



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS DE COMUNIDADES DE
MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE
HIDRÓGENO DE AMBIENTES HIPERSALINOS
NATURALES Y EN MICROCOSMOS

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

GUADALUPE VIRIDIANA SORIA ANDRADE

La Paz. Baja California Sur, Febrero del 2013

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 19 del Mes de Febrero del 2013, 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:

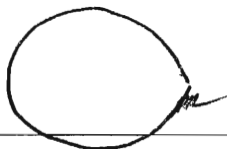
"Análisis de comunidades de microorganismos productores de hidrógeno de ambientes hipersalinos naturales y en microcosmos"

Presentada por el alumno:

Guadalupe Viridiana Soria Andrade

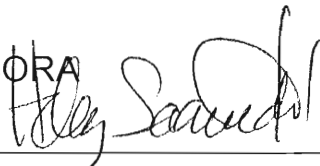
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

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.

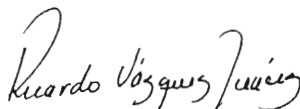


DR. ALEJANDRO LÓPEZ CORTÉS
DIRECTOR DE TESIS

LA COMISION REVISORA



DRA. NORMA Y. HERNÁNDEZ SAAVEDRA
CO-TUTOR



DR. RICARDO VÁZQUEZ JUÁREZ
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS DE COMUNIDADES DE
MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE
HIDRÓGENO DE AMBIENTES HIPERSALINOS
NATURALES Y EN MICROCOSMOS

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

GUADALUPE VIRIDIANA SORIA ANDRADE

La Paz. Baja California Sur, Febrero del 2013

Comité tutorial:

Dr. Alejandro López Cortés

Director de Tesis.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra.

Tutora.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Tutor.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz

Comité revisor de tesis:

Dr. Alejandro López Cortés

Director de Tesis.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra.

Tutora.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Tutor.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz

Dra. Elisa Serviere Zaragoza

Directora de estudios de Posgrado

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz

Jurado de examen de grado:

Dr. Alejandro López Cortés

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Suplente:

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

RESUMEN

La composición simple del hidrógeno molecular tiene influencia significativa en la función y estructura de la población de ecosistemas microbianos a través de su fuerte control sobre la termodinámica de reacciones redox en el metabolismo. Para la fermentación y oxidación de pequeñas moléculas orgánicas, la producción de hidrógeno es a menudo obligada. Sin embargo, la estructura de la comunidad se presume distintiva de acuerdo a las condiciones de uso de suelo y ambientales existentes, por lo que al comparar dos sitios diferentes como ESSA_A1 y LSI_S3, encontraremos diferencias tanto en la estructura como en las concentraciones de hidrógeno. Se realizó un análisis de la estructura de la comunidad por medio de la técnica PCR-DGGE utilizando el gen *hydA* de la Fe-Fe hidrogenasa (que codifica para la subunidad A de la enzima involucrada en la producción de hidrógeno) y el gen 16S ARNr (que codifica para la subunidad pequeña del 16S ARNr) tanto para sistemas denominados microcosmos, como para muestras ambientales intactas. Se registraron diferencias entre los sitios de estudio; las salinidades fueron para ESSA_A1, 5.3%, mientras que para LSI_S3, 28%; las concentraciones de hidrógeno *in situ* fueron 0.0011% o 11 ppm para ESSA_A1 y para LSI_S3, 0.0055% o 55 ppm. También fueron diferentes las estructuras y estimaciones ecológicas de la comunidad bacteriana y aquellos putativos productores de hidrógeno. Los filotipos obtenidos del gen 16S ARNr sugieren que existe una mayor estabilidad y complejidad en la comunidad presente en ESSA_A1, donde los parámetros fisicoquímicos son manipulados con fluctuaciones mínimas ya que este sitio forma parte de un proceso industrial, y por ello la comunidad está menos deteriorada, explicándose su mayor estabilidad por un incremento en la redundancia funcional de diferentes unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de la comunidad. Se especula que las concentraciones bajas de hidrógeno en este sitio, son por la rápida reactividad del hidrógeno molecular generando un corto tiempo de retención de esta molécula en la comunidad. Al analizar el número de OTUs obtenidos por medio de estimaciones ecológicas, se sugiere una mayor diversidad y uniformidad de la comunidad encontrada en ESSA_A1. La obtención de perfiles de DGGE y concentraciones de hidrógeno en el tratamiento con formaldehído, sugiere la existencia de microorganismos que pueden utilizar a este compuesto como fuente de carbono o energía, tal es el caso de las bacterias metilotróficas, aunque esto debe confirmarse mediante otros estudios. En el caso del gen funcional (*hydA*) se encontraron mayores valores de las estimaciones ecológicas en la comunidad de ESSA_A1, que habla de una mayor estabilidad y diversidad comparada con LSI_S3, esto nos ayuda a fundamentar la hipótesis de diferencias en la estructura de la comunidad de microorganismos putativos productores de hidrógeno. Las mayores concentraciones de hidrógeno encontradas en LSI_S3 pueden deberse a la acumulación de los gases bajo las costras de sal evitando la disipación de estos a la atmósfera, de esta manera darían valores mayores de las concentraciones de hidrógeno frente a la comunidad poco diversa encontrada en este sitio. Es importante conocer desde el punto de vista ecológico y biotecnológico a la comunidad de microorganismos que intervienen en la generación de hidrógeno, además de los microorganismos que lo consumen, en comunidades tan complejas como los tapetes microbianos.

Palabras claves: fermentación, hidrógeno, hidrogenasa.

ABSTRACT

The simple composition of molecular hydrogen has significant influence on the function and structure of microbial ecosystem population through its strong control over the thermodynamics of redox reactions in metabolism. For fermentation and oxidation of small organic molecules, hydrogen production is often required. However, the community structure is expected to be distinctive according to environmental soil use conditions, so when we compare two different sites as ESSA_A1 and LSI_S3, we will find differences in both structure and hydrogen concentrations. We performed a community structure analysis by PCR-DGGE technique using the Fe-Fe hydrogenase gene-*hydA* (which codes for the enzyme subunit A involved in hydrogen production) and the 16S rRNA (encoding the small 16S rRNA subunit) gene for both systems denominated microcosms and intact environmental samples. We recorded differences between study sites; salinities for ESSA_A1 were 5.3‰ and 28‰ for LSI_S3; hydrogen concentrations *in situ* were 0.0011% or 11 ppm for ESSA_A1 and 0.0055% or 55 ppm for LSI_S3. Structures and ecological estimates of the bacterial community and those of putative hydrogen producers were also different. The 16S rRNA gene phlotypes obtained suggest a greater stability and complexity in ESSA_A1 community where physicochemical parameters are manipulated with minimal fluctuations, as this site is part of an industrial process; hence the community is less deteriorated, its higher stability for an increase in the functional redundancy of different operational taxonomic units (OTUs) in the community. It is speculated that low hydrogen concentrations in this site are the fast reactivity of molecular hydrogen generating a short retention time of this molecule in the community. When analyzing the number of OTUs obtained through ecological estimates, it suggests a greater community diversity and uniformity was found in ESSA_A1. Obtaining DGGE profiles and hydrogen concentrations in the treatment with formaldehyde suggests there are microorganisms that can use this compound as an energy or carbon source as methylotrophic bacteria although it should be confirmed. In the case of the functional gene (*hydA*), we found a community with greater values in ecological estimates in ESSA_A1, suggesting greater diversity and stability compared to LSI_S3, which helps us to support the hypothesis of differences in the putative hydrogen producing microorganism community. Moreover, higher hydrogen concentrations in LSI_S3 could be due to gas accumulation under salt crusts preventing gas dissipation into the atmosphere, which explains the greater values in the little diverse community found in this site. It is important to know from an ecological and biotechnological point of view a community of microorganisms involved in hydrogen generation and of those that are consumers within highly complex communities, as microbial mats.

Keys words: fermentation, hydrogen, hydrogenase.

Dedicatoria

A la memoria de mi mamá, porque gracias a ella tuve la oportunidad de estudiar y de llegar hasta este logro en mi vida y a quien le debo todo lo que soy, por el apoyo incondicional que siempre me dio y que aun siento después de su partida, por enseñarme a luchar como ella lo hacía frente a cualquier adversidad y sin dejarse vencer... Te extraño y te amo mucho mami.

A mi papá, por darme su apoyo, su confianza y su amor incondicional.

A mi esposo, por el apoyo y el ánimo que me brinda siempre para alcanzar mis sueños, por todos los momentos felices que me ha dado y aguantarme en mis momentos de debilidad y estrés, te amo Fher.

A mi familia, por tolerarme, por ser parte importante en mi vida, por todos los momentos maravillosos y difíciles que hemos vivido, en especial a mis tíos Armando y Yamilet y mis primas Deneb, Yami y Sofi, de verdad gracias por todo.

A mis amigos de maestría, Cinthya, Abel y Matus por todo su apoyo.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), por la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa institución y darme todas las facilidades para mi superación profesional, en especial al área de posgrado, Lety, Osvelia, Claudia, Horacio y Tania.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través del programa de becas (376102) durante estos 2 años de la realización de mi tesis de maestría

A mi director de tesis, Dr. Alejandro López Cortés, por darme la oportunidad de trabajar en el proyecto 031C, además de compartir conmigo su conocimiento, experiencia y consejos.

A mi Comité Tutorial: Dr. Alejandro López Cortés, Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, suplente, por su valioso tiempo y apoyo para la realización y mejoramiento de mi trabajo de tesis.

A José García Maldonado, por ayudarme en el desarrollo de las técnicas de biología molecular, por su apoyo y consejos en el desarrollo de mi trabajo.

A la Maestra Diana Dorantes por su apoyo en la edición del resumen en inglés.

A Exobiology Branch, NASA Ames Research Center, Moffett Field, CA, USA, en especial al Dr. Brad Bebout y a la técnico Angela Detweiler, por su apoyo en las mediciones de concentración de hidrógeno.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 <i>Importancia del hidrógeno</i> | 1 |
| 1.2 <i>Vías metabólicas</i> | 4 |
| 1.2.1 <i>Vía Embder-Meyerhoff-Parnas</i> | 5 |
| 1.2.2 <i>Vía Entner-Doudoroff</i> | 6 |
| 1.2.3 <i>Vía Warburg-Dickens</i> | 7 |
| 1.3 <i>Técnicas moleculares utilizadas para el análisis de comunidades</i> | 7 |
| 1.4 <i>Herramientas en el análisis de comunidades</i> | 11 |
| 2. ANTECEDENTES | 12 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 4 OBJETIVOS | 14 |
| 4.1 <i>General</i> | 14 |
| 4.2 <i>Específicos</i> | 14 |
| 5 HIPÓTESIS | 15 |
| 6 MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 6.1 <i>Áreas de estudio</i> | 15 |
| 6.2 <i>Parámetros fisicoquímicos y recolección de muestras de tapetes microbianos</i> | 17 |
| 6.3 <i>Recolección de gas ambiental</i> | 17 |
| 6.4 <i>Recolección de gas en microcosmos</i> | 17 |
| 6.5 <i>Determinaciones de hidrógeno</i> | 17 |
| 6.6 <i>Preparación de incubaciones</i> | 18 |
| 6.7 <i>Extracción de ADN</i> | 18 |
| 6.8 <i>Condiciones de PCR</i> | 19 |
| 6.9 <i>Electroforesis de gel de gradiente desnaturizante (DGGE)</i> | 20 |
| 6.10 <i>Obtención de secuencias, análisis de comunidades (GelCompare) y Blast en GenBank</i> | 22 |
| 7 RESULTADOS | 23 |
| 7.1 <i>Parámetros fisicoquímicos de las localidades</i> | 23 |
| 7.2 <i>Análisis de la comunidad microbiana por medio del gen 16S ARNr</i> | 24 |
| 7.2.1 <i>Muestras ambientales</i> | 24 |
| 7.2.2 <i>Caso de tapete intacto o sin agregar sustrato</i> | 26 |
| 7.2.3 <i>Caso de tapete enriquecido con glucosa</i> | 27 |
| 7.2.4 <i>Caso de tapetes estériles</i> | 29 |
| 7.2.5 <i>Caso de tapetes con formaldehído</i> | 30 |
| 7.3 <i>Análisis de comunidades del gen hydA</i> | 31 |
| 7.3.1 <i>Muestras Ambientales</i> | 33 |
| 7.3.2 <i>Caso de tapete intacto o sin glucosa</i> | 35 |
| 7.3.3 <i>Caso de tapete con glucosa</i> | 36 |
| 8 DISCUSIÓN | 39 |
| 8.1 <i>Variaciones en parámetros fisicoquímicos</i> | 39 |
| 8.2 <i>Análisis de la estructura y diversidad de la comunidad microbiana</i> | 40 |
| 8.3 <i>Resultados preliminares de la producción de hidrógeno en microcosmos</i> | 48 |
| 8.4 <i>Secuencias</i> | 49 |
| 9 CONCLUSIONES | 50 |
| 10 LITERATURA CITADA | 51 |
| 11 ANEXOS | 59 |

LISTA DE FIGURAS

- | | |
|---|----|
| Fig. 1 Imagen satelital de Exportadora de Sal en Guerrero Negro, B.C.S. | 16 |
| Fig. 2 Imagen satelital de Laguna San Ignacio | 16 |
| Fig. 3 Diseño experimental. Las incubaciones se realizaron por triplicado, sin modificación de la atmósfera. | 18 |
| Fig. 4 Patrón de bandas de DGGE de productos de PCR de muestras ambientales para el gen 16S ARNr. Sitio 3 de Laguna San Ignacio (LSI_S3_Amb1 y LSI_S3_Amb2); Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (ESSA_A1_Amb1 y ESSA_A1_Amb2). En la parte izquierda de la figura se muestra el dendograma con los porcentajes de similitud, en la parte media del gel y en la parte derecha los nombres pertenecientes a cada carril y su riqueza de unidades taxónomicas operacionales OTUs correspondiente. Las flechas indican las bandas cortadas mientras que los números nos indican las secuencias recuperadas del GenBank. | 25 |
| Fig. 5 Patrones de bandas obtenidos por DGGE de productos de PCR de comunidades bacterianas (empleando secuencias del gen 16S ARNr) del sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Int1 y S3-Int2) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Int1 y A1-Int2). Corresponde al tratamiento que no posee glucosa como sustrato. | 27 |
| Fig. 6 Filotipos del gen 16S ARNr de muestras del tratamiento con glucosa Sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Glu1 y S3-Glu2); área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Glu1 y A1-Glu2). En la parte izquierda se muestran los porcentajes de similitud así como el dendograma generado por Gel Compare II, en la parte central se muestra la imagen del gel obtenido por DGGE, donde se muestran las bandas obtenidas y en la parte derecha los nombres y riqueza. La flecha indica la banda cortada y el número 5 corresponde a la secuencia del GenBank que está más relacionada. | 28 |
| Fig. 7 Patrón de bandas del gen 16S ARNr de muestras del tratamiento estéril del Sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Est1 y S3-Est2) y área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Est1 y A1-Est2). Izq. Porcentajes de similitud; centro, patrón de bandas; der. Nombres y riqueza de OTUs. La flecha indica la banda cortada y el número 6 representa la secuencia obtenida del GenBank | 29 |
| Fig. 8 Patrón de bandas del gen 16S ARNr de muestras del tratamiento con formaldehído al 5% del Sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Form1 y S3-Form2) y área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Form1 y A1-Form2).Izq. porcentaje de similitud; centro imagen del gel de DGGE; der. Nombres y riqueza de OTUs | 31 |
| Fig. 9 Filotipos del gen <i>hydA</i> II de los sitios de estudio. Arriba A1 en ESSA; A) A1 en ESSA; B) S3 en LSI; C) Comparación de ambos sitios | 33 |
| Fig. 10 Patrón de bandas del gen <i>hydA</i> de muestras ambientales de los Sitios 3 de Laguna San Ignacio (hyd-S3-Amb) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (hyd-A1-Amb1 y hyd-A1-Amb2). Las flechas indican las bandas cortadas en el gel y los | 34 |

números 7 y 8 las secuencias recuperadas del GenBank

Fig. 11 Patrones de bandas del gen *hydA* del sitio 3 de Laguna San Ignacio (hyd-S3-Int1 y hyd-S3-Int2) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (hyd-A1-Int1 y hyd-A1-Int2) como tratamiento que no posee glucosa, también llamado intacto. 36

Fig. 12 Análisis de patrones de bandas del gen *hydA* de 2 localidades de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno el Sitio 3 de Laguna San Ignacio (hyd-S3-Glu) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (hyd-A1-Glu1 y hyd-A1-Glu2) bajo el tratamiento de enriquecimiento con glucosa. Las flechas indican las bandas cortadas del gel y los números 9 y 10 las secuencias recuperadas del GenBank. 38

Fig.13 Resultados de la medición de H₂ por RGA con el detector de óxido de mercurio acoplado a un GC 59

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I. Parámetros fisicoquímicos registrados de los sitios LSI_3 y ESSA_A1, marzo del 2012. | 23 |
| Tabla II. Se muestran las estimaciones ecológicas realizadas del gel de la Fig. 1 | 25 |
| Tabla III. Descripción de las posibles identidades de acuerdo a la banda recuperada del DGGE | 26 |
| Tabla IV. Índices de diversidad y dominancia pertenecientes a muestras intactas | 27 |
| Tabla V. Índices de Shannon y Simpson de muestras enriquecidas con glucosa. | 28 |
| Tabla VI. Secuencia obtenida del tratamiento de glucosa | 28 |
| Tabla VII. Índices de diversidad y dominancia del tratamiento estéril. | 29 |
| Tabla VIII. Secuencia con mayor relación obtenida del GenBank del tratamiento estéril | 30 |
| Tabla IX. Tratamiento de formaldehído. Índices calculados | 31 |
| Tabla X. Índices calculados para el patrón de bandas del gen <i>hydA</i> de muestras ambientales | 34 |
| Tabla XI. Secuencias más relacionadas en el GenBank obtenidas de fragmentos del gen <i>hydA</i> | 35 |
| Tabla XII. Índice de Shannon y Simpson calculados para muestras enriquecidas con glucosa | 36 |
| Tabla XIII. Secuencias más relacionadas en el GenBank | 38 |
| Tabla XIV. Índices de diversidad y dominancia obtenidos para muestras intactas o sin glucosa. | 38 |
| Tabla XV. Tasas de producción de hidrógeno en el experimento de microcosmos. | 39 |

LISTA DE FÓRMULAS

| | |
|--|----|
| Fórmula (1). Índice de Shannon-Weaver | 21 |
| Fórmula (2). Proporción de bandas | 21 |
| Fórmula (3). Índice de uniformidad | 22 |
| Fórmula (4). Índice de dominancia de Simpson | 22 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del hidrógeno

El hidrógeno es el elemento más ligero y abundante del Universo. En peso representa el 92% de la materia conocida; del resto, un 7% es de He y solamente queda un 1% para los demás elementos. Sin embargo, en el Universo el hidrógeno es el sistema de almacenamiento de energía por excelencia (Heras- Celemín, 2008).

Originalmente, nuestro planeta en desarrollo tuvo probablemente una composición semejante a la del Universo. En el periodo de formación de la Tierra, esta se contrajo, se desarrollaron fuerzas gravitatorias y los elementos más livianos escaparon. Los elementos más pesados no escaparon, de manera que la composición de la Tierra resulto diferente de la composición del Universo.

La presencia inicial de grandes cantidades de hidrógeno en la atmósfera terrestre puede haber dado origen a la formación de compuestos hidrogenados como metano (CH_4), amoníaco (NH_3) y agua (H_2O), probablemente a través del metabolismo de los primeros microorganismos presentes que debieron estar adaptados a la atmósfera reducida de la Tierra. De esta manera en la actualidad encontramos al hidrógeno combinado en forma de agua (su compuesto más abundante; cubre el 80% de la superficie del planeta), materia viva (hidratos de carbono y proteínas; constituye el 70% del cuerpo humano), compuestos orgánicos, combustibles fósiles (petróleo y gas natural), etc. (Campbell, 2004).

Los microorganismos tuvieron un papel muy importante en el desarrollo de la atmósfera actual. Estudios realizados por Hoehler y colaboradores (2001), sugiere que una de las comunidades a las que se les ha atribuido su influencia en la composición de la atmósfera de la Tierra actual es a los tapetes microbianos (Hoehler *et al.*, 2001).

En los tapetes microbianos se ha reconocido que la diversidad microbiológica y la distribución de los grupos funcionales tienen un papel importante en el análisis ecológico de comunidades microbianas. La complejidad funcional que se ha detectado en los ambientes hipersalinos comprende: fotótrofosoxigénicos (diatomeas y cianobacterias), bacterias fototróficasanoxigénicas (proteobacterias, verdes no sulfurosas y verdes

sulfurosas), bacterias organotróficas aerobias y anaerobias, arqueas metanogénicas, bacterias sulfato reductoras y quimilitotróficos (DesMarais, 2003; Ley *et al.*, 2006). Dentro de estos microorganismos algunos están involucrados en la producción de hidrógeno.

La simple composición del hidrógeno molecular tiene influencia significativa en la función y estructura de la población de ecosistemas microbianos a través de su fuerte control sobre la termodinámica de reacciones redox en el metabolismo. Esto es más claramente expresado en sistemas anóxicos, alimentados de materia orgánica donde dichos sistemas requieren una múltiple transferencia de electrones entre organismos. De una variedad de compuestos que pueden mediar transferencias extracelulares, el hidrógeno parecer ser empleado por un amplio espectro de organismos. El favorecimiento termodinámico de cada una de las estrategias metabólicas donde está asociado el hidrógeno depende sobre las presiones parciales de hidrógeno intracelular las cuales son fuertemente afectadas por los niveles extracelulares locales (Hoehler *et al.*, 2002).

Mientras el rendimiento de energía libre (ΔG) de cualquier reacción química depende básicamente de la concentración de todos los productos y reactantes (Atkins, 1990), el hidrógeno ejerce particularmente una fuerte influencia sobre los procesos microbianos en el ambiente por dos razones principales:

1.- En reacciones redox que involucran la transferencia de más de un par de electrones, el hidrógeno es casi siempre el producto o reactante dominante en términos de estequiometría. Por ejemplo en la oxidación de propionato y la reducción metanogénica de CO_2 , ambas estequiometrías muestran alta relación con el hidrógeno más que con los demás productos y reactantes

2.- En la mayoría de los ecosistemas naturales hasta ahora estudiados las presiones parciales de hidrógeno son muy bajas (comúnmente <10 Pa o 70nM), mientras la tasa de recambio de hidrógeno es a menudo rápida. Por lo tanto el tiempo de residencia de hidrógeno en tales sistemas es muy corta, y la presión parcial de hidrógeno puede fluctuar dramáticamente en escalas de tiempo cortas (Hoehler *et al.*, 2002).

La fuerte sensibilidad de metabolismos microbianos anaerobios a la presión parcial del hidrógeno es expresada en una variedad de caminos, los cuales dependen grandemente de la

naturaleza del sustrato. La fermentación de moléculas más grandes que unos pocos carbonos se caracterizan frecuentemente por la producción facultativa de hidrógeno. Si la presión parcial de hidrógeno se lleva a cabo en niveles bajos, esta fermentación puede liberar grandes cantidades de hidrógeno, lo que permite altos rendimientos de energía a través de la oxidación completa del sustrato (Hoehler *et al.*, 2002).

Para la fermentación u oxidación de pequeñas moléculas orgánicas, la producción de hidrógeno es a menudo obligada. En tales procesos una acumulación de hidrógeno en el ambiente local incrementa rápidamente las condiciones termodinámicas desfavorables y la reacción deja de proceder en una dirección de avance neto. Por esta razón, organismos productores de hidrógeno generalmente no crecen en cultivos puros. Sin embargo, ellos crecen rápidamente en co-cultivo con organismos consumidores de hidrógeno que mantienen las presiones parciales bajas en el medio local (Hoehler *et al.*, 2002).

Los procesos de consumo de hidrógeno se ven afectados de manera opuesta: las reacciones son termodinámicamente o bioenergéticamente desfavorables cuando la presión parcial de hidrógeno es demasiado baja. Este hecho sustenta la exclusión competitiva comúnmente observada de procesos menos favorables termodinámicamente por otros más favorables. Por ejemplo a una concentración milimolar de sulfato, las bacterias sulfato reductoras pueden mantener presiones parciales de hidrógeno a niveles bajos que todavía les proporciona rendimientos de energía viables, pero excluye competitivamente de metanógenas haciendo que la reducción metanogénica del CO_2 sea termodinámicamente desfavorable (Lovley *et al.*, 1982).

Los microorganismos capaces de producir hidrógeno se encuentran distribuidos en los tres dominios Bacteria, Arquea y Eucaria. Estos organismos poseen enzimas que intervienen en dicha producción y pueden ser la FeFe-hidrogenasa, la NiFe-hidrogenasa y la hidrogenasa libre de metales. Entre los microorganismos se encuentran bacterias fotosintéticas, cianobacterias, bacterias fermentadoras, bacterias sulfato reductoras, metanógenos, algas verdes y protozoarios (Das *et al.*, 2006).

En estudios realizados para determinar la distribución del flujo de hidrógeno a lo largo del día en los tapetes microbianos, se demostró que el flujo de hidrógeno es mayor durante la

noche que en las horas de luz. Por otro lado una de las enzimas más importantes que interviene en la producción biológica de hidrógeno es la Fe-Fe hidrogenasa, la cual se encuentra presente en anaerobios estrictos como *Clostridium* y sulfato reductoras. Estos datos sugieren que el metabolismo potencial utilizado en los tapetes microbianos hipersalinos para la producción de hidrógeno es la fermentación, lo que hace de esta vía una atractiva ruta para producción renovable de hidrógeno (Hallenbeck, 2008).

Para el proceso fermentativo existen factores que afectan la producción biológica del hidrógeno como es la concentración del sustrato, pH y temperatura. Con respecto al sustrato los más empleados son los carbohidratos como la glucosa (cuya concentración utilizada en reactores es de 10% v/v) que son transformados a alcoholes o ácidos orgánicos como pueden ser etanol, butanol, ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico, ácido propiónico, entre otros. A través de esta transformación estos microorganismos obtienen energía química en forma de ATP, pero también de manera concomitante se genera hidrógeno. (Decker *et al.*, 1970; Das *et al.*, 2006).

Se conoce que los microorganismos que liberan hidrógeno dentro del tapete microbiano se localizan en los primeros 2 mm de la capa superficial (Burow *et al.*, 2011). Además, se sabe que con la secuencia del gen 16S ARNr se puede obtener una idea de la identidad pero también de las historias biológicas de las cepas depositadas en colecciones de cultivo de microorganismos para inferir si producen o no la hidrogenasa y posteriormente, explorar con mayor certeza la existencia de microorganismos productores de hidrógeno, a través del gen *hydA*. Ya que el hidrógeno se ha convertido en una de las alternativas energéticas más atractivas para sustituir a los combustibles fósiles ya que se trata de una fuente limpia, renovable y con un alto contenido energético que no contribuye en la contaminación ambiental (Tamagnini *et al.*, 1997; Pandu y Joseph, 2012) es importante realizar análisis y estudios de aquellas comunidades que posean potenciales productores de hidrógeno.

1.2 Vías metabólicas

La degradación bacteriana de los hidratos de carbono ocurre por varias vías metabólicas en las que los electrones son transferidos sucesivamente a compuestos de potencial de óxido-reducción mayor, con la liberación final de energía en forma de ATP. La glucosa es la

principal fuente de hidratos de carbono para las bacterias y su degradación (como la de otros hidratos de carbono de cuatro y cinco carbonos) prosigue por tres vías principales: de Embden-Meyerhoff-Parnas, de Entner-Doudoroff y de Warburg-Dickins. La glucosa es convertida en ácido pirúvico en cada una de estas tres vías por un conjunto diferente de pasos de degradación. Las bacterias utilizan una o más de estas vías para el metabolismo de la glucosa, de acuerdo a su composición enzimática y a la condición de presencia o ausencia de oxígeno (Koneman, 2006).

En algunos lugares las fluctuaciones de oxígeno son tan marcadas (tapetes microbianos) que obligan a algunos microorganismos a cambiar su metabolismo, como es el caso de algunas cianobacterias que durante el día, y en presencia de oxígeno, realizan la fotosíntesis, mientras que durante la noche y en condiciones de anoxia emplean la fermentación para poder subsistir (Moezelaar *et al.*, 1996)

1.2.1 Vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP)

La fermentación involucra reacciones de oxidación–reducción interna equilibrada en la que algunos átomos de la fuente de energía se reducen mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación a nivel de sustrato (Madigan *et al.*, 2004). En esta vía metabólica la glucosa se degrada sin oxígeno por lo que la vía EMP, también es llamada vía glucolítica o anaerobia, y es utilizada fundamentalmente por las bacterias anaerobias y, en cierta medida, también por las bacterias anaerobias facultativas. Consiste de nueve reacciones enzimáticas que producen dos moléculas de piruvato y dos equivalentes reducidos de NADH. Los pasos intermedios en la vía EMP comprenden la fosforilación inicial de glucosa, la conversión a fosfato de fructosa y la segmentación para formar dos moléculas de gliceraldehído fosfato, las cuales a través de una serie de pasos intermedios, forman ácido pirúvico (Koneman, 2006).

Históricamente, la vía EMP también ha sido llamada vía fermentativa. Fermentación y metabolismo anaerobio fueron considerados sinónimos desde que Pasteur demostró que los ácidos y los alcoholes constituyen los principales productos finales de la degradación de los hidratos de carbono cuando se excluye el oxígeno del sistema. Según un concepto actual, se sostiene que existe un metabolismo fermentativo en un sistema glucolítico cuando los

compuestos orgánicos sirven como aceptor final de hidrógeno (electrones). Por lo tanto, en la vía EMP el ácido pirúvico actúa como aceptor intermedio de hidrógeno, pero luego se oxida al entregar sus hidrogeniones al lactato de sodio para formar ácido láctico u otras sales orgánicas para formar algunos de los denominados ácidos mixtos. Estos ácidos son los productos finales del metabolismo de la glucosa por la vía EMP y explican la caída del pH en las pruebas de fermentación utilizadas para la identificación de las bacterias. Las bacterias tienen los sistemas enzimáticos con los que pueden degradar aún más estos ácidos mixtos en alcoholes, CO₂ u otros compuestos orgánicos (Koneman, 2006; Madigan *et al.*, 2004).

El resultado final de esta ruta es el consumo de glucosa, la síntesis neta de dos ATPs y la formación de productos de fermentación derivados del piruvato, un intermediario clave. Los productos más frecuentes son etanol, ácido láctico y una extensa variedad de otros ácidos orgánicos y alcoholes, así como compuestos gaseosos como el hidrógeno molecular (Madigan *et al.*, 2004).

1.2.2 Vía de Entner-Doudoroff

La vía de ED está bastante extendida, sobre todo en bacterias Gram negativas, aunque no es común en bacterias anaerobias. La vía ED degrada la glucosa a gluconato mediante las enzimas glucosa deshidrogenada, y gluconato deshidrogenada, las cuales están enlazadas a membrana y alimentan directamente electrones a la cadena respiratoria. La glucosa no es convertida en dos moléculas de triosa carbono como en la vía EMP: más bien, es oxidada a 6-fosfoglucono y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato antes de formar ácido pirúvico. Algunas bacterias utilizan vías de corto circuito para oxidar la glucosa en ácido glucorónico y cetoglucorónico sin un paso de fosforilación inicial. En cualquier caso, se forma en ácido pirúvico intermedio. “Oxidación” se refiere más a la manera en que el ácido pirúvico transfiere sus hidrogeniones a la vía por medio de la cual se forma. Al carecer de las enzimas deshidrogenasas necesarias para oxidar el ácido pirúvico a ácido láctico u otros “ácidos mixtos”, las bacterias oxidativas transfieren los hidrogeniones disponibles del ácido pirúvico al ciclo de Krebs, donde los iones finalmente se unen con oxígeno elemental para

formar agua. Por lo tanto, el metabolismo oxidativo de los hidratos de carbono actualmente se define como las reacciones productoras de energía que requieren oxígeno molecular (u otros elementos no orgánicos) como aceptor terminal de electrones (Koneman, 2004).

El entendimiento de las comunidades microbianas, es decir la función que desempeñan dentro de la comunidad, es de suma importancia para varios fines entre ellos el ecológico y el biotecnológico. No solo debemos conocer las vías metabólicas que se pueden desarrollar dentro del ecosistema, sino que también se debe hacer uso de las nuevas herramientas que se han desarrollado, entre las que destacan las basadas en la biología molecular.

1.2.3 Warburg-Dickins

La vía Warburg.-Dickins, es en realidad un híbrido de la vía Embden-Meyerhof-Parnas y la vía Entner-Doudoroff. Los pasos iniciales son paralelos a los de la vía de ED; sin embargo, más adelante se forma gliceraldehído-3-fosfato como precursor del ácido pirúvico, similar a la vía de EMP. Estos microorganismos aparecen como fermentadores en los sistemas de prueba, aun cuando se utilice estrictamente esta última vía.

Sin embargo cabe mencionar que existen distintos sustratos que pueden emplearse para la fermentación, no solo azúcares, también se utilizan aminoácidos, entre otros. (Decker *et al.*, 1970)

1.3 Técnicas moleculares utilizadas en el análisis de comunidades (fingerprinting)

Las técnicas de biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y composición de especies de las comunidades microbianas (Muyzer *et al.*, 1993), ya que pueden analizarse comunidades en su totalidad, incluyendo a aquellos microorganismos que no han logrado ser cultivados en el laboratorio, es por ello que estos métodos han alcanzado gran importancia en la ecología microbiana. (Rosas *et al.*, 2003). Entre las técnicas utilizadas para el análisis de comunidades se pueden mencionar:

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Esta técnica utiliza oligonucleótidos de 10 a 12 pares de bases para amplificar segmentos al azar de ADN. Cuando el ADN que se encuentra entre las secuencias amplificadas consta de repeticiones en tándem y hay variaciones en su longitud, el fragmento amplificado será de longitud variable o polimórfico en la población o comunidad (Rosas *et al.*, 2003).

Esta estrategia sirve para dar un primer vistazo a la composición de distintas comunidades; ya que no es posible distinguir el origen hetero u homocigoto (NCBI, 2012). Por otro lado, debemos mencionar que esta técnica es poco reproducible debido a que cualquier variación mínima en las condiciones de PCR o del ADN original puede generar cambios en los patrones.

T-RFLP's (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)

Este método se basa en la variación en la posición de sitios de restricción entre las secuencias, y en la determinación de la longitud de fragmentos terminales de restricción marcados con fluorescencia, analizados mediante de electroforesis en geles de alta resolución en secuenciadores de ADN. El resultado es una distribución de abundancia de fragmentos de diferentes tamaños (NCBI, 2012).

A pesar de ser un método rápido de análisis comparativo de la comunidad tiene baja resolución, ya que existe la probabilidad de que varios filotipos se encuentren representados por un solo tamaño de fragmento y con ello un solo pico en la distribución (Rosas *et al.*, 2003).

ARDRA (Amplified Ribosomal ADN- Restriction Analysis)

Esta técnica que se usa para caracterizar comunidades y poblaciones, consiste en amplificar por PCR el gen 16S ARNr de la comunidad total, aislar las diferentes copias que se encuentran en la mezcla y, posteriormente, someter a cada una de las copias a digestiones enzimáticas (también puede digerirse la muestra total). Esto resulta en un patrón de bandas en electroforésis en geles de agarosa; los patrones de restricción permiten identificar diferentes grupos o identificar comunidades distintas.

FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)

Es un método usado principalmente con comunidades de bacterias y arqueas y permite la identificación y cuantificación directa de grupos taxonómicos generales o específicos dentro de su ambiente natural. Todas las células son fijadas y su 16S ARNr o 23S ARNr se hibridiza con sondas de oligonucleótidos de un taxón específico y marcado con fluorescencia. Posteriormente las células que hibridaron y quedaron marcadas pueden verse en un microscopio óptico de fluorescencia; con este método se evitan artefactos generados por sesgos en la extracción de ADN, amplificación por PCR y clonación.

Electroforesis de geles en gradiente desnaturizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis/DGGE)

Con esta técnica se pueden separar fragmentos de ADN de la misma longitud (200-700pb) pero con diferente secuencia (Muyzer *et al.*, 1993). La separación se basa en la disminución de la movilidad electroforética que sucede cuando la cadena doble de la molécula de ADN se fusiona parcialmente en los geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturizantes de ADN (una mezcla de urea y formamida). Cuando la fusión de los fragmentos de ADN es alcanzada, se da una transición helicoidal de la molécula y la migración de esta se detiene prácticamente. Esta transición que ocurre en la molécula de ADN debido al desnaturizante químico es influenciada por dos factores:

- Los enlaces de hidrógeno formados entre los pares de bases, en donde las regiones ricas en GC se separan a porcentajes mayores del desnaturizante en comparación con las regiones que tienen un mayor contenido de AT.
- La atracción entre las bases vecinas de la misma hebra en la cadena de ADN.

Esta técnica demuestra la presencia de varias bandas distinguibles en un patrón de separación (Muyzer y Smalla, 1998), en donde se puede visualizar también la intensidad de las bandas, infiriendo con posteriores estudios de secuenciación las especies predominantes en las comunidades microbianas.

Cada banda en el gel se considera como un filotipo, unidad taxonómica operacional (OTUs) distinta en la comunidad y la intensidad de las bandas se considera un reflejo de la abundancia de esa secuencia en la comunidad (Rosas *et al.*, 2003).

La técnica de PCR- DGGE, nos permite estudiar comunidades microbianas de muestras ambientales, al emplear regiones de genes como el 16S ARNr o funcionales como el gen *hydA*, cuyos productos de amplificación nos proporcionan un panorama general de la comunidad presente en la muestra al visualizarlos en el gel de acrilamida. En el gel, cada banda representa una población dentro de la comunidad.

Los perfiles de DGGE son una alternativa atractiva y confiable a pesar de algunas incertidumbres inherentes tales como sesgos en productos de amplificación y la sobreestimación de la abundancia de células grandes (Nübel *et al.*, 2000), es una técnica rápida, menos costosa y requiere menos mano de obra que la secuenciación (Muyzer *et al.*, 1993), que nos permite el análisis altamente reproducible de las comunidades bacterianas. La PCR-DGGE es especialmente adaptado a diferencias espaciales y temporales en las comunidades bacterianas (Singh y Ramaiah, 2011).

Esta técnica cultivo independiente basada sobre el análisis de ADN ambiental, especialmente del 16S ARNr, tiene el potencial para superar las limitaciones inherentes a la técnica y se ha convertido en una herramienta poderosa de la ecología microbiana moderna (Amann *et al.*, 1995). Por otra parte, está la existencia de base de datos que contiene miles de secuencias ribosomales que permiten la afiliación filogenética de microorganismos no cultivables. Además la estructura genética de comunidades microbianas como un todo puede ser estudiada por DGGE. Por otra parte el número de bandas de DGGE nos da información acerca de la riqueza de OTUs analizadas en la comunidad. Sin embargo se ha convertido en evidencia de que la comunidad microbiana del suelo es demasiado compleja para ser comprendida como un todo. Microorganismos ecológicamente relevantes de poca abundancia no pueden ser detectados en un enfoque universal (Muyzer *et al.*, 1993; Kuffner *et al.*, 2004).

En suma, el patrón de bandeo del DGGE representa principalmente uno de los mayores constituyentes del análisis de la comunidad porque su aprovechamiento permite la separación de moléculas de ADN que difiere por una sola base (Myers *et al.*, 1987; Dar *et al.*, 2005; Yanling *et al.*, 2008)

Además esta técnica se conoce y aplica en el laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, del CIBNOR.

1.4 Herramientas en el análisis de comunidades

Por otra parte, para complementar las técnicas moleculares se hace uso de conceptos en ecología que ayudan a caracterizar una comunidad de tal manera que se estima y expresa cuantitativamente como es dicha comunidad. El análisis de cualquier comunidad involucra la determinación estadística de la diversidad a partir de la abundancia relativa de los OTUs presentes. Sin embargo, estimar la diversidad presenta algunos problemas como el tamaño de muestra necesario para representar a la comunidad y la elección correcta del estimador de diversidad (Magurran, 1995)

Se han realizado evaluaciones sobre el tamaño de muestra que se requiere para realizar una estimación útil de la diversidad en la comunidad, además de los estimadores útiles en comunidades bacterianas (Hughes *et al.*, 2001).

Con respecto al tamaño de muestra la rarefacción ha sido utilizada (Dunbar *et al.*, 1999), esta aproximación compara la diversidad observada entre sitios, tratamientos o hábitats que no han sido muestreados equitativamente. Una curva de rarefacción muestra el cambio en el valor esperado de riqueza de especies en función del tamaño de la muestra (Ricklefs y Miller, 2000).

En cuanto a los estimadores como los índices de Simpson y Shannon–Wieber, han mostrado ser eficientes para hacer comparaciones de la comunidad entre muestras de diferentes localidades; aunque es importante mencionar que todos los estimadores tienen limitaciones y una de ellas es que no hay rigor en la definición de los OTUs (Staley, 1997). Sin embargo, la mayoría de las preguntas sobre estructura y función de las comunidades sobrepasa los problemas sobre definición de OTUs y los sesgos de muestreo (Hughes *et al.*, 2001), para evitar el efecto del sesgo en el muestreo se deben utilizar varias técnicas o genes que hagan más robustas las comparaciones (Nübel *et al.*, 1999).

2. ANTECEDENTES

Existe una base de evidencias, que nos hacen suponer que la eficiente producción de hidrógeno es el resultado de consorcios, donde cada microorganismo cumple un rol dentro del sistema de producción biológica del hidrógeno, ya que algunos microorganismos proveerán de sustratos a otros para que estos a su vez desarrollen metabolitos de interés para otros. Es por ello el especial interés de conocer y entender las relaciones existentes entre la diversidad microbiana involucrada en el metabolismo del hidrógeno de un sistema (Hung *et al.*, 2011), como lo son los tapetes microbianos.

Estudios realizados en Shark Bay, Australia, se mostraron que la producción de hidrógeno puede variar dependiendo del sitio, en cuanto a los ciclos del día y la noche, y que además puede relacionarse con las características de la macro estructura del tapete (Skyring *et al.*, 1988); en estos trabajos, también se observó que el proceso de fermentación es una de las principales fuentes de hidrógeno (Burow *et al.*, 2011).

En relación a la producción de hidrógeno, se han determinado dos grandes grupos productores a partir del proceso de fermentación; los microorganismos fototróficos y las bacterias fermentadoras. Entre los primeros destacan las cianobacterias ya que algunas de ellas poseen la capacidad de fermentación como alternativa para obtención de energía y producción de hidrógeno en condiciones de anoxia y oscuridad (Moezelaar, 1996), además se sabe que la enzima involucrada es la hidrogenasa bidireccional (Tamagnini *et al.*, 1997, 1999, 2007; Schmitz *et al.*, 1995; Schütz *et al.*, 2003). Por otro lado recientemente, en el estuario Elkhorn Slough (Monterey Bay, California, USA), se realizó un análisis filogenético complementado con experimentos de incubación de tapetes microbianos donde se inhibió del fotosistema II (o el proceso de fijación de nitrógeno) para evaluar si estos son contribuidores importantes dentro de la producción de hidrógeno, concluyéndose que la fijación de nitrógeno no contribuye significativamente en la producción biológica de hidrógeno, ya que al inhibir el proceso no se detectaron cambios en la producción de hidrógeno (Burow *et al.*, 2011). En cuanto al segundo grupo de microorganismos involucrados en el proceso, se sabe que la enzima involucrada es la Fe-Fe hidrogenasa, para la cual se han diseñado parejas de primers para amplificar fragmentos específicos del gen *hydA*, y de esta manera determinar la diversidad de microorganismos que presentan este

gen y por lo tanto son productores potenciales de hidrógeno. Estos trabajos se han realizado en un pantano en Alemania (Schmidt *et al.*, 2010), en los tapetes microbianos del parque Yellowstone (Boyd *et al.*, 2010) y en Guerrero Negro (Boyd *et al.*, 2009) e incluso en ambientes controlados en un biorreactor (Chang *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2008). Cabe destacar, que en ambientes controlados, el género de mayor estudio ha sido *Clostridium* del que se conocen los parámetros óptimos de producción de hidrógeno: pH, temperatura y concentración de sustrato (Alalayah *et al.*, 2008)

3. JUSTIFICACIÓN

Los ecosistemas microbianos estratificados, representan excelentes modelos para reconstruir y comprender las primeras etapas de la evolución biológica, ya que son la contraparte moderna de los estromatolitos (López-Cortes, 1998; Hoehler *et al.*, 2001; DesMarais, 2003). Además, nos ayudan a comprender los ciclos biogeoquímicos, donde los microorganismos involucrados deben estudiarse detalladamente.

Entre los ciclos biogeoquímicos, se encuentra el ciclo del hidrógeno donde es importante conocer la dinámica de los microorganismos involucrados, tanto en su producción como en su consumo, ya que el hidrógeno (en cuestiones ecológicas) representa un intermediario en la descomposición de la materia orgánica, así como en interacciones sintróficas (Ley *et al.*, 2006; Kunin *et al.*, 2008; Boyd *et al.*, 2009). La diversidad metabólica de la producción de hidrógeno es condición para los estudios de bio-exploración de microorganismos por ser una alternativa de energía renovable que en el futuro puede sustituir los combustibles fósiles, así con esta información se pueden generar las bases para el entendimiento del proceso de producción biológica de hidrógeno y con ello optimizar la producción de hidrógeno en sistemas controlados (Schutz, 2003; Tamagnini *et al.*, 2007; Burow *et al.*, 2011).

PREGUNTA

¿Cómo es la estructura de la comunidad microbiana en términos de patrón de filotipos de microorganismos productores de hidrógeno en la electroforesis de DGGE de comunidades naturales y de un experimento de microcosmos en cual el tapete fue enriquecido con un sustrato como la glucosa?

4. OBJETIVOS

4.1 General

Realizar un análisis de las poblaciones que constituyen la comunidad de microorganismos productores de hidrógeno a partir de los genes, 16S ARNr y *hydA* de la FeFe- hidrogenasa de tapetes microbianos hipersalinos intactos y de microcosmos.

4.2 Particulares

1. Comparar dos sitios, uno natural y otro artificial, con respecto a muestras ambientales y a la respuesta en el experimento de microcosmos.
2. Medir la concentración de hidrógeno ambiental colectado *in situ*.
3. Estudiar la estructura y composición microbiana en tapetes naturales y manipulados experimentalmente.
4. Obtener secuencias de los genes de 16S ARNr y el gen *hydA* de hidrogenasa de experimentos de muestras intactas y manipuladas.

5. HIPÓTESIS

Si, la composición de la comunidad depende tanto de los factores fisicoquímicos encontrados en un sitio como de la capacidad metabólica de dicha comunidad, entonces se espera observar diferencias en el patrón de bandas de los filotipos del 16S ARNr y del gen *hydA* en dos tipos distintos de comunidades de dos sitios geográficos, con y sin la estimulación con glucosa.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Áreas de estudio

Se realizó una salida a localidades importantes para nuestro estudio situadas en la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno, Una de ellas es nombrada Exportadora de Sal S. A. (ESSA), situada en Guerrero Negro (Fig. 1), cuyo ambiente se considera construido por el hombre; ESSA posee varios estanques de concentración pero para este estudio fue considerada el Área 1 (A1) o primer estanque de concentración (N 27°35.857' W 113°53.716') cuya localidad se caracteriza por presentar tapetes sumergidos permanentemente en forma de polígonos; la otra localidad considerada como ambiente hipersalino natural, está localizada a los N 27°56.361' W 113°04.428' en Laguna San Ignacio (Fig. 2), y cuya área de estudio se le denominó Sitio 3 (LSI_S3) que consta de un charco, cuya columna de agua es somera y color rojo, además de otros charcos más pequeños color gris, aquí la comunidad no forma tapetes, más bien se asocia a sedimentos de color gris y café, en este sitio se encontraron costras de sal alrededor del charco y por debajo de la columna de agua, las comunidades en sedimentos encontrados aquí son dependientes de las condiciones naturales por lo que existen épocas del año donde se encuentran sin agua.



Fig. 1 Imagen satelital de Exportadora de Sal, S.A., en Guerrero Negro, B.C.S.



Fig. 2 Imagen satelital de Laguna San Ignacio, B. C. S.

6.2 Parámetros fisicoquímicos y recolección de muestras de tapetes microbianos

En marzo y abril del 2012 se realizaron visitas a las localidades de estudio para determinar los parámetros fisicoquímicos *in situ* y para coleccionar muestras. El pH y la salinidad se determinaron mediante el uso de equipos portátiles (ThermoOrion, Beverly, MA USA y Hanna Instruments, Rumania-USA, respectivamente) y la temperatura con un termómetro digital (VWR, Alemania). Se coleccionaron un promedio de 6 muestras por sitio, en crioviales para su preservación (se utilizó material estéril, como jeringas, espátula) y para la realización de estudios de biología molecular. Además, se recoleccionaron alrededor de 300 cm² de muestras de tapete microbiano en contenedores de plástico para su uso en los experimentos de microcosmos, y el material que sobro se puso a secar a temperatura ambiente en condiciones de intemperie.

6.3 Recolección de gas ambiental

La captura de las muestras de gas se realizó al quebrar o perturbar la corteza mineral o el tapete microbiano, consiguiendo la liberación de burbujas de gas en la columna de agua, estas burbujas fueron capturadas con un embudo invertido con septo. Una vez que se desplazó el agua, éste fue recuperado con una jeringa que se insertó en el septo del embudo; posteriormente el gas se colocó en botellas de 10 mL selladas, en las que previamente se generó vacío.

6.4 Recolección de gas en microcosmos

Primero las botellas fueron agitadas para que se liberara el gas de los tapetes a la atmósfera de la botella, posteriormente se introdujo una jeringa por los septos de las botellas y se extrajo el aire. Después, la jeringa se colocó en botellas con solución salina (200 ppm) previamente preparadas, desplazando el líquido con el gas introducido

6.5 Análisis de hidrógeno

Las muestras de gas fueron analizadas en Exobiology Branch, NASA Ames Research Center, Moffett Field, CA, USA por Angela Detweiler, en un analizador de gases reducidos (RGA) equipado con un detector de óxido de mercurio y una columna de tamiz molecular (13X60/80), utilizando helio como gas acarreador (caudal de 20-25SCCM).

6.6 Preparación de incubaciones

Las incubaciones se realizaron a 26°C con periodos de luz-oscuridad 12:12.

En el experimento de microcosmos, los tratamientos de esterilización por autoclave y el empleo de formaldehído se realizaron para contar con controles negativos de la producción de hidrógeno. La adición de glucosa se utilizó para estimular y favorecer el crecimiento de grupos de bacterias que usan este sustrato (enriquecimiento). Se preparó otro control que carece de sustrato, del cual se esperó la nula capacidad de producción de hidrógeno, al considerar que no habría estimulación de microorganismos fermentadores que emplean este carbohidrato en dichas comunidades. Los patrones de bandas del DGGE de los diferentes tratamientos fueron comparados con el programa Gel Compare II.









| TRATAMIENTOS | SITIOS | |
|---|--|---|
| | ESSA_A1 | LSI_S3 |
| Problema: Adicionado con glucosa 1% (Tapete + agua de la localidad + solución de glucosa) |  |  |
| Control vivo. (Tapete + agua de la localidad) |  |  |
| Control negativo. Tapete estéril (Tapete + agua de la localidad ; esterilizar a 15lb de presión por 25 minutos) |  |  |
| Control negativo. Tapete con formaldehido (Tapete + agua de la localidad + solución de formaldehido, dando una concentración final del 5%) |  |  |

Fig. 3 Diseño experimental. Las incubaciones se realizaron por triplicado, sin modificación de la atmósfera.

6.7 Extracción de ADN

De las muestras A1 (Exportadora de Sal, S.A. o ESSA) y S3 (Laguna San Ignacio o LSI) se realizaron extracciones de ADN total mediante el kit PowerBiofilm, siguiendo las instrucciones del fabricante (Mo BioLaboratories, Calrsbad, CA). La pureza y

concentración del ADN obtenido se verificó en un NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA), considerando la Abs_{280} y Abs_{260}/Abs_{280} (respectivamente), y la integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 2 μ L de bromuro de etido. Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes: tiempo de corrida 55 minutos a 100V. Se cargaron en cada pozo 5 μ L de muestra con 3 μ L de loading buffer, usando como marcador de peso molecular el 24Kpb Max DNA Ladder (exACTGene, Fischer BioReagents). Los geles obtenidos fueron visualizados y documentados digitalmente con un el fotodocumentador BioDoc-It -20 System (UVP)

6.8 Condiciones de PCR

PCR anidado como estrategia para análisis la complejidad de la comunidad microbiana (Dar *et al.*, 2004)

Primer paso. Amplificación del segmento 8-1522 del gen 16S ARNr de bacteria.

Se realizó la amplificación por PCR de segmentos específicos del gen 16S ARNr, el tamaño esperado de los amplicones de 1514 bases; utilizando los primers: 8F: 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' y 1522R: 5' AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA 3' (Giovannoni, 1991); la amplificación se realizó en un termociclador BioRad (MJ mini 48-well personal thermalcyclerPTC-1148C). Cada reacción consistió de: 8.5 μ L era agua estéril Sigma libre de nucleasas, 1.0 μ L (10ng) del primer 8F, 1.0 μ L (10ng) del primer 1522R, 12.5 μ L de Master MixPromega (contiene iones de magnesio, dNTPs y la enzima Taq polimerasa) y 2 μ L de ADN (ADN purificado de las muestras) en un volumen final de 25 μ L. El programa de amplificación fue: 3 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C (1 min), 60°C (1 min) y 72°C (2 min) y finalmente un ciclo de 72°C por 7 min (Polz y Cavanaugh, 1997). En cada lote de amplificación se incluyeron, un control positivo (bacteria), un control negativo (arquea) y un blanco (sin ADN).

Segundo paso. Amplificación del segmento 341-907 del 16S ARNr bacteriano.

La segunda pareja de primers utilizada fue 341F+ GC: 5' CGC CCG CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG 3' y 907R: 5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3' (Muyzer *et al.*, 1993), el tamaño calculado de los amplicones fue de alrededor de 550pb. Para la amplificación se utilizaron las mismas

cantidades de reactivos que en el primer paso, diferenciándose en los primers y en el ADN usado como templado que en este caso es el producto del primer paso del PCR. El programa de amplificación consistió de: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 94°C (1 min), 56°C (1 min) y 72°C (1 min), con una extensión final de 5 minutos 72°C (Muyzer *et al.* 1993). Al igual que el primer PCR, las muestras fueron acompañadas de un control positivo, un control negativo y un blanco.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con 2 µL de bromuro de etidio; en cada pozo se cargaron 5µL de muestra y como marcador molecular se usó el 50pb mini ADN Ladder (exACTGene, Fischer BioReagents). Los geles fueron fotodocumentados digitalmente (BioDoc-It -20 System, UVP).

PCR directo. Amplificación del gen *hydA* de la hidrogenasa Fe-Fe

Los primers utilizados fueron 272F: 5' GCH GAY MTB ACH ATW ATG GAR GA 3' y 427R: 5' GCN GCY TCC ATD ACD CCD CCN GT 3'; estos cebadores son utilizados de manera general para organismos fermentadores (Boyd *et al.*, 2009). Se utilizaron las mismas cantidades y reactivos antes mencionados; el programa de amplificación utilizado fue: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C (1 min), 56.5°C (1 min) y 72°C (1 min) y una extensión final de 7 min a 72°C.

6.9 Electroforesis de gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los productos de PCR obtenidos fueron separados mediante la técnica DGGE, dichos productos fueron cargados en geles de poliacrilamida al 6%, conteniendo un gradiente desnaturalizante químico vertical del 30 al 70 %. A cada gel se le formo una zona de empaquetamiento sin agente desnaturalizante; la electroforesis se realizó a temperatura constante de 60°C con 50V durante 18h.

La detección de las bandas en el gel, se realizó usando tinción con Bromuro de etidio que consiste en 30 min de incubación en una solución de EtBr 0.5µg/mL en solución amortiguadora TAE 1X.

Las bandas se recuperaron del gel mediante corte con bisturí y fueron colocadas en viales de 0.6mL con 50µL de agua en la que el ADN se eluyó durante 24 horas. Una vez transcurrido dicho tiempo se realizó un PCR con los primers 272F y 427R (en el caso del gen *hydA*) y 341F y 907R para el 16s ARNr. Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1% y de ahí se seleccionaron las bandas que amplificaron para su posterior secuenciación (Genewiz).

Cálculo de índices de diversidad y dominancia

Los gels obtenidos del DGGE se fotodocumentaron digitalmente y las imágenes fueron analizadas con el programa GelCompare II (AppliedMaths, Sint-Matens-Latem, Belgium), obteniendo dendogramas e intensidades de bandas de cada tratamiento.

Con dicho análisis, se calculó la riqueza de especies (R), el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H'), el índice de uniformidad (e) y el índice de dominancia de Simpson (S). Para la riqueza se asumió que cada banda de DGGE representa una unidad taxonómica operativa (OTU), para el índice de Shannon las intensidades de las bandas de DGGE son una aproximación de la abundancia relativa (datos que se proporcionan en el análisis del GelCompare II) (Kosman y Leonard, 2005)

Fórmula 1. Índice de diversidad de Shannon-Weaver

$$H' = - \sum [(p_i)](\ln[p_i])$$

(Gafanet *al.*, 2005; Yanling *et al.*, 2008)

donde: H' es el Índice de diversidad y p_i es la proporción de las bandas y se calcula:

Fórmula 2.

$$p_i = \frac{n_i}{\sum n_i}$$

donde, n_i es la altura del pico de la curva arroja el GelCompare II. Por otra parte el índice de equitatividad o uniformidad se calculó mediante la fórmula.

Fórmula 3 Índice de uniformidad

$$e = \frac{H'}{\ln R}$$

(Atlas y Barta, 1998)

En este caso el numerador representa al índice de diversidad de Shannon (H') y el denominador el logaritmo natural de la riqueza (R)

Por último presentamos la fórmula utilizada para calcular el índice de dominancia de Simpson;

Fórmula 4. Índice de dominancia de Simpson

$$S = \sum p_i^2$$

(Gafan *et al.*, 2005; Yanling *et al.*, 2008)

6.10 Obtención de secuencias, análisis de comunidades (GelCompare) y Blast en GenBank

Las bandas de interés en los geles de DGGE, fueron cortadas con un bisturí estéril, posteriormente el ADN contenido fue eluido del gel con agua destilada estéril a 4°C durante 24 horas. El ADN recuperado fue re- amplificado con las parejas de primers 341F y 907R utilizados en el segundo paso del PCR anidado. Los productos obtenidos se secuenciaron.

Las secuencias obtenidas fueron calificadas y editadas para posteriormente compararse con la base de datos de GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov/pagina) usando la herramienta BLAST (discontiguous megablast)

7. RESULTADOS

7.1 Parámetros fisicoquímicos de las localidades

Los datos fisicoquímicos de los sitios de estudio de situadas en la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno (marzo del 2012) se muestran en la tabla I. Para cada sitio se señalan datos como temperatura, pH, salinidad y concentración de hidrógeno registrada. Ambas localidades de estudio son consideradas como ambientes hipersalinos, debido a que superan el 3.5% de salinidad. Durante las colectas ambas localidades estuvieron inundadas. La toma de las muestras de gas se logró al quebrar o perturbar la corteza mineral o el tapete microbiano, liberándose burbujas de gas en la columna de agua.

Tabla I. Parámetros fisicoquímicos registrados de los sitios LSI_3 y ESSA_A1, marzo del 2012

| | ESSA_A1 | LSI_S3 |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| Tipo de ambiente hipersalino | Construida por el hombre | Es un sitio natural |
| Geoposición | N 27°35.857' W 113°53.716' | N 27°56.361' W 113°04.428' |
| Temperatura (°C) | 20°C | 31°C |
| Salinidad (g/L) | 53.9 | 282 |
| pH | 8 | 6.7 |
| Concentración de H₂ (%) | 0.001145 | 0.005567 |
| Presencia de burbujas | + | + |
| Presencia de columna de agua | + | + |

+ Presencia.

7.2 Análisis de la comunidad microbiana por medio del gen 16S ARNr

7.2.1 Muestras ambientales

El análisis de los patrones de PCR-DGGE del gen 16S ARNr extraído de muestras ambientales de tapetes microbianos, revelan la presencia de varias bandas del Dominio Bacteria. El número de bandas y su intensidad fueron obtenidas mediante el programa de Gel Compare II; con estos datos se calcularon los índices de Shannon, Simpson y equitatividad que se muestran en la tabla II, además del número de OTUs o riqueza. Los tratamientos se analizaron por separado para realizar de manera más sencilla la descripción e interpretación de los resultados. El primer análisis gel DGGE (Fig.4) se realizó de muestras ambientales de ambas localidades lo que se observa en la figura (4) ya que dos *clusters* se distinguen claramente, uno conformado por LSI_S3 y el otro por ESSA_A1. El primer *cluster* (S3-Amb 1 y 2) muestra que hay un 80% de similitud entre los duplicados. El primer integrante de este *cluster* está formado por 25 OTUs y el segundo de 20, mientras que en el segundo *cluster* generado (A1-Amb 1 y 2) el porcentaje de similitud es del 90% y sus elementos revelan 26 y 23 OTUs respectivamente. El valor de 74% de similitud entre los sitios (LSI_S3 y ESSA_A1), apoya la hipótesis que planteo la existencia de estructuras de comunidades diferentes en muestras ambientales; alrededor de 15 OTUs estuvieron presentes en ambos sitios. Por otra parte, en los recuadros azules se observan las bandas únicas en ESSA_A1 y en los morados las bandas presentes únicas en LSI_S3, estos datos sugieren que existen diferencias en la estructura de la comunidad ya que cada localidad presenta un patrón de bandas distinto lo que sugiere que ciertos microorganismos no son favorecidos por las características fisicoquímicas particulares de cada sitio.

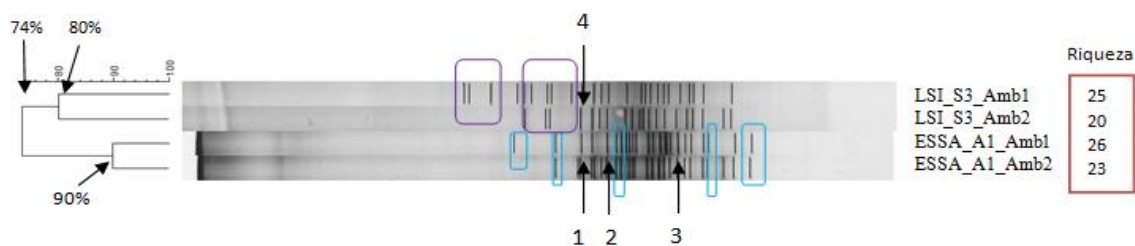


Fig. 4 Patrón de bandas de DGGE de productos de PCR de muestras ambientales para el gen 16S ARNr. Sitio 3 de Laguna San Ignacio (LSI_S3_Amb1 y LSI_S3_Amb2); Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (ESSA_A1_Amb1 y ESSA_A1_Amb2). En la parte izquierda de la figura se muestra el dendrograma con los porcentajes de similitud, en la parte media del gel y en la parte derecha los nombres pertenecientes a cada carril y su riqueza de unidades taxónomicas operacionales OTUs correspondiente. Las flechas indican las bandas cortadas mientras que los números nos indican las secuencias recuperadas del GenBank.

En cuanto a los datos ecológicos, en la Tabla II se observa que los valores obtenidos son muy cercanos por lo que no puede darse una conclusión exacta de cuál de las dos localidades tiene mayor diversidad respecto a las muestras ambientales, aunque existe una ligera ventaja para ESSA_A1 (ya que la mayor diversidad se encontró en ESSA_A1_Amb2). Por otro lado, en la Tabla III se muestran las descripciones más cercanas de las secuencias recuperadas de las bandas 1, 2, 3 y 4 (Fig. 4). En esta tabla, se observa que los porcentajes de similitud de las secuencias obtenidas en este trabajo, con respecto a los registros homólogos incluidos en el GenBank son relativamente bajos. Los microorganismos relacionados a nuestras secuencias pertenecen a organismos del Dominio Bacteria no cultivables. Se recuperaron 3 secuencias para ESSA_A1 y solo una de LSI_S3. La secuencia que mayor porcentaje de similitud presenta es una cianobacteria no cultivable (95%), este microorganismo se encuentra típicamente en la primera capa del tapete, debido a sus necesidades metabólicas.

Tabla II. Se muestran las estimaciones ecológicas realizadas del gel de la Fig.4

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad(e) | Índice de Simpson (S) |
|--------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| ESSA_A1_Amb1 | 2.95 | 0.941 | 0.0579 |
| ESSA_A1_Amb2 | 3.118 | 0.957 | 0.0484 |
| LSI_S3_Amb1 | 3.062 | 0.951 | 0.0524 |
| LSI_S3_Amb2 | 2.817 | 0.940 | 0.0668 |

Tabla III. Descripción de las posibles identidades de acuerdo a la banda recuperada del DGGE.

| No. Banda | Gen | Sitio | No. Acceso | secuencia del GenBank más relacionada | % de similitud |
|-----------|----------|--------------|------------|--|----------------|
| 1 | 16S ARNr | ESSA-A1_Amb1 | AM1774271 | Clon Ct-3-39 de sec. Parcial del gen 16S ARNr de cianobacteria no cultivable | 95 |
| 2 | 16S ARNr | ESSA-A1_Amb1 | EF429658.1 | Clon LB_B12 secuencia parcial del gen 16s ARNr de bacteria no cultivable. | 79 |
| 3 | 16S ARNr | ESSA-A1_Amb1 | JN431713.1 | Clon SBXY_7206 de secuencia parcial del gen 16S ARNr de organismo no cultivable. | 92 |
| 4 | 16S ARNr | LSI-S3_Amb2 | GU4773591 | Clon 82d12b de secuencia parcial del gen 16S ARNr de <i>Bacillus</i> sp. no cultivable | 89 |

7.2.2 Caso de tapete intacto o sin agregar sustrato

En la Fig. 5, se observa que tanto para los duplicados de ESSA_A1 como para los de LSI_S3 hay un 87% de similitud. En este experimento, la principal diferencia entre los sitios radica en el número de OTUs. En este caso también se observa la tendencia de un mayor número de bandas en ESSA_A1, lo que sugiere una mayor riqueza de microorganismos. Por otra parte, el análisis del gel DGGE revela la clara formación de dos *clusters*, donde cada uno de ellos representa una localidad (75% de similitud). Si se compara este dendograma con el obtenido de las muestras ambientales con el gen 16S ARNr, se observa que existe una diferencia en la estructura de las bandas, dada por el número y la distribución de las bandas en el gel, lo que sugiere poblaciones distintas. En recuadros azules se denotan los OTUs únicos de ESSA_A1, mientras que en el recuadro morado se denotan los de LSI_S3. Por otra parte, en la tabla IV se muestran las estimaciones ecológicas calculadas para este tratamiento, donde podemos observar los mayores valores del índice de Shannon en ESSA_A1.

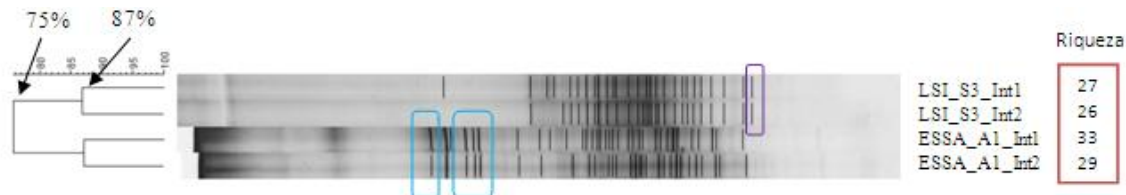


Fig. 5 Patrones de bandas obtenidos por DGGE de productos de PCR de comunidades bacterianas (empleando secuencias del gen 16S ARNr) del sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Int1 y S3-Int2) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Int1 y A1-Int2). Corresponde al tratamiento que no posee glucosa como sustrato.

Tabla IV. Índices de diversidad y dominancia pertenecientes a muestras intactas

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad (e) | Índice de Simpson (S) |
|--------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| ESSA_A1_Int1 | 3.318 | 0.949 | 0.0414 |
| ESSA_A1_Int2 | 3.248 | 0.964 | 0.0431 |
| LSI_S3_Int1 | 3.111 | 0.944 | 0.0502 |
| LSI_S3_Int2 | 3.087 | 0.947 | 0.0508 |

7.2.3 Caso de tapete enriquecido con glucosa

Por otro lado, en el experimento de microcosmos con tratamiento con glucosa (Fig. 6) se observa que entre LSI_S3_Glu 1 y 2 solo hay un 70% de similitud, en contraste con ESSA_A1_Glu 1 y 2 que presentan un 96% de similitud. En cuanto al número de OTUs se puede decir que el mayor número se presenta en ESSA_A1 respecto a las muestras de LSI_S3. Por otra parte, se observa que se recuperan más OTUs en Área 1 que en S3, además, el porcentaje de similitud entre los sitios de estudio fue de 58%, lo que sugiere que existen diferencias en la estructura de la comunidad representada en cada caso. Al comparar este tratamiento con el de tapetes intactos o sin sustrato, es evidente que no en todos los casos hay nuevas bandas, sino que por el contrario, hay bandas que desaparecen (específicamente para el caso de LSI_S3-glu2). Esto sugiere que el sustrato beneficia a algunos microorganismos haciéndolos dominantes, por lo que frente a la competencia otros microorganismos son menos representativos; en otros casos no se observan diferencias. En

la figura 6, en recuadros azules se encierran los OTUs únicas de ESSA_A1 y en los morados los de LSI_S3. Con este tratamiento también se observó un valor de diversidad más alto para el sitio ESSA_A1 (tabla V).

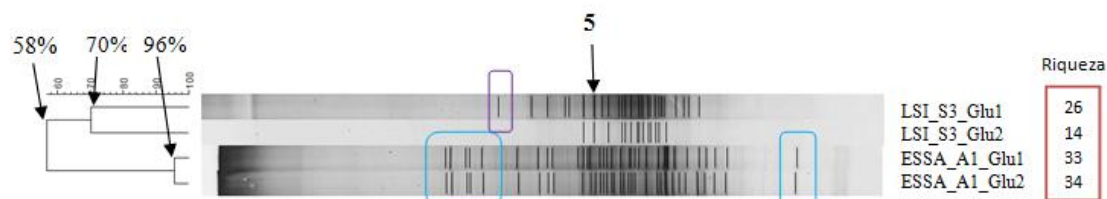


Fig. 6 Filotipos del gen 16S ARNr de muestras del tratamiento con glucosa Sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Glu1 y S3-Glu2); área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Glu1 y A1-Glu2). En la parte izquierda se muestran los porcentajes de similitud así como el dendrograma generado por Gel Compare II, en la parte central se muestra la imagen del gel obtenido por DGGE, donde se muestran las bandas obtenidas y en la parte derecha los nombres y riqueza. La flecha indica la banda cortada y el número 5 corresponde a la secuencia del GenBank que está más relacionada.

Tabla V. Índices de Shannon y Simpson de muestras enriquecidas con glucosa.

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad (e) | Índice de Simpson (S) |
|--------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| ESSA_A1_Glu1 | 3.365 | 0.963 | 0.0378 |
| ESSA_A1_Glu2 | 3.411 | 0.967 | 0.0361 |
| LSI_S3_Glu1 | 3.105 | 0.953 | 0.0489 |
| LSI_S3_Glu2 | 2.561 | 0.970 | 0.0822 |

Tabla VI. Secuencia obtenida del tratamiento de glucosa

| No. Banda | Gen | Sitio | No. Acceso | secuencia del GenBank más relacionada | % de similitud |
|-----------|----------|-------------|------------|---|----------------|
| 5 | 16S ARNr | LSI_S3_Glu1 | JQ286008.1 | Clone ncd1364h02c1 secuencia parcial del gen 16S ARNr de bacteria no cultivable | 87 |

7.2.4 Caso de tapetes estériles

Como control negativo para la producción de hidrógeno se tomaron tapetes estériles, en la Fig. 7 se muestra el patrón de bandeo obtenido en el gel DGGE.

El perfil de bandas obtenido por DGGE para el tratamiento estéril (Fig. 7) reveló 2 *clusters* uno integrado por LSI_S3-Est 1 y 2 (70% de similitud, OTUs respectivamente) u otro conformado por ESSA_A1-Est 1 y 2 (95% de similitud, 11 y 12 OTU's). Considerando los porcentajes de similitud y apoyándonos en la figura 7, se puede sugerir que en ESSA_A1 hay una mayor homogeneidad y estabilidad en el ambiente, al contrario de LSI_S3. Por otra parte, entre los sitios existe un 30% de similitud, lo que habla de diferencias muy grandes en la comunidad de cada sitio, lo que contribuye la hipótesis de que existen diferencias entre los sitios. En los recuadros azules muestran las OTUs de ESSA_A1 y en morado las de LSI_S3.

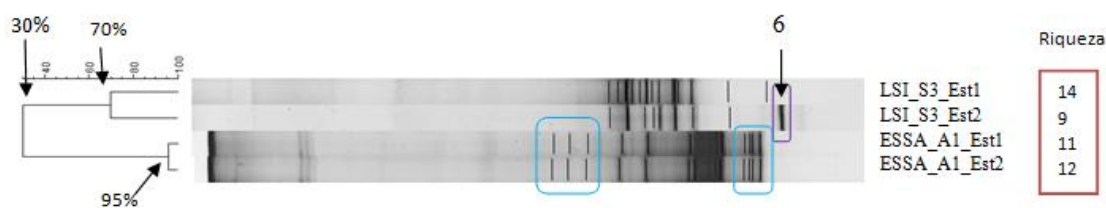


Fig. 7 Patrón de bandas del gen 16S ARNr de muestras del tratamiento estéril del Sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Est1 y S3-Est2) y área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Est1 y A1-Est2). Izq. Porcentajes de similitud; centro, patrón de bandas; der. Nombres y riqueza de OTUs. La flecha indica la banda cortada y el número 6 representa la secuencia obtenida del GenBank

Tabla VII. Índices de diversidad y dominancia del tratamiento estéril.

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad (e) | Índice de Simpson (S) |
|--------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| ESSA_A1_Est1 | 2.159 | 0.9 | 0.128 |
| ESSA_A1_Est2 | 2.305 | 0.928 | 0.109 |
| LSI_S3_Est1 | 2.499 | 0.947 | 0.088 |
| LSI_S3_Est2 | 1.972 | 0.897 | 0.1568 |

En la tabla VII se muestran algunos parámetros ecológicos como los índices de Shannon, Simpson y de equitatividad que permiten darle características a las dos comunidades encontradas de acuerdo al tratamiento estéril, observamos que existen valores ligeramente mayores para ESSA_A1.

Tabla VIII. Secuencia con mayor relación obtenida del GenBank del tratamiento estéril

| No. Banda | Gen | Sitio | No. Acceso | secuencia del GenBank más relacionada | % de similitud |
|-----------|----------|-------------|------------|---|----------------|
| 6 | 16S ARNr | LSI_S3_Est2 | JF119703.1 | Clon 8-4 de secuencia parcial del gen 16S ARNr de procariota no cultivable. | 96 |

Y en la tabla VIII se muestra la única banda purificada y secuenciada para el tratamiento estéril. Dicha secuencia tiene un porcentaje de similitud de 96% con un procariote no cultivable; dicha secuencia pertenece a la comunidad de Laguna San Ignacio.

7.2.5 Caso de tapetes con formaldehído

En la figura 8 se observa que entre A1-form 1 y 2 solo existe un 65% de similitud, mientras que entre S3-Form1 y 2 hay un 70% de similitud. A pesar de observarse porcentajes similares, en la figura se observa una riqueza mayor (prácticamente el doble) para LSI_S3 en cuanto a OTUs recuperados en este tratamiento, y que entre ellos hay un 40% de similitud, lo que sugiere diferencias entre la estructura de la comunidad que encontramos en este tratamiento en cada localidad. En recuadros morados se muestran los OTUs de LSI_S3. En cuanto a las estimaciones ecológicas (Tabla IX), podemos observar que existe una mayor diversidad de OTUs en LSI_S3 con respecto a ESSA_A1.



Fig. 8 Patrón de bandas del gen 16S ARNr de muestras del tratamiento con formaldehído al 5% del Sitio 3 de Laguna San Ignacio (S3-Form1 y S3-Form2) y área 1 en Exportadora de Sal S. A. (A1-Form1 y A1-Form2). Izq. porcentaje de similitud; centro imagen del gel de DGGE; der. Nombres y riqueza de OTUs.

Tabla IX. Tratamiento de formaldehído. Índices calculados.

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad (e) | Índice de Simpson (S) |
|---------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| ESSA_A1_Form1 | 1.66 | 0.923 | 0.207 |
| ESSA_A1_Form2 | 1.985 | 0.862 | 0.164 |
| LSI_S3_Form1 | 2.903 | 0.94 | 0.0613 |
| LSI_S3_Form2 | 2.922 | 0.945 | 0.0612 |

7.3 Análisis de comunidades del gen *hydA*

Área 1 en Exportadora de Sal S. A.

El análisis del gel DGGE (Fig. 9A) muestra que se forman 2 *clusters* principales, uno conformado muestras del experimento de microcosmos (tratamiento sin glucosa y con glucosa) y el otro integrado por las muestras ambientales, teniendo entre ellos un 45% de similitud. También se puede ver que el mayor número de OTUs se encuentra en el microcosmos lo que sugiere que el hecho de tenerlos sistemas aislados (tapados) y en condiciones de temperatura constantes puede favorecer a ciertos grupos de microorganismos con potencial producción de hidrógeno.

Sitio 3 en Laguna San Ignacio.

En las muestras naturales de LSI_S3 los perfiles de DGGE muestran entre 4 y 13 OTUs (Fig. 9B), siendo estos números menores en comparación con lo encontrado en el sitio ESSA_A1 (de 15 a 28 OTUs), lo que habla de la presencia de una menor diversidad de

microorganismos potenciales productores de hidrógeno en LSI_S3. Por otra parte, persiste la tendencia en cuanto a la formación de dos *clusters*; el primero está constituido por el microcosmos y el segundo por muestras ambientales. Entre ellos existe un 42% de similitud, que revela diferencias en la estructura de la comunidad de microorganismos putativos productores de hidrógeno. Mediante el experimento de microcosmos, es evidente que las condiciones de incubación promueven la aparición de nuevas bandas (promueve el crecimiento de microorganismos menos favorecidos para su crecimiento en condiciones normales) al comparar con la contraparte ambiental.

Análisis integrado.

Realizando la comparación de ambos patrones de bandas observamos que se definen muy bien las localidades, teniendo un 40% de similitud entre ellas (ESSA_A1 y LSI_S3), lo que sugiere que existen diferencias en la estructura de la comunidad de microorganismos potenciales productores de hidrógeno, y que estas diferencias probablemente estén regidas por las condiciones fisicoquímicas características de cada localidad dentro de las que destaca el porcentaje de hidrógeno recuperado *in situ* en ESSA_A1 se detectó una menor concentración de hidrógeno, en contraste con el recuperado en LSI_S3 (Fig.9C).

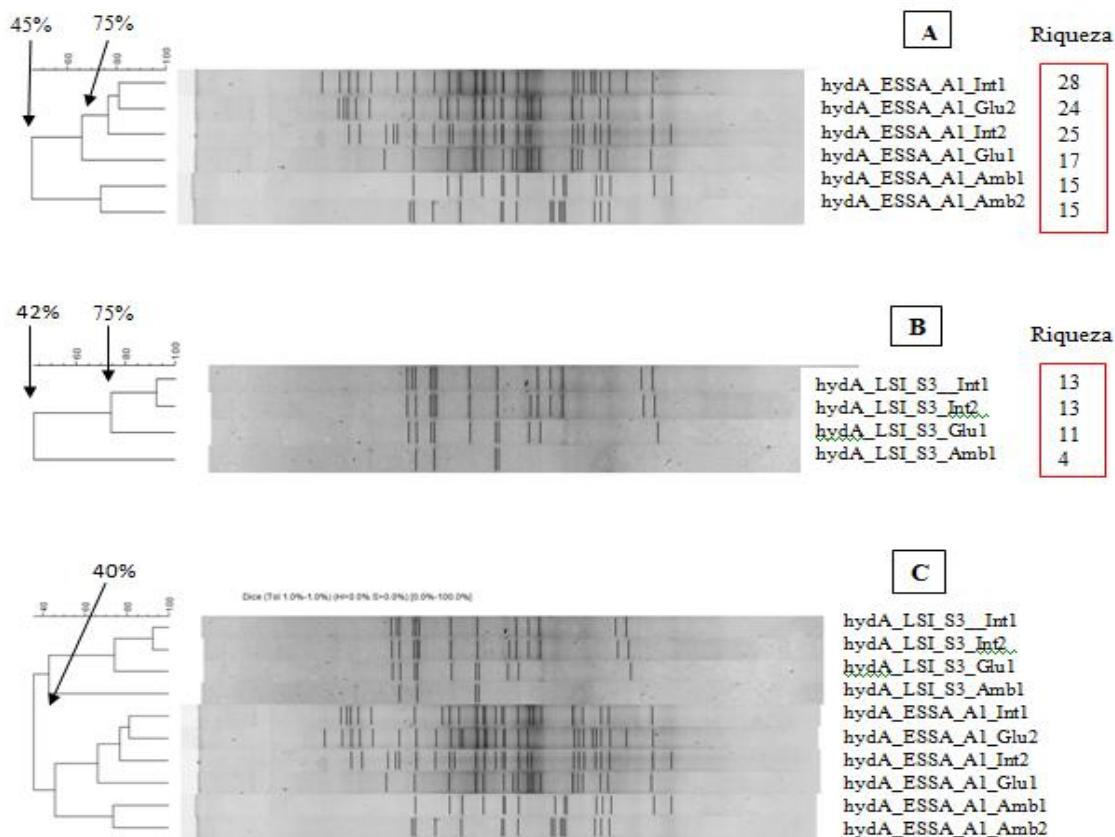


Fig. 9 Filotipos del gen *hydA* II de los sitios de estudio.; A) ESSA_A1; B) LSI_S3; C) comparación de ambos sitios

7.3.1 Caso de muestras ambientales

En el análisis del gen *hydA* en muestras ambientales, se define un *cluster* constituido por hyd-A1-Amb 1 y 2 que tienen 75% de similitud (Fig. 10). En ESSA_A1 existe una mayor riqueza de filotipos (recuperándose alrededor del triple con respecto a LSI_S3) lo que sugiere que existe un número mayor de poblaciones de microorganismos putativos productores de hidrógeno, sin embargo, esto no implica que están activos. Por otra parte, se puede comentar que observamos una mayor reproducibilidad en muestras de ESSA_A1 en cuanto a las poblaciones recuperadas, además de presentar homogeneidad y estabilidad. Por otra parte, entre ESSA_A1 y LSI_S3 hay un 15% de similitud, esto sustenta que existen diferencias entre la estructura de la comunidad productora de hidrógeno en ambos sitios. Al comparar todos los resultados de las muestras ambientales (de ambos genes) se observa que

hay una tendencia a recuperar un mayor número de bandas con el gen del 16S ARNr que con el gen *hydA*. Esto puede deberse a los primers utilizados, ya que los primers para son universales para el Dominio Bacteria, mientras que *hydA* se trata de un gen que codifica la Fe-Fe hidrogenasa que solo está presente en bacterias productoras de hidrógeno, lo que representa un conjunto menor de microorganismos.

En la tabla X se muestran las estimaciones ecológicas calculadas para ambos sitios de muestras naturales, estas nos indican que hay mayor diversidad y poca dominancia de pocos OTUs en ESSA_A1 a diferencia de LSI_S3. Por otro lado cabe señalar que existe solo una muestra para este último sitio, debido a que no fue posible obtener productos en la amplificación del ADN. En la tabla XI, se muestran las secuencias obtenidas de este tratamiento (figura 11, números 7 y 8).

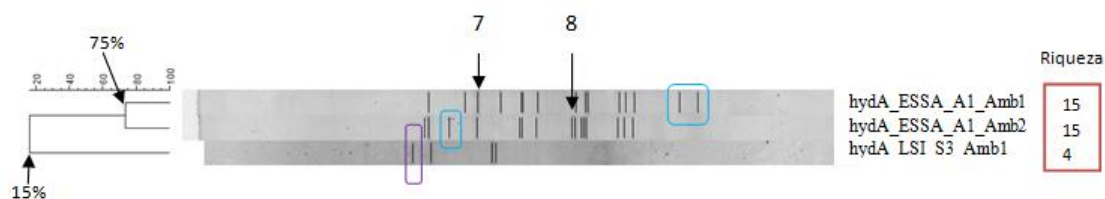


Fig. 10 Patrón de bandas del gen *hydA* de muestras ambientales de los Sitios 3 de Laguna San Ignacio (hyd-S3-Amb) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (hyd-A1-Amb1 y hyd-A1-Amb2). Las flechas indican las bandas cortadas en el gel y los números 7 y 8 las secuencias recuperadas del GenBank.

Tabla X. Índices ecológicos calculados para el patrón de bandas del gen *hydA* de muestras ambientales

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad (e) | Índice de Simpson (S) |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| hydA_ESSA_A1_Amb1 | 2.593 | 0.958 | 0.0824 |
| hydA_ESSA_A1_Amb2 | 2.508 | 0.926 | 0.0983 |
| hydA_LSI_S3_Amb1 | 1.306 | 0.943 | 0.2883 |

Tabla XI. Secuencias más relacionadas en el GenBank obtenidas de fragmentos del gen *hydA*

| No. Banda | Gen | Sitio | No. Acceso | secuencia del GenBank mas relacionada | % de similitud |
|-----------|-------------|--------------|------------|---|----------------|
| 7 | <i>hydA</i> | ESSA_A1_Amb1 | HQ021111.1 | Clon Rhyn G1 de bacteria no cultivable, secuencia parcial del gen <i>hydA</i> | 88 |
| 8 | <i>hydA</i> | ESSA_A1_Amb2 | HM636656.1 | Clon 1_20 de procariota no cultivable de la subunidad grande de la FeFe-hidrogenasa | 78 |

7.3.2 Caso de tapetes intactos o sin glucosa

Este tratamiento es muy interesante ya que la única diferencia entre el ambiental y este radica en el hecho de que el intacto está en una botella cerrada conservando la atmósfera normal y el agua de la localidad, pero por el simple hecho de estar en la botella ya se encuentran diferencias observándose en primera instancia un aumento en la riqueza de filotipos u OTUs. Esto sugiere que a pesar de querer representar al ambiente tal cual, existe un sesgo en la estructura de la comunidad encontrada bajo estas condiciones que discrepan de la comunidad natural del área de estudio, probablemente a un cambio en la atmósfera de la botella, ya que al no existir intercambio de gases, supone una atmósfera carente de aire (oxígeno y nitrógeno). En los patrones de bandas mostrados en la figura 12, existe un 80% de similitud entre los carriles de A1 (hyd-A1-Int 1 y 2) y un 93% de similitud entre los carriles de S3 (hyd-S3-Int1 y 2). La principal diferencia radica en el número de bandas visibles en cada sitio, en donde ESSA_A1 posee de 25 a 28 bandas mientras que LSI_S3 solo posee 13. También puede notarse que hay un 42% de similitud entre los sitios, lo que sugiere diferencias en la comunidad de microorganismos bajo esta condición (estas bandas representan las diferentes poblaciones putativas productoras de hidrógeno). Por otra parte cabe destacar que también existen diferencias en el número de bandas recuperadas en productos del gen 16S y del gen *hydA*.

La diversidad de microorganismos potenciales productores de hidrógeno mostrada en ESSA_A1 frente a la condición intacta o sin glucosa es mayor que la existente en LSI_S3 (véase tabla XII).



Fig. 11 Patrones de bandas del gen *hydA* del sitio 3 de Laguna San Ignacio (hyd-S3-Int1 y hyd-S3-Int2) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (hyd-A1-Int1 y hyd-A1-Int2) como tratamiento que no posee glucosa, también llamado intacto.

Tabla XII. Índices de diversidad y dominancia obtenidos para muestras intactas o sin glucosa.

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad (e) | Índice de Simpson (S) |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| hydA_ESSA_A1_Int1 | 3.119 | 0.936 | 0.0522 |
| hydA_ESSA_A1_Int2 | 3.087 | 0.959 | 0.0510 |
| hydA_LSI_S3_Int1 | 2.5 | 0.975 | 0.0871 |
| hydA_LSI_S3_Int2 | 2.5 | 0.974 | 0.0868 |

7.3.3 Caso de tapetes con glucosa

En la figura 12 se puede observar que existe una tendencia a tener un porcentaje mayor de similitud en ESSA_A1, que con los resultados obtenidos en LSI_S3. Respecto a su contraparte del gen 16S, se observa que en este gen se recuperan un mayor número de bandas con respecto al gen funcional, lo que nos da indicio del panorama general de estructura de la comunidad a partir del 16 S y con el gen *hydA* de los putativos productores de hidrógeno.

Por otra parte se observa que se recuperan (nuevamente) un mayor número de OTUs en ESSA_A1 lo cual sugiere mayor estabilidad, homogeneidad y reproducibilidad de las muestras. Sin embargo, cabe recordar que a pesar de que se tiene un mayor número de poblaciones putativas productoras de hidrógeno esto no quiere decir que se encuentren activas en el sitio. El porcentaje de similitud entre los sitios es de 45% lo que sugiere que existen diferencias entre las comunidades representadas en cada sitio.

En recuadros azules se muestran los OTUs encontrados solamente en ESSA_A1 y en recuadros morados los encontrados en LSI_S3 (Fig. 12).

En la tabla XIII se presenta el índice de Shannon y el índice de Simpson, que indican la diversidad y dominancia en la comunidad respectivamente, en este caso se encontró mayor diversidad en ESSA_A1 que en LSI_S3.

Por otra parte en la figura 12 se indican, las bandas que fueron purificadas y secuenciadas (números 9 y 10), estas secuencias tienen un porcentaje de similitud del 80 y 81% respectivamente (tabla XIV), lo que significa que estos valores son bajos para poder afirmar que se tratan de estos microorganismos en particular; cabe mencionar que estas secuencias pertenecen a primers del gen *hydA*.

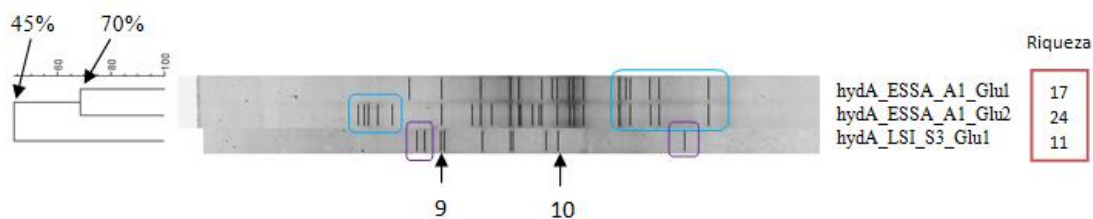


Fig. 12 Análisis de patrones de bandas del gen *hydA* de 2 localidades de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno el Sitio 3 de Laguna San Ignacio (hyd-S3-Glu) y Área 1 en Exportadora de Sal S. A. (hyd-A1-Glu1 y hyd-A1-Glu2) bajo el tratamiento de enriquecimiento con glucosa. Las flechas indican las bandas cortadas del gel y los números 9 y 10 las secuencias recuperadas del GenBank.

Tabla XIII. Índices de Shannon y Simpson calculados para muestras enriquecidas con glucosa

| Localidad | Índice de Shannon (H') | Índice de uniformidad (e) | Índice de Simpson (S) |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| hydA_ESSA_A1_Glu1 | 2.643 | 0.933 | 0.0821 |
| hydA_ESSA_A1_Glu2 | 3.022 | 0.951 | 0.0559 |
| hydA_LSI_S3_Glu1 | 2.333 | 0.973 | 0.103 |

Tabla XIV. Secuencias más relacionadas en el Gen Bank

| No. Banda | Gen | Sitio | No. Acceso | Secuencia del GenBank más relacionada | % de similitud |
|-----------|-------------|-------------|------------|---|----------------|
| 9 | <i>hydA</i> | LSI_S3_Glu1 | HM636675.1 | Clon 1_65 de procariota no cultivable de la subunidad grande de la FeFe-hidrogenasa | 80 |
| 10 | <i>hydA</i> | LSI_S3_Glu1 | HM636683.1 | Clon 2_4 de procariota no cultivable de la subunidad grande de la FeFe-hidrogenasa | 81 |

Como resultados preliminares se obtuvieron los valores de la velocidad de producción de hidrógeno en el experimento de microcosmos (Tabla XV) bajo distintos tratamientos, se muestra que el tratamiento con mayor tasa de producción para ambos sitios es al que se le agregó formaldehído

Tabla XV. Tasas de producción de hidrógeno en el experimento de microcosmos.

| Tratamiento | Sitios de estudio | |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| | ESSA_A1 | LSI_S3 |
| intacto | 2.84 ± 1.16 ppm/día/g | 8.17 ± 2.59 ppm/día/g |
| glucosa | 14.15 ± 5.9 | 10.82 ± 3.99 |
| formaldehído | 53.97 ± 29.2 | 71.5 ± 48.3 |
| estéril | 4.33 ± 0.47 | 5.16 ± 3.53 |

8. DISCUSIÓN

8.1 Factores fisicoquímicos

Una de las principales razones de la variación en los parámetros fisicoquímicos encontrados en las dos localidades, puede atribuirse a que ESSA_A1, ha sido controlada por el hombre ya que poseen un programa de bombeo elaborado en función de la variación mensual de evaporación, lo cual mantiene niveles y densidades constantes en las salmueras del sistema de vasos facilitando su control (ESSA, 2012), por el contrario en LSI_S3 las condiciones ambientales no son controladas por lo que los parámetros ambientales varían dependiendo de la época del año en que se determinen. Ya que la salinidad depende de factores físicos como la precipitación, la insolación, la temperatura, los vientos y la profundidad (Águilar-Rodríguez, 2004; Figueruelo y Dávila, 2004), en este puede sugerirse que caso las concentraciones de salinidad registradas para LSI_S3 se deben al menor volumen de agua por lo que el efecto de la evaporación, la temperatura y vientos tienen mayor impacto, concentrando los iones que se encuentran en la columna de la salmuera. En cuanto a la diferencia de temperaturas registradas, se puede especular que se debe principalmente al volumen de agua y a la presencia de arqueas halófilas extremas que causan un calentamiento rápido de la salmuera, alcanzando temperaturas de hasta 40°C (López-Cortés, 1998). Estos microorganismos están frecuentemente presentes en los cristalizadores y amargos de las salineras cuya salinidad normalmente oscila entre 250 g/L y 300 g/L, en el caso de ESSA (Tamez, 2009) y a características cualitativas como son el color rojizo de la columna de agua (López-Cortés, 1998). LSI_S3 posee ambas características por ello se sugiere la presencia de estos microorganismos en este sitio, sin embargo deben realizarse estudios de microbiología y/o moleculares para confirmar tal especulación.

En cuanto a la salinidad registrada en los últimos 20 años y de acuerdo a trabajos anteriores realizados en la zona de ESSA_A1 (Javor, 1983; DesMarais, 1995; Huerta-Díaz y Reimer, 2011; Shumilin *et al.*, 2002; García-Maldonado *et al.*, 2012), se registró una salinidad similar que oscila entre los 4.4 a 5.0% (44-50 g/L), esto se debe como ya se ha mencionado anteriormente a que los vasos de concentración son controlados por medio de bombeo y de esta manera se controla el proceso.

Por otra parte los estudios realizados por García-Pichel y colaboradores (1999), donde se relacionó la concentración de oxígeno disuelto con la salinidad, se muestra que a mayor salinidad hay una menor concentración de oxígeno disuelto, por lo que se puede considerar que como en LSI_S3 hay una menor concentración de oxígeno, las probabilidades de que el metabolismo predominante pueda ser anaerobio de tipo fermentativo aumenta, y por esta razón se encontró una mayor concentración de hidrógeno en este lugar.

Para los registros de concentración de hidrógeno se pueden hacer varios razonamientos. Por una parte, la recolección de gas fue hecha por las mañanas y según estudios realizados por Hoehler y colaboradores (2002) y DesMarais (2003) las mayores concentraciones de hidrógeno se encuentran durante la noche porque es el periodo en el que la concentración de oxígeno es menor por lo que se favorece el proceso de fermentación que da como uno de sus productos hidrógeno. Por lo tanto, se puede sugerir que si la recolección de gases se hubiera realizado por la noche, se habrían tenido registros de hidrógeno mayores para ambos sitios. Por otra parte las diferencias significativas entre ambos sitios pueden deberse que en LSI_S3 existe una costra de sales que obstruye la disipación de los gases al exterior por lo que puede acumularse y al momento de recolectarlo mediante la perturbación del suelo este se libere. También puede sugerir que en ESSA_A1 el hidrógeno producido es consumido por otros microorganismos dejando un rendimiento neto pobre, lo que podría ser comprobado determinando la presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno como sulfato reductores y metanógenos la presencia de estos últimos se ha sugerido por García Maldonado y colaboradores (2012).

8.2 Análisis de la estructura y diversidad de la comunidad microbiana

Gen 16 S ARNr

Para el caso de las muestras ambientales se puede sugerir una mayor homogeneidad de la comunidad de ESSA_A1 que para el caso de LSI_S3, ya que los porcentajes de similitud entre los duplicados dan valores de 90% y 80% respectivamente (Fig. 4), esto probablemente se debe a que existen condiciones constantes que ayudan al desarrollo de estabilidad funcional de los microorganismos (Konopka, 2009), esto quiere decir que si

perturbamos a esta comunidad probablemente habría microorganismos que pueden reemplazarse entre sí en cuanto a la función que desarrollan en la comunidad. Por otra parte el porcentaje encontrado para LSI_S3 (80%) nos habla de la heterogeneidad de la comunidad, donde la representación de los OTUs encontrados varia de un duplicado a otro probablemente esto se debería a que los microorganismos no están bien representados en la comunidad, debido a las condiciones irregulares que se presentan en este sitio. Además el 74% de similitud que hay entre los sitios de estudio sugiere que hay semejanzas en la estructura de la comunidad presente para el caso de microorganismos del Dominio Bacteria, pero también existen microorganismos que pueden ser distintivos dentro de cada comunidad. Esto se debe principalmente a las adaptaciones de los microorganismos que desarrollen frente a las condiciones tanto bióticas o abióticas de su ambiente (Hughes *et al.*, 2001).

En las muestras de microcosmos, los perfiles de DGGE revelaron que para ambos duplicados tanto de ESSA_A1 y LSI_S3 hay un 87% de similitud (Fig. 5), este valor sugiere que en este tratamiento no hay una diferencia en cuanto a la estabilidad y homogeneidad de la comunidad y que en ambos existe una reproducibilidad idéntica de los duplicados, mientras que el 75% de similitud entre los sitios que no existe diferencia entre las comunidades representadas en cada sitio, pero que de igual manera hay microorganismos representativos en cada uno.

En el caso de las muestras de microcosmos a las que se adiciono glucosa, existió un 96% de similitud entre los duplicados de ESSA_A1, que sugiere una alta reproducibilidad de las muestras y también una alta estabilidad de la comunidad (Konopkaa, 2009). Por otro lado en el sitio LSI_S3 hay un 70% de similitud (Fig. 6) entre los duplicados, que habla de una comunidad inestable y con un valor regular en cuanto a la reproducibilidad de la muestra. Mientras tanto el 58% de similitud entre los sitios, sugiere que si existió un cambio en la comunidad frente al sustrato empleado y que se esto estimulo el surgimiento de nuevas bandas que representan OTUs que sin el sustrato estaban representados pobremente y que al aumentar su densidad celular puede ser perceptible dentro del patrón de bandas.

Muestras de microcosmos sometidas bajo un tratamiento de esterilización arrojó para el sitio ESSA_A1 un 95% de similitud (Fig. 7) es decir una alta reproducibilidad, y

homogeneidad en la comunidad, que sugiere que esta comunidad al ser sometida bajo un estrés en su ambiente se recuperó fácilmente, es decir, tiene una alta resiliencia (Konopka, 2009). Esto puede deberse a una redundancia funcional en la comunidad donde algunos microorganismos desempeñan la misma función en el ecosistema (Naeem, 1998; Konopka, 2009). Para LSI_S3 no se puede decir lo mismo ya que tiene solo un 70% de similitud, que nos sugiere que bajo este estrés esta comunidad tardará más tiempo en recuperarse o incluso no hacerlo, ya que probablemente no exista una redundancia funcional, sino más bien que existan microorganismos que desempeñen un papel fundamental en la comunidad. El 30% de similitud entre los sitios, indica que existen grandes diferencias en la estructura de la comunidad probablemente debido a las propiedades emergentes que caractericen a la comunidad original y sobre todo a la estabilidad que presentan cada uno de los sitios bajo las condiciones bióticas y abióticas presentes en el ambiente que se desarrollan (Hughes *et al.*, 2001).

Para el caso de las muestras de microcosmos sometidas a formaldehído (Fig. 8), en ambos casos el porcentaje de similitud entre los duplicados fue baja, sin embargo por primera vez fue más alto para LSI_S3 (70%). Además de que se presenta un número mayor de OTUs, esto sugiere que bajo esta condición la respuesta de la comunidad fue más favorable, probablemente porque en esta comunidad hay microorganismos que pueden emplear al formaldehído como fuente de carbono o energía como *Pseudomonas* (Mirdamadi *et al.*, 2005) o bacterias metilotróficas (Oren *et al.*, 1992). Con el tratamiento se estimuló la actividad de estos microorganismos que un principio estaban pobremente representados, cabe mencionar que en ningún trabajo se han registrado concentraciones tan elevadas (5%), por lo que es necesario corroborar que los microorganismos presentes, pertenezcan a la comunidad que emplee formaldehído como fuente de energía o carbono. También se puede especular que precisamente a la estabilidad constante que ha estado presentando ESSA_A1, bajo un sustrato tan peculiar como puede ser el formaldehído, no posea microorganismos que puedan usarlo, a diferencia de LSI_S3 que presente condiciones adversas comparadas con el otro sitio. Por otra parte también se puede suponer que el ADN es preservado con el formaldehído, por lo que el ADN recuperado puede ser de cualquier microorganismo, esto se podrá confirmar con la secuenciación e identificación del ADN. Por otra parte el 40% de

similitud entre los sitios confirma la gran diferencia en la estructura de la comunidad que se obtuvo frente a esta condición de estrés.

Así de manera general encontramos un mayor número de OTUs en ESSA_A1 en todos los casos, es decir, tanto en muestras ambientales como los tratamientos del microcosmos (ambiental, intacto o sin glucosa, con glucosa, estéril) que en LSI_S3, esto sugiere que hay una comunidad con mayor estabilidad además de mayor complejidad de acuerdo a estudios realizados por Spear *et al.* (2003) y Ley *et al.* (2006), donde se ha encontrado cierta adaptación de los microorganismos frente a las condiciones extremas presentes en estos ambientes hipersalinos. Cabe mencionar que ESSA_A1 tiene parámetros que no son tan adversos como en el caso de LSI_S3 (ejemplo, salinidad véase tabla I).

Por otra parte la separación bien definida de 2 *clusters* uno perteneciente a ESSA_A1 y el otro a LSI_S3, confirma la hipótesis de que en cada localidad se desarrolla una comunidad diferente de microorganismos (en este caso del dominio bacteria), esto se logró observar tanto para las muestras ambientales como para las muestras obtenidas del microcosmos.

El porcentaje de similitud entre los duplicados indica que las muestras son estables y homogéneas es decir, hay reproducibilidad entre ellas. Sin embargo, de acuerdo a la zona del tapete que fue muestreada en el caso de ESSA (primeros dos milímetros de profundidad que representa la zona fótica o la zona con mayor concentración de oxígeno) se caracteriza por tener una gran complejidad y diversidad de microorganismos u OTUs (Ley *et al.*, 2006; Spear *et al.*, 2003; Boyd *et al.*, 2009) por lo que se puede suponer que a pesar de ser la misma muestra se pueden esperar pequeñas diferencias en la composición de la comunidad. Sin embargo, para el caso de LSI parece que la explicación es otra y esta depende en gran medida a los parámetros fisicoquímicos y características de la localidad, donde se observa tanto menor estabilidad como homogeneidad.

Gen hydA

Se conoce muy poco de la función potencial de bacterias fermentadoras y/o ciclo del hidrógeno en el tapete microbiano perteneciente a los posos de la salinera de Guerrero Negro (Boyd *et al.*, 2009)

En estos microorganismos, la Fe-Fe hidrogenasa tiene un papel central en la fermentación de sustratos, catalizando la oxidación del exceso de equivalentes reducidos acoplado a la reducción de protones rindiendo hidrógeno. La Fe-Fe hidrogenasa solo se conoce en bacterias anaerobias y un pequeño número de algas verdes, haciendo de esta enzima un útil biomarcador para examinar la diversidad y distribución de esta clase de organismos funcionales (Boyd, *et al.*, 2009).

En muestras ambientales los perfiles de bandas de secuencias del gen *hydA* en el DGGE arrojaron un 75% de similitud (Fig. 10) entre el duplicado del sitio ESSA_A1, mientras que para LSI_S3 obtuvimos perfil de bandas de un solo ejemplar, además en el primer sitio hay 3 veces más OTUs que en LSI_S3 esto habla de que en ESSA_A1 existe redundancia funcional (Naeem, 1998; Konopka, 2009) de microorganismos putativos productores de hidrógeno, además de una mayor estabilidad de la comunidad que es representada con una mayor reproducibilidad de la muestra. Por otra parte el 15% de similitud entre los sitios de estudio, indica que hay una gran diferencia en la estructura de la comunidad de microorganismos con potencial producción de hidrógeno.

Continuando con el gen *hydA*, para las muestras de microcosmos intactas o sin glucosa (Fig. 11), encontramos que hay una menor heterogeneidad de la estructura de la comunidad en las muestras del sitio LSI_S3 con 93% de similitud en comparación al 80% que presenta ESSA_A1, pero este último presenta un mayor número de OTUs. Por otra parte el 42% de similitud entre los sitios sugiere una estructura de la comunidad distintas en cuanto a microorganismos que poseen el gen *hydA* en este tratamiento.

Las muestras enriquecidas con glucosa (Fig. 12) muestran una mayor homogeneidad para ESSA_A1 y comparada con sus contrapartes intactas y ambientales se observa un patrón de bandas distintas, que sugiere que si existe un cambio de la comunidad al adicionarle glucosa. Por otra parte también se puede decir que la estructura de la comunidad entre los sitios si es distinta de acuerdo a los filotipos encontrados en cada uno, y esto probablemente se debe tanto a factores bióticos como abióticos que caracterizan a cada una de las comunidades (Hughes *et al.*, 2001).

Para el caso de este gen funcional se observa de manera general un decrecimiento en el número de OTUs de manera significativa para LSI y pequeña para ESSA, esto sugiere que en la última localidad mencionada hay una comunidad mayor de microorganismos putativos productores de hidrógeno y esto es confirmado con los índices de diversidad.

Sin embargo de acuerdo con los valores de concentración de hidrógeno obtenidos *in situ* (véase Tabla I) en cada localidad, puede sugerir que la mayor cantidad de OTUs relacionados con el gen *hydA* encontrados en ESSA_A1, no necesariamente están activos en la comunidad como productores de hidrógeno o que el tiempo de residencia del hidrógeno es demasiado corto en el sistema. Tener muy bajas concentraciones de hidrógeno en sistemas típicos naturales supone que el tiempo de residencia del hidrógeno puede ser extremadamente corto (0.1 a 5 segundos) (Zinder, 1993). Por ejemplo, la tasa típica de recambio del hidrógeno de los sedimentos de Cape Lookout en el verano (inferidos de tasas medidas de la reducción de CO₂ metanogénico, Hoehler *et al.*, 1994 y sulfato reducción, Crill y Martens, 1987) donde el cálculo del tiempo de residencia del hidrógeno varía de 4 a 5 segundos (s) cerca de la parte inferior de un núcleo a menor que 0.1 s en sedimentos superficiales (Hoehler *et al.*, 1998).

Por lo tanto, la concentración de hidrógeno medida en una muestra dada no es totalmente influenciada por flujos de materia de horizontes adyacentes, más bien refleja únicamente las condiciones ambientales de las muestras en el momento de las mediciones (Hoehler *et al.*, 1998).

Para el caso de ambos genes (16S ARNr y *hydA*) se dio el fenómeno de un cambio en la estructura de la comunidad por el simple hecho de estar bajo el microcosmos con respecto a sus contrapartes ambientales, puede explicarse con los experimentos realizados por Bebout y colaboradores (2002), en lo que se mostró que toda la energía necesaria para el crecimiento y mantenimiento de la comunidad en tapetes microbianos es al final derivado de la energía radiante del sol. Por lo tanto, estos tapetes son altamente sensibles a la intensidad y composición espectral de la radiación disponible en la superficie del tapete además la producción y consumo de oxígeno determinan la estructura física de la comunidad entera del tapete (Bebout *et al.* 2002) y nuestras incubaciones están bajo lámparas que probablemente no cubren la composición espectral que nuestros tapetes

requerían para ser una copia fiel de la comunidad ambiental. Por otra parte, se especula que la composición atmosférica de las botellas de suero utilizadas después de un periodo de tiempo se reduce la concentración de oxígeno debido a la liberación de gases que son producidos por los procesos metabólicos que se desarrollan en el tapete. Por ello hay un cambio en la estructura de la comunidad teniendo una tendencia a que surjan nuevos OTUs en el patrón de bandeo.

Frente a los cambios en las condiciones del tapete en la botella, donde la atmósfera tentativamente se ha quedado sin aire por lo que los microorganismos deben adaptarse o surgir nuevos microorganismos que probablemente permanecían en estado latente por lo que se puede suponer que los microorganismos que prevalecen o dominan en el microcosmos y que además degradan al sustrato elegido en este experimento (glucosa), pueden pertenecer a la vía metabólica Embder-Meyerhoff- Parnas (EMP) que se caracteriza por realizarse en ausencia de oxígeno por lo que es la vía metabólica que está presente en microorganismos anaerobias o anaerobias facultativas a diferencia de la vía Entner-Doudoroff que necesita al oxígeno para que se lleve a cabo.

También cabe mencionar que puede haber una sobreestimación de los OTUs ya que la formación de una molécula heteroduplex durante el proceso de amplificación puede contribuir a dificultades en la interpretación del patrón de bandas de DGGE. Un heteroduplex de una molécula de ADN tiene cadenas de dos diferentes productos de PCR, los cuales pueden ser formados por el realineamiento de productos de PCR desnaturalizados, esto resulta en la visualización de dos bandas en el gel, por lo que de esta manera se da una sobrestimación del número de OTUs integrados en la comunidad. En general el perfil de DGGE mostrara los fragmentos de ADN obtenidos de los OTUs predominantes que están presentes en la comunidad (Muyzer y Smalla, 1998) aunque puede darse el caso de que algunas bandas representan múltiples amplicones de distintos organismos que migran juntos en una sola banda (Legatzki *et al.*, 2011).

Los tapetes microbianos son puntos críticos de diversidad bacteriana y constituyen un rico reservorio de diversidad de genes para estudios de evolución bacteriana y diversidad genómica (Ley *et al.*, 2006)

Para cuantificar dicha diversidad se calculan los índices de diversidad que son utilizados ampliamente para estudios ecológicos en macro ecosistemas, pero pueden ser adaptados para el análisis y caracterización de las comunidades microbianas a través de datos obtenidos a partir del DGGE (Fromin *et al.*, 2002)

El índice de diversidad de Shannon (H') es utilizado para determinar la diversidad de OTUs (Gafan *et al.*, 2005; Yanling *et al.*, 2008) presentes en la comunidad microbiana, los valores van de 0 para comunidades con una sola especie hasta valores altos para comunidades con muchas especies, cada una con pocos individuos (Brown y Bowman, 2001). Por otra parte el índice de Simpson está basado en la probabilidad de que si toman dos individuos, estos sean de la misma especie (Brown y Bowman, 2001). Valores cercanos a 1 indican que solo unas pocas especies predominan en la muestra.

Los índices de diversidad más altos registrados para el caso de las comunidades conformadas por fragmentos del gen 16S ARNr para la localidad de ESSA_A1 fueron para las muestras de microcosmos con sustrato es decir con glucosa, donde los valores van de 3.365 a 3.411, esto dice que existe una alta diversidad de OTUs en este tratamiento; mientras que los valores del índice de dominancia de Simpson para este mismo tratamiento son de 0.0378 a 0.0361, lo que quiere decir que son varios los OTUs dominantes, es decir que nos confirma una alta diversidad en la muestra. Esto sugiere que hay un cambio en la comunidad que puede deberse al sustrato, ya que la diversidad fue mayor con respecto a muestras ambientales ($H'=2.95-3.118$; $S=0.0579-0.0484$) e intactas o sin glucosa ($H'=3.248-3.318$; $S=0.0431-0.0414$) (Tablas II y IV, respectivamente). Para el caso de la localidad de LSI_S3 los valores más altos se encuentran en el tratamiento sin glucosa también llamado intacto ($H'=3.087-3.111$) y sus respectivos valores de dominancia son 0.0508-0.0502; ambos datos hablan de la alta diversidad en este tratamiento, por lo que se puede especular que no hay un efecto en la comunidad frente al enriquecimiento con glucosa. Sin embargo, en las tasas de producción de hidrógeno registradas se observa un ligero incremento por lo que se puede sugerir que hay un efecto en la comunidad sin

embargo no el esperado, notándose que fue mayor el efecto de este sustrato para ESSA_A1 que para LSI_S3, esto puede deberse probablemente a los microorganismos presentes en cada uno de los sitios que pueden preferir sustratos distintos. Para el caso de los índices de diversidad más altos obtenidos para las comunidades de microorganismos que contienen el gen *hydA* para ambas localidades fue en el tratamiento intacto o sin glucosa, para ESSA_A1, los valores son de $H'=3.087-3.119$ y $S=0.051-0.0522$; mientras que para LSI_S3 $H'=2.5$ y $S=0.0868-0.0871$ (Tabla XII), lo que dice que la comunidad tuvo un cambio en cuanto a su diversidad por el hecho de estar en el microcosmos, sin embargo que no hubo un efecto en la estructura al enriquecerse con glucosa, aunque existe la misma explicación que para el gen 16S ARNr.

Cabe mencionar que se esperaba una mayor diversidad del gen *hydA* en ESSA_A1 en los primeros milímetros de profundidad de manera similar al estudio realizado por Boyd y colaboradores (2009), donde muestra índices de diversidad altos que oscilan de $H'=3.28$ a 3.55 (su área de estudio en Guerrero Negro fue el pozo 4 o también llamado ESSA_A4) cuyos valores representan una alta diversidad, incluso mayor a la que nosotros encontramos con el mismo gen funcional. Esta alta diversidad encontrada puede deberse en gran medida a que en ESSA_A4, es uno de los tapetes mejor desarrollados en ESSA, ya que posee una estructura de capas bien definidas que sugiere que hay una alta estabilidad en la comunidad ya que los microorganismos ahí presentes tienen alimento suficiente para subsistir y además para realizar metabolismos secundarios como exopolisacáridos y carbonatos que ayudan a darle esa laminación al tapete.

8.3 Producción de hidrógeno en el microcosmos

De acuerdo a los datos obtenidos (Tabla XV), se encontró que la adición de glucosa promueve una mayor producción de hidrógeno en ambos sitios, sin embargo se observa una mayor estimulación en ESSA_A1 que en LSI_S3, esto puede atribuirse a que los microorganismos putativos productores de hidrógeno presentes en este último sitio pueden preferir otro sustrato. Por otra parte se observó que la mayor tasa de producción de hidrógeno se encontró en ambos sitios en el tratamiento con formaldehído, lo que no era esperado, sin embargo, en la literatura se conoce de la existencia de microorganismos que pueden usar al formaldehído como fuente de carbono o energía, generando nuevos sustratos

que estimulen la producción de hidrógeno o que se diera una producción abiótica de hidrógeno.

8.4 Secuencias

Todas las secuencias recuperadas tienen un porcentaje menor al 97% de similitud (Tablas III, VI, VIII, XI y XIV) y de acuerdo con Stackebrandt y Goebel (1994) además de Spear y colaboradores (2003), se considera que se tiene la misma identidad cuando el porcentaje de similitud es mayor o igual al 97%, sin embargo esto es solo aplicable a secuencias completas del 16S ARNr y en este trabajo el tamaño de las secuencias recuperadas va de los 200 a 400pb por lo que se debe considerar obtener secuencias completas para determinar si en los sitios de estudios se encontraron nuevas secuencias que representen a nuevas identidades de microorganismos.

9. CONCLUSIONES

Se pudo demostrar la existencia de hidrógeno en muestras de gas ambientales para los dos sitios de estudio. La recuperación de secuencias del gen *hydA*, sugieren que parte del hidrógeno detectado pudiese ser producto de la actividad metabólica de bacterias.

Patrones de bandas de secuencias del 16S y *hydA* en el DGGE, sugieren heterogeneidad al interior de las localidades y diferencias profundas entre las localidades para todas las condiciones de estudio.

En el experimento de microcosmos, la glucosa tuvo un mayor efecto en la producción de hidrógeno en ESSA_A1 que en LSI_S3. El formaldehído también tuvo un efecto en las tasas de producción de hidrógeno, sin embargo este fue mayor en LSI_S3, sugiriendo que otros sustratos pueden estimular la producción de hidrógeno.

Valores de estimaciones ecológicas como el índice de Shannon y el de Simpson sugieren una mayor diversidad y dominancia de OTUs en ESSA_A1 en todos los casos de estudio.

Los sitios de ESSA promueven el desarrollo de comunidades microbianas estables por redundancia funcional de una comunidad altamente diversa con bajas abundancias de individuos de las poblaciones.

10. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rodríguez A. 2004. Geografía general. Pearson. México pp. 301
- Alalayah W. M., M. S. Kalil, A. A. H. Kadhum, J. M. Jahim, N. M. Alauj. 2008. Hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *Int. J. Hyd. Ener.* 33:7392-7396.
- Amann R., W. Ludwings y K.H. Sclifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol.Rev.* 59:143-169.
- Atkins P.W. 1990. Physical Chemistry. Oxford University Press, New York. pp. 1157
- Atlas R.M., R. Bartha. 1998. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Addison Wesley. Espana. 677 pp.
- Bebout B.M., D.J. DesMarais, M. Discipulo, T. Embaye, F. Garcia-Pichel, M. Hogan, L.L. Jahnke, R.M. Keller, S.R. Miller, L.E. Prufert-Bebout, C. Raleigh, M. Rothrock y K. Turk 2002. Long term manipulations of intact microbial mat communities in a greenhouse collaboratory; simulating earth's present and past field environments. *Astrobiology* 2; 383-402
- Boyd E.S., J.R. Spear y J.W. Peters. 2009. [FeFe] Hydrogenase genetic diversity provides insight into molecular adaptation in a saline microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4620- 4623.
- Boyd E.S., T.L. Hamilton, J.R. Spear, M. Lavin y J.W. Peters. 2010. [FeFe]-hydrogenase in Yellowstone National Park: evidence for dispersal limitations and phylogenetic niche conservatism. *The ISME Journal.* 4: 1485-1495.
- Brown M.V. y J.P. Bowman. 2001. A molecular phylogenetic survey of sea-ice-microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 267-275.
- Burow L.C., D. Woebken, B.M. Bebout, P.J. McMurdie, S.W. Singer, J. Pett- Ridge, L. Prufert-Bebout, A.M. Sportmann, P.K. Weber, T.M. Hoehler. 2011. Hydrogen production in photosynthetic microbial mats in the Elkhorn Slough estuary, Monterey Bay. *The ISME Journal* 6, 863-874

- Campbell M.K. 2004. *Bioquímica*. Thompson editores. México. 812pp.
- Chang J.J., W.E. Chen, S.Y. Shih, S.J. Yu, J.J. Lay, F.S. Wen y C.C. Huang. 2005. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 598-604
- Crill P.M. y C.S. Martens. 1987. Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin, 6. Temporal and spatial variations in sulfate reduction rates. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 51: 1175-1186.
- Dar S., J.G. Kuenen y G. Muyzer. 2005. Nested PCR- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Approach to determine the diversity complex sulfate reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl. Environ Microbiol.* 71:2325-2330
- Das D.T. Dutta, K. Nath, S.M. Kotay, A.K. Das, T.N. Veziroglu. 2006. Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Curr. Sci.* 90: 1627-1637.
- Decker K., K. Jungermann, R.K. Thauer. 1970. Energy Production in Anaerobic Organisms. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 9(2): 138-158
- DesMarais D.J. 1995. The biogeochemistry of hypersaline microbial mats, *Adv. Microbiol. Ecol.* 14: 251-274.
- DesMarais D.J. 2003. Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biol. Bull.* 204:160-167.
- Dunbar J., S. Takala, S.M. Brnaes, J.A. Davis y C.R. Kuske. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1662-1669.
- Figueruelo J.E., M.M. Dávila. 2004. *Química Física del Ambiente y de los Procesos Medioambientales*. Editorial Reverté. España. 570 pp.

Fromin, N., J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cvuelle, F. Gillet, M. Aragno y P. Rossi. 2002. Statical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 4:634-643.

Gafan G.P., V.S. Lucas, G.J. Roberts, A. Petrie, M. Wilson y D.A. Spratt. 2005. Statistical Analyses of complex denaturing gradient gel electrophoresis profiles. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3971-3978.

García-Maldonado J.Q., B.M. Bebout, L.B. Celis y A. López-Cortés. 2012. Phylogenetic diversity of methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) gene and methanogenesis from trimethylamine in hypersaline environments. *Int. Microbiol.* 15: 33-41.

García-Pichel F., M. Kühl, U. Nübel y G. Muyzer. 1999. Salinity-dependent limitation of photosynthesis and oxygen exchange in microbial mats. *J. Phycol.* 35: 227-238.

Giovannoni S.J. 1991. The polymerase chain reaction. *Modern microbiological methods: nucleic acids techniques in bacterial systematic.* John Wiley and Sons. New York. p. 177-203.

Hallenbeck P.C. 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 7379-7389

Heras -Celemín, M.R. 2008. Fuentes de energía para el futuro. Editorial Estilo Estugraf Impresores. España Pág. 95.

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

Hoehler T.M., M.J. Alperin, D.B. Albert, C.S. Martens 1998. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 62: 1745-1756.

Hoehler T.M., B.M. Bebout y D.J. DesMarais. 2001. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature.* 412: 324-327.

Hoehler T.M., M.J. Alperin, D.B. Albert, B.M. Bebout, C.S. Martens y D.J. Des Marais. 2002. Comparative ecology of H₂ cycling in organotrophic and phototrophic ecosystems. A. van Leeuw.

Huerta-Diaz M.A. y J.J. Reimer. 2011. Phosphorus speciation and sedimentary fluxes in hypersaline sediments of Guerrero Negro salt evaporation area, Baja California Sur, Mexico. *Estuar. Coast* 34: 514-528.

Hughes, J.B., J.J. Hellmann, T.H. Ricketts y J.M. Bohannon. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4399-4406.

Hung C.H., Y.T. Chang y Y.J. Chang. 2011. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technol.* 102: 8437-8444.

Javor B.J. 1983. Planktonic standing crop and nutrients in a saltern ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 28: 153-159.

Koneman E.W. 2006. *Diagnostico microbiológico*. Editorial medica panamericana 6ta edición. Buenos Aires. Pp.1696

Konopka A. 2009. What is microbial community ecology? *The ISME Journal*.3: 1223-1230.

Kosman E. y J. Leonard.2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploidy species. *Mol. Ecol.* 14: 415-424.

Kuffner M., G. Piñar, K. Hace, M. Hnadschur y A.G. Haslberger. 2004. DGGE-fingerprinting of arable soils shows differences in microbial community structure of conventional and organic farming systems. *J. Food Agric. Environ.* 3&4: 260-268.

Kunin V., J. Raes, J.K. Harris, J.R. Spear, J.J. Walker, N. Ivanova, C. Mering, B.M. Bebout, N.R. Pace, P. Bork, P. Hugenholtz. 2008. Millimeter-scale genetic gradients and

community-level molecular convergence in a hypersaline microbial mat. *Mol. Syst. Biol.* 4:198.

Legatzki A., M. Ortiz, J.W. Neilson, S. Dominguez, G.L. Andersen, R.S. Toomey, B.M. Pryor, L.S. I. Pierson y R.M. Maier. 2011. Bacterial and archaeal community structure of two adjacent calcite speleothems in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *Geomicrobiol. J.* 28: 99-117.

Ley R.E., J.K. Harris, J. Wilcox, J. R. Spear, S. R. Miller, B.M. Debout, J.A. Maresca, D.A. Bryant, M.L. Sogin y N. Pace. 2006. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3685-3695.

López-Cortés A. 1998. Ecología y biotecnología de las comunidades microbianas. *Ciencia y Desarrollo.* 138:11-17.

Lovley D.R., D.F. Dwyer y M.J. Klug. 1982. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1373-1379.

Madigan M.T., J.M. Martinko, J. Parker. 2004. Brock: *Biología de los microorganismos.* Pearson Prentice Hall. 10 edición. Southern Illinois University Carbondale, pp. 1011.

Magurran, A.E. 1995. *Ecological diversity and its measurement.* Princeton University, Princeton, N.J.

Mirdamadi S., A. Rajabi, P. Khalizadeh, D. Norozian, A. Akbarzadeh y F.A. Mohseni. 2005. Isolation of bacteria able to metabolize high concentrations of formaldehyde. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1299- 1301.

Moezeelar, R., S.M. Bijvank y L.J. Stal. 1996. Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1752-1758.

Muyzer G., E.C. De Waal y A.G. Uitterlinden. 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. y K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *A. vanLeeuw.* 73:127-141.

Myers R.M., T. Maniatis, L.S. Lerman.1987.Detection and localization of single base changes by denaturing gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155: 501-527.

Naeem S. 1998. Species redundancy and ecosystem reliability. *Conserv. Biol.* 12: 39-45.

Nübel, U., F. García-Pichel, M. Kühl y G. Muyzer 1999. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats.*Appl. Environ. Microbiol.* 65:422-430.

Nübel U., F. Garcia-Pichel, E. Clavero y G. Muyzer. 2000. Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ. Microbiol.* 2: 217-226.

Oren A., P. Gurevich, M. Azachi y Y. Henis. 1992. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation.*3: 387- 398.

Pandu K. y S. Joseph. 2012. Comparisons and limitations of biohydrogen production processes: a review.*IJAET.*Vol.2, Issue 1 pp. 342-356.

Polz M.F. y C.M. Cavanaugh 1997.A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on in vitro transcription of 16S rRNA.*Appl. Environ Microbiol.* 63:1028-1033

Rosas I., A. Cravioto, E. Ezcurra. 2003. *Microbiología Ambiental.* Editorial Programe S. A. México. Págs. 111-118

Ricklefs, R.E. y G.L. Miller. 2000. *Ecology.* W.H. Freeman and Company. New York, N.Y.

Schmidt O., H.L. Drake y M.A. Horn. 2010. Hitherto unknown [FeFe]-hydrogenase gene diversity in anaerobes and anoxic enrichments front a moderately acidic fen. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2027-2031.

Schmitz O., G. Boison, R. Hilscher, B. Hundeshagen, W. Zimmer, F. Lottspeich y H. Bothe. 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur J. Biochem.* 233: 266-276.

Schütz K., T. Happe, O. Troshina, P. Lindblad, E. Leitaó, P. Oliveira, P. Tamagnini. 2003. Cyanobacterial H₂ production- a comparative analysis. *Planta.* 218: 350-359.

Shumilin E., M. Grajeda-Muñoz, N. Silverberg y D. Sapozhnikov. 2002. Observations on trace element hypersaline geochemistry in surficial deposits of evaporation ponds of Exportadora de Sal, Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *Mar. Chem.* 79: 133-153.

Singh S. K., N. Ramaiah. 2011. Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of bacterial communities composition in Arabian Sea. *J. Environ. Biol.* 32: 339-346.

Skyring G.W., R.M. Lynch, G.D. Smith. 1988. Acetylene reduction and hydrogen metabolism by a cyanobacterial sulfate. Reducing bacterial mat ecosystem. *Geomicrobiol. J.* 6:1, 25-31. Spear 2003

Spear J. R., R.E. Ley, A.B. Berger y N.R. Pace. 2003. Complexity in natural microbial ecosystems: the Guerrero Negro experience. *Biol Bull.* 204: 168-173.

Stackebrandt E. y B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.

Staley, J.T. 1997. Biodiversity: are microbial species threatened? *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:340-345.

Tamagnini P., O. Troshina, F. Oxelfelt, R. Salema y P. Lindblad. 1997. Hydrogenases in *Nostoc* sp. Strain PCC 73102, a Strain lacking a bidirectional enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1801-1807.

Tamagnini P., J.L. Costa, L. Almeida, M.J. Oliveira, R. Salema y P. Lindblad. 2000. Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Curr. Microbiol.* 40: 356-361.

Tamagnini P., E. Leitão, P. Oliveira, D. Ferreira, F. Pinto, D.J. Harris, T. Heidorn y P. Lindblad.2007. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. FEMS Microbiol.Rev. 31: 692-720.

Tamez P. 2009. Diversidad filogenética de arqueas halófilas extremas cultivables de Exportadora de Sal, S. A., Guerrero Negro. Tesis de Maestría del CIBNOR.

Xing D., N. Ren y B.E. Rittmann.2008. Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in a acidophilic ethanol- H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. Appl. Environ, Microbiol. 74: 1232-1239.

Yanling Y., L. Zhenmei, M. Hang y C. Jun. 2008. Dynamic changes of microbial community diversity in a photohydrogen producing reactor monitored by PCR-DGGE. J. Environ. Sci. 20: 1118-1125.

Zinder S.H. 1993. Physiological ecology of methanogens pp. 128-206 in Methanogenesis: Ecology, physiology, biochemistry and genetics. J. G. Ferry, Ed Chapman and Hall, New York.

11. ANEXOS

11.1 Selección de sitios de estudio

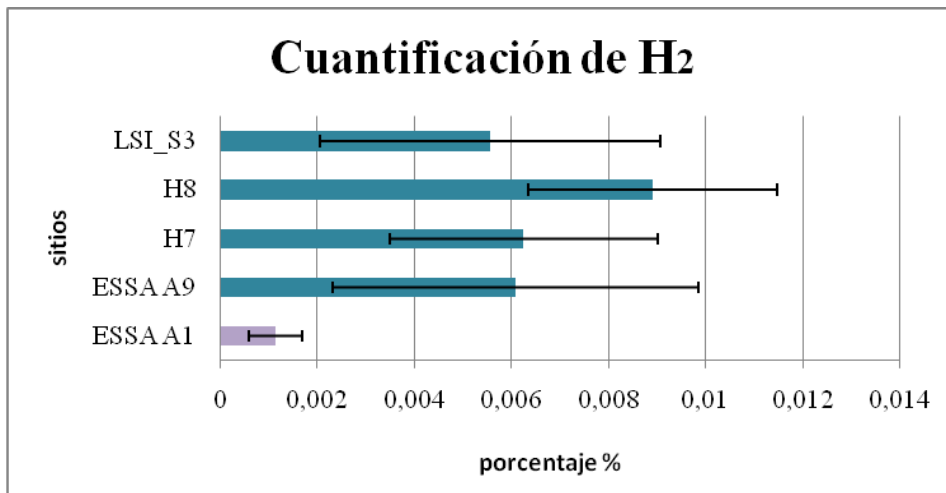


Fig.13. Resultados de la medición de H₂ por RGA con el detector de óxido de mercurio acoplado a un GC.

De acuerdo al Análisis de varianza de un factor, con $p= 0.05$, nos dice que si hay diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones registradas, por otra parte se realizó la prueba de Turkey que nos dice que dicha diferencia es entre el valor de ESSA_A1 y H8. Sin embargo entre las demás localidades podemos apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas por lo que el otro razonamiento de selección fue que existirá columna de agua en el sitio para poder realizar las mediciones de los parámetros fisicoquímicos, por ello para este estudio se seleccionó a LSI_S3.



11.2 Propiedades de ADN extraído

Tabla XVI. Propiedades de pureza y concentración del ADN extraído en este trabajo.

| Muestra | [ADN] (ng/μl) | 260/280 | 260/230 |
|--------------------|----------------------|----------------|----------------|
| 1_ESSA_A1 | 55.6 | 1.84 | 0.55 |
| 2_ESSA_A1 | 19.4 | 1.84 | 0.07 |
| 3_ESSA_A1 | 55.9 | 1.88 | 1.45 |
| L2-A1-glu-i | 87.1 | 1.9 | 1.24 |
| L2-A1-glu-ii | 72.7 | 1.92 | 0.47 |
| L2-A1-glu-iii | 80.5 | 1.94 | 1.7 |
| L2-A1-intacto-i | 91.1 | 1.91 | 2.11 |
| L2-A1-intacto-ii | 79.4 | 1.93 | 2.05 |
| L2-A1-intacto-iii | 62.2 | 1.94 | 2 |
| L2-A1-estéril | 10.7 | 1.64 | 0.31 |
| L2-A1-formaldehído | 2.4 | 1.37 | 0.3 |
| 1_LSI_S3 | 5.5 | 1.58 | 0.12 |
| 2_LSI_S3 | 7.1 | 1.48 | 0.23 |
| 3_LSI_S3 | 6.2 | 1.67 | 0.17 |
| L2-S3-glu-i | 12.1 | 2.05 | 0.38 |
| L2-S3-glu-ii | 14.3 | 1.98 | 0.97 |
| L2-S3-glu-iii | 15.2 | 1.89 | 0.82 |
| L2-S3-intacto-i | 11.4 | 2.12 | 0.83 |
| L2-S3-intacto-ii | 11.8 | 2 | 0.66 |
| L2-S3-intacto-iii | 9.9 | 1.85 | 1.2 |
| L2-S3-estéril | 5.8 | 1.59 | 0.43 |
| L2-S3-formaldehído | 4.2 | 1.41 | 0.22 |