrato y la suma de potenciales de los correspondientes pares redox es mayor de 0 (Fig. 1C).

Tipo 3. Fermentación de acetato. En la metanogénesis acetoclástica el enlace carbono - carbono del acetato se rompe para producir un grupo metilo y uno carbonilo; el grupo metilo se reduce a metano con electrones provenientes de la oxidación del grupo carbonilo

a dióxido de carbono (Lessner, 2009). Previo al rompimiento del enlace C - C, el acetato necesita ser activado. *Methanosarcina* sp. convierte en acetyl-CoA el acetato para ser activado en una reacción catalizada por una cinasa acetato y fosfotransacetilasa. Esas enzimas no están presentes en *Methanosaeta* spp., en su lugar, la sintetasa CoA cataliza la activación de acetato en acetyl-CoA (Ferry, 1992) (Fig. 1B).

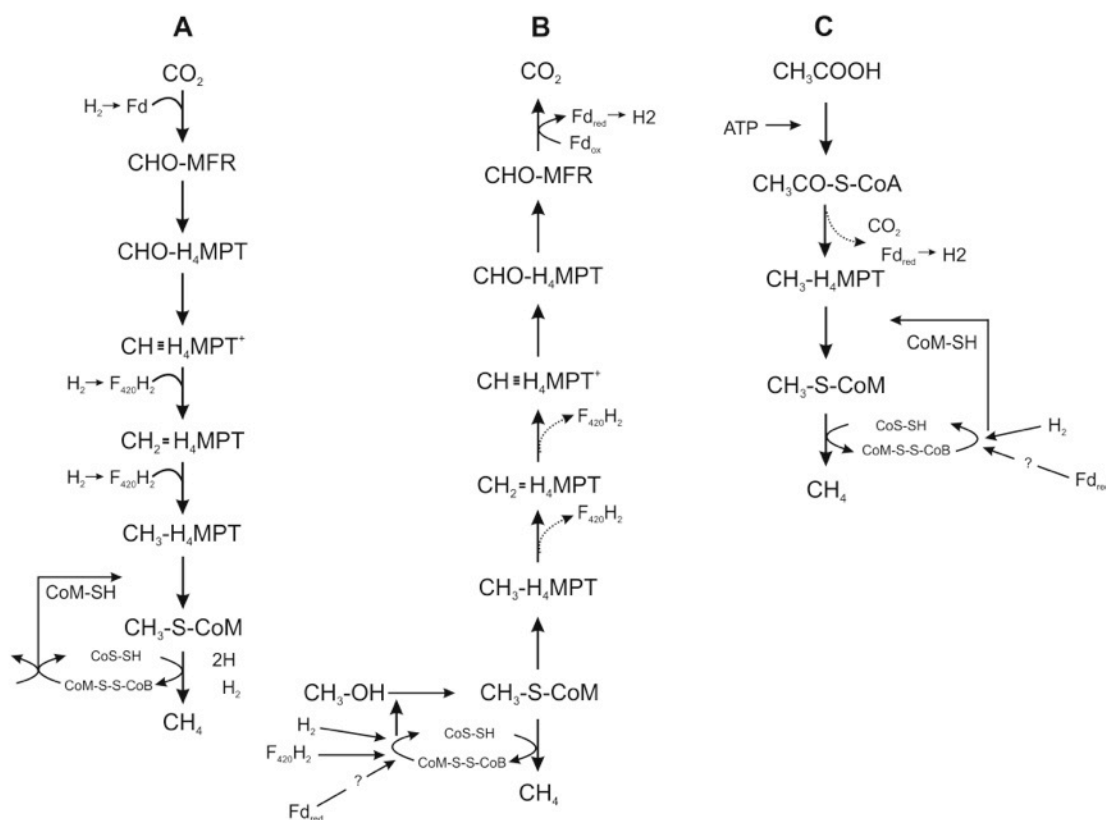


Fig. 1. Metanogénesis a partir de H₂/CO₂ (A), metanol (B) y acetato (C). Aunque tienen un origen diferente, las tres vías metabólicas tienen un intermediario común; Metil-coenzima M (CH₃-S-CoM). Tomado de Hedderich y Whitman (2006).

Las AM son incapaces de utilizar algunos de los productos de fermentadores primarios, como ácidos grasos de más de dos átomos de carbono o ácidos grasos aromáticos. Por lo tanto, las AM requieren de la acción de un grupo adicional de bacterias fermentadoras (fermentación secundaria), para convertir los productos de fermentación primaria en acetato o hidrógeno (Schink, 1997) (Fig. 2). Las macromoléculas orgánicas son hidrolizadas por

bacterias hidrolíticas, los monómeros son fermentados por bacterias para obtener productos de fermentación que pueden ser utilizados por arqueas metanógenas como sustratos para su crecimiento. Sin embargo, en sedimentos con altas concentraciones de sulfatos, las bacterias sulfato reductoras (BSR) excluyen a las arqueas Metanógenas por competencia de los sustratos acetato e hidrógeno. Varios compuestos metilados son utilizados por arqueas metanógenas y no pueden ser usados por BSR, los cuales son conocidos como sustratos no competitivos.

Tabla 1. Energía libre de Gibbs para las reacciones metanogénicas mas comunes.

Reacción	ΔG° (kJ/mol de CH ₄)
Tipo 1	
$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-130
$4 \text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	- 120
$\text{CO}_2 + 4 (\text{isopropanol}) \rightarrow \text{CH}_4 + 4 (\text{acetona}) + 2 \text{H}_2\text{O}$	- 37
Tipo 2	
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-113
$4 \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-103
$4 \text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4\text{Cl}$	-74
$2 (\text{CH}_3)_2\text{S} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{S}$	-49
Tipo 3	
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-33

(Whitman *et al.*, 2006)

La sintrofia es una forma de cooperación simbiótica en comunidades microbianas (Schink, 1997). Los organismos en una relación sintrófica son capaces de degradar compuestos que no pueden degradar por ellos mismos y viceversa. Por ejemplo, el hidrógeno producido por bacterias fermentadoras puede ser utilizado por AM, y al hacerlo, mantienen una baja concentración del hidrógeno; lo cual es benéfico para las bacterias fermentadoras, ya que las altas concentraciones de hidrógeno pueden inhibir la fermentación (Schink, 1997). La utilización de dicho hidrógeno, es conocido como transferencia interespecífica de hidrógeno.

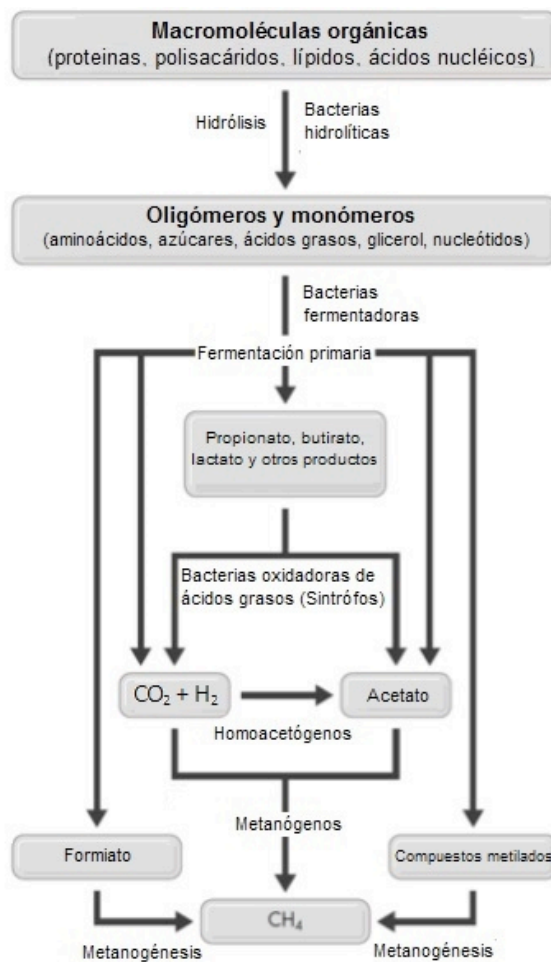


Fig. 2. Secuencia de la degradación microbiana de macromoléculas orgánicas en ambientes anóxicos.

Metanogénesis en ambientes hipersalinos

El mantenimiento de una comunidad microbiana viable en ambientes hipersalinos requiere que los microorganismos desarrollen un mecanismo metabólico para mantener la estabilidad osmótica. Las AM utilizan solutos orgánicos como la glicina betaina y la β -glutamina para eliminar la diferencia osmótica entre los ambientes celulares interiores y exteriores (Lai *et al.*, 1991). Posiblemente, los solutos orgánicos, en adición con las altas

concentraciones intracelulares de K^+ , permiten que las AM sobrevivan en ambientes hipersalinos (Oren, 2001).

La salinidad es un factor limitante que controla las rutas de producción de metano en AM de ambientes hipersalinos. Los experimentos con cultivos puros han mostrado que metanogénesis vía reducción de CO_2 ocurre a salinidades de hasta 12%; mientras que las AM capaces de utilizar aminas metiladas y metanol pueden continuar produciendo metano hasta aproximadamente 25% (Oren, 2011). Los límites de salinidad para las diferentes rutas metanogénicas utilizando sustratos específicos son presentadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Límites superiores de tolerancia a la salinidad que han sido publicados a partir de experimentos de cultivos para valorar la metanogénesis con sustratos específicos (Oren, 2011). TMA = trimetilamina; ppm = partes por mil.

Sustrato metanogénico	Límite superior de salinidad (ppm)
Acetato	60
$CO_2 + H_2$	120
TMA	250
Metanol	250

Los estudios previos de incubación de sedimentos en condiciones anaerobias sugieren que entre los factores limitantes de la metanogénesis en ambientes hipersalinos se encuentran: la salinidad, concentración de sulfatos, disponibilidad de sustratos, la competencia por sustratos entre BSR y AM, y el tamaño relativo de la comunidad metanogénica (Lovley *et al.*, 1982; Oremland y Polcin, 1982; King, 1988; Orphan *et al.*, 2008). Sin embargo, estos parámetros por si solos no explican la variabilidad en la producción de metano en diferentes localidades, por lo tanto, se requiere una mejor comprensión de los procesos microbianos involucrados en la producción y consumo de CH_4 en condiciones naturales (Amaral y Knowles, 1994).

Para el caso particular de ambientes hipersalinos con altas concentraciones de sulfatos (de 50 a 100mM), las mayores tasas de producción de metano en experimentos de incubación (microcosmos), ocurren cuando se utilizan sustratos como la trimetilamina (TMA) o el metanol (King, 1988; Giani *et al.*, 1989; Orphan *et al.*, 2008). Estos sustratos no competitivos proporcionan un nicho único para poblaciones metanogénicas y permiten que coexistan arqueas productoras de metano con comunidades de bacterias reductoras de sulfatos, en hábitats donde los metanógenos acetoclásticos e hidrogenotróficos son típicamente pobres competidores (Lovley *et al.*, 1982; Oremland y Polcin, 1982; Buckley *et al.*, 2008).

Sustratos no competitivos

Los sustratos que son utilizados por AM pero no por BSR, son conocidos como sustratos no competitivos (SNC). Los SNC son comúnmente productos de degradación de comunidades microbianas, e incluyen a los siguientes compuestos: aminas metiladas (metilamina, dimetilamina y trimetilamina-TMA), a los sulfuros metilados como el DMS y el metanetiól, y al metanol. Los precursores metabólicos de la TMA son solutos orgánicos compatibles (como la glicina betaína) que son acumulados por algunos microorganismos de ambientes hipersalinos como una estrategia de osmorregulación (King, 1988). Ejemplos de organismos que acumulan glicina betaína son bacterias fototróficas anoxigénicas del tipo *Ectothiorhodospira*, y algunas cianobacterias como *Calothrix*, *Dactylococcopsis*, *Gloeocapsa*, *Leptolyngbya*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Aphanothece* y *Spirulina* (Oren, 1990).

La glicina betaína presente en ambientes hipersalinos es posteriormente transformada en TMA por una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios por diferentes vías metabólicas. No obstante, la TMA en ambientes hipersalinos también puede ser formada por la reducción de óxido de trimetilamina por la actividad de algunas bacterias o arqueas halófilas extremas. El óxido de trimetilamina es un constituyente de algunos animales

marinos, incluyendo peces e invertebrados, que al morir lo liberan, y éste funciona como último aceptor de electrones en la respiración aeróbica de bacterias, reduciéndolo a TMA (Strom *et al.*, 1979). La degradación de trimetilamina en ambientes hipersalinos por arqueas halófilas metanogénicas, resulta en la formación de metano, dióxido de carbono y amonio (Oren, 1990; Orphan *et al.*, 2008). Un esquema de las diferentes vías para la formación de TMA en ambientes hipersalinos se muestra en la Figura 3.

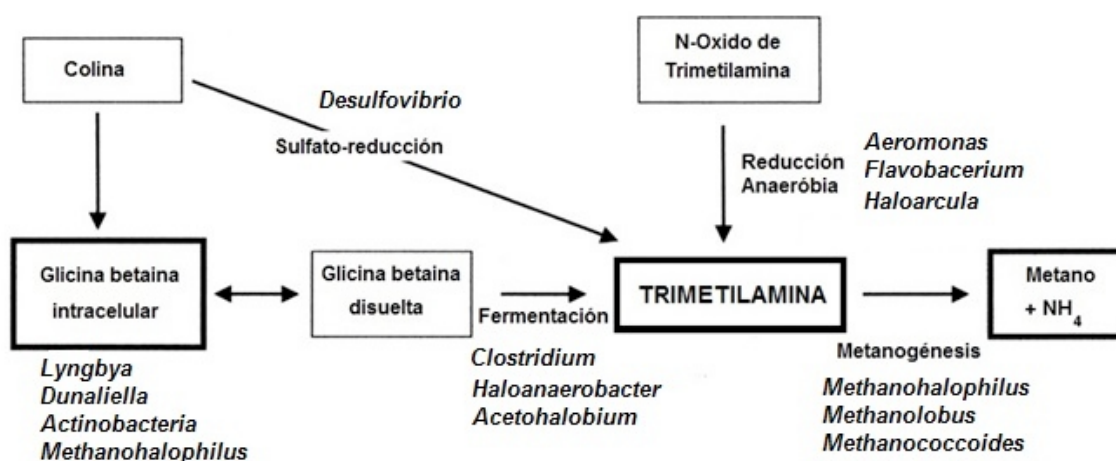


Fig. 3. Procesos de formación de trimetilamina en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos. Imagen modificada de Welsh (2000).

Competencia entre Bacterias Sulfato Reductoras y Arqueas Metanógenas

En sedimentos marinos e hipersalinos existen grupos de microorganismos en competencia por hidrógeno como sustrato de crecimiento. Las BSR pueden excluir por competencia por el hidrógeno a bacterias homoacetogénicas y AM. Las AM son capaces de excluir a bacterias homoacetogénicas bajo condiciones de bajas concentraciones de hidrógeno; sin embargo, las homoacetogénicas parecen estar mejor adaptadas a bajas temperaturas que las AM (Kotsyurbenko *et al.*, 2001).

Las concentraciones de sulfatos mayores a 3 mM pueden ser consideradas como favorables (no limitantes) para las BSR (Boudreau y Westrich, 1984). En los ecosistemas hipersalinos,

la concentración de sulfatos en salmuera es generalmente mayor a 30 mM (King, 1988), por lo tanto la reducción de sulfatos es considerada como el proceso anaeróbico mas importante en altas concentraciones de sulfato (Reeburgh, 2007). Así, las BSR excluyen por competencia de sustratos a las AM, tales como el acetato o el hidrógeno; las bacterias reductoras de sulfatos tienen una mayor afinidad que las AM hacia dichos sustratos y también presentan un menor valor de umbral (*threshold*) hacia ellos. Por ejemplo, se ha mostrado que la AM *Methanosarcina barkeri* tiene una menor afinidad hacia el acetato que la BSR *Desulfobacter postgatei*, ya que tienen un valor de constante de afinidad por sustrato (K_s) de 3 y 0.2 mM, respectivamente (Schönheit *et al.*, 1982). Los umbrales para emplearlos los sustratos son un resultado del efecto termodinámico de las concentraciones de acetato e hidrógeno en el rendimiento de la energía libre. Las estimaciones previas sugieren que la utilización de acetato e hidrógeno, cuando existen en altas concentraciones, es mas desfavorable energéticamente para las AM que para las BSR (Zinder, 1993).

Interacciones entre Bacterias Sulfato Reductoras y Arqueas Metanógenas

Las BSR nos sólo se desarrollan en ambientes con altas concentraciones de sulfato. Por ejemplo, *Desulfobolus* en ausencia de sulfato puede fermentar lactato y etanol a propionato y acetato, pero únicamente lo logra en asociación sintrófica con AM consumidoras de hidrógeno (Bryant *et al.*, 1977). Además, se ha mostrado que cuando algunas AM metilotróficas se encuentran creciendo en presencia de BSR, se da una fuga de hidrógeno (Finke *et al.*, 2007). En ese tipo de relación, donde las BSR consumen el hidrógeno y mantienen bajas las concentraciones de hidrógeno, La fuga de hidrógeno resulta en rendimiento de energía libre potencialmente favorable para AM. A su vez, las AM que utilizan sustratos no competitivos como las aminas metiladas, pueden proveer los requerimientos de sustrato para el desarrollo de BSR, generando sinergias metabólicas para el consumo de diferentes sustratos (Finke *et al.*, 2007).

Diversidad de Arqueas Metanógenas

A pesar de que las AM obtienen la energía para su crecimiento a partir de un número limitado de sustratos, las AM son filogenéticamente diversas, y están clasificadas en seis órdenes: Methanobacteriales, Methanocellales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanopyrales (Tabla 3). La filogenia microbiana está basada en el análisis comparativo de secuencias del gen conservativo y evolutivo 16S ARNr (Woese, 1987). Los órdenes de AM están basados en porcentajes de similitudes de secuencias del gen 16S ARNr, menores a 82% (Liu y Whitman, 2008). Los órdenes están divididos en 13 familias (porcentajes menores de 88-93) y 31 géneros (porcentajes menores de 93-95). Una similitud del 98% o menor ha sido establecida como un criterio para la separación de especies en AM (Whitman *et al.*, 2006).

La secuencia de la enzima metil coenzima M reductasa es otro marcador genético que ha sido empleado para establecer relaciones filogenéticas en AM (Luton *et al.*, 2002). Dicha enzima consiste de dos subunidades alfa (*mcrA*), dos beta (*mcrB*), y dos gama (*mcrG*). Las subunidades son filogenéticamente conservadas (Hallam *et al.*, 2003). En particular, el gen *mcrA* ha sido utilizado como marcador genético alternativo, mostrando relaciones filogenéticas similares como aquellas encontradas por el 16S ARNr (Luton *et al.*, 2002).

A continuación se describen los seis órdenes de AM conocidos hasta el momento:

Methanobacteriales

El orden Methanobacteriales contiene dos familias y cinco géneros (Tabla 3). Los miembros de este orden generalmente utilizan H₂/CO₂ para la metanogénesis, aunque algunos también pueden utilizar formiato o alcoholes secundarios (Whitman *et al.*, 2001). Los Methanobacteriales tienen una pared celular compuesta de pseudomureína, y se encuentran dentro de la familia Methanothermaceae que también tiene una capa superficial de proteína. La morfología celular de los miembros de este orden pueden ser en forma de

bastones o cocoides. Los miembros del género *Methanosphaera* únicamente pueden producir metano por la reducción del metanol con hidrógeno. Este es el único género fuera del orden Methanosarcinales que puede utilizar metanol para la metanogénesis (Whitman *et al.*, 2001).

Methanococcales

Este orden contiene dos familias y cuatro géneros (Tabla 3). Ambos géneros de la familia Methanocaldococcaceae contienen microorganismos que toleran altas temperaturas (hipertermófilos). Los miembros de este orden utilizan H_2/CO_2 para la metanogénesis y presentan una envoltura celular compuesta de ensamblajes planos de proteínas o de subunidades de glicoproteínas, denominada capa celular superficial cristalina (capa-S) (Whitman *et al.*, 2001).

Methanomicrobiales

El orden Methanomicrobiales contiene tres familias y once géneros (Tabla 3). Los miembros este orden utilizan H_2/CO_2 para la metanogénesis. Algunas especies también pueden utilizar formiato o alcoholes secundarios como donadores de electrones. El acetato no puede ser utilizado como sustrato por todos los miembros del orden, sin embargo, varias especies si lo requieren para su metabolismo (Whitman *et al.*, 2001). Este es el orden morfológicamente mas variado de AM, ya que pueden presentar formas de cocos, bastones, placa o espirales. Las paredes celulares tienen una capa S de glicoproteína y también pueden tener una vaina exterior (Whitman *et al.*, 2001).

Methanocellales

Este orden contiene solamente una familia y un género (Sakai *et al.*, 2008; Liu, 2010). Fue previamente conocido como *Rice Custer* I (RC-I), y fue conocido únicamente a través de

secuencias del 16S ARNr obtenidas de suelos de arrozales, hasta que la primera cepa se aisló en 2008: *Methanocella paludicola* (Sakai *et al.*, 2008; Liu, 2010). Hasta el momento se conocen dos especies y ambas pueden utilizar H_2/CO_2 y formiato para la metanogénesis (Sakai *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2010).

Methanosarcinales

El orden Methanosarcinales consiste de tres familias (Tabla 3). Los miembros de este orden son metabólicamente los más versátiles de todas las AM. Ellos pueden producir metano por la dismutación de compuestos conteniendo un grupo metilo, la fermentación de acetato y la reducción de CO_2 con H_2 (Whitman *et al.*, 2001). Sin embargo, no utilizan formiato. Todas las AM que utilizan compuestos metilados con hidrógeno, se encuentran en este orden; tienen diversas morfologías que incluyen cocos, pseudosarcina y bastones envainados. Los miembros del género *Methanosaeta* (*Methanotrix*) son las únicas AM que utilizan solo acetato para la metanogénesis. Las paredes celulares de los miembros del orden Methanosarcinales tienen una capa S (Whitman *et al.*, 2001).

Methanopyrales

Este orden está representado únicamente por una especie, la AM hipertermófila *Methanopyrus kandleri*. Utiliza H_2/CO_2 para la metanogénesis y las paredes celulares contienen pseudomureína (Whitman *et al.*, 2001). *M. kandleri* tiene un intervalo de temperatura de crecimiento de 84 - 110 °C, y son encontradas en sistemas hidrotermales (Kurr *et al.*, 1991).

Tabla 3. Órdenes, familias y géneros de arqueas metanógenas, basado en secuencias del gen 16S ARNr (Euzéby, 2008).

Orden	Familia	Géneros
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanosphaera</i> <i>Methanothermobacter</i>
	Methanothermaceae	<i>Methanothermus</i>
Methanococcales	Methanococcaceae	<i>Methanococcus</i> <i>Methanothermococcus</i>
	Methanocaldococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i> <i>Methanotorris</i>
Methanocellales	Methanocellaceae	<i>Methanocella</i>
Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i> <i>Methanoculleus</i> <i>Methanofollis</i> <i>Methanogenium</i> <i>Methanolacinia</i> <i>Methanoplanus</i> <i>Methanosphaerula</i>
		<i>Methanospirillum</i>
		<i>Methanocorpusculum</i>
		<i>Methanocalculus</i>
		<i>Methanoregula</i>
Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Halomethanococcus</i> *
		<i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanohalobium</i> <i>Methanohalophilus</i> <i>Methanolobus</i> <i>Methanomethylovorans</i> <i>Methanomicrococcus</i> <i>Methanosalsum</i>
		<i>Methanosaeta</i> **
		<i>Methanococcus</i>
Methanopyrales	Methanopyraceae	<i>Methanopyrus</i>

* *Halomethanococcus* puede ser considerado como un sinónimo de *Methanohalophilus* (Paterek y Smith, 1988).

** El género *Methanosaeta* ha sido recientemente declarado ilegítimo y debe ser reemplazado por el género *Methanotrix* (Garrity *et al.*, 2011).

Arqueas Metanógenas no cultivables

Además de los taxos de AM reconocidos a través de la aproximación cultivo dependiente, existen nuevos grupos filogenéticos detectados a partir de estudios cultivo independiente. Por ejemplo, Zooide *Cluster I* (ZC-I, Zooide wetlands, Tibetan Plateau) es un linaje filogenético de AM no cultivables conocido a través de secuencias de los genes 16S ARNr y *mcrA* (Großkopf *et al.*, 1998). Se sospecha también la existencia de otros linajes de arqueas que contienen AM, por ejemplo, el candidato a división I del Mediterranean Sea Brine Lake (MSBL1) que ha sido identificado en cuencas hipersalinas del Mediterráneo (Bannock, Discovery, L'Atalante and Urania) a través de análisis basados en el gen 16S ARNr (van der Wielen *et al.*, 2005). Se sabe que la metanogénesis ocurre en todas esas cuencas del Mediterráneo pero solo algunas secuencias del 16S ARNr de AM han sido identificadas, la mayoría de ellas pertenecen al MSBL1, lo que hace a este linaje como el principal candidato responsable de la metanogénesis en esas cuencas hipersalinas (van der Wielen *et al.*, 2005).

Trabajos previos

Estudios anteriores han demostrado que la metanogénesis ocurre en todos los ambientes hipersalinos (Oremland *et al.*, 1982; Bebout *et al.*, 2004), y que existen comunidades microbianas desarrollándose dentro de minerales evaporíticos. Dichas comunidades endolíticas han sido denominadas endoevaporitas (Rothschild *et al.*, 1994; Spear *et al.*, 2003). Varios trabajos han considerado la diversidad, abundancia y fisiología de AM de ambientes hipersalinos (Sorensen *et al.*, 2005; Orphan *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2009; Sørensen *et al.*, 2009; Lazar *et al.*, 2011; Kozubal *et al.*, 2013). A la fecha, solo AM metilotróficas del orden Methanosarcinales han sido reportadas para muestras naturales de ambientes hipersalinos (Orphan *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Lazar

et al., 2011). Particularmente, en Guerrero Negro, Baja California Sur, México, la localidad donde está ubicada la empresa de Exportadora de Sal S. A. (ESSA), se ha reportado actividad de metanogénesis en presencia de altas tasas de reducción de sulfatos en tapetes microbianos del Área 4 cerca del Área 1, denominada P4n1. En dicho estudio, mediante el empleo de secuencias de los genes 16S ARNr, *mcrA*, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) y análisis de biomarcadores lipídicos, se encontró que la actividad metanogénica es llevada a cabo principalmente por tres géneros metanogénicos del orden Methanosarcinales: *Methanohalophilus* sp., *Methanococoides* sp. y *Methanolobus* sp. (Orphan *et al.*, 2008).

A partir de tapetes microbianos hipersalinos recolectados del Área 4 de ESSA (sitio distinto al P4n1, denominado A4 cerca del dique que separa A4 de A5) e incubados bajo condiciones de invernadero, se encontró que las concentraciones de sulfatos y niveles de salinidad, manipuladas experimentalmente en incubaciones de largo plazo, resultó en cambios de la estructura y función de la actividad metanogénica (Smith *et al.*, 2008). A partir de secuencias del gen *mcrA* de tapetes intactos e incubados bajo condiciones similares a las de la localidad, se obtuvo que las secuencias estuvieron exclusivamente relacionadas con miembros metilotróficos del orden Methanosarcinales. En experimentos de laboratorio, cuando las concentraciones de sulfatos fueron bajas, se observó un incremento en la producción de metano que correlacionó con un incremento en la abundancia de secuencias del *mcrA* de AM hidrogenotróficas relacionadas al orden Methanomicrobiales (Smith *et al.*, 2008).

La metanogénesis hidrogenotrófica y acetoclástica ha sido detectada a través de experimentos de radiomarcadao utilizando sustratos marcados con ^{14}C en sedimentos hipersalinos a 50 cm por debajo del piso marino, en un volcán lodoso profundo del Mar Mediterráneo (Lazar *et al.*, 2011). Sin embargo, no se han realizado esfuerzos para aislar AM hidrogenotróficas de esos sitios, ni tampoco se han detectado secuencias del 16S ARNr, ni del *mcrA* de AM hidrogenotróficas o acetoclásticas, presumiblemente debido a las

baja abundancias de esas AM en los sitios previamente estudiados. Así, se requiere realizar análisis microbiológicos y moleculares con el fin de adquirir nuevo conocimiento que permita enlazar la diversidad de AM con sus actividades metabólicas en los ambientes hipersalinos.

Estudios previos han descrito la comunidad de AM con la cuantificación de diferentes linajes filogenéticos a través del uso de sondas marcadas del ARNr con técnicas como hibridación *dot blot* (Raskin *et al.*, 1994; Angenent *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002) y FISH (Rocheleau *et al.*, 1999; Sekiguchi *et al.*, 1999; Crocetti *et al.*, 2006). Sin embargo, PCR en tiempo real (PCRC) es una técnica alternativa capaz de determinar el número de copias de un gen en particular presente en ADN o ADN complementario (ADNc) extraído de muestras ambientales. Pocos estudios han utilizado PCRC para examinar cuantitativamente diferentes linajes filogenéticos dentro de comunidades metanogénicas, y la mayoría de dichos estudios han trabajado exclusivamente el gen 16S ARNr (Hori *et al.*, 2006; Sawayama *et al.*, 2006; Saengkerdsab *et al.*, 2007). Otras investigaciones han utilizado PCRC para cuantificar linajes metanogénicos a través del gen *mcrA* (Inagaki *et al.*, 2004; Shigematsu *et al.*, 2004; Nunoura *et al.*, 2006), pero han estado limitado a solo algunos grupos filogenéticos.

OBJETIVOS

General

Aportar conocimiento a cerca de la producción biológica de metano en ambientes hipersalinos naturales y construidos por el hombre, no previamente caracterizados, así como contribuir en el conocimiento de la diversidad filogenética y funcional de arqueas metanógenas, para comprender su contribución en el funcionamiento del ecosistema.

Particulares

1. Determinar las concentraciones de metano y sulfato en ambientes hipersalinos tanto naturales como construidos por el hombre, de Baja California Sur, México.
2. Valorar el efecto de la adición de sustratos metanogénicos y de la reducción de la salinidad y sulfatos, sobre la producción de metano en tapetes microbianos hipersalinos bajo condiciones experimentales de incubación (microcosmos).
3. Elucidar la composición de la comunidad metanogénica en tapetes microbianos hipersalinos a través de la recuperación de secuencias de ADN que codifican para los genes 16S ARNr y *mcrA* de muestras intactas y manipuladas experimentalmente, y del aislamiento de cultivos enriquecidos de arqueas metanógenas.
4. Elucidar la participación de bacterias sulfato reductoras (BSR) y cianobacterias en relación con la metanogénesis en ambientes hipersalinos, a través del análisis de comunidades de ambos grupos a partir de ADN de muestras intactas e incubadas con iniciadores específicos para cada grupo.
5. Estimar la expresión del gen *mcrA* de diferentes linajes filogenéticos de arqueas

metanógenas en tapetes microbianos hipersalinos bajo condiciones ambientales y manipuladas, a través de la cuantificación del número de copias del gen *mcrA* por PCR en tiempo real.

HIPÓTESIS

Si la complejidad de los diferentes procesos químicos y biológicos asociados a la metanogénesis no son iguales para todas las localidades, entonces se espera encontrar diferencias en la producción de metano y en la estructura y composición de arqueas metanógenas, de muestras de ambientes hipersalinos naturales y contruidos por el hombre.

Si aceptamos que existe un conocimiento escaso acerca de la diversidad filogenética y funcional de arqueas metanógenas de ambientes hipersalinos, entonces, investigaciones de estos microorganismos en sitios no estudiados previamente, permitirá incrementar nuestra comprensión de la estructura y su contribución al funcionamiento del ecosistema.

Si los microorganismos existen en diferentes estados metabólicos (dormante, activos o en reproducción) y los análisis de ARNr son frecuentemente empleados para identificar la fracción activa de los microorganismos en muestras ambientales, entonces se espera encontrar diferencias en el número de copias del gen *mcrA* en muestras de ADN y ANDc de diferentes linajes filogenéticos, que permitirá distinguir la fracción activa (y/o en reproducción) de arqueas metanógenas, de aquellas en estado dormante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio

Se estudiaron dos localidades de ambientes hipersalinos con desarrollo de tapetes microbianos a lo largo de la costa del Océano Pacífico, en el Estado de Baja California Sur, México. Las colectas se realizaron en septiembre de 2010, marzo y noviembre de 2012. Se analizaron cinco sitios, tres dentro del ecosistema natural Laguna San Ignacio (LSI), sitios: LSI-S3 (26°56.361'N, 113°04.428'W), LSI-H7 (26°48.087'N, 113°07.548'W) y LSI-H8 (26°45.249'N, 113°07.443'W); y dos en el ambiente construido por la humanidad Exportadora de Sal S.A. (ESSA) en Guerrero Negro, sitios: ESSA-A1 (27°35.857'N, 113°53.716'W) y ESSA-A9 (27°45.804'N, 113°58.268'W) (Fig. 4). El sitio LSI-H7 presentó tapetes microbianos pustulares de color negro, no laminados, con textura correosa y de aproximadamente 7 mm de grosor. LSI-H8 presentó tapetes microbianos planos, laminados, de color naranja – rosa, de aproximadamente 8 mm de espesor. El sitio LSI-S3 es un pequeño estanque formado naturalmente dentro de una planicie evaporítica que presenta arenas finas limosas de color negro por debajo de delgadas costras de yeso. ESSA-A1 se caracterizó por presentar tapetes microbianos laminados de color verde oscuros y de consistencia blanda, de aproximadamente 10 mm de grosor. En el sitio ESSA-A9 se encuentran numerosas cabezas de costras de yeso de color café claro, que en su interior presentan comunidades endoevaporíticas laminadas y coloridas.

En cada uno de los sitios de estudio, se colectaron núcleos de tapetes microbianos de 1 cm de profundidad por 1 cm de diámetro, y se almacenaron en nitrógeno líquido para posteriores análisis de biología molecular. Adicionalmente, las muestras frescas de tapetes microbianos y de agua de la localidad fueron mantenidas a temperatura ambiente para los experimentos de microcosmos. Se tomaron núcleos de mayor tamaño (8 cm de profundidad × 8 cm de diámetro) los cuales fueron transportados a temperatura ambiente para subsecuentes mediciones de contenido de sulfatos. También se recolectaron burbujas de gas

provenientes del interior de los tapetes microbianos realizando una perturbación de los sedimentos, y atrapándolas con un embudo invertido, tapado con un septo de goma. En algunas ocasiones los sitios de muestreo LSI-H7 y LSI-H8 estuvieron desecados, y por lo tanto se recolectaron muestras de gas directamente de elevaciones de los sedimentos (de 2 – 10 cm de altura) en forma de burbuja que en la parte superficial presentaron tapetes microbianos (llamados ocasionalmente tapetes pustulares), para ello se utilizaron jeringas de 5 ml con agujas hipodérmicas. Todas las muestras de gas fueron transferidas y almacenadas en viales de suero sin atmósfera (evacuados), para su posterior cuantificación de concentración de metano por cromatografía de gases (Kelley *et al.*, 2012).

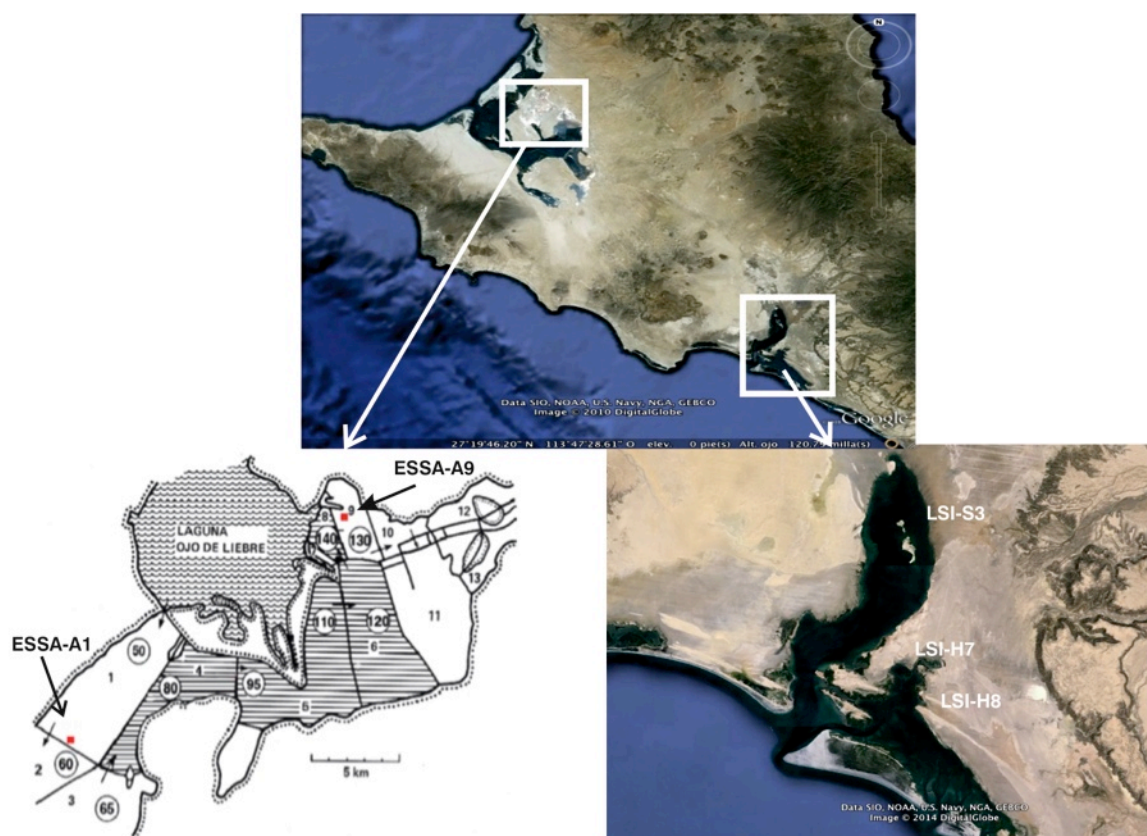


Fig. 4. Localización geográfica de los sitios de estudio.

Determinaciones fisicoquímicas y cuantificación del porcentaje de metano en muestras de gas ambiental

La salinidad de la salmuera y la temperatura en los sedimentos para cada sitio, fueron determinadas *in situ* con un refractómetro y termómetro portátiles, respectivamente. El contenido de sulfatos en las muestras de sedimentos fue determinado por turbidimetría en un espectrofotómetro automatizado (QuickChem series 8000 FIAS, Lachat Instruments, Hach Loveland, CO, USA), siguiendo el protocolo del laboratorio de Edafología del CIBNOR, utilizando una solución de extracto de Morgan y BaCl_2 para la precipitación del sulfato (Chesnin y Yien, 1951). El carbono orgánico total en las muestras de tapetes microbianos y endoevaporitas fue determinado en el mismo laboratorio siguiendo el protocolo de Hedges y Stern (1984). La concentración de sulfatos en salmuera fue analizada siguiendo el protocolo certificado del laboratorio de Análisis químico de agua del CIBNOR.

El contenido de metano en muestras de gas fue analizado en el Laboratorio de Cromatografía de Gases del CIBNOR por la técnica de cromatografía de gases con un detector de ionización en flama (GC-FID) (Shimadzu Mini-2, Kyoto, Japan), equipado con una columna Poropak N 2-m, mantenida a 40°C con nitrógeno como gas acarreador. Todas las muestras fueron directamente inyectadas (100 μL) en el GC-FID. Se utilizaron estándares certificados de metano (1.00 - 10,400 $\mu\text{mol/mol}$ en N_2) obtenidos de Matheson Tri-Gas (Ohio, USA) para la calibración y para el cálculo de los porcentajes de metano a través de la comparación de las áreas de los picos para las muestras y estándares.

Experimentos de microcosmos

Determinación del uso de sustratos metanogénicos

Para estudiar a detalle los procesos metabólicos que dan lugar al metano detectado en los sitios de estudio se realizaron experimentos de microcosmos para la cuantificación de la

tasa de producción de metano con diferentes sustratos metanogénicos (objetivo 2). Dicho experimento fue realizado en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por la Dra. Berenice Celis García y Natalia Trabal Fernández. Se analizaron muestras únicamente de los sitios ESSA-A1, LSI-H7 y LSI-H8. Se adicionaron diez mL de salmuera del sitio de estudio, previamente desoxigenada (purgada con N₂), en viales de suero que contenían muestras de tapetes microbianos, para formar una mezcla de lodo con salmuera (*slurries*). Los viales fueron tapados con septos azules de goma de butilo y con anillos de aluminio. La atmósfera de las botellas se intercambió con N₂ para eliminar cualquier cantidad presente de O₂. Los *slurries* de los sitios de LSI fueron enriquecidos con trimetilamina (15 mM), metanol (20 mM), formiato (20 mM), acetato (20 mM), H₂/CO₂ (80/20%) durante 20 segundos, y molibdato de sodio (2 mM). El tratamiento con molibdato de sodio se realizó para inhibir la reducción de sulfatos por bacterias sulfato reductoras, y con ello eliminar la competencia por H₂ y acetato entre ellas y las arqueas metanógenas hidrogenotróficas y acetoclásticas (Banat *et al.*, 1981). El molibdato, un oxianión del Grupo VI que es estereoquímicamente similar al sulfato, es un inhibidor competitivo e irreversible de la reducción de sulfatos (Oremland y Capone, 1988). Experimentos de incubación similares a los realizados en este estudio han sido previamente reportados por Kelley *et al.* (2012).

Las muestras de ESSA-A1 fueron enriquecidas con TMA (1 mM) e incubadas a temperatura ambiente (~ 25 °C) por 48 horas, mientras que las muestras de LSI fueron incubadas a 30 °C por 33 días. Se recolectaron muestras de gas en diferentes tiempos para seguir la concentración de metano en el espacio gaseoso de las botellas, lo que permitió calcular las tasas específicas de producción de metano por gramo de muestra (nmol g⁻¹ día⁻¹).

Valoración del efecto de la salinidad, concentración de sulfatos y adición de trimetilamina

Para determinar los límites superiores de salinidad y de concentración de sulfatos donde la metanogénesis metilotrónica puede ocurrir, así como el efecto de la adición de trimetilamina (TMA) sobre la producción de metano y sobre la estructura de la comunidad metanogénica (objetivo 2), se realizó un experimento de microcosmos por triplicado. En el experimento, ~15 g de tapetes microbianos hipersalinos con 20 mL de salmuera artificial (preparada con reactivos químicos de grado analíticos, conteniendo los constituyentes principales y menores de la salmuera *in situ*) (Smith *et al.*, 2008), fueron incubados bajo condiciones anóxicas a 30 °C en la oscuridad. La salmuera artificial fue diseñada específicamente para cada tratamiento, dependiendo de la salinidad y concentración de sulfatos *in situ*. Las concentraciones de salinidad y sulfato utilizadas en los diferentes tratamientos, se muestran en la Tabla 4. Las muestras fueron incubadas durante 24 días, y se midió la concentración de metano en la atmósfera de los viales, cada semana ($n = 3$), para determinar las tasas de producción de metano. Al final del experimento, se recolectaron sub-muestras de sedimentos y fueron congeladas a -80 °C para posteriores análisis de biología molecular.

Para calcular las tasas de producción de metano en cada vial de incubación, se realizó una regresión lineal a partir de una gráfica de la concentración de metano detectada en los diferentes tiempos de muestreo. Las concentraciones de metano detectadas en las atmósferas de los viales (ppm) fueron convertidas a nanomol (nmol) utilizando la ley de los gases ideales, conociendo el volumen de la fase gaseosa en cada vial. El volumen de la fase gaseosa se calculó a partir de la diferencia entre el volumen total del vial (50 mL) y el volumen ocupado por los sedimentos, salmuera y sustratos adicionados, bajo condiciones estándar de temperatura y presión ($T = 273 \text{ K}$, $P = 1 \text{ atm}$). Se utilizó la densidad en peso húmedo de los sedimentos para determinar el volumen de los sedimentos. La densidad de los sedimentos se determinó por el desplazamiento de agua de 0.68 – 5.25 g. de muestra. Las tasas de producción de metano fueron reportadas en nmol/g de seimento/d.

Tabla 4. Concentraciones de salinidad y sulfato utilizadas en experimentos de incubación. En el tratamiento TMA se utilizaron las mismas concentraciones que en el tratamiento CONTROL, pero con la adición de 15mM de trimetilamina.

	CONTROL		LOW	
	Salinidad (%)	Sulfato (mM)	Salinidad (%)	Sulfato (mM)
ESSA-A1	6	55	3	28
LSI-H7	9	85	4.5	42
LSI-H8	11	103	5.5	51
ESSA-A9	17	160	8.5	80
LSI-S3	28	263	14	131

Análisis estadísticos

Los porcentajes de metano en muestras de gas ambiental fueron valorados estadísticamente con un análisis de varianza (ANDEVA) incluyendo la prueba *a priori* de normalidad de Kolgomorov-Smirnov y *a posteriori* Tukey. Además, se realizó otra ANDEVA con los datos obtenidos de los experimentos de incubación (tasas de producción de metano), para valorar si existió diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

Obtención de cultivos enriquecidos de arqueas metanógenas

Para elucidar la composición de la comunidad metanogénica en tapetes microbianos hipersalinos a través de la estrategia cultivo dependiente, se realizó el aislamiento de cultivos enriquecidos de arqueas metanógenas de la siguiente manera: al final del experimento de valoración del uso de sustratos metanogénicos, los viales con muestras de LSI fueron mantenidos a temperatura ambiente (~ 25 °C) durante ~ 1 año. Posteriormente, las muestras fueron reactivadas con el medio DSM 525 específico para el género *Methanohalophilus*, utilizando TMA (15 mM) y metanol (20 mM) como sustratos. Las muestras fueron incubadas durante una semana a 30 °C bajo la oscuridad, y posteriormente

se realizó una transferencia de 1 mL del medio de cultivo en 9 mL de medio DSM 525 (logrando diluciones seriadas de hasta 10^{-6}), y fueron nuevamente incubadas a 30 °C y en oscuridad durante una semana mas, para tratar de obtener cultivos enriquecidos con el menor número posible de especies de arqueas metanógenas. El crecimiento en los cultivos enriquecidos fue monitoreado a través de observaciones a simple vista de cambios de turbidez del medio y por la detección de metano (por GC-FID) en muestras de la fase gaseosa de los tubos con los cultivos enriquecidos. La muestras de los cultivos enriquecidos fueron observadas al microscopio de epifluorescencia para detectar la coenzima F420 presente en Arqueas Metanógenas (Solera *et al.*, 2001). Una característica peculiar de las AM es su autofluorescencia verde-azul inducida por luz UV, que permite detectarlos por microscopía (Doddema y Vogels, 1978). Distintas morfologías fueron detectadas por microscopía, por lo tanto se procedió a recolectar muestras de los diferentes cultivos enriquecidos para posteriores análisis de biología molecular.

Extracciones de ácidos nucleicos

Para llevar a cabo los objetivos 3, 4 y 5 de esta tesis, a las muestras naturales e incubadas (recolectadas al final de los experimentos de microcosmos) se les extrajo ADN genómico y ARN total, mediante el protocolo del fabricante del kit Power Biofilm DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad CA, USA), utilizando un lisador de células (*bead beater*) (Fast DNA prep; MP Biomedicals United States, Solon, OH, USA). La extracción de ARN se realizó con el kit RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad CA, USA). Las muestras de cultivos celulares enriquecidos de arqueas metanógenas (1 ml) fueron centrifugadas durante 5 minutos a 10000 g. Las pastillas (*pellets*) obtenidas se usaron para extraer ADN con el kit DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, USA). Todos los ácidos nucleicos extraídos fueron visualizados en geles de agarosa al 1 % y las concentraciones y cocientes de pureza fueron determinadas con un espectrofotómetro NanoDrop Lite NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

El ADN extraído de las muestras fue utilizado para amplificar por PCR el gen 16S ARNr, utilizando iniciadores específicos para el grupo arquea ARC-8F (5'-TCCGGTTGATCCTGCC-3') y ARC-1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Teske *et al.*, 2002). Todas las reacciones de PCR (volumen total de la reacción 25 μ L) contuvieron 2 μ L de ADN total sin diluir (10–50 ng μ L⁻¹), 1 μ L de cada primer (10 mM), y 12.5 μ L de GoTaq master mix (Promega M7122, Madison, WI, USA). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador (MJ Mini Thermal Cycler, Bio-Rad, Foster City, CA, USA). Las condiciones de amplificación por PCR fueron 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 1 min cada uno, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min, y un paso final de elongación de 5 min a 72°C. Los productos de PCR fueron re-amplificados utilizando los iniciadores 344f (5'-ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA-3') (Raskin *et al.*, 1994) con una cola de GC adicionada en el extremo terminal 5' (Muyzer *et al.*, 1998), y 915r (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') (Stahl y Amann, 1991). Las condiciones de amplificación por PCR para dichos iniciadores fueron: 94°C por 5 min, 20 ciclos de 94°C por 30 s cada uno, 65–55°C por 45 s (reduciendo 0.5°C en cada ciclo), 72°C por 1.5 min, 10 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 45 s, 72°C por 1.5 min, y una extensión final a 72°C por 5 min (Stahl y Amann, 1991). Asimismo se amplificó el gen *mcrA* para incrementar la información (número de secuencias recuperadas) de arqueas metanógenas. Los iniciadores empleados fueron aquellos previamente diseñados por Luton *et al.* (2002). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C por 1 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s cada uno, 55–54.5°C (reduciendo 0.1°C en los primeros cinco ciclos) por 30 s cada uno, 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min.

Para lograr el objetivo 4 de esta tesis, se realizó La amplificación de segmentos específicos del gen 16S ARNr de cianobacterias y de bacterias sulfato reductoras, a partir de ADN extraído de muestras ambientales intactas e incubadas. Para el caso de cianobacterias se utilizaron los iniciadores CYA359F+GC y una mezcla equimolar de CYA781R(a) y

CYA781R(b) (Nübel *et al.*, 1997). La pareja de iniciadores, compuesta por 385F + GC (Amann *et al.*, 1992) Y 907R (Muyzer *et al.*, 1998), fue utilizada para amplificar selectivamente un segmento de 500 pb específico de bacterias sulfato reductoras. En todas las reacciones de PCR se utilizaron controles negativos y positivos para evaluar contaminación potencial.

Separación de productos de PCR por DGGE y clonación

Para realizar los objetivos 3 y 4 de esta tesis, los productos de PCR generados a partir de ADN extraído de muestras ambientales intactas, incubadas y de cultivos celulares enriquecidos, fueron separados por electroforesis de geles con gradiente desnaturizante (DGGE) utilizando una modificación del protocolo previamente publicado (López-Cortés *et al.*, 2008). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y documentados con un sistema de foto-documentación UV (BioDoc-It® Imaging System, GelDoc-It TS300, UVP, Upland, CA, USA). Los patrones de bandas fueron analizados con el programa GelCompare II 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), para calcular los coeficientes de correlación Dice y para generar dendrogramas por el método de UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*). Las bandas representativas en el gel, fueron cortadas con un bisturí estéril y el ADN fue eluido durante 24 hrs en agua ultra pura a 4 °C. Los ADN fueron re-amplificados con los mismos iniciadores que fueron originalmente amplificadas (previo a su corrimiento por DGGE), pero con únicamente 20 ciclos de amplificación, y secuenciados comercialmente por la técnica de Sanger. Para obtener un mayor número de secuencias de arqueas metanógenas, los productos de PCR del gen *mcrA* amplificados a partir de ADN de muestras naturales intactas (con los iniciadores de Luton *et al.* (2002), fueron purificados con el kit QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germantown, PA, USA), y posteriormente 1 -2 µL de producto de PCR purificado fueron ligados en el vector de clonación pCR®4-TOPO® y transformados químicamente en células competentes de TOP10 *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las colonias positivas (blancas) fueron inoculadas en 125 µL de medio líquido LB enriquecido con 8% (v/v) glicerol y carbenicilina (100 mg mL⁻¹), e

incubadas 24 hrs a 37 °C. La verificación del inserto fue realizada por PCR con los iniciadores M13F y M13R. El trabajo de secuenciación fue realizado por la empresa Sequetech (Mountain View, CA, USA) con la técnica de Sanger.

Diseño de iniciadores específicos de grupos (linajes filogenéticos) de Arqueas Metanógenas para la amplificación por PCR en tiempo real PCRC

Para lograr el objetivo 5, las secuencias obtenidas a partir de clonación de productos de PCR de muestras ambientales intactas fueron utilizadas para diseñar iniciadores de diferentes grupos filogenéticos de arqueas metanógenas para su detección y cuantificación en un sistema de PCR en tiempo real (PCRC) basado en el método de detección con SYBR Green I, con la especificidad necesaria para distinguir entre los diferentes grupos (Steinberg y Regan, 2009). Los diferentes iniciadores diseñados se muestran en la Tabla 5. Los iniciadores fueron diseñados con una temperatura de alineamiento de 55 a 65 °C, con un contenido de GC de 40 a 60%, y de una longitud de 23 a 30 pares de bases. El diseño de iniciadores fue realizado con la herramienta en línea “DesignStudio - Illumina” (<http://designstudio.illumina.com/>). La especificidad de los iniciadores fue verificada a través de búsquedas de BLAST en las bases de datos del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), y confirmada experimentalmente con controles positivos (ADN de la clona de referencia para la cual fueron diseñados los iniciadores) y negativos (ADN de diferentes linajes filogenéticos para los cuales no fueron diseñados los iniciadores). Los iniciadores fueron sintetizados comercialmente por la empresa Invitrogen.

Tabla 5. Secuencias de los iniciadores diseñados en este estudio para la cuantificación del número de copias del gen *mcrA* de distintos linajes filogenéticos de arqueas metanógenas, a través de PCRc.

Especificad	Clon de referencia (GenBank)	Tamaño producto (pb)	Clave	Secuencia del iniciador (5' - 3')
<i>Methanohalophilus</i>	A9_H02 (KF030709)	107	CL_A_F	GATATCGCAACAGAGTCCACACTTTACGG
			CL_A_R	GATACCATGCGGAGAGACCGGCATTTGC
<i>Methanohalobium</i>	H7_CO7 (KF030714)	108	CL_C_F	TCGTAGTTCTCAAGTCCGTAAAG
			CL_C_R	ATACAACAAAGCTGGAAAACCTG
Euriarqueota no cultivable	A1_A02 (KF030718)	118	CL_G_F	CGCAACTGAGTCCACCATCTACGGTATCG
			CL_G_R	AGCGGAACCAGCTGCTGCTGAA
Putativo hidrogenotrófico linaje L	A1_B11 (KF030719)	100	CL_L_F	TCGTAGCCGAAGAACCCGAGACGTGA
			CL_L_F	CCATCAGTACCGGAAACTCCAACGCCG
Putativo hidrogenotrófico linaje M	S3_11 (KF030715)	91	CL_M_F	TACAGCACCATACACCGACAACATCC
			CL_M_F	GTTCTGCCAGTCGACACCGTACT

Generación de ADNc a partir de ARN por transcripción reversa (RT)

Para el objetivo 5, el ARN total extraído de muestras ambientales intactas del sitio ESSA-A1, fue utilizado para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a través de una reacción de transcripción por la enzima transcriptasa-reversa. La síntesis de ADNc se realizó con el kit comercial QuantiTec Reverse Transcription Kit (QUIAGEN, USA). Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante para obtener 20 μ L de volumen final de reacción. El ADNc fue almacenado a -20 °C, para su posterior uso en la detección y cuantificación de secuencias específicas por qPCR.

Curvas estándar para qPCR

Las clonas seleccionadas como representantes de linajes filogenéticos (Tabla 5) fueron reactivadas y crecidas en medio líquido LB con carbenicilina (100 mg mL⁻¹). Se realizó la extracción de ADN plasmídico de cada uno de los cultivos siguiendo el protocolo del

fabricante del kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Las extracciones de ADN plasmídico fueron visualizadas en geles de agarosa al 1% y cuantificadas en Nanodrop. Dependiendo de las concentraciones obtenidas, se realizaron diluciones de 1:10 en agua destilada grado molecular, para generar series de diluciones en el intervalo de 1×10^9 hasta 1×10^2 copias por μL . Las curvas estándar fueron utilizadas para estimar el número de copias de *mcrA* de cada uno de los 5 diferentes linajes filogenéticos de AM para los cuales fueron diseñados los iniciadores.

Análisis de PCRc

Los PCRc se realizaron para el ADN de las muestras ambientales intactas e incubadas del sitio LSI-H7 y de ADN y ADNc de muestras ambientales intactas de ESSA-A1, para cubrir el objetivo 5 de esta tesis. La cuantificación del número de copias del gen *mcrA* de arqueas metanógenas, se realizó a través de la técnica PCRc anidado, utilizando el fluoróforo no específico SYBR Green I (Molecular Probes, Invitrogen). Primero se realizó una amplificación por PCRc con los mismos iniciadores que fueron utilizados para generar las bibliotecas de clones (Luton *et al.*, 2002), seguido de un segundo paso de PCRc donde los productos de PCRc resultantes del primer paso, sirvieron como molde para la segunda amplificación con los iniciadores específicos de linaje filogenético, diseñados en este estudio (Tabla 5). La aproximación de qPCR anidado se utilizó para incrementar la concentración inicial de número de copias del gen *mcrA* en las muestras y con ello asegurar la detección específica de cada grupo. Además, esta aproximación ha sido utilizada para garantizar la comparación entre los resultados de PCRc y clonación, ya que se ha observado previamente que la composición de las especies de AM pueden ser afectadas por un sesgo de la PCR dependiendo de los iniciadores utilizados (Tymensen y McAllister, 2012). Todas las mezclas de reacción fueron realizadas en un volumen final de $10 \mu\text{L}$, incluyendo $5 \mu\text{L}$ de 2x Master Mix, $0.5 \mu\text{L}$ de cada primer (10 mM), $1 \mu\text{L}$ de molde (ADN para el caso de los estándar y ADNc para las muestras problema) y $3 \mu\text{L}$ de agua grado molecular. La reacción fue seguida en un sistema de PCRc “Eco qPCR System” (Illumina, USA), con las

siguientes condiciones de amplificación: 15 s a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 30 s, extensión a 72°C por 45 s, y la captura de la imagen se realizó a los 72°C. Finalmente, se realizó un análisis de curva de fusión para evaluar la especificidad de los productos amplificados (para detectar la presencia de potenciales dímeros de los iniciadores), con el incremento de la temperatura de 50 a 95°C en incrementos de 0.5°C cada 15 segundos.

Análisis filogenéticos

Todas las secuencias de *mcrA* y del 16S ARNr fueron filtradas de acuerdo a su calidad (bajo número de ambigüedades y los picos de los fenogramas bien definidos), y recortadas en el programa Geneious 5.3 (Auckland, NZ). Posteriormente, las secuencias que mostraron al menos un 97% de similitud, fueron agrupadas (en linajes filogenéticos) con 97% de similitud, utilizando la herramienta en línea CD-HIT (Li y Godzik, 2006).

Para identificar las secuencias mas similares para posteriores análisis filogenéticos y para la construcción del árbol, se realizo una búsqueda en el NCBI (Genebank) (Altschul *et al.*, 1990) con las secuencias representativas de los diferentes linajes filogenéticos (identificadas con la herramienta CD-HIT). Las secuencias de *mcrA* fueron traducidas a secuencias de proteínas (McrA) con el programa Geneious 5.3 (Auckland, NZ), y exportadas a una base de datos personalizada de la proteína metil-coenzyma M reductasea subunidad alfa. Los alineamientos de las secuencias de McrA fueron realizados con el programa Clustal X 2.1 (Larkin *et al.*, 2007), utilizando los parámetros por default. Los alineamientos finales fueron verificados visualmente para descartar potenciales ambigüedades y porciones discontinuas del alineamiento. Con base en los valores de similitud bajos de BLAST y en las aberraciones de los alineamientos, se excluyeron dos secuencias putativas de McrA. El alineamiento final de las secuencias traducidas de McrA, incluyó 160 residuos de aminoácidos.

La reconstrucción filogenética de las secuencias de McrA se realizó utilizando máxima verosimilitud (ML) con el programa PhyML (Guindon *et al.*, 2010), aplicando el modelo de sustitución LG+G+F, que fue previamente seleccionado por el programa ProTest 2.4 (Abascal *et al.*, 2005). También se realizaron reconstrucciones filogenéticas mediante métodos Bayesianos (BA), para lo cual se utilizó el programa MRBAYES 3.2.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Para los análisis de BA se utilizó el mismo modelo de sustitución de proteínas que el elegido para análisis de ML. La longitud de la cadena para todos los análisis de BA fue de 5×10^6 generaciones, con tres muestreos cada 100 generaciones. El 10% inicial de cada corrida se excluyó (*burnin*). Para verificar la reconstrucción de los árboles se emplearon métodos de bootstrap (para ML) y probabilidades posteriores (para BA) de los nodos de las ramas, indicándolos únicamente cuando fueron soportados por ambos métodos (ML y BA).

La filogenia del 16S ARNr consideró 476 posiciones. El análisis del programa Mallard (Ashelford *et al.*, 2006) no detectó ninguna secuencia quimérica. La filogenia del gen 16S ARNr fue construida por el método de neighbor-joining (NJ), con el modelo Jukes-Cantor, distribución gama y delección parcial, disponibles en el programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011), con análisis de máxima parsimonia (MP) con una búsqueda heurística utilizando el algoritmo de intercambio TBR en el programa PAUP* (Swofford, 2003). Las proporciones de bootstrap de NJ y MP fueron calculadas utilizando 1000 réplicas. Todas las secuencias representativas fueron depositadas en GenBank, bajo los siguientes números de acceso: secuencias de *mcrA* HQ131850 - HQ131869; JF836052; JF836061 - JF836067; KF030705–KF030719; secuencias del 16S ARNr KF309676–KF309697.

Un esquema que muestra los métodos utilizados en este estudio se presenta en la Fig. 5.

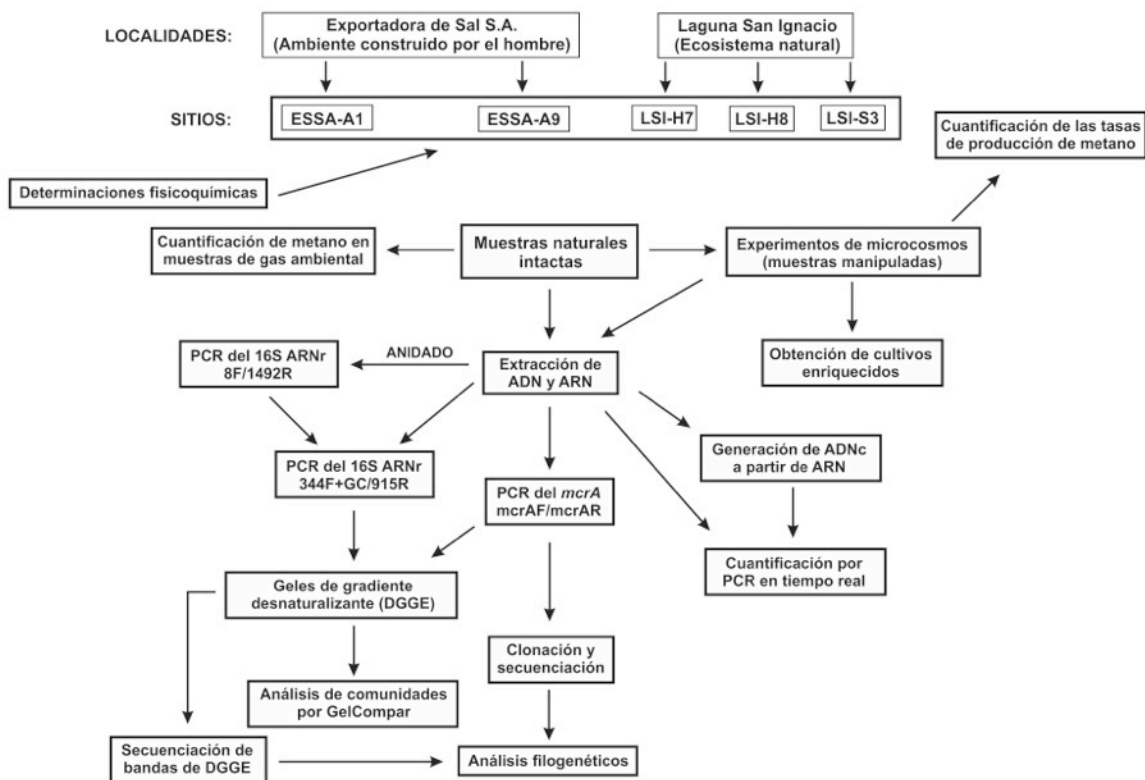


Fig. 5. Diagrama de flujo de los métodos utilizados en este trabajo.

RESULTADOS

Metanogénesis en ambientes hipersalinos: parámetros fisicoquímicos y concentraciones de metano

Se detectaron porcentajes de metano en muestras de gas ambiental proveniente de sedimentos de los cinco sitios hipersalinos de la península de Baja California (Tabla 6). Los porcentajes estuvieron en un intervalo de 0.188–25.817 %. Los sitios del ecosistema construido por la humanidad Exportadora de Sal S.A. (ESSA-A1 y ESSA-A9) presentaron porcentajes de metano (4.94 - 25.81 %) significativamente mayores (ANDEVA $p < 0.001$) en comparación con aquellos valores de metano detectados en los sitios del ecosistema natural LSI-H8, LSI-H7 y LSI-S3 (0.18 - 0.29 %). La prueba de Tukey sugirió que los porcentajes de metano estadísticamente distintos fueron aquellos detectados para los sitios de ESSA. Los parámetros fisicoquímicos de los sitios donde se detectó metano, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones fisicoquímicas asociadas con metanogénesis en cinco sitios hipersalinos de Baja California Sur, México. Se muestran las desviaciones estándar. Sal. = Salinidad. TOC = Carbono orgánico total.

	Sal. (%)	Sulfato (mM)	Temp. (°C)	Sulfato (g/kg)	TOC (%)	Metano (%)
	Salmuera			Sedimentos		Gas
Laguna San Ignacio						
LSI-H7	5.8	46.39 ± 0.17	35	3.009 ± 0.79	0.60 ± 0.17	0.28 ± 0.15
LSI-H8	22	106.93 ± 3.01	37	3.846 ± 0.90	0.76 ± 0.11	0.18 ± 0.06
LSI-S3	28	38.31 ± 3.52	31	6.350 ± 0.23	1.76 ± 0.15	0.29 ± 0.07
Guerrero Negro						
ESSA-A1	6	46.09 ± 0.45	20	3.687 ± 0.51	5.43 ± 3.69	4.94 ± 0.23
ESSA-A9	17	104.12 ± 16.2	22	5.438 ± 0.11	0.33 ± 0.11	25.81 ± 2.91

Caracterización de la respuesta metanogénica en experimentos de microcosmos

Valoración del uso de sustratos metanogénicos

En el experimento de incubación de muestras de tapetes microbianos de los sitios ESSA-A1, LSI-H7 y LSI-H8, con diferentes sustratos metanogénicos (competitivos y no competitivos), la metanogénesis no fue estimulada con la adición de H_2/CO_2 , formiato ni acetato; tampoco el tratamiento de inhibición de la actividad sulfato reductora estimuló la producción de metano. Solo la adición de TMA y metanol mostraron una estimulación en la producción de metano, en comparación con los controles (muestras incubadas con salmuera de la localidad sin la adición de sustrato) (Fig. 6). Las tasas de producción de metano de los muestras estimuladas con la adición de TMA fueron significativamente mayores (ANDEVA $p < 0.001$) en comparación con el resto de los tratamientos (sustratos).

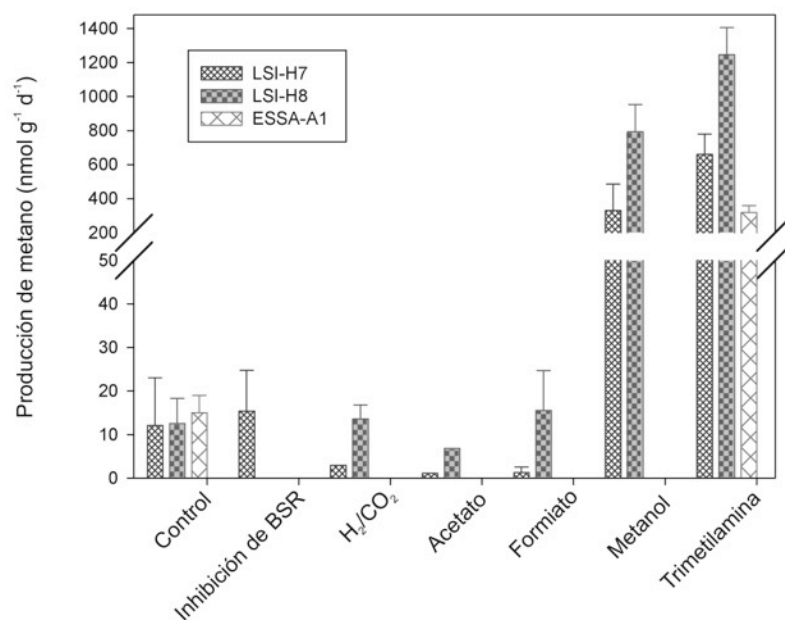


Fig. 6. Tasas de producción de metano de muestras de tapetes microbianos hipersalinos de los sitios LSI-H7 y LSI-H8 de Laguna San Ignacio, y ESSA-A1 de Exportadora de Sal S.A. en Guerrero Negro, B.C.S., enriquecidos con salmuera de la localidad y con sustratos metanogénicos competitivos y no competitivos. Las barras de error indican una desviación estándar sobre la media de dos muestras por duplicado. BSR = bacterias sulfato reductoras.

Efecto de la salinidad, concentración de sulfato y de la adición de TMA sobre la producción de metano en experimentos de microcosmos

En el experimento de incubación (microcosmos) para valorar la de la reducción de la salinidad y sulfatos, así como la adición de TMA sobre la producción de metano en muestras de tapetes microbianos hipersalinos colectados en noviembre de 2012, (objetivo 2), se observó que la adición de TMA estimuló significativamente (ANDEVA $p < 0.001$) la producción de metano en todas las muestras estudiadas en comparación con aquellas muestras incubadas sin la adición de sustratos y sin ninguna modificación en las concentraciones de salinidad ni de sulfato (control) (Fig. 7), demostrando la presencia y actividad de metanogénesis metilotrófica, además sugiere una potencial limitación de sustrato en los ecosistemas hipersalinos estudiados. El tratamiento de reducción de salinidad y sulfato para el sitio ESSA-A1, con valores de 3% y 28 mM, respectivamente, también resultó en la estimulación de la producción de metano ($894.3 \pm 375.6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Fig. 7). Por su parte, las tasas de producción de metano para muestras del sitio LIS-S3, incubadas en las mayores concentraciones de salinidad y sulfatos (28% y 263 mM, respectivamente), fueron significativamente menores (valor máximo de $30.1 \pm 8.3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) que para el resto de las muestras de los otros sitios, denotando la importancia de dichos parámetros en condiciones naturales, y sugiriendo esos valores como potenciales límites superiores de tolerancia a la salinidad y concentraciones de sulfatos en los cuales la metanogénesis puede operar en la naturaleza.

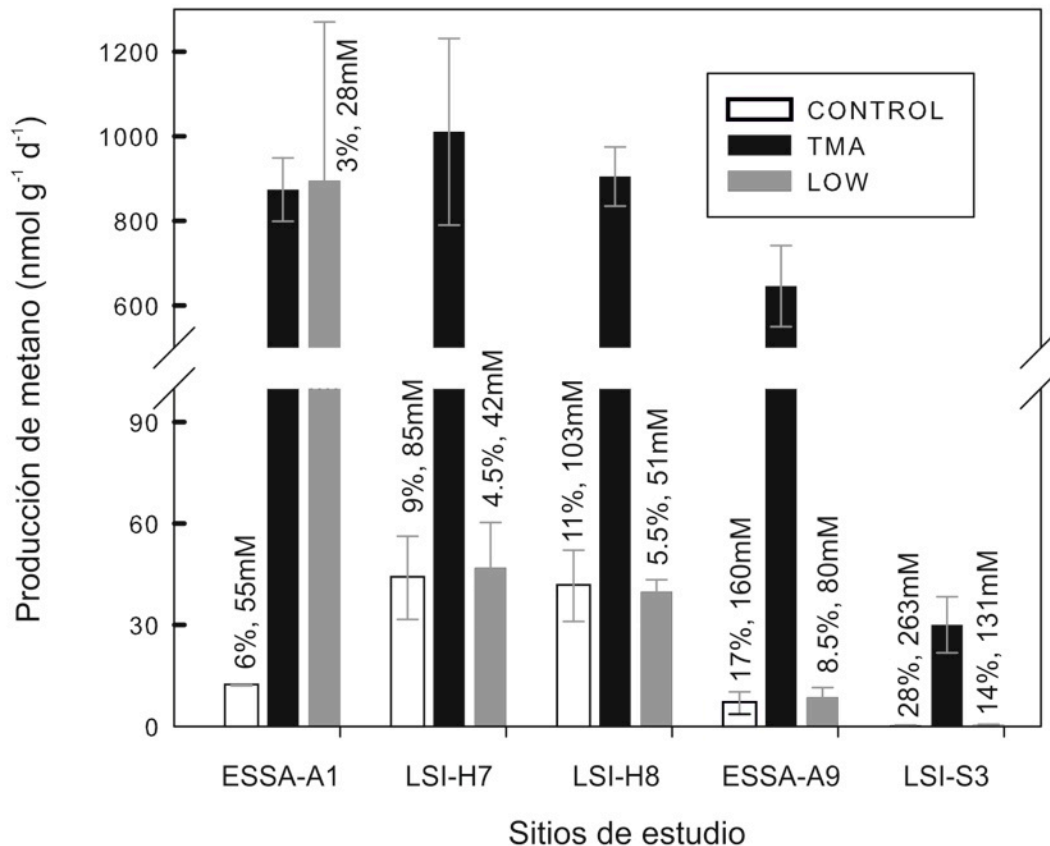


Fig. 7. Tasas de producción de metano obtenidas en experimentos de microcosmos. Las concentraciones de salinidad (%) y de sulfatos (mM) de las salmueras artificiales utilizadas para las diferentes muestras, se indican arriba de las barras.

Composición de la comunidad de arqueas metanógenas a través del aislamiento de cultivos enriquecidos (estrategia cultivo dependiente)

A partir de las muestras de LSI del experimento de microcosmos de valoración del uso de sustratos metanogénicos, se obtuvieron cinco cultivos enriquecidos de AM. Se observó crecimiento microbiano (verificado por turbidez del medio de cultivo) en todas las diluciones realizadas (10^0 - 10^{-6}), sin embargo únicamente se trabajó con las diluciones de 10^{-6} debido a que las observaciones de microscopía con epifluorescencia mostraron distintas morfologías celulares (cocos irregulares, angulares, poligonales) mezcladas para

cada cultivo enriquecido, por lo tanto se procedió a verificar su pureza (potencial contaminación con diferentes grupos microbianos) por DGGE del 16S ARNr y del *mcrA*. La presencia de más de una banda en los geles (Fig. 8), sugiere que los enriquecimientos requieren ser nuevamente sometidos a diluciones seriadas para lograr el aislamiento de cepas puras de AM. No se logró la identificación de las arqueas metanógenas que conforman los cultivos enriquecidos debido a problemas con la secuenciación de las muestras, sin embargo, la detección de una banda de *mcrA* en diferente posición en el gel (Fig. 8 AM_5) en comparación con las demás, sugiere que potencialmente los el cultivo enriquecido AM_5 puede ser distinto en su composición de AM.

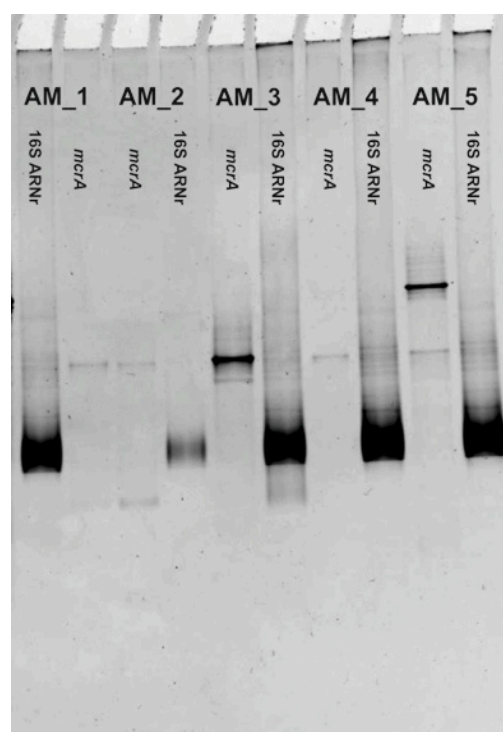


Fig. 8. DGGE del 16S ARNr y del gen *mcrA* de 5 cultivos enriquecidos de arqueas metanogénicas (AM), obtenidos a partir de las muestras de LSI del experimento de microcosmos de valoración del uso de sustratos metanogénicos, para la verificación del número de unidades taxonómicas operativas (OTU's) de cada uno de los cultivos enriquecidos. Las claves de cada uno de los cinco cultivos enriquecidos se muestran en la parte superior de la imagen.

Composición de la comunidad de arqueas metanógenas a través de la recuperación de secuencias de ADN que codifican para los genes 16S ARNr y *mcrA* de muestras intactas y manipuladas experimentalmente (estrategia cultivo independiente)

Análisis de DGGE del gen que codifica para el 16S ARNr, amplificado con iniciadores específicos para el Dominio Arquea

Las huellas digitales (*fingerprints*) detectadas por DGGE de productos de PCR del gen que codifica para el 16S ARNr, sugieren que la comunidad de arqueas, tanto en muestras intactas como aquellas muestras que fueron incubadas en el experimento de reducción de salinidad y sulfato, presenta una alta riqueza de unidades taxonómicas operacionales (OTU's). Se detectó de 12 a 16 unidades taxonómicas operativas en las muestras intactas. El número, posición e intensidad de las bandas de DGGE fueron diferentes entre los sitios (Fig. 9). Los análisis de GelCompare (coeficiente de similitud Dice – dendrograma basado en UPGMA) de las huellas digitales de DGGE mostraron una heterogeneidad en los patrones de bandas de la comunidad de arquea para todos los sitios (Fig. 9).

Por su parte, los patrones de bandas de DGGE de muestras incubadas fueron similares a sus respectivos controles (muestras naturales), sin embargo, la adición de TMA generó bandas intensas y distintivas, en comparación con el tratamiento control sin TMA (e.g., banda 8 de LSI-H7 y banda 15 de ESSA-A1; Fig. 9). Las secuencias de ADN obtenidas para el gen 16S ARNr de dichas bandas intensas y distintivas fueron idénticas (100%) a las secuencias de *Methanohalophilus halophilus* (moderadamente halofílico), obtenidas del GenBank, sugiriendo que las condiciones de incubación fueron favorables para estos microorganismos, o que dicha especie puede ser considerada como abundante y probablemente dominante en los ecosistemas estudiados.

Se recuperaron 22 secuencias del 16S ARNr a partir de bandas recortadas de DGGE, de las cuales, 19 fueron agrupadas en 8 linajes filogenéticos (clusters), basándose en su similitud

mayor al 97%. El número de secuencias y banda de procedencia de cada linaje filogenético se presenta en la Tabla 7. Los análisis filogenéticos de las secuencias del 16S ARNr tanto por NJ como por MP presentaron topologías similares y el árbol que se presenta está basado en NJ (Fig. 10). El árbol mostró que la mayoría de las secuencias estuvieron afiliadas con el clado de Halobacteriales basado en análisis de BLAST (Fig. 10), un grupo que incluye a la mayoría de los miembros halófilos de Arquea, presentes en las salmueras que recubren los sedimentos hipersalinos muestreados (Oren, 2008). Con la aproximación de DGGE se reconocieron secuencias del 16S ARNr que los análisis filogenéticos mostraron que están relacionadas con los géneros *Halorubrum*, *Halorhabdus*, *Haladaptus*, *Halorussus*, *Haloterrigena*, *Natrinema* y *Haloterrigena*, debido a que formaron agrupaciones coherentes y bien soportadas en el árbol por los dos métodos utilizados (NJ y MP) (Fig. 10). Algunas de las secuencias del 16S ARNr fueron categorizadas como Euryarchaeota no cultivables ni clasificadas, debido a su bajo porcentaje de similitud con especies relacionadas de Arqueas halófilas cultivables, y por su agrupación en el árbol con secuencias del GenBank descritas bajo dicha categoría.

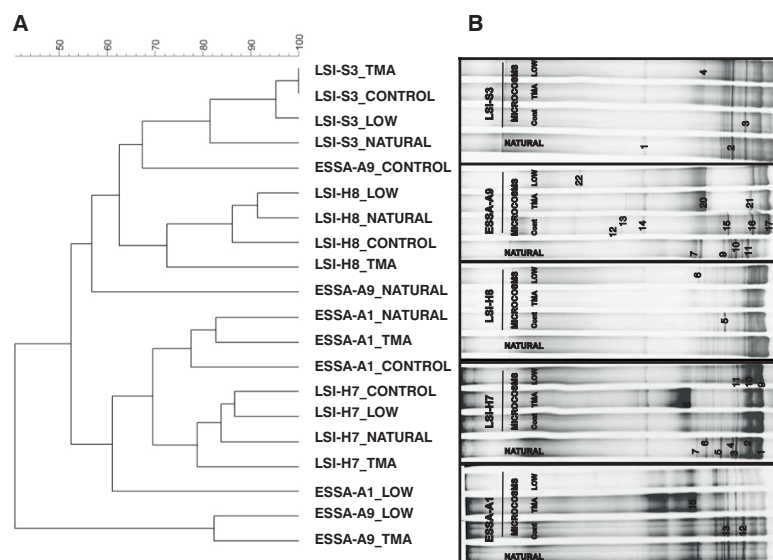


Fig. 9. (A) Dendrograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del gen 16S ARNr del Dominio Arquea, obtenidos a partir de muestras intactas (NATURAL) y manipuladas experimentalmente (en experimentos de microcosmos: tratamientos CONTROL, TMA y LOW). (B) Patrones de bandas de DGGE de muestras intactas y manipuladas experimentalmente. Los números en el gel indican las bandas secuenciadas.

La información generada a cerca de la composición de la comunidad metanogénica en tapetes microbianos hipersalinos a través de la recuperación de secuencias de ADN que codifican para los genes 16S ARNr de muestras intactas y manipuladas experimentalmente (objetivo 3), estuvo restringida a la detección de tres secuencias de *Methanohalophilus halophilus* (linaje filogenético 3), las cuales fueron recuperadas a partir de muestras que fueron sometidas al tratamiento de adición de TMA (Tabla 7), es decir, que con esta aproximación no se pudo obtener información de la composición de arqueas metanógenas en muestras intactas, por lo que se procedió a realizar los análisis con el gen específico de este grupo (*mcrA*).

Tabla 7. Número de secuencias de ADN del gen 16S ARNr específico del Dominio Arquea, que componen cada uno de los 8 linajes filogenéticos detectados. Se describe la banda de DGGE de procedencia de las secuencias.

Clave del linaje filogenético	Número de secuencias que conforman cada linaje	Sitio	Clave de banda
1	2	LSI-H7	9, 10
2	1	LSI-H8	6
	1	ESSA-A9	22
3	1	LSI-H7	2
	1	LSI-H8	5
	1	ESSA-A1	15
4	1	ESSA-A9	20
	1	LSI-H7	8
5	2	ESSA-A9	12, 13
6	2	ESSA-A9	15, 16
7	2	ESSA-A9	14, 17
8	2	LSI-S3	1, 4
	2	LSI-H7	3, 5

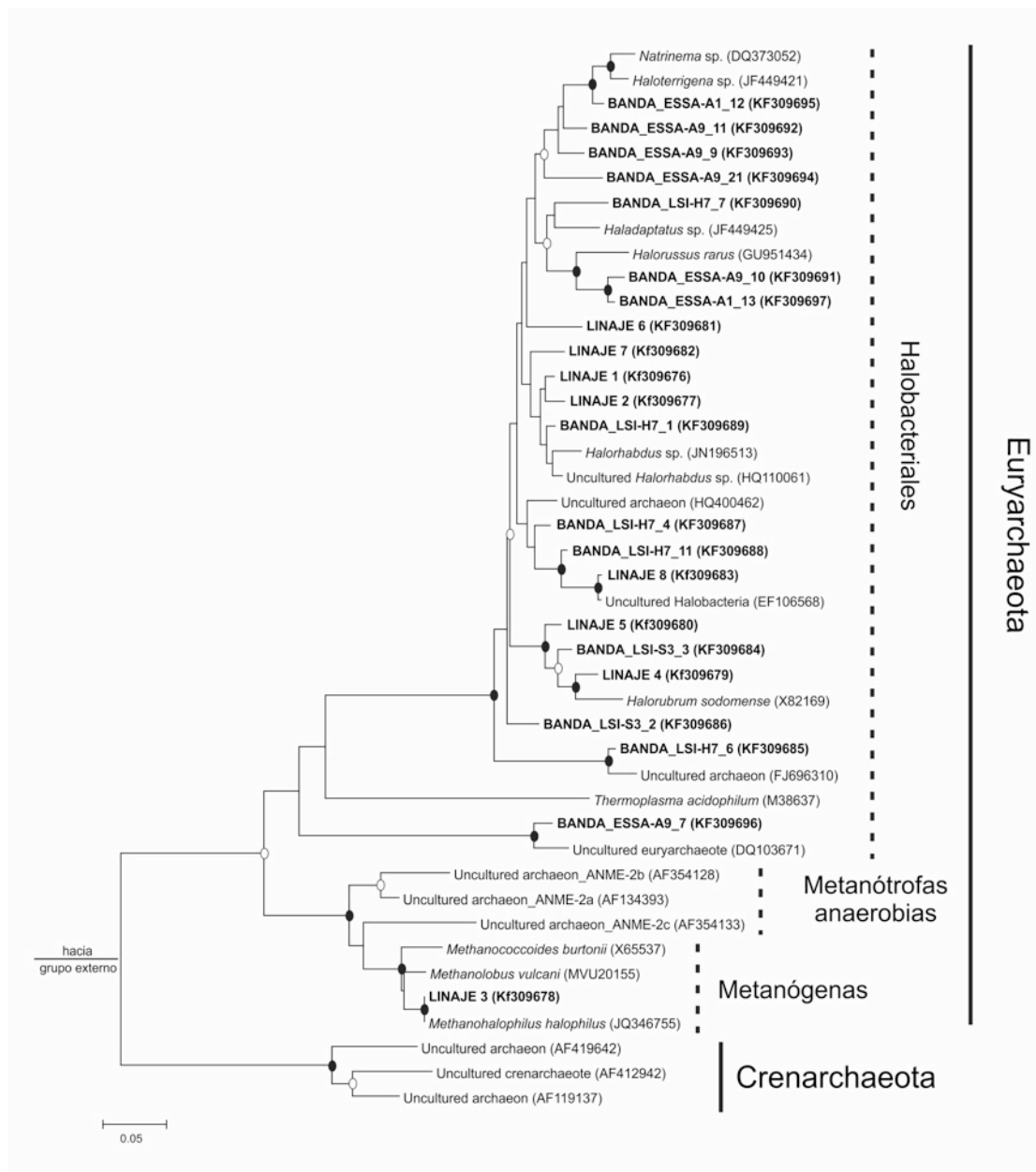


Fig. 10. Árbol construido con el método de neighbor-joining (NJ), basado en comparaciones de secuencias de ADN del gen 16S ARNr recuperadas a partir de bandas de DGGE. Los nodos de las ramas que fueron soportados por análisis filogenéticos de NJ y máxima parsimonia (MP) con valores de bootstrap >95% se indican con círculos negros rellenos. Los círculos vacíos indican soporte de bootstrap entre 75 - 95%. Los nodos de las ramas sin círculos presentaron valores de bootstrap <75%. El árbol fue enraizado con una secuencia ambiental relacionada con el Dominio Bacteria. Los números de acceso de GenBank de las secuencias representativas de cada linaje se indican en paréntesis. La barra de escala representa 0.05 cambios por posición de nucleótido.

Análisis de DGGE del gen *mcrA*

Las muestras de los sitios LSI_H7 y LSI-H8 que se sometieron al experimento de valoración del uso de sustratos metanogénicos, fueron utilizadas para realizar el análisis de comunidades de AM a través de DGGE y secuenciación del gen *mcrA*. Los iniciadores originales de Luton (Luton *et al.*, 2002), fueron modificados, adicionándoles una cola de GC en el extremo 5' (Muyzer *et al.*, 1998) para utilizarlos en DGGE. Los análisis de *mcrA*-DGGE mostraron que las muestras del sitio LSI-H7 presentaron un patrón de bandas más complejo que las del sitio LSI-H8, y que el sustrato TMA favoreció el desarrollo de AM para ambos sitios. Una banda común fue detectada en todas las muestras (Fig. 11).

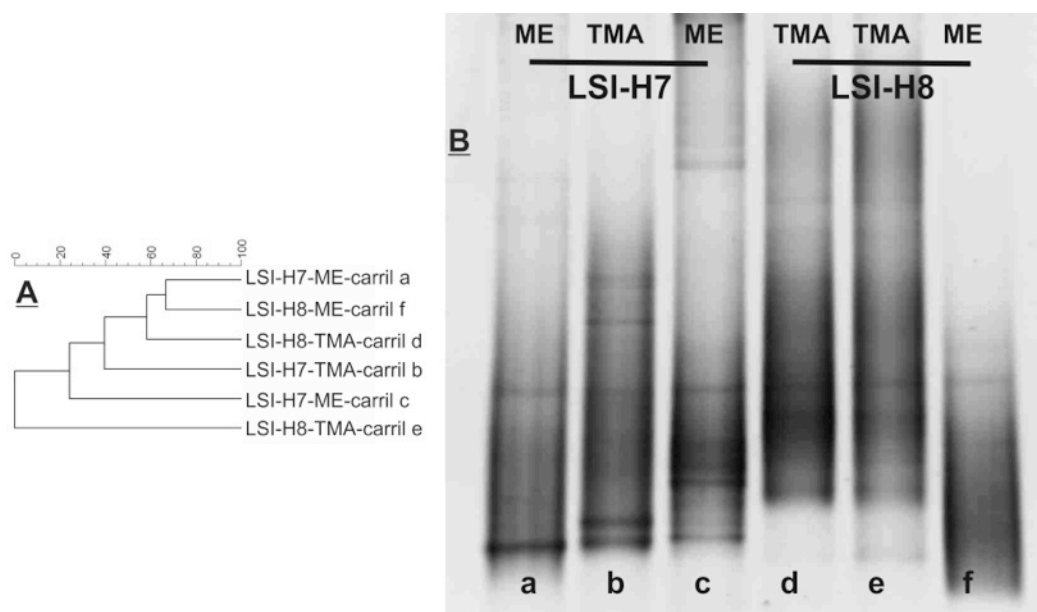


Fig. 11. Análisis de patrones de bandas de DGGE de productos de PCR del gen *mcrA*, obtenidos a partir de muestras manipuladas experimentalmente (microcosmos) de los sitios LSI-H7 y LSI-H8. A. Dendrograma obtenido con el porcentaje de similitud entre los patrones de bandeado calculado por el método Dice-UPGMA. B. Patrones de bandas de DGGE del gen *mcrA* de muestras incubadas y complementados con medio de cultivo con dos diferentes sustratos; ME= metanol; TMA = trimetilamina. La escala representa los índices de similitud de Dice. Los carriles a y c son muestras duplicadas del sitio LSI-H7. Los carriles d y e son muestras duplicadas del sitio LSI-H8.

Las muestras de ESSA-A1, LSI-H7, LSI-H8 y LSI-S3 empleadas para el experimento de microcosmos de reducción de salinidad y sulfatos, fueron utilizadas para realizar el análisis de comunidades de AM por DGGE con los primers originales de Luton (Luton *et al.*, 2002). En la Fig. 12 se muestra la separación de productos de PCR del gen *mcrA*. Se detectaron de 3 -10 unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Los análisis por GelCompare mostraron una heterogeneidad en la comunidad de AM para los sitios ESSA-A1 y LSI-H7, ya que los patrones de bandas para cada sitio fueron distintivos y formaron sus propias agrupaciones. Los sitios LSI-H8 y LSI-S3 presentaron similitud entre alguna de sus muestras, como fue el caso de LSI-S3_LOW y LSI-H8_NATURAL, que se agruparon en un grupo separado presentando 80% de similitud entre ellas (Fig. 12).

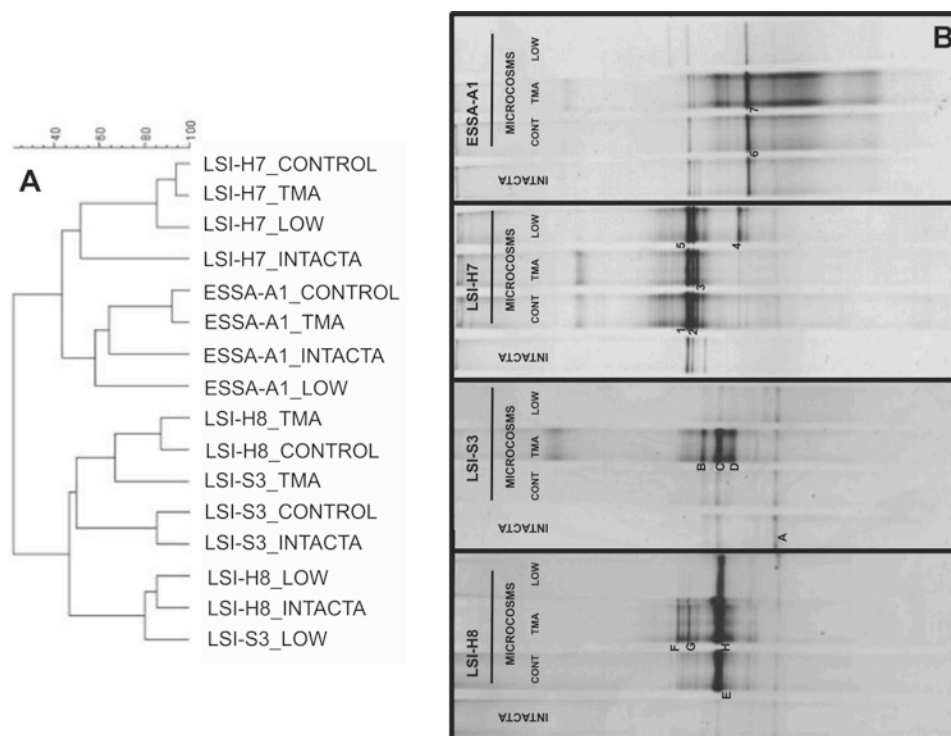


Fig. 12. Análisis de patrones de bandas de DGGE de productos de PCR del gen *mcrA*, obtenidos a partir de muestras intactas y manipuladas experimentalmente (microcosmos) de los sitios ESSA-A1, LSI-H7, LSI-H8 y LSI-S3. A. Dendrograma obtenido con el porcentaje de similitud entre los patrones de bandeado calculado por el método Dice-UPGMA. B. Patrones de bandas de DGGE del gen *mcrA*. CONTROL = muestras incubadas con salmuera artificial con las condiciones de salinidad y sulfato similares a su condición natural y sin la adición de trimetilamina. TMA = tratamiento de incubación con la adición

de trimetilamina; LOW = tratamiento de incubación con salmuera artificial reducida en salinidad y concentración de sulfato. La escala representa los índices de similitud de Dice. Las letras y números dentro del gel indican las claves de las bandas secuenciadas.

Clonación de productos de PCR del gen *mcrA* amplificado a partir de muestras intactas de los cinco sitios de estudio

Para incrementar la información a cerca de la composición de arqueas metanógenas en muestras intactas, se realizaron análisis de clonación de productos de PCR del gen *mcrA*.

Un total de 187 secuencias parciales (480 pares de bases) del gen *mcrA* fueron generadas en este estudio: 29 a partir de bandas de DGGE y 158 a partir de bibliotecas de clones de muestras intactas de los cinco sitios de estudio. Las 187 secuencias fueron agrupadas en 6 grupos basándose en los resultados de similitud de BLAST (>97 %): 34.% de todas las secuencias fueron designadas como *Methanohalophilus* (halófilo moderado), 22.5 % como *Methanohalobium* (halófilo extremo), 20.8% como putativos hidrogenotróficos, 13.4% como Euryarchaeota no clasificado (debido a que estas secuencias no empataron con ningún género cultivable), 8% como *Methanolobus* (marino), y 1.1% como *Methanococcoides* (halófilo ligero) (Fig. 13). Se observaron diferencias en diversidad y abundancias de secuencias de *mcrA* entre los sitios estudiados (Fig. 13). En este estudio se reportan por primera vez secuencias similares al género *Methanohalobium* para los sitios estudiados.

Para facilitar los análisis filogenéticos, las 187 secuencias del gen *mcrA* fueron agrupadas en 13 linajes filogenéticos utilizando la herramienta CD-HIT, se seleccionó una secuencia representativa de cada grupo y se tradujo a aminoácidos para la elaboración de árboles filogenéticos. Se obtuvieron topologías similares con los dos métodos utilizados (ML y BA), y se decidió utilizar la topología del árbol arrojado por ML para elaborar la Figura 14. El árbol mostró que las secuencias de McrA están relacionados con siete clados filogenéticos de arqueas metanógenas: cinco dentro del orden nutricionalmente versátil Methanosarcinales, y dos relacionados con el orden Methanomicrobiales (Fig. 14). Los

detalles (número y técnica de procedencia) de cada uno de los trece linajes filogenéticos se muestran en la Tabla 8. Se detectaron 39 secuencias de *mcrA* relacionadas con AM putativamente hidrogenotróficas, en muestras de los sitios ESSA-A1, LSI-H8 y LSI-S3, a través de clonación. Dichas secuencias resultaron distribuidas en dos clados filogenéticos bien soportados (linajes L y M), los cuales fueron distantemente relacionados con miembros de AM estrictamente hidrogenotróficas del Orden *Methanomicrobiales* (Fig. 14).

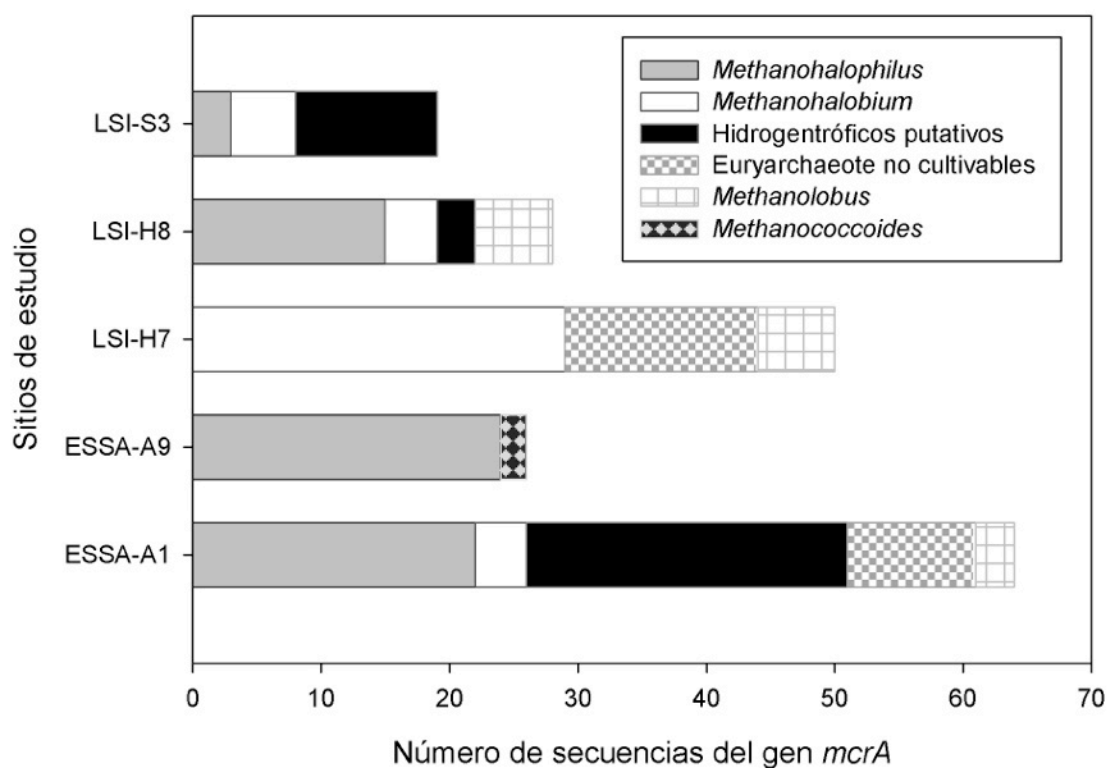


Fig. 13. Composición de la comunidad de arqueas metanógenas de ambientes hipersalinos de Baja California Sur, México, basándose en los resultados de similitud de análisis de BLAST (>97 %).

Tabla 8. Número de secuencias del gen *mcrA* que conforman los 13 linajes filogenéticos obtenidos con la herramienta CD-HIT. Se muestra en detalle cuantas secuencias fueron recuperados por la aproximación de DGGE, por clonación y el sitio de estudio de su procedencia.

Linaje filogenético	Número de secuencias del gen <i>mcrA</i>			
	Clonación	Sitio	DGGE	Sitio
A	19	ESSA-A9		
B	11	ESSA-A1		
	5	ESSA-A9		
	9	LSI-H8		
C	3	LSI-S3		
	14	LSI-H7		
	4	ESSA-A1		
D			4	LSI-S3
			4	LSI-H8
			2	LSI-H7
E	11	LSI-H7	2	LSI-H7
			1	LSI-S3
F	2	ESSA-A9		
G	5	LSI-H7		
H	10	ESSA-A1		
I			2	LSI-H7
J	6	LSI-H8	1	LSI-H7
K			6	LSI-H7
L	12	ESSA-A1		
	7	LSI-S3		
	3	LSI-H8		
M	13	ESSA-A1		
	4	LSI-S3		



Fig. 14. Árbol filogenético construido con Máxima Verosimilitud (Maximum-likelihood; ML), basado en comparaciones de secuencias inferidas de aminoácidos del gen *mcrA* de arqueas metanógenas de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos. Los nodos de las ramas soportados tanto por análisis filogenéticos con valores de bootstrap >95% por ML, y por probabilidades posteriores >0.95 por Análisis Bayesianos (BA), se indican con círculos negros rellenos. Los círculos vacíos indican soporte de bootstrap entre 75 y 95% por ML, o soporte de probabilidades posteriores entre 0.75 - 0.95 por análisis de BA. Los nodos de las ramas sin círculos presentaron valores de bootstrap <75% y probabilidades posteriores <0.75. El árbol fue enraizado con una secuencia ambiental relacionada con el Grupo I de Arqueas Oxidadoras de Metano (ANME-1). Los números de acceso de GenBank de las secuencias representativas de cada linaje están indicados en paréntesis. La barra de escala representa 0.2 cambios por posición de aminoácido.

Cuantificación del número de copias del gen *mcrA* por qPCR

Para realizar el objetivo 5 de esta tesis, se realizaron curvas estándar para los análisis de PCR en tiempo real (PCRc) con SYBR green I. Las diluciones seriadas de clones de cinco

diferentes linajes filogenéticos (Tabla 5) fueron utilizados como estándares para los análisis de los iniciadores específicos de grupos filogenéticos. Las curvas estándar fueron analizadas por triplicado y se calcularon las medias y desviaciones estándar a partir de los todos los datos. Se obtuvieron resultados similares para cada curva estándar entre los distintos análisis, con una pendiente promedio de -3.653, eficiencia promedio de 93.2%, intercepto de y promedio de 32.23, y una R^2 promedio de 0.9921.

Los iniciadores fueron analizados en triplicado para valorar su especificidad, y la detección reproducible de su amplificación con diluciones seriadas de clones utilizados como estándares para cada iniciador. La amplificación y detección fue diferente para los diferentes iniciadores, con eficiencias en el intervalo de 91 a 99%. Se obtuvieron intercepciones de y similares para cada primer, sugiriendo que las cinco parejas de iniciadores presentaron sensibilidad similar para sus respectivos grupos objeto. Los análisis de qPCR con los mismos iniciadores fueron similares para todos los análisis, lo cual demostró la reproducibilidad del método. No se obtuvieron amplificaciones en ninguno de los controles negativos (ADN de otro linaje filogenético) y blanco, lo cual corroboró la especificidad de los iniciadores con los grupos filogenéticos para los cuales fueron diseñados.

El número de copias del gen *mcrA* de diferentes grupos específicos de AM, fue analizado en muestras de ADN de muestras naturales intactas y proveniente de manipulaciones en microcosmos de tapetes microbianos del sitio LSI-H7. De manera general, el número de copias del gen *mcrA* detectado en muestras naturales del sitio LSI-H7 fue un orden de magnitud menor que los detectados para las muestras manipuladas experimentalmente (Fig. 15). Los miembros del género *Methanohalophilus* fueron siempre detectadas tanto en muestras naturales intactas como manipuladas. AM putativas hidrogenotróficas del linaje L fueron observadas en bajas abundancias (número de copias) en la muestra natural y en el tratamiento control; sin embargo, en el tratamiento low (reducción de salinidad y sulfatos) se detectó un incremento en las abundancias de este linaje. En el tratamiento con adición de

TMA se observó una dominancia de miembros de *Methanohalophilus* y de organismos no cultivables Euryarqueota. Las AM putativamente hidrogenotróficas correspondientes al linaje M no fueron detectadas en ninguna muestra para este sitio.

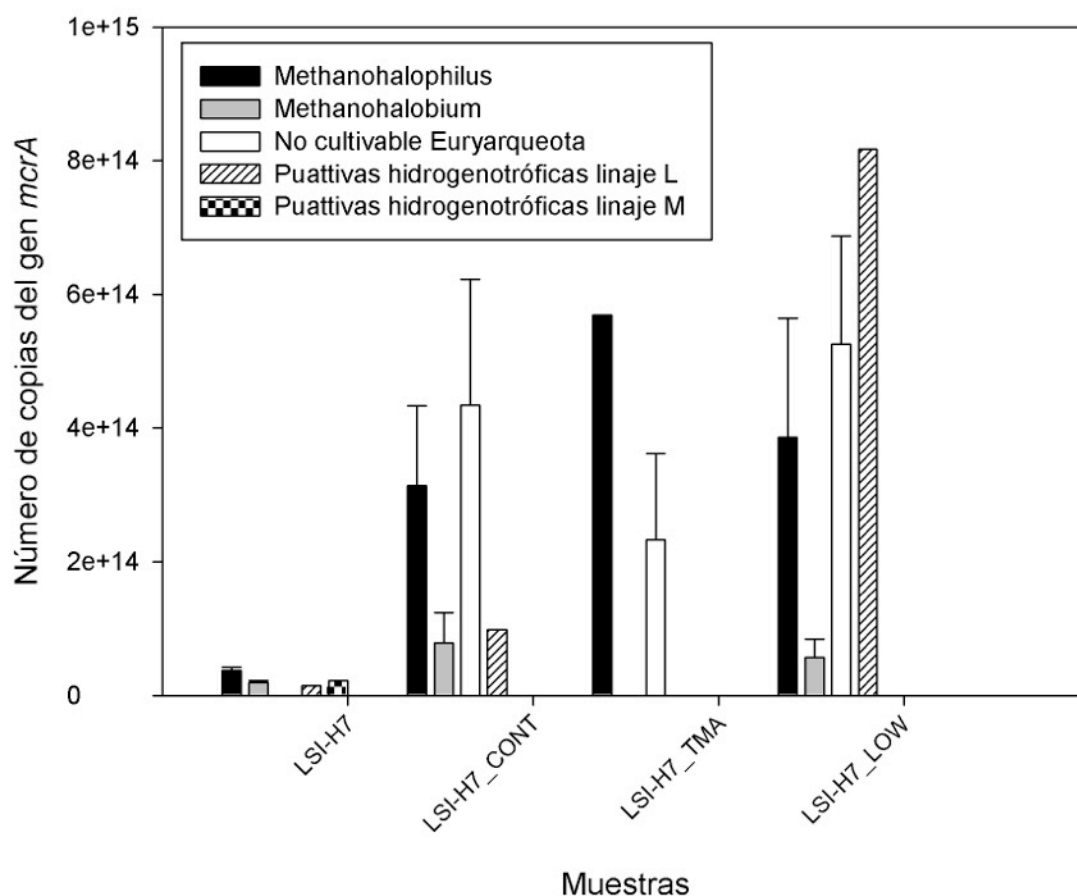


Fig. 15. Cuantificación del número de copias del gen *mcrA* en muestras naturales y manipuladas del sitio LSI-H7.

Se realizó la cuantificación del número de copias del gen *mcrA* en muestras de ADNc y ADN obtenidos a partir únicamente de muestras naturales del sitio ESSA-A1. Se logró la detección de *Methanohalophilus*, *Methanohalobium* y putativos hidrogenotróficos de los linajes L y M, para ambas muestras (Fig. 16). Sin embargo, los valores encontrados para la muestra ADNc siempre fueron menores (pero detectables) que aquellos detectados para la

muestra de ADN. El grupo de Euryarqueota no cultivables, fue detectado únicamente para la muestra de ADNc pero en valores muy bajos (1.77×10^{10}) (Fig. 16).

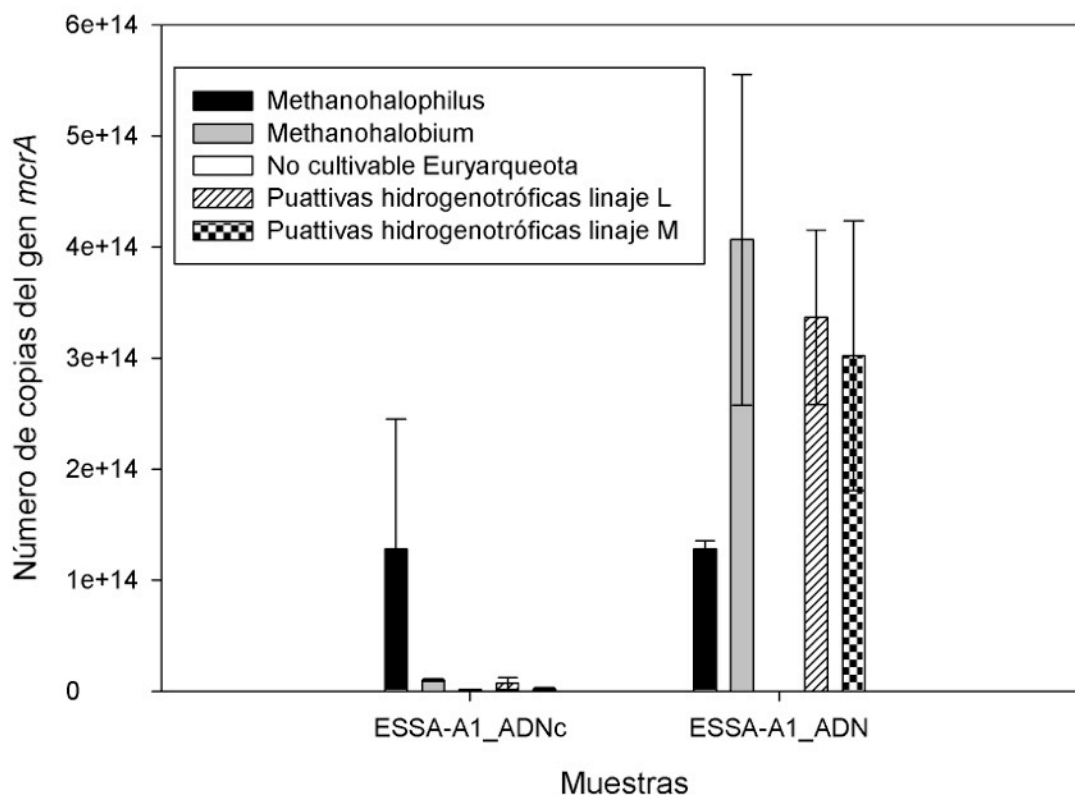


Fig. 16. Cuantificación del número de copias del gen *mcrA* en muestras naturales de ADN y ADNc del sitio ESSA-A1.

Análisis de la comunidad de Bacterias Sulfato Reductoras de muestras naturales y manipuladas, a través de patrones de bandas de DGGE del gen 16S ARNr.

*Nota: Como parte de mi formación doctoral, participé como parte del comité tutorial de la tesis de licenciatura de Santiago Cadena Rodríguez, contribuyendo con generación de ideas, diseño de experimentos así como en la capacitación y monitoreo del trabajo experimental. Por lo tanto, algunos de los resultados que se muestran a continuación se lograron en colaboración con el estudiante de licenciatura.

Para estudiar el objetivo 4 de esta tesis, se procedió a evidenciar potenciales cambios en la estructura de la comunidad de bacterias sulfato reductoras (BSR) bajo condiciones de incubación con baja salinidad y sulfatos (tratamiento LOW), se realizaron análisis de DGGE de productos de PCR amplificados con un iniciador R universal para bacterias Gram positivas (Muyzer *et al.*, 1993) y un iniciador F previamente diseñado específicamente para BSR (Amann *et al.*, 1992). Únicamente se logró obtener información de los sitios LSI-S3, H8, H7 y ESSA-A1 (Fig. 17). Cada sitio formó agrupaciones individuales, y se observó que las comunidades de los sitios de LSI son diferentes a la de ESSA, debido a que formaron dos linajes separados. En el caso particular del sitio ESSA-A1 se observó que las muestras intactas y la muestra manipulada del tratamiento control fueron similares, sin embargo, los tratamientos TMA y LOW presentaron patrones diferentes (Fig. 18), que pueden reflejar cambios en la estructura de la comunidad sulfatoreductora, lo cual es una evidencia mas para sugerir que las tasas de producción de metano elevadas que se obtuvieron en el tratamiento LOW del sitio ESSA-A1 pudo haber sido consecuencia de un decremento de la actividad de BSR y por lo tanto, la disponibilidad del sustrato H_2/CO_2 probablemente estuvo disponible para la metanogénesis.

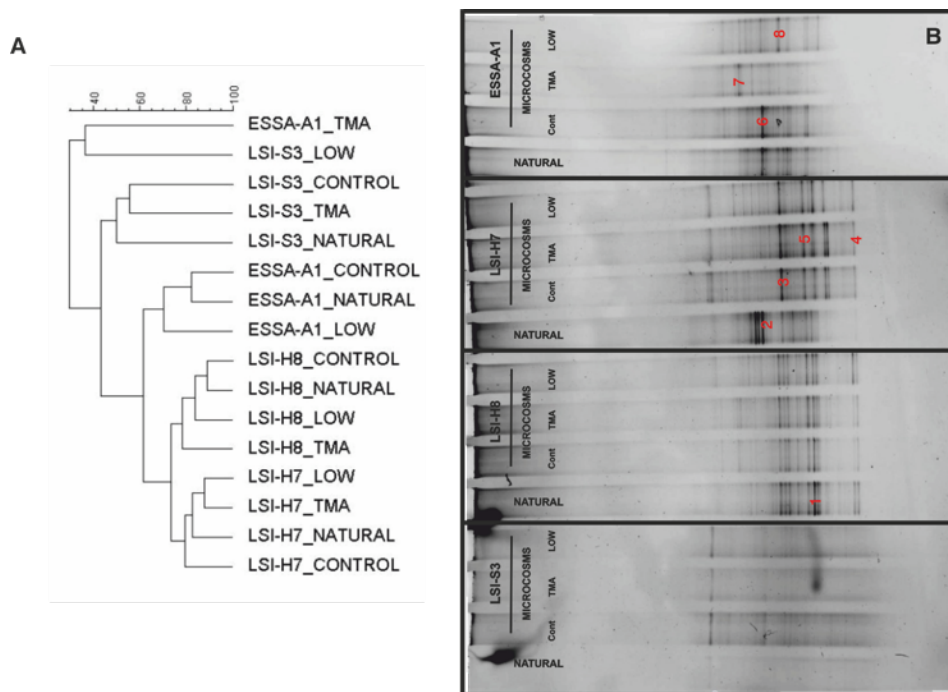


Fig. 17. Análisis de patrones de bandas de DGGE de productos de PCR del gen 16S ARNr, amplificado con iniciadores específicos para bacterias sulfato reductoras, obtenidos a partir de muestras intactas y manipuladas experimentalmente (microcosmos) de los sitios ESSA-A1, LSI-H7, LSI-H8 y LSI-S3. A. Dendrograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del 16S ARNr. B. Patrones de bandas de DGGE, los números indican las bandas que fueron cortadas para su posterior secuenciación.

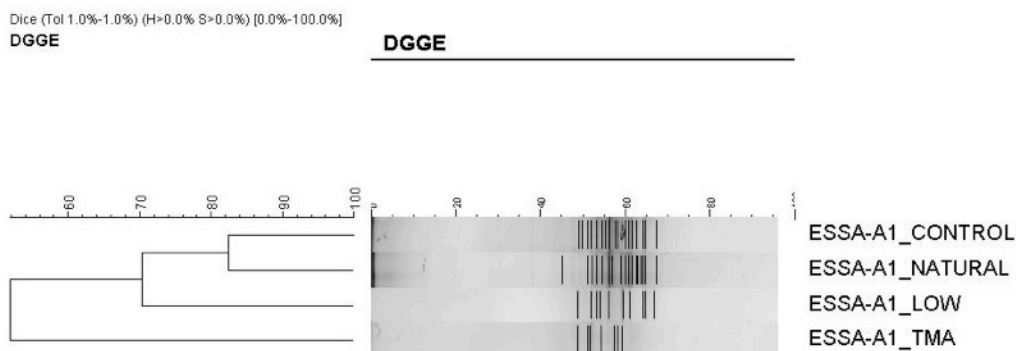


Fig. 18. Dendrograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del 16S ARNr amplificado con iniciadores específicos para bacterias sulfato reductoras, de muestras intactas y manipuladas del sitio ESSA-A1.

Análisis de la comunidad de cianobacterias de muestras naturales y manipuladas, a través de patrones de bandas de DGGE del gen 16S ARNr.

Para continuar con el estudio del objetivo número 4 de esta tesis, el grupo de cianobacterias fue analizado para identificar potenciales microorganismos productores de GBT, que es un precursor del sustrato metanogénico trimetilamina. Al respecto, se logró identificar a miembros no cultivables del orden Chroococcales y al género *Phormidium*, que potencialmente producen GBT. De manera similar que con los resultados obtenidos para BSR, el análisis de comunidades de Cianobacterias mostró una heterogeneidad en la comunidad de los diferentes sitios estudiados (ESSA-A1, LSI-H7, LSI-H8 y LSI-S3), ya que cada sitio formó agrupaciones individuales, a partir de sus perfiles de bandas de DGGE (Fig. 19).

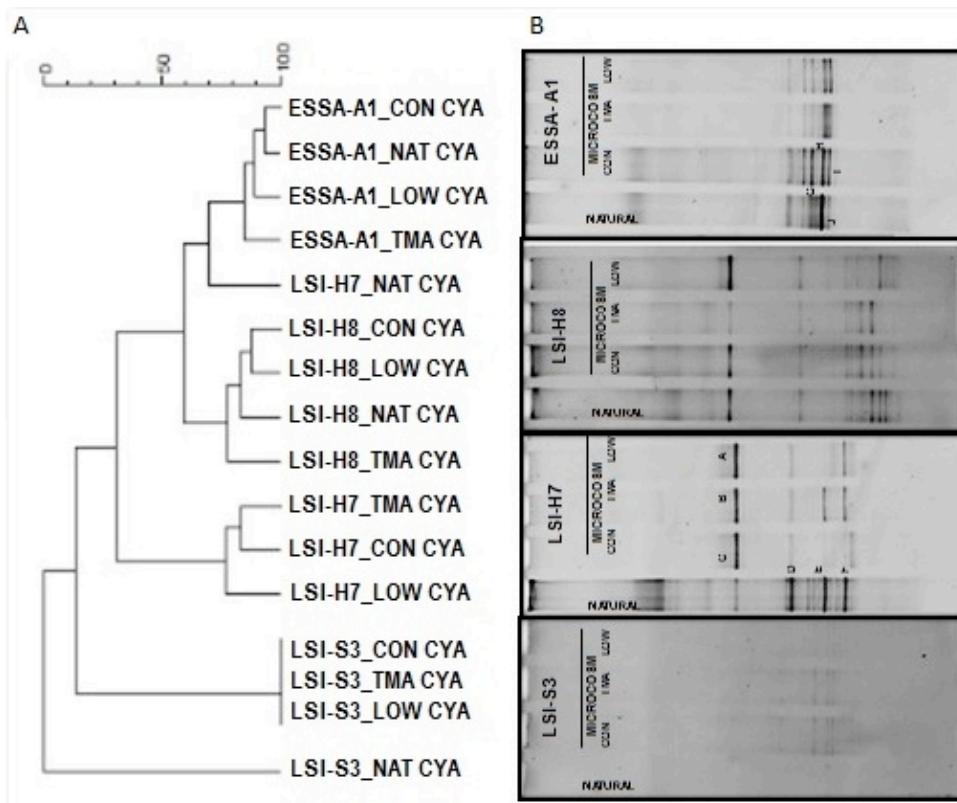


Fig. 19. Análisis de patrones de bandas de DGGE de productos de PCR del gen 16S ARNr, amplificado con iniciadores específicos para cianobacterias, obtenidos a partir de muestras intactas y manipuladas experimentalmente (microcosmos) de los sitios ESSA-A1, LSI-H7, LSI-H8 y LSI-S3. A. Dendrograma de similitud de patrones de bandas de DGGE del 16S

ARNr. B. Patrones de bandas de DGGE, los números indican las bandas que fueron cortadas para su posterior secuenciación.

DISCUSIÓN

Factores que intervienen en la producción de metano en ecosistemas hipersalinos

La producción de metano ha sido observada previamente en una gran variedad de ecosistemas hipersalinos (Oremland *et al.*, 1982), incluyendo tapetes microbianos estratificados y endoevaporitas (King, 1988; Conrad *et al.*, 1995; Hoehler *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 2005). En el presente trabajo, se cuantificaron los porcentajes de metano en cada uno de los cinco sitios estudiados, por un periodo de tres años (2010 - 2012), y se encontraron valores similares en el periodo de tiempo analizado. Trabajos previos han reportado resultados similares de las concentraciones de metano detectadas para tapetes microbianos de ambientes hipersalinos geográficamente cercanos a los analizados en este estudio (Kelley *et al.*, 2012; Tazaz *et al.*, 2013).

En la literatura se han reportado tasas de metanogénesis relativamente bajas para tapetes microbianos de ambientes hipersalinos (Oremland *et al.*, 1982), lo cual sugiere valores bajos de concentración de metano para las muestras de gas ambiental. No obstante, en este estudio se encontraron altos porcentajes de metano en muestras de gas ambiental (>25%) provenientes de comunidades endoevaporíticas del sitio ESSA-A9. Las altas concentraciones de metano detectadas, pueden ser explicadas por altas tasas de metanogénesis en combinación con bajas tasas de oxidación de metano dentro de las costras de yeso y/o por la gruesa capa relativamente impermeable de yeso que alberga a las comunidades endoevaporíticas.

La actividad microbiana puede ser afectada tanto por las condiciones ambientales como por interacciones biológicas (McGenity, 2010). Los mayores porcentajes de metano fueron detectados en los sitios del ecosistema construido por el hombre ESSA (4.9 - 25.8 %),

mientras que en los sitios del ecosistema natural LSI, las concentraciones de metano siempre estuvieron por debajo de 1%. Las diferencias en porcentajes de metano entre las dos localidades estudiadas pueden ser atribuidas a que las muestras de ESSA se encuentran permanentemente sumergidos, raramente experimentan disturbios físicos y se encuentran aproximadamente en estado estacionario con respecto a las tasas de crecimiento - descomposición (Hoehler *et al.*, 2001). Las condiciones anteriores parecen favorecer el crecimiento de las poblaciones anaeróbicas microbianas, que contribuyen prominentemente con la biogeoquímica total de esas comunidades submareales (Canfield y Des Marais, 1993). Por otra parte, los tapetes microbianos de la localidad LSI sufren perturbaciones físicas constantes, periodos alternantes de desecación - aireación, exposición a la luz UV y/o salinidad, e incrementos en los niveles de marea del agua proveniente de la laguna. Las condiciones anteriores obligan a que las comunidades microbianas existan en un modo pionero permanente de crecimiento mas rápido, en donde se incrementan los requerimientos de fijación de nitrógeno (Hoehler *et al.*, 2001). En esta situación, los procesos anaeróbicos hacen una contribución relativamente pequeña con la biogeoquímica total de los tapetes microbianos, sugiriendo que las condiciones ambientales fluctuantes pueden inhibir el desarrollo substancial de las poblaciones de AM (Hoehler *et al.*, 2001).

La metanogénesis también puede ser afectada por interacciones entre las especies e íntimas microorganismo - microorganismo (tanto estimulatorias como competitivas) dentro de la comunidad microbiana de los tapetes microbianos y/o factores abióticos (ambientales) que actúan a niveles bioquímicos o bioenergéticos. En adición a los parámetros fisicoquímicos antes mencionados, otros factores pueden afectar la distribución ambiental de AM, que se ve limitada en gran medida por las disponibilidad energética, tales como las distribuciones ambientales de oxígeno (inhibición bioquímica), y el contenido de sulfatos en la salmuera (efecto competitivo que actúa a nivel bioenergético) (Lovley *et al.*, 1982). Por lo tanto, posteriores estudios son requerido para establecer cuáles son los factores fisicoquímicos y biológicos que tienen mayor influencia sobre la distribución de los microorganismos en diferentes ambientes naturales (Ríos *et al.*, 2010).

A partir de experimentos de microcosmos, se ha sugerido que la metanogénesis en ambientes hipersalinos, puede estar limitada debido a bajas concentraciones de sustratos, en particular, trimetilamina (Kelley *et al.*, 2012). En este trabajo, las concentraciones de carbono orgánico total (TOC) fueron determinadas como una aproximación de la concentración de todos los sustratos orgánicos, incluyendo a la trimetilamina. Se encontraron porcentajes relativamente bajos de TOC en los sitios ESSA-A9, LSI-H7, LSI-H8 y LSI-S3 (0.33–1.76%). Las muestras de ESSA-A1 tuvieron una mayor concentración de TOC (5.43%) comparado con los demás sitios estudiados. Lo anterior correspondió con el segundo valor más alto de concentración de metano en muestras de gas ambiental (Tabla 6). Lo anterior sugiere una potencial mayor disponibilidad de sustratos para la metanogénesis en ese sitio. La producción de metano en las muestras de todos los cinco sitios estudiados fue estimulada con la adición de TMA en los experimentos de microcosmos, denotando y corroborando la potencial limitación de sustratos metanogénicos bajo condiciones naturales, así como la dominancia de la metanogénesis metilotrófica en ambientes hipersalinos. Las incubaciones en condiciones altas de salinidad y de concentración de sulfatos (28% y 263 mM, respectivamente) de muestras del sitio LSI-S3, no incrementaron la producción de metano, por lo que dichos valores se proponen como limitantes de la metanogénesis.

Estimulación de la producción de metano en experimentos de microcosmos

La determinación del aprovechamiento de sustratos en metanogénesis es de gran relevancia para poder explicar las relaciones tróficas y el nivel de su actividad en la naturaleza. Como un ejemplo, solo los miembros del orden *Methanosarcinales* son capaces de utilizar metilaminas como sustratos catabólicos, y algunos otros miembros del mismo orden también utilizan $H_2 + CO_2$, mientras que los miembros de los otros cuatro ordenes únicamente son capaces de utilizar sustratos competitivos ($H_2 + CO_2$, formiato o acetato).

Aunque la producción de metano dentro de la capa superficial (0 – 20 mm) de tapetes microbianos hipersalinos, fue previamente relacionada con la producción de H₂ por parte de cianobacterias (Hoehler *et al.*, 2001), los primeros experimentos de microcosmos que se realizaron en este estudio, donde se valoró la estimulación de la producción de metano con distintos sustratos, mostraron que la metanogénesis no fue estimulada con la adición de H₂ + CO₂. Únicamente los sustratos TMA y metanol estimularon la producción de metano (Fig. 6). Los resultados anteriores están en congruencia con estudios previos donde han registrado la producción de metano en medios de cultivo diseñados para enriquecer AM metilotróficas con TMA, utilizando muestras ricas en sulfatos de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos del volcán lodoso en Nápoles (Lazar *et al.*, 2011). Los sustratos competitivos utilizados por AM hidrogenotróficas y acetoclásticas (H₂/CO₂, formiato y acetato) no incrementaron la producción de metano en el experimento de microcosmos (Fig. 6), lo cual confirmó estudios previos donde se encontraron resultados similares para sedimentos de marisma de zonas intermareales (Winfrey y Ward, 1983). Las AM acetoclásticas e hidrogenotróficas, con sus bajos rendimientos energéticos, son por lo tanto, más susceptibles que las AM metilotróficas, lo cual explica aún más la dominancia de metanogénesis metilotrófica en ambientes hipersalinos (McGenity, 2010).

Nuestro avance sobre la comprensión de cómo la metanogénesis está acoplada al proceso de conservación de energía, ha sido lento y pausado. Se ha propuesto una hipótesis quimiosmótica para explicar la conservación de energía en organismos fotosintéticos y respiradores. El paso de transferencia de un grupo metilo tiene una función central en la mayoría de las vías metanogénicas y conduce directamente a la exportación de iones de sodio. Otros componentes del aparato de la conservación energética parecen diferir en AM metilotróficas e hidrogenotróficas. Las AM metilotróficas tienen citocromos y una cadena transportadora de electrones de un protón translocador, que utilizan para conservar energía en el último paso de la metanogénesis, el cual es exergónico ($\Delta G^\circ = -130$ kJ/mol de CH₄). Sin embargo, las AM hidrogenotróficas carecen de esos componentes, y no está claro cómo estos últimos organismos obtienen una ganancia neta positiva en la conservación de

energía, ya que el primer paso en la metanogénesis a partir de CO_2 es endergónico (Leigh *et al.*, 2011). Un mecanismo propuesto involucra la bifurcación de electrones, en el que el flujo de electrones exergónico acciona directamente el flujo de electrones endergónico, el cual puede resolver el enigma (Thauer *et al.*, 2008).

Para evaluar si la actividad de bacterias sulfato reductoras atenúa la metanogénesis hidrogenotrófica en concentraciones no limitantes de sulfatos, se inhibió la reducción de sulfatos en experimentos de microcosmos. La adición de molibdato de sodio resultó en un decremento de 76 – 78 % de la producción de sulfuro de hidrógeno en el microcosmos (datos nos mostrados), indicando un notable decremento en las tasas de reducción de sulfatos. Sin embargo, dicho decremento no resultó en la estimulación de la producción de metano (Fig. 7), que puede ser explicado por las bajas abundancias de AM capaces de utilizar H_2/CO_2 o acetato como sustrato en esas muestras. La producción de metano en las muestras no enriquecidas con sustratos, son las que mejor representan las condiciones naturales, las cuales son probablemente sub-óptimas para AM metilotróficas debido a las bajas concentraciones de metilaminas (Kelley *et al.*, 2012).

Por otra parte, se observó una estimulación en la producción de metano en condiciones bajas de salinidad y de concentración de sulfatos únicamente para las muestras de ESSA-A1 (tratamiento LOW; Fig. 7). Debido a que ESSA-A1 fue el sitio con las mayores concentraciones de TOC, se generó la hipótesis de que el efecto de las bajas concentraciones de sulfatos y salinidad, pudieron haber favorecido, por reducción del estrés debido a la disminución de la salinidad, la actividad de microorganismos productores de hidrógeno, utilizando los compuestos orgánicos disponibles en las muestras. Las altas concentraciones de TOC, sugieren altas abundancias de cianobacterias y diatomeas, que son los principales productores primarios en la mayoría de los tapetes microbianos fotosintéticos, debido a que ellas son conocidas por producir y excretar compuestos orgánicos, particularmente bajo condiciones de estrés como las concentraciones de O_2 , CO_2 , y bajo limitación de nutrientes (Jonkers *et al.*, 2005). Tanto organismos fotótrofos

como diazotróficos son capaces de producir hidrógeno, a través de fermentación o como un producto co-metabólico de la fijación de N_2 (Bothe *et al.*, 2010). En estudios previos se ha observado una red de producción de hidrógeno dentro de la capa superficial fotosintética (0 -2 mm) de tapetes microbianos de Monterey Bay, California (Burow *et al.*, 2012) y tapetes microbianos hipersalinos de ESSA (Hoehler *et al.*, 2001). La salinidad de las muestras utilizadas en los estudios anteriores, fueron similares a la salinidad utilizada en este estudio para el tratamiento LOW de las muestras de ESSA-A1 (~ 3%), por lo que se sugiere la posibilidad de que una red similar de producción de hidrógeno pudiera estar ocurriendo también en nuestro experimento de microcosmos, siendo el sustrato potencial que soporte la metanogénesis hidrogenotrófica. Sin embargo, se requiere de investigaciones posteriores para poder determinar si el hidrógeno producido a través de dichos procesos, y su utilización por AM hidrogenotróficas, constituyen una relación sintrófica en el ecosistema.

Diversidad de Arquea en ambientes hipersalinos

Las AM son frecuentemente estudiadas a partir de técnicas independientes de cultivo, debido a una correspondencia generalmente aceptable entre su filogenia y su fenotipo, que es menos típica en otros grupos metabólicos (McGenity, 2010). En el presente estudio se encontró que la diversidad filogenética de AM fue diferente para todos los sitios analizados. Los resultados presentados en este estudio muestran la importancia de estudiar la composición de comunidades microbianas de diferentes ambientes hipersalinos, aunque también se ha observado que grupos filogenéticamente idénticos pueden ser detectados en sedimentos independientemente de su localización geográfica (Köchling *et al.*, 2011). En contraste a la hipótesis de que la diversidad microbiana en ambientes hipersalinos es esencialmente la misma para distintas localidades geográficas, en este estudio sugerimos diferencias en la diversidad filogenética entre sitios que comparten escenarios fisiográficos y climáticos.

Existe incertidumbre a cerca de los fenotipos de organismos no cultivables que surgen de secuencias del 16S ARNr y que se agrupan dentro de Euryarchaeota, pero por fuera de las AM conocidas hasta el momento (McGenity, 2010). Sin embargo, trabajos recientes han mostrado la importancia de estudiar indirectamente a los microorganismos no cultivables, debido a que se puede conocer su identidad y reconocer nuevos microorganismos con herramientas moleculares (Ghai *et al.*, 2011). La recuperación de secuencias ambientales ha resultado en el reciente descubrimiento de un nuevo linaje superior denominado Nanohaloarchaea, elucidado a partir de ensamblajes metagenómicos de muestras de comunidades microbianas hipersalinas (Narasingarao *et al.*, 2011), y el reporte de un candidato de nueva división, MSBL1, que agrupa profundamente dentro de Euryarchaeota, de comunidades microbianas extremadamente halófilas en sedimentos anaeróbicos de una salina solar (López-López *et al.*, 2010).

La diversidad microbiana puede ser extremadamente alta en ambientes donde la salinidad es dos o tres veces mayor que la del agua de mar, y donde existen gradientes de luz y de potencial de óxido reducción (redox) (McGenity, 2010). Los tapetes microbianos hipersalinos del Área 4 de ESSA, han sido recientemente listados entre los ambientes conocidos con una mayor diversidad filogenética, basado en análisis de diversidad bacteriana (Harris *et al.*, 2013). Sin embargo, el Dominio Arquea ha recibido poca atención, a pesar de que es bien sabido que la contribución de Arquea con las actividades metabólicas en los tapetes microbianos, es significativa (Robertson *et al.*, 2009). Mucha atención ha sido enfocada en los tapetes microbianos del Área 4 de ESSA, sin embargo otras áreas de concentración de la compañía de producción de sal no han sido completamente caracterizadas. Por tales razones, en este trabajo se evaluó la diversidad de Arquea de sitios previamente no explorados, para contribuir al conocimiento de sus grupos filogenéticos.

Para los ecosistemas hipersalinos estudiados aquí, se sugiere que las AM moderadamente halófilas del género *Methanohalophilus* pueden ser consideradas como las AM dominantes en los ecosistemas hipersalinos, ya que mas de 30% de las secuencias recuperadas de *mcrA*,

fueron designadas a dicho género, con base en análisis de BLAST y filogenéticos (Fig. 13 y 14). Además, todas las secuencias del 16S ARNr relacionadas con AM, que se recuperaron a partir de bandas de DGGE, estuvieron afiliadas con el mismo género. Sin embargo, se debe de tener en cuenta que para los sitios ESSA-A9 y LSI-S3 el número de secuencias recuperadas estuvo limitado debido a la dificultad de extraer ácidos nucleicos de muestras naturales con altas concentraciones de sales, quizá por una baja abundancia de células activas y en división.

Metanogénesis hidrogenotrófica en ambientes hipersalinos

El único registro de AM hidrogenotróficas cultivables conocido hasta el momento, que tolere concentraciones máximas de salinidad de 2 M de NaCl (~ 12%), es *Methanocalculus halotolerans* (cepa SEBR 4845^T), un miembro del orden *Methanomicrobiales* (Ollivier *et al.*, 1998). La cepa fue aislada de un pozo petrolero salino (8.7% NaCl), y sus características fenotípicas y filogenéticas indican que es una cepa de AM halotolerante, que no utiliza compuestos metilados y por lo tanto no puede ser descrita como un género conocido de AM halofílico metilotrófico. Difiere de miembros hidrogenotróficos de los órdenes *Methanococcales* y *Methanomicrobiales* en el rango de tolerancia a la salinidad para su crecimiento (0 - 12 % NaCl), que es el rango mas amplio reportado a la fecha para cualquier AM hidrogenotrófica (Ollivier *et al.*, 1998). Por otra parte, estudios previos han reportado la producción microbiana de hidrógeno y detección (cultivo independiente) de AM putativamente hidrogenotróficas en tapetes microbianos hipersalinos de ESSA, pero exclusivamente bajo condiciones de incubación en bajas concentraciones de sulfatos (reducida de 50 a 0 mM) durante mas de un año en un estudio de invernadero de largo plazo (Smith *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, se encontraron dos nuevos linajes de secuencias de *mcrA* obtenidas a partir de muestras intactas de ESSA-A1, LSI-H8 y LSI-S3. De los cuales, los análisis filogenéticos mostraron ser diferentes a cualquier AM cultivable, pero relacionados con

miembros estrictamente hidrogenotróficos del orden *Methanomicrobiales*. Además, los análisis de BLAST indicaron que comparten 99% de similitud con las secuencias previamente reportadas como AM hidrogenotróficas por Smith *et al.*, (2008). Estos resultados hacen suponer que los dos nuevos linajes detectados en este estudio, pueden ser considerados como AM putativamente hidrogenotróficas. Por otro lado, no fue posible establecer una relación de similitud con *M. halotolerans*, debido a que hasta el momento solo se cuenta con secuencias parciales del 16S ARNr de dicha cepa. Se requiere de la aproximación cultivo dependiente para investigar el metabolismo de los miembros que constituyen los nuevos linajes de AM reportados en este trabajo, así como de trabajos secuenciación del gen *mcrA* de *M. halotolerans* para incrementar el conocimiento de metanogénesis hidrogenotrófica en ambientes hipersalinos.

Los microorganismos existen en diferentes estados metabólicos en los ecosistemas: en reproducción (creciendo), activos, dormantes y recientemente muertos (Blazewicz *et al.*, 2013). Dichos estados metabólicos corresponden a diferentes grados de influencia que los microorganismos pueden tener en un ambiente. Los análisis de ARN se emplean frecuentemente para identificar la fracción activa o en reproducción de los microorganismos, por lo tanto los datos de abundancia de ARN pueden servir como indicadores de actividad potencial y sirven como base para proponer un marco de trabajo para futuras aplicaciones. Además, los análisis de ARN se relacionan directamente con una población potencial que cataliza una función específica o síntesis de proteínas, y por lo tanto pueden documentar la expresión relativa de dicha función (Blazewicz *et al.*, 2013). En el presente trabajo se logró mostrar la contribución de AM metilotróficas y putativas hidrogenotróficas con el funcionamiento de ecosistemas hipersalinos, a través de la detección y cuantificación de transcritos de *mcrA* en muestras naturales de ESSA-A1 (Fig. 16). Además se sugiere que parte de la comunidad de AM pueden estar en estado de dormancia debido a que los valores de número de copias del gen *mcrA* detectados en muestras de ADN fueron mayores que aquellos encontrados en muestras de ADNc.

CONCLUSIONES

A continuación se mencionan las principales conclusiones sobre el estudio de la metanogénesis en ambientes hipersalinos:

- La metanogénesis por arqueas metanógenas ocurre tanto en ambientes hipersalinos naturales como aquellos contruidos de manera artificial en Baja California Sur, México. Su presencia y actividad fue detectada a través de evidencias geoquímica y molecular.
- Las condiciones extremas, características de los ambientes hipersalinos, no son impedimento para la metanogénesis, ya que se detectó metano en muestras de gas ambiental para los cinco sitios estudiados. Las concentraciones de metano fueron mayores para los sitios de Exportadora de Sal S.A. (ESSA-A1 y ESSA-A9), en comparación con los valores de metano detectados en los sitios del ecosistema natural LSI; lo cual sugiere que las modificaciones físicas en el ambiente y las variaciones en los parámetros fisicoquímicos comunes de los sitios naturales, son factores que regulan la actividad metanogénica, y de manera general en la biogeoquímica de los tapetes microbianos hipersalinos.
- En experimentos de incubación de tapetes microbianos hipersalinos, la metanogénesis puede ser estimulada con la adición de TMA o metanol, pero no con $H_2 + CO_2$, acetato ni con formiato; lo cual corrobora la dominancia de AM metilotróficos y supone una limitación de sustratos no competitivos en los ecosistemas hipersalinos estudiados.
- La producción de metano es estimulada cuando se reducen las concentraciones de salinidad y sulfatos hasta 3% y 25 mM, respectivamente. Dichas condiciones pueden favorecer la actividad de microorganismos productores de hidrógeno, utilizando compuestos orgánicos disponibles en las muestras; y con ello proporcionan condiciones apropiadas para una metanogénesis potencialmente hidrogenotrófica. Por lo tanto, valores

de salinidad y sulfatos mayores que 3% y 25 mM, respectivamente pueden ser limitantes ambientales para la metanogénesis putativamente hidrogenotrófica.

- Los resultados sugieren que la composición de la comunidad de arqueas y en particular la de AM, difieren en número y abundancia de linajes filogenéticos dependiendo del ecosistema analizado, lo cual contradice la hipótesis que indicaba que la diversidad microbiana en los ambientes hipersalinos es esencialmente la misma sin importar la ubicación geográfica. Además, se observó una gran heterogeneidad de la diversidad filogenética en ecosistemas similares que comparten características fisicoquímicas y clima, lo cual es un indicador del efecto que tienen las condiciones *in situ* sobre la estructura de la comunidad.

- Se propone al género *Methanohalophilus* como el grupo de AM metilotróficas dominante en tapetes microbianos de ambientes hipersalinos de Baja California Sur., debido a que 34.2 % de las secuencias de ADN del gen *mcrA* estuvieron filogenéticamente relacionadas con dicho microorganismo.

- Se realizó la detección de dos clados filogenéticos de AM putativamente hidrogenotróficas que no habían sido previamente reportadas para muestras naturales de ambientes hipersalinos, resaltando la gran diversidad microbiana inexplorada que albergan los tapetes microbianos de los ambientes hipersalinos de BCS.

- Se mostró la contribución de AM metilotróficas y putativas hidrogenotróficas con el funcionamiento de ecosistemas hipersalinos, a través de la detección y cuantificación de transcritos de *mcrA* en muestras naturales. Sin embargo, debido a que se encontraron valores bajos del número de copias del gen *mcrA* en las muestras de ARN (ADNc), en comparación con los obtenidos con las muestras de ADN, se hipotetiza que parte de la comunidad de AM está en estado de dormancia o activas pero no es proceso de

reproducción, lo cual sugiere que las condiciones ambientales no son las óptimas para llevar a cabo el metabolismo energético adecuadamente a través de la producción de metano.

Perspectivas

- Las arqueas metanógenas de tapetes microbianos de ambientes hipersalinos de BCS tienen un gran potencial biotecnológico como importantes productores de metano (biogas). El uso de estos microorganismos como fábricas celulares de bioenergía, puede contribuir con el desarrollo de tecnologías alternas para la generación de energía.
- Una mejor comprensión de la metanogénesis en ambientes hipersalinos requiere del análisis que involucre la totalidad de la comunidad, en particular de las relaciones sintróficas.
- El encuentro de nuevos grupos filogenéticos con nuevos metabolismos potenciales, requiere de una explicación evolutiva para comprender los mecanismos y procesos que resultaron en estos nuevos grupos.

REFERENCIAS

- Abascal, F., Zardoya R. , Posada D. 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 21:2104-2105.
- Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. , Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Mol Biol*. 215:403-410.
- Amann, R., Stromley J., Devereux R., Key R. , Stahl D. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 58:614-623.
- Amaral, J. , Knowles R. 1994. Methane metabolism in a temperate swamp. *Appl Environ Microbiol*. 60:3945-3951.
- Angenent, L.T., Sung S., Raskin L. 2002. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res*. 36:4648-4654.
- Ashelford, K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Jones A.J. , Weightman A.J. 2006. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol*. 72:5734-5741.
- Balch, W., Fox G., Magrum L., Woese C. , Wolfe R. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*. 43:260.
- Banat, I.M., Lindström E.B., Nedwell D.B. , Balba M.T. 1981. Evidence for coexistence of two distinct functional groups of sulfate-reducing bacteria in salt marsh sediment. *Appl Environ Microbiol*. 42:985-992.
- Bebout, B.M., Hoehler T.M., Thamdrup B., Albert D., Carpenter S.P., Hogan M., Turk K. , Des Marais D.J. 2004. Methane production by microbial mats under low sulphate concentrations. *Geobiology*. 2:87-96.
- Blazewicz, S.J., Barnard R.L., Daly R.A. , Firestone M.K. 2013. Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME J*. 7:2061-2068.
- Bothe, H., Schmitz O., Yates M.G. , Newton W.E. 2010. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 74:529-551.

- Boudreau, B.P., Westrich J.T. 1984. The dependence of bacterial sulfate reduction on sulfate concentration in marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta*. 48:2503-2516.
- Bryant, M., Campbell L.L., Reddy C., Crabill M. 1977. Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 33:1162-1169.
- Buckley, D.H., Baumgartner L.K. , Visscher P.T. 2008. Vertical distribution of methane metabolism in microbial mats of the Great Sippewissett Salt Marsh. *Environ Microbiol*. 10:967-977.
- Burow, L.C., Woebken D., Bebout B.M., McMurdie P.J., Singer S.W., Pett-Ridge J., Prufert-Bebout L., Spormann A.M., Weber P.K., Hoehler T.M. 2012. Hydrogen production in photosynthetic microbial mats in the Elkhorn Slough estuary, Monterey Bay. *ISME J*. 6:863-874.
- Canfield, D.E., Des Marais D.J. 1993. Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat. *Geochim Cosmochim Acta*. 57:3971-3984.
- Chesnin, L. , Yien C.H. 1951. Turbidimetric determination of available sulphates. *Soil Sci Soc Am Proc*. 15:149-151.
- Conrad, R., Frenzel R., Cohen Y. 1995. Methane emission from hypersaline microbial mats: lack of aerobic methane oxidation activity. *FEMS Microbiol Ecol*. 16:297-306.
- Crocetti, G., Murto M. , Björnsson L. 2006. An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic *Archaea* for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). *J Microbiol Methods*. 65:194-201.
- Demirbas, A. 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*. 49:2106-2116.
- Doddema, H., Vogels G. 1978. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 36:752-754.
- Euzéby, J. (2008) List of Prokaryotic names with standing in nomenclature—Genus *Mycobacterium*. eds.).
- Ferry, J.G. 1992. Methane from acetate. *J Bacteriol*. 174:5489-5495.

- Ferry, J.G., Kastead A.K. 2007. Methanogenesis. En: Cavicchioli R (eds.) *Archaea: Molecular and celular biology*. ASM Press. Washington, D.C. pp. 288-314.
- Finke, N., Hoehler T.M. , Jørgensen B.B. 2007. Hydrogen 'leakage' during methanogenesis from methanol and methylamine: implications for anaerobic carbon degradation pathways in aquatic sediments. *Environ Microbiol.* 9:1060-1071.
- Formisano, V., Atreya S., Encrenaz T., Ignatiev N. , Giuranna M. 2004. Detection of methane in the atmosphere of Mars. *Science.* 306:1758-1761.
- Garrity, G.M., Labeda D.P., Oren A. 2011. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes XIIIth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology: Minutes of the meetings, 3, 4 and 6 August 2008, Istanbul, Turkey. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61:2775-2780.
- Ghai, R., Pašić L., Fernández A.B., Martin-Cuadrado A.-B., Mizuno C.M., McMahon K.D., Papke R.T., Stepanauskas R., Rodriguez-Brito B. , Rohwer F. 2011. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Scientific reports.* 1.
- Giani, D., Janssen D., Schostak V., Krumbein W.E. 1989. Methanogenesis in a saltern in the Bretagne (France). *FEMS Microbiol Lett.* 62:143-149.
- Gray, N., Sherry A., Hubert C., Dolfig J. , Head I. 2010. Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons in subsurface environments: remediation, heavy oil formation, and energy recovery. *Adv Appl Microbiol.* 72:137-161.
- Großkopf, R., Stubner S., Liesack W. 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 64:4983-4989.
- Guindon, S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. , Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 59:307-321.
- Hallam, S.J., Girguis P.R., Preston C.M., Richardson P.M. , DeLong E.F. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol.* 69:5483-5491.

- Harris, J.K., Caporaso J.G., Walker J.J., Spear J.R., Gold N.J., Robertson C.E., Hugenholtz P., Goodrich J., McDonald D., Knights D., Marshall P., Tufo H., Knight R. , Pace N.R. 2013. Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *ISME J.* 7:50-60.
- Hedderich, R. , Whitman W.B. 2006. Physiology and biochemistry of the methane-producing Archaea. *The prokaryotes.* 2:1050-1079.
- Hedges, J.I. , Stern J.H. 1984. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids [In sediments, sediment trap materials and plankton]. *Limnol Oceanogr.* 29.
- Heimann, M. 2010. Climate change. How stable is the methane cycle? *Science.* 327:1211-1212.
- Hoehler, T.M., Bebout B.M. , Des Marais D.J. 2001. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature.* 412:324-327.
- Hori, T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M. , Igarashi Y. 2006. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Appl Environ Microbiol.* 72:1623-1630.
- Huelsenbeck, J.P. , Ronquist F. 2001. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 17:754-755.
- Inagaki, F., Tsunogai U., Suzuki M., Kosaka A., Machiyama H., Takai K., Nunoura T., Nealson K.H. , Horikoshi K. 2004. Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing pmoA, mmoX, mxaF, mcrA, and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 70:7445-7455.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jones, D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B.F., Oldenburg T., Erdmann M. , Larter S.R. 2008.

- Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*. 451:176-180.
- Jones, W.J., Nagle D.P. , Whitman W.B. 1987. Methanogens and the Diversity of Archaeobacteria. *Microbiological Reviews*. 57:135-177.
- Jonkers, H.M., Koh I.O., Behrend P., Muyzer G. , de Beer D. 2005. Aerobic organic carbon mineralization by sulfate-reducing bacteria in the oxygen-saturated photic zone of a hypersaline microbial mat. *Microb Ecol*. 49:291-300.
- Kelley, C.A., Poole J.A., Tazaz A.M., Chanton J.P. , Bebout B.M. 2012. Substrate limitation for methanogenesis in hypersaline environments. *Astrobiology*. 12:89-97.
- Keppler, F., Boros M., Frankenberg C., Lelieveld J., McLeod A., Pirttilä A.M., Röckmann T. , Schnitzler J. 2009. Methane formation in aerobic environments. *Environmental Chemistry*. 6:459-465.
- King, G.M. 1988. Methanogenesis from methylated amines in hypersaline algal mat. *Appl Environ Microbiol*. 54:130-136.
- Köchling, T., Lara-Martín P., González-Mazo E., Amils R. , Sanz J.L. 2011. Microbial community composition of anoxic marine sediments in the Bay of Cádiz (Spain). *Int Microbiol*. 14:143-154.
- Kotsyurbenko, O.R., Glagolev M.V., Nozhevnikova A.N. , Conrad R. 2001. Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiol Ecol*. 38:153-159.
- Kozubal, M.A., Romine M., Jennings R., Jay Z.J., Tringe S.G., Rusch D.B., Beam J.P., McCue L.A. , Inskeep W.P. 2013. Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. *ISME J*. 7:622-634.
- Kurr, M., Huber R., König H., Jannasch H.W., Fricke H., Trincone A., Kristjansson J.K. , Stetter K.O. 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 C. *Arch Microbiol*. 156:239-247.

- Lai, M.-C., Sowers K.R., Robertson D.E., Roberts M.F. , Gunsalus R.P. 1991. Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *J Bacteriol.* 173:5352-5358.
- Larkin, M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. , Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23:2947-2948.
- Lazar, C.S., Parkes R.J., Cragg B.A., L'Haridon S. , Toffin L. 2011. Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol.* 13:2078-2091.
- Leigh, J.A., Albers S.V., Atomi H. , Allers T. 2011. Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS Microbiol Rev.* 35:577-608.
- Lessner, D.J. 2009. Methanogenesis Biochemistry. En: (eds.) eLS. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. p.^pp.
- Li, W. , Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 22:1658-1659.
- Liu, W.-T., Chan O.-C. , Fang H.H. 2002. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Res.* 36:1767-1775.
- Liu, Y. 2010. Taxonomy of methanogens. En: (eds.) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer. p.^pp. 547-558.
- Liu, Y. , Whitman W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci.* 1125:171-189.
- López-Cortés, A., Lanz-Landazuri A. , Garcia-Maldonado J.Q. 2008. Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. *Microb Ecol.* 56:112-120.
- López-López, A., Yarza P., Richter M., Suárez-Suárez A., Antón J., Niemann H. , Rosselló-Móra R. 2010. Extremely halophilic microbial communities in anaerobic sediments from a solar saltern. *Environmental microbiology reports.* 2:258-271.

- Lovley, D.R., Dwyer D.F. , Klug M.J. 1982. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl Environ Microbiol.* 43:1373-1379.
- Luton, P.E., Wayne J.M., Sharp R.J. , Riley P.W. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology.* 148.
- McGenity, T.J. 2010. Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments. En: Timmis KN (eds.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp. 665-680.
- Muyzer, G., De Waal E.C. , Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59:695-700.
- Muyzer, G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H. , Wawer C. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: Akkermans ADL vEJ, deBruijn FJ (eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual.* Kluwer. The Netherlands. pp. 1-23.
- Narasimharao, P., Podell S., Ugalde J.A., Brochier-Armanet C., Emerson J.B., Brocks J.J., Heidelberg K.B., Banfield J.F. , Allen E.E. 2011. De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *The ISME journal.* 6:81-93.
- Nübel, U., Garcia-Pichel F. , Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 63:3327-3332.
- Nunoura, T., Oida H., Toki T., Ashi J., Takai K. , Horikoshi K. 2006. Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS Microbiol Ecol.* 57:149-157.
- Ollivier, B., Fardeau M.-L., Cayol J.-L., Magot M., Patel B.K., Prensier G. , Garcia J.-L. 1998. *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol.* 48:821-828.

- Oremland, R. , Capone D. 1988. Use of specific inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Adv Microb Ecol.* 10:285-383.
- Oremland, R.S. , Polcin S. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 44:1270-1276.
- Oremland, R.S., Marsh L.M. , Polcin S. 1982. Methane production and simultaneous sulfate reduction in anoxic, salt-marsh sediments. *Nature.* 296:143-145.
- Oren, A. 1990. Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 58:291-298.
- Oren, A. 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia.* 466:61-72.
- Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems.* 4:2.
- Oren, A. 2011. Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol.* 13:1908-1923.
- Orphan, V.J., Jahnke L.L., Embaye T., Turk K.A., Pernthaler A., Summons R.E. , D.J. D.E.S.M. 2008. Characterization and spatial distribution of methanogens and methanogenic biosignatures in hypersaline microbial mats of Baja California. *Geobiology.* 6:376-393.
- Osorio, F. , Torres J. 2009. Biogas purification from anaerobic digestion in a wastewater treatment plant for biofuel production. *Renewable energy.* 34:2164-2171.
- Paterek, R.J. , Smith P.H. 1988. *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a Methylotrophic Halophilic Methanogen†. *Int J Syst Bacteriol.* 38:122-123.
- Raskin, L., Stromley J.M., Rittmann B.E. , Stahl D.A. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol.* 60:1232-1240.

- Raskin, L., Poulsen L.K., Noguera D.R., Rittmann B.E. , Stahl D.A. 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 60:1241-1248.
- Reeburgh, W.S. 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews.* 107:486-513.
- Rimbault, A., Niel P., Virelizier H., Darbord J.C. , Leluan G. 1988. 1-Methionine, a Precursor of Trace Methane in Some Proteolytic Clostridia. *Appl Environ Microbiol.* 54:1581-1586.
- Ríos, A.d.l., Valea S., Ascaso C., Davila A.F., Kastovsky J., McKay C.P. , Wierzchos J. 2010. Comparative analysis of the microbial communities inhabiting halite evaporites of the Atacama Desert.
- Robertson, C.E., Spear J.R., Harris J.K. , Pace N.R. 2009. Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol.* 75:1801-1810.
- Rocheleau, S., Greer C.W., Lawrence J.R., Cantin C., Laramée L. , Guiot S.R. 1999. Differentiation of *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* in Anaerobic Mesophilic Granular Sludge by Fluorescent In Situ Hybridization and Confocal Scanning Laser Microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 65:2222-2229.
- Rothschild, L.J., Giver L.J., White M.R. , Mancinelli R.L. 1994. Metabolic activity of microorganisms in evaporites. *J Phycol.* 30:431-438.
- Saengkerdsab, S., Herrera P., Woodward C., Anderson R., Nisbet D. , Ricke S. 2007. Detection of methane and quantification of methanogenic archaea in faeces from young broiler chickens using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.* 45:629-634.
- Sakai, S., Conrad R., Liesack W. , Imachi H. 2010. *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:2918-2923.
- Sakai, S., Imachi H., Hanada S., Ohashi A., Harada H. , Kamagata Y. 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58:929-936.

- Sawayama, S., Tsukahara K. , Yagishita T. 2006. Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresour Technol.* 97:69-76.
- Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:262-280.
- Schoell, M. 1988. Multiple origins of methane in the Earth. *Chemical Geology.* 71:1-10.
- Schönheit, P., Kristjansson J.K. , Thauer R.K. 1982. Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Arch Microbiol.* 132:285-288.
- Sekiguchi, Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A. , Harada H. 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol.* 65:1280-1288.
- Shigematsu, T., Tang Y., Kobayashi T., Kawaguchi H., Morimura S. , Kida K. 2004. Effect of dilution rate on metabolic pathway shift between aceticlastic and nonaceticlastic methanogenesis in chemostat cultivation. *Appl Environ Microbiol.* 70:4048-4052.
- Smith, J.M., Green S.J., Kelley C.A., Prufert-Bebout L. , Bebout B.M. 2008. Shifts in methanogen community structure and function associated with long-term manipulation of sulfate and salinity in a hypersaline microbial mat. *Environ Microbiol.* 10:386-394.
- Solera, R., Romero L. , Sales D. 2001. Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: comparative analysis by different counting methods. *Anaerobe.* 7:79-86.
- Sørensen, K., Řeháková K., Zapomělová E. , Oren A. 2009. Distribution of benthic phototrophs, sulfate reducers, and methanogens in two adjacent saltern evaporation ponds in Eilat, Israel. *Aquat Microb Ecol.* 56:275-284.
- Sorensen, K.B., Canfield D.E., Teske A.P. , Oren A. 2005. Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. *Appl Environ Microbiol.* 71:7352-7365.

- Spear, J.R., Ley R.E., Berger A.B. , Pace N.R. 2003. Complexity in natural microbial ecosystems: the Guerrero Negro experience. *The Biological Bulletin*. 204:168-173.
- Stahl, D.A. , Amann R.I. 1991. Development and amplification of nucleic acid probes. En: Stackebrandt E & Goodfellow M (eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley. New York. pp. 205-248.
- Steinberg, L.M. , Regan J.M. 2009. mcrA-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Appl Environ Microbiol*. 75:4435-4442.
- Strom, A.R., Olafsen J.A. , Larsen H. 1979. Trimethylamine oxide: a terminal electron acceptor in anaerobic respiration of bacteria. *Journal of general microbiology*. 112:315-320.
- Swofford, D.L. (2003) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. , Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 28:2731-2739.
- Tazaz, A.M., Bebout B.M., Kelley C.A., Poole J. , Chanton J.P. 2013. Redefining the isotopic boundaries of biogenic methane: Methane from endoevaporites. *Icarus*. 224:268-275.
- Teske, A., Hinrichs K.U., Edgcomb V., de Vera Gomez A., Kysela D., Sylva S.P., Sogin M.L. , Jannasch H.W. 2002. Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Appl Environ Microbiol*. 68:1994-2007.
- Thauer, R.K., Kaster A.-K., Seedorf H., Buckel W. , Hedderich R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*. 6:579-591.
- Tymensen, L.D. , McAllister T.A. 2012. Community structure analysis of methanogens associated with rumen protozoa reveals bias in universal archaeal primers. *Appl Environ Microbiol*. 78:4051-4056.

- van der Wielen, P.W., Bolhuis H., Borin S., Daffonchio D., Corselli C., Giuliano L., D'Auria G., de Lange G.J., Huebner A. , Varnavas S.P. 2005. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science*. 307:121-123.
- Webster, C.R., Mahaffy P.R., Atreya S.K., Flesch G.J., Farley K.A. , Team t.M.S. 2013. Low Upper Limit to Methane Abundance on Mars. *Science*.
- Welsh, D.T. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev*. 24:263-290.
- Whiticar, M.J. 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology*. 161:291-314.
- Whitman, W.B., Bowen T.L. , Boone D.R. 2006. The methanogenic bacteria. *Prokaryotes*. 3:165-207.
- Whitman, W.B., Boone D.R., Koga Y. , Keswani J. 2001. Taxonomy of the methanogenic archaea. En: Boone DR, Castenholz RW & Garrity GM (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition Volume one: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Springer-Verlag. Vol. one: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria New York. pp. 211-213.
- Winfrey, M.R. , Ward D.M. 1983. Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. *Appl Environ Microbiol*. 45:193-199.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. 51:221.
- Zinder, S.H. 1993. Physiological ecology of methanogens. En: (eds.) *Methanogenesis*. Springer. pp. 128-206.